



HAL
open science

**Développement d'un modèle de chondropathie
expérimentale chez le rat : l'arthrite induite au
zymosan ; évaluation des propriétés anti-inflammatoires
et chondroprotectrices d'antagonistes du récepteur au
leucotriène B4**

Pascale Gegout

► **To cite this version:**

Pascale Gegout. Développement d'un modèle de chondropathie expérimentale chez le rat : l'arthrite induite au zymosan ; évaluation des propriétés anti-inflammatoires et chondroprotectrices d'antagonistes du récepteur au leucotriène B4. Biochimie [q-bio.BM]. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1995. Français. NNT : 1995NAN10464 . tel-01748032

HAL Id: tel-01748032

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748032v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

1995

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTE"

THESE

présentée et soutenue publiquement
le 25 Janvier 1995
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY I
Mention Biochimie-Pharmacologie

par

Pascale GEGOUT

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies
Pharmacologie : Métabolisme des Médicaments et Pharmacologie Clinique



Sujet :

**Développement d'un modèle de chondropathie expérimentale chez le rat :
l'arthrite induite au zymosan. Evaluation des propriétés anti-
inflammatoires et chondroprotectrices d'antagonistes du récepteur au
leucotriène B4**



104 030046 9

MEMBRES DU JURY

<i>Président</i>	P. NETTER	Professeur (Nancy)
<i>Rapporteurs</i>	JP. GIROUD B. KERDELHUE	Professeur (Cochin, Paris) Directeur de Recherche (Jouy en Josas)
<i>Juges</i>	B. TERLAIN N. DEREU P GILLET	Professeur (Nancy) Docteur (Département Chimie, Rhône Poulenc Rorer) Docteur (Nancy)

A Monsieur le Professeur P. NETTER,
Professeur de Pharmacologie à la Faculté de Médecine de Nancy,

Il nous a fait un grand honneur en présidant cette thèse et nous l'en remercions. Par son expérience et ses conseils judicieux, il nous a guidé dans la réalisation de nos travaux. Le dynamisme et l'énergie qu'il met en œuvre pour diriger son unité de recherche sont dignes d'admiration et, nous ont notamment permis des collaborations scientifiques déterminantes pour la réalisation de cette thèse. Nous le remercions de sa confiance et nous tenons à lui exprimer notre respectueuse considération.

A Monsieur le Professeur B. TERLAIN,
Professeur Associé de Pharmacologie à la Faculté de Médecine de Nancy,

Il nous a inspiré le sujet de cette thèse et nous a guidé tout au long de sa réalisation avec un enthousiasme peu commun. Sa passion pour la recherche, sa curiosité débordante et ses nombreuses connaissances scientifiques suscitent chaque jour notre admiration. Nous le remercions de son soutien total dans les moments difficiles, de ses encouragements sans relâche et de sa totale disponibilité. Nous avons pu également bénéficier de la richesse de ses qualités humaines qui forcent notre respect. Nous lui exprimons notre sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur J.P. GIROUD,
Professeur de Pharmacologie à la faculté de Médecine de Cochin Port-Royal,

Il nous a fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Nous le remercions de l'intérêt qu'il a porté à cet ouvrage et nous lui exprimons notre sincère reconnaissance et notre profond respect.

A Monsieur le Docteur B. KERDELHUE
Directeur de Recherche au CNRS

Il nous a fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Nous sommes très honorés de pouvoir participer à ses travaux et espérons qu'ils seront à l'origine d'une collaboration scientifique enrichissante. Qu'il trouve ici le témoignage de notre respect et de notre reconnaissance.

A Monsieur le Docteur N. DEREU

Directeur du département Chimie de Rhône Poulenc Rorer.

Nous le remercions pour la spontanéité avec laquelle il a accepté de juger cette thèse. Il nous a permis de réaliser ce travail en nous fournissant les antagonistes au récepteur de leucotriène B4 et nous lui en sommes reconnaissant. Nous l'assurons de notre totale gratitude.

A Monsieur le Docteur P. GILLET

Maître de Conférences, Praticien Hospitalier à la Faculté de Médecine de Nancy.

Il a guidé nos premiers pas dans la recherche. Ses encouragements constants, son soutien moral et ses judicieux conseils furent précieux tout au long de ce travail. Nous avons pu bénéficier de sa compétence clinique de Rhumatologue, de son expérience enrichissante et de sa grande disponibilité. Nous le remercions d'avoir bien voulu juger ce travail. Qu'il trouve ici la marque de notre reconnaissance et de notre respect.

Nous remercions Monsieur le Professeur R-J. ROYER de nous avoir accueillis dans son laboratoire. Nous remercions également Monsieur le Professeur J. FLOQUET qui a réalisé les nombreux examens histologiques que nous lui avons confiés et qui nous fait l'honneur de poursuivre cette collaboration.

Nous remercions le département Recherche et Développement du laboratoire RHÔNE POULENC RORER qui a permis la réalisation de ce travail.

Nous remercions Monsieur le Professeur J.P. NICOLAS de nous avoir permis l'accès à son laboratoire pour la réalisation des études biochimiques nécessitant l'utilisation d'isotopes, ainsi que Monsieur Gilles DEJARDIN et Elisabeth PAYAN pour leur précieuse collaboration lors de la mise au point de la technique.

Nous remercions Monsieur le Professeur C. BURLET de nous avoir permis d'exercer l'enseignement universitaire dans son service de biologie cellulaire.

Nous remercions nos collègues et amis du Laboratoire de Pharmacologie, les Docteurs Jean-yves JOUZEAU et Denis CHEVRIER avec qui nous avons eu le grand plaisir de partager de longues heures de travail depuis le début de notre thèse. Nous remercions également les doctorants Corinne GUNGAMP et Lionel PHILIPPE ainsi que Meriem TIBARI pour leur collaboration quotidienne. Une pensée amicale pour Michel THIERY qui s'occupe avec soin de nos animaux durant nos travaux.

Nous tenons également à remercier l'ensemble du personnel du Laboratoire de Pharmacologie pour sa collaboration quotidienne, et plus particulièrement les Docteurs Françoise LAPICQUE et Philippe TRÉCHOT.

A mes parents,

Avec toute mon affection reconnaissante, ils ont toujours été présents tout au long de mes études et sans eux, cette thèse n'aurait pas vu le jour. Qu'ils trouvent ici la marque de ma gratitude et de toute ma tendresse.

A Jean-Charles, avec tout mon Amour.

A mon frère Stéphane et à Lydie, avec toute mon affection

A toute ma famille,

A tous mes amis.

Abréviations

5-LO : 5-lipoxygénase

35 S : soufre 35

α 2M : alpha-2 macroglobuline

α -CPI : a-cystéine protéinase

AA : acide arachidonique

AH : acide hyaluronique

AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

BHE : barrière hémato-encéphalique

C6S et C4S : chondroïtine 6 sulfate et chondroïtine 4 sulfate

CGMP : cartilage matrix glycoprotein

CII : collagène de type II

CIX : collagène de type IX

CMP : cartilage matrix protein

COX : cyclooxygénase

CS : chondroïtine sulfate

CS/PG : protéoglycanes à chondroïtine sulfate

CVI : collagène de type VI

CX : collagène de type X

CXI : collagène de type XI

DS : dermatane sulfate

DS/PG : protéoglycanes à dermatane sulfate

EGF : epidermal growth factor

FGF : fibroblast growth factor

G-CSF : granulocyte colony stimulating factor

GAG : glycosaminoglycane

GM-CSF : granulocyte macrophage colony stimulating factor

HETE : acide hydroxy-eicosatétraénoïque

HS : héparane sulfate

HS/PG : protéoglycanes à héparane sulfate.

ia : intra-articulaire

IFN- γ : interféron - γ

IGF: insulin-like growth factor

Ig : immunoglobuline

IL-1 : interleukine 1

IL-1 RA : antagoniste du récepteur de l'IL-1

IL-3 : interleukine 3

IL-4 : interleukine 4

IL-5 : interleukine 5
IL-6 : interleukine 6
IL-8 : interleukine 8
IL-13 : interleukine 13
ip : intrapéritonéale
iv : intraveineux
kDa : kilodalton
KS : kératane sulfate
KS/PG : protéoglycanes à kératane sulfate
LIF : leukemia inhibitory factor
LP : protéine de liaison
LPS : lipopolysaccharides
LTB4 : leucotriène B4
LTC4 : leucotriène C4
LTD4 : leucotriène D4
LTE4 : leucotriène E4
LTF4 : leucotriène F4
LTs : leucotriènes
LXA, LXB : lipoxine A, lipoxine B
M-CSF : macrophage colony stimulating factor
MIA : mono-iodoacétate
MMPs : métalloprotéases
NO : monoxyde d'azote
PAI : activateur du plasminogène
PAF : platelet activating factor
PLA2 : phospholipase A2
PLC : phospholipase C
PDGF : platelet derived growth factor
PG : protéoglycanes
PGE2: prostaglandines E2
PGs : prostaglandines
PM : poids moléculaire
po : per os
TGF- β : transforming growth factor- β
TIMP : inhibiteur tissulaire des métalloprotéases
TNF- α : tumor necrosis factor α
TX : thromboxane



INTRODUCTION	15
CHAPITRE I : LE CARTILAGE ARTICULAIRE	19
I.1 GENERALITES	19
I.2 LES CHONDROCYTES	22
I.2.1 Le chondron	22
I.2.2 Morphologie des chondrocytes	22
I.2.3 Division et renouvellement des chondrocytes	23
I.2.4 Métabolisme des chondrocytes	24
I.2.5 Nutrition	25
I.3 ETUDE DU CARTILAGE PATELLAIRE CHEZ LE RONGEUR	25
I.3.1 Pourquoi la rotule ?	26
I.3.2 La rotule	27
I.3.3 La rotule supérieure	28
I.4 LA MATRICE EXTRACELLULAIRE	29
I.4.1 Les protéoglycanes	30
<i>I.4.1.1 Définition et nomenclature des protéoglycanes</i>	30
<i>I.4.1.2 Les glycosaminoglycanes</i>	31
<i>I.4.1.3 L'agrécan</i>	32
a) Structure de la protéine porteuse ("core protein")	33
b) Domaine G1	33
c) Domaine interglobulaire E1 (ou IGD)	34
d) Domaine G2	34
e) Région riche en Kérotane Sulfate	35
f) Région riche en Chondroïtine Sulfate	35
g) Domaine G3	35
<i>I.4.1.4 Les petits protéoglycanes libres</i>	36
a) Les protéoglycanes à dermatanes sulfate (DS/PG)	36
b) Les protéoglycanes à kérotanes sulfates	39
c) Les protéoglycanes à héparanes sulfates	39
d) Les protéoglycanes à chondroïtines sulfates	40
<i>I.4.1.5 Rôle d'hydratation des protéoglycanes</i>	40
I.4.2 Les collagènes	41
<i>I.4.2.1 Le collagène de type II</i>	43
<i>I.4.2.2 Les collagènes mineurs</i>	45
a) Le collagène de type XI	45
b) Le collagène de type IX	46
c) Le collagène de type VI	47
d) Le collagène de type X	47
<i>I.4.2.3 Biosynthèse du collagène</i>	48

1.4.2.4	Dégradation du collagène.....	50
I.4.3	Les glycoprotéines.....	50
1.4.3.1	La protéine de liaison "link protein".....	50
1.4.3.2	Chondronectine.....	52
1.4.3.3	La fibronectine.....	52
1.4.3.4	CGMP "Cartilage Matrix GlycoProtein".....	53
1.4.3.5	Autres glycoprotéines.....	53
a)	CMP "Cartilage Matrix Protein".....	53
b)	Trombospondine.....	54
c)	Anchorine CII.....	54
d)	Protéine S100.....	54
e)	Facteur de croissance du cartilage "Cartilage Growth Factor".....	54
f)	Inhibiteur de l'angiogénèse.....	55
g)	Facteurs anti-invasifs.....	55
h)	Protéine de 69kDa.....	55
i)	Protéine de 59kDa.....	55
j)	Protéine de 54kDa.....	56
k)	Protéine de 36kDa.....	56
l)	Chondrocalcine.....	56
m)	Molécules de la surface membranaire.....	56
n)	Protéines de structure.....	56
1.4.3.6	Perspectives.....	57
I.4.4	L'acide hyaluronique.....	57
1.4.4.1	Structure de l'Acide Hyaluronique (AH).....	57
1.4.4.2	Rôles de l'acide hyaluronique.....	58
I.5	SCHEMA GENERAL DE L'ORGANISATION DU CARTILAGE ARTICULAIRE.....	60
	CHAPITRE II : VARIATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES.....	62
II.1	LES CYTOKINES.....	63
II.1.1	L'interleukine 1.....	64
II.1.1.1	Inhibition de la synthèse des protéoglycanes par l'IL-1.....	67
II.1.1.2	Stimulation de la dégradation des PG par l'IL-1.....	67
II.1.1.3	Les récepteurs à l'IL-1.....	68
II.1.1.4	Effets biologiques de l'IL-1.....	69
II.1.1.5	Régulation de la transcription des protéases par l'IL-1.....	70
II.1.2	L'interleukine 6 (IL-6).....	71
II.1.3	Le Tumor necrosis factor α (TNF- α).....	72
II.1.4	L'IL-1 RA.....	73
II.1.5	IL-3, IL-4, IL-5.....	73
II.1.6	LIF : Leukemia Inhibitory Factor.....	73

II.2 LES FACTEURS DE CROISSANCE.....	74
II.2.1 PDGF : Platelet derived growth factor	74
II.2.2 TGF- β : Transforming Growth Factor- β	74
II.2.3 EGF : Epidermal Growth Factor.....	75
II.2.4 FGF : Fibroblast Growth Factor	75
II.2.5 IGF : Insulin-like Growth Factor.....	76
II.2.5.1 IGF-I.....	76
II.2.5.2 IGF-II.....	76
II.2.6 IFN γ : Interféron gamma.....	76
II.3 LES FACTEURS DE CROISSANCE HÉMATOPOÏÉTIQUES.....	77
II.3.1 M-CSF : Macrophage colony stimulating factor.....	77
II.3.2 GM-CSF : Granulocyte macrophage colony stimulating factor.....	77
II.3.3 G-CSF : Granulocyte colony stimulating factor	77
II.4 LES PROTÉASES	78
II.4.1 Les metalloproteases	78
II.4.1.1 Caractères généraux des MMPs.....	78
II.4.1.2 La collagénase.....	79
II.4.1.3 Les stromélysines.....	79
II.4.1.4 Les gélatinases.....	80
a) La 72kDa gélatinase	80
b) La 92kDa Gelatinase	81
II.4.1.5 L'élastase des macrophages	81
II.4.2 Les cystéinyl protéinases	82
II.4.3 Les sérine protéinases.....	82
II.4.3.1 L'activateur du plasminogène	82
II.4.3.2 La plasmine.....	83
II.4.3.3 La kallikréine plasmatique.....	84
II.4.3.4 L'élastase leucocytaire.....	84
II.4.3.5 La cathepsine G.....	84
II.4.3.6 La protéinase mastocytaire.....	84
II.4.3.7 La sérine estérase des lymphocytes.....	85
II.4.4 Les aspartyl- protéinases.....	85
II.4.5 Les inhibiteurs enzymatiques endogènes.....	87
II.4.5.1 L'alpha-2 macroglobuline.....	87
II.4.5.2 Les inhibiteurs spécifiques des métalloprotéases : TIMP.....	87
a) TIMP-1.....	88
b) TIMP-2	88
c) TIMP-3.....	88
II.4.5.3 Les serpines.....	88

II.4.5.4 Les inhibiteurs des cystéine protéases	89
II.4.6 Mécanisme de dégradation du cartilage	89
II.5 LES RADICAUX LIBRES.....	91
II.6 LE MONOXYDE D'AZOTE : NO	91
II.6.1 Bioynthèse du NO	92
II.5.2 Fonctions biologiques.....	93
II.6.3 NO et arthrite	94
II.7 RETINOÏDES ET CHONDROCYTES	95
II.8 REGULATION HORMONALE DU CARTILAGE.....	96
CHAPITRE III : TECHNIQUES D'ETUDE DU CARTILAGE	98
III.1 ETUDES MORPHOLOGIQUES DU CARTILAGE	98
III.1.1 Radiologie	98
III.1.2 Scanner	98
III.1.3 IRM	99
III.1.4 Histologie.....	99
III.1.5 Densitométrie optique	99
III.1.6 Autoradiographie.....	100
III.2 ETUDE BIOCHIMIQUE DU CARTILAGE.....	100
III.2.1 Les marqueurs biochimiques du cartilage.....	100
III.2.1.1 Marqueurs liés au collagène	100
III.2.1.2 Marqueurs liés aux protéoglycanes.....	101
III.2.1.3 Marqueurs liés aux protéines de la matrice	101
III.2.1.4 Marqueurs reliés aux chondrocytes et à leurs protéines membranaires	102
III.2.1.5 Marqueurs anaboliques de la progression de la maladie dans le cartilage articulaire.....	103
III.2.2 Méthodes de dosage des protéoglycanes	103
III.2.2.1 Sources de protéoglycanes et conditions d'extraction	103
III.2.2.2 Les méthodes colorimétriques.....	104
III.2.2.3 Marquage isotopique.....	104
III.2.2.4 Electrophorèse.....	105
III.2.2.5 Chromatographie.....	105
III.3 METABOLISME DES PROTEOGLYCANES.....	106
III.3.1 Anabolisme des protéoglycanes.....	106
III.3.2 Catabolisme des protéoglycanes	107
CHAPITRE IV : EICOSANOÏDES ET INFLAMMATION	110
IV.1 LES LEUCOTRIÈNES	110
IV.1.1 Biosynthèse	110
IV.1.2 Fonctions biologiques des leucotriènes.....	112
IV.1.2.1 Les cystéinyl-leucotriènes	112
IV.1.2.2 Le Leucotriène B4	113

IV.1.3 Régulation de la voie de la 5-lipoxygénase	114
IV.1.3.1 La 5-lipoxygénase	115
IV.1.3.2 Inhibition de la 5-lipoxygénase	115
a) Les inhibiteurs redox	116
b) Les inhibiteurs qui se lient au fer	116
c) Les inhibiteurs non redox	117
d) Conclusion et perspectives.....	117
IV.1.3.3 Les antagonistes des récepteurs aux LTB ₄	117
IV.1.3.4 Conclusion	118
IV.1.4 Les lipoxines	119
IV.2 LES PROSTAGLANDINES	119
IV.2.1 Historique.....	119
IV.2.2 Structure des prostaglandines.....	120
IV.2.3 Biosynthèse des prostaglandines.....	120
IV.2.4 Rôles biologiques des prostaglandines.....	122
IV.2.4.1 Médiation de la douleur aiguë et de l'inflammation.....	122
IV.2.4.2 Action pyrogène des prostaglandines	123
IV.2.4.3 Effets des prostaglandines sur le cartilage	124
IV.2.5 Les cyclooxygénases.....	125
IV.2.5.1 Inhibition des Cyclooxygénases	126
a) Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	126
b) AINS et métabolisme du cartilage.....	127
CHAPITRE V : ZYMOCHAN ET INFLAMMATION	130
V.I INTRODUCTION.....	130
V.2 ZYMOCHAN ET INFLAMMATION AIGUË.....	131
V.2.1 Inflammation aiguë in vitro	131
V.2.2 Modèles d'inflammation in vivo.....	132
V.2.2.1 Pleurésie et péritonite induite au zymosan.....	132
V.2.2.2 Inflammation de la poche à air par le zymosan	132
V.2.2.3 Œdème de la patte au zymosan.....	133
V.2.2.4 Autres modèles	134
V.2.3 L'arthrite au zymosan chez le rongeur.....	134
CHAPITRE VI : MATERIEL ET METHODES	139
VI.1 LA BIOTELEMÉTRIE.....	139
VI.1.1 Intérêt de la biotélémetrie.....	139
VI.1.2 Principes généraux	140
VI.1.2.1 L'émetteur.....	140
VI.1.2.2 Les récepteurs et la matrice de consolidation	142
VI.1.2.2 Le logiciel	142

VI.1.2.3 Organisation générale du système	143
VI.1.2.4 Paramètres étudiés	144
VI.1.2.5 Modalités pratiques.....	144
VI.1.2.6 Expression et exploitation des résultats.....	145
a) Étude de la température.....	146
b) Étude de l'activité locomotrice.....	146
VI.1.3 Signification physiopathologique : exemples d'application.....	147
VI.1.4 Conclusion.....	150
VI.2 ETUDE DU METABOLISME DU CARTILAGE ARTICULAIRE.....	151
VI.2.1 Etude de l'anabolisme du cartilage.....	151
VI.2.1.1 Matériel et méthodes.....	152
VI.2.1.2 Expression des résultats.....	152
VI.2.2 Etude du catabolisme du cartilage	153
VI.2.2.1 Matériel et méthodes.....	153
VI.2.2.2 Expression des résultats.....	153
CHAPITRE VII : RESULTATS.....	155
VII.1 L'ARTHRITE AU ZYMOSAN CHEZ LE RAT : ÉTUDES PRÉLIMINAIRES	155
VII.1.1 étude des effets de la dose de zymosan.....	155
VII.1.1.1 Effets de la dose de zymosan sur la tuméfaction articulaire.....	156
VII.1.1.2 Effets de la dose de zymosan sur l'activité locomotrice.....	157
VII.1.1.3 Effets de la dose de zymosan sur la réponse fébrile	158
VII.1.1.4 Conclusion	159
VII.1.2 L'acide hyaluronique au cours de l'arthrite au zymosan.....	159
VII.1.2.1 Introduction.....	159
VII.1.2.2 AH : Marqueur de la sévérité de l'arthrite au zymosan ?.....	159
VII.1.2.3 discussion.....	160
VII.2 L'ARTHRITE AU ZYMOSAN CHEZ LE RAT : CARACTÉRISTIQUES	162
VII.2.1 Introduction	162
VII.2.2 Caractérisation de l'arthrite au zymosan chez le rat : effets sur l'inflammation articulaire et le métabolisme du cartilage.....	163
VII.3 L'ARTHRITE AU ZYMOSAN : EFFETS DES ANTI-INFLAMMATOIRES.....	171
VII.3.1 Introduction	171
VII.3.2 Effets des anti-inflammatoires dans l'arthrite au zymosan	172
VII.4 EFFETS DES ANTAGONISTES AUX RECEPTEURS DU LTB4 : RP 66364 ET RP 69698.....	182
VII.4.1 Introduction	182
VII.4.2 Administration et posologie.....	185
VII.4.3 Effets des antagonistes de LTB4 sur l'œdème du genou	185
VII.4.4 Effets des antagonistes du LTB4 sur l'hypomobilité induite par le zymosan.....	186

VII.4.5 Effets des antagonistes de LTB4 sur la réponse fébrile induite par le zymosan	187
VII.4.6 Effets des antagonistes de LTB4 sur l'inhibition de l'anabolisme induite par le zymosan.....	188
VII.4.7 Effets des antagonistes de LTB4 sur la perte de protéoglycanes du cartilage induite par le zymosan.....	189
VII.4.8 Effets des antagonistes de LTB4 sur le score histologique dans l'arthrite au zymosan.	190
VII.4.8 Discussion.....	191
VII.5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	192
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	195
BIBLIOGRAPHIE.....	213

INTRODUCTION



INTRODUCTION

Les maladies articulaires, à la fois chroniques et évolutives, sont du fait de leur incidence élevée, une des principales sources de consultation médicale, de consommation médicamenteuse et d'invalidité. Il est bien établi que le cartilage est la première structure atteinte lors de nombreuses affections rhumatologiques, notamment au cours des rhumatismes inflammatoires (arthrite) ou dégénératifs (arthrose). C'est pourquoi le cartilage articulaire, composé de chondrocytes inclus dans une matrice extracellulaire riche en protéoglycanes et en collagènes, constitue une des principales cibles de recherche pour la prochaine décennie.

Les médicaments des rhumatismes inflammatoires et principalement de la polyarthrite rhumatoïde sont essentiellement de deux types : les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) classiques destinés à diminuer les processus inflammatoires aigus et les symptômes associés (douleur en particulier) et les anti-rhumatismaux d'action lente (traitement de fond) visant le plus souvent à moduler le processus dysimmunitaire. On sait cependant que ces traitements classiques n'agissent que de façon symptomatique et ne peuvent enrayer que de façon très incomplète les modifications importantes, parfois irréversibles du cartilage observées au cours de l'arthrite chronique.

Par ailleurs, la plupart des AINS actuellement sur le marché ont été sélectionnés au cours de la phase pharmacologique initiale, à partir de modèles d'inflammation très classiques comme l'œdème à la carragénine ou l'arthrite à l'adjuvant chez le rat. La clinique a validé cette stratégie en montrant qu'effectivement les produits ainsi sélectionnés diminuaient la réaction inflammatoire. Malheureusement, cette démarche conduit à la sélection de molécules anti-inflammatoires de même type qui présentent un certain nombre de limites (effets secondaires, traitement uniquement symptomatique du processus inflammatoire articulaire...). Il convient donc de renouveler cette approche en choisissant de nouvelles cibles pharmacologiques, en sélectionnant à cet effet des produits puissants, plus ou moins sélectifs, et actifs tant *in vitro* qu'*in vivo*.

La validation de produits, sélectionnés pour leur activité sur une nouvelle cible dans les études préalablement réalisées *in vitro*, nécessite au moins deux types de modèles : tout d'abord, des modèles permettant de vérifier l'impact des produits sur la cible *in vivo*, et ultérieurement, des modèles *in vivo* chez l'animal capables

de confirmer le bien fondé de cette cible à améliorer ou à éviter les effets du processus pathologique retenu. Dans ces conditions, nous avons donc cherché à mettre au point un modèle expérimental de ce dernier type, mimant les conditions physiopathologiques qui entraînent une atteinte du cartilage, et capable de tester à la fois les potentialités anti-inflammatoires et chondroprotectrices de molécules originales. Cette approche validée par l'utilisation de produits de référence, devra permettre de trouver d'une part, une nouvelle cible pharmacologique et d'autre part, des produits originaux sélectionnés vis à vis de cette cible. Tout ceci pourrait concourir à une meilleure compréhension des phénomènes physiopathologiques et peut-être à la sélection de nouveaux marqueurs. La recherche de nouvelles cibles pharmacologiques nécessite également la mise au point de méthodes d'évaluations pertinentes et reproductibles pour pouvoir étudier la réaction inflammatoire ainsi que les modifications quantitatives et qualitatives des constituants du cartilage.

A cet effet, nous nous sommes adressés à un polysaccharide extrait des parois cellulaires de levures, le zymosan qui possède des propriétés phlogogènes intéressantes. Ses effets dans l'inflammation aiguë sont très étudiés, cependant ses capacités pro-inflammatoires n'ont été que peu exploitées dans les modèles expérimentaux d'arthrite et le plus souvent les études ont été réalisées chez la souris sans être spécialement consacrées à la mesure de l'atteinte fonctionnelle et cartilagineuse. Aussi, nous avons cherché à développer un modèle expérimental d'arthrite induite au zymosan chez le rat, en évaluant à la fois les conséquences de l'administration intra-articulaire de zymosan aux niveaux inflammatoire, fonctionnel et dégénératif, du fait notamment de la capacité du zymosan à agir sur des voies physiopathologiques très diverses, liées en partie seulement à l'activation de la cyclo-oxygénase.

Le présent travail rassemble les recherches bibliographiques et expérimentales qui nous ont conduit à l'étude de produits originaux, antagonistes du leucotriène B₄, dans le modèle que nous avons mis au point pour évaluer leurs propriétés chondroprotectrices potentielles. Le travail bibliographique réunit des données récentes sur le cartilage, sa composition et les différents médiateurs inflammatoires qui contribuent à son catabolisme et à son anabolisme. Après avoir passé en revue les techniques d'études permettant l'évaluation de la fonctionnalité du cartilage, nous envisageons plus précisément l'implication des principaux métabolites de l'acide arachidonique (leucotriènes et prostaglandines) et de leurs inhibiteurs dans la réaction inflammatoire articulaire. Enfin, une

revue des données de la littérature concernant les différents types d'inflammation induite par le zymosan est établie.

Les travaux expérimentaux nous ont permis de trouver un modèle original d'arthrite au zymosan chez le rat où les effets de l'inflammation aiguë et subaiguë sont évalués par des paramètres d'inflammation classiques (œdème, score d'inflammation...) et surtout par des abords originaux. En effet, la biotéléométrie, non encore utilisée en pathologie articulaire, nous a permis une approche novatrice du handicap fonctionnel et de la réaction inflammatoire au cours de l'arthrite au zymosan chez le rat. Les investigations biochimiques du cartilage rotulien nous ont également permis de rendre compte de l'anabolisme des protéoglycanes et de l'équilibre entre anabolisme et catabolisme (dosage des protéoglycanes résiduels) du cartilage articulaire.

Sa mise au point étant faite, nous avons pu vérifier dans ce modèle l'impact de produits de référence (indométacine et dexaméthasone) présentant des profils pharmacologiques différents, et susceptibles d'indiquer de nouvelles cibles pharmacologiques potentielles pouvant conduire à une action chondroprotectrice. Cette démarche nous a amené à tester dans ce modèle des produits originaux visant à bloquer certains effets médiés par les leucotriènes B₄, en mimant ainsi une des propriétés de la dexaméthasone. Les résultats de nos travaux expérimentaux évalueront la validité de cette approche et nous renseigneront sur l'utilité d'une telle démarche pour la recherche de molécules à potentialités chondroprotectrices.

CHAPITRE I

LE CARTILAGE ARTICULAIRE

CHAPITRE I

LE CARTILAGE ARTICULAIRE

I.1 GENERALITES

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif hautement spécialisé, de couleur blanche ou jaunâtre, brillant à la lumière, d'aspect homogène à la coupe, d'où son qualificatif de "hyalin". Le cartilage recouvre les extrémités articulaires des os participant aux articulations de type synovial ou diarthrose. Le cartilage hyalin représente d'une part la surface de contact entre deux os et d'autre part, l'interface avec le liquide synovial. Dépourvu de nerfs et de vaisseaux sanguins, il forme une couverture épiphysaire rendant imperceptibles les frottements de deux pièces osseuses articulées.

Il est composé d'un petit nombre de cellules, les chondrocytes (2 à 10% du volume tissulaire), qui synthétisent puis sécrètent autour d'eux une matrice de molécules géantes. Les propriétés chimiques et structurales de ces molécules confèrent au cartilage sa résistance à la traction (capacité de répartir le poids et de ne pas se rompre) et son élasticité (capacité de reprendre sa forme et sa structure initiale après déformation). Le collagène, assemblage moléculaire rigide en forme de fibres, confère à la matrice la résistance à la traction. L'élasticité est due à une famille de molécules remarquables que l'on appelle les protéoglycanes. La matrice extracellulaire renferme de l'eau en quantité importante (70% du poids total) et cette rétention d'eau détermine les propriétés du tissu.

Le cartilage articulaire peut être divisé en quatre zones (*figure 1*) qui sont respectivement de la surface articulaire vers l'os sous-chondral : la zone tangentielle (zone I), la zone moyenne (zone II), la zone profonde (zone III), et la zone calcifiée (zone IV). Ces subdivisions ont pour origine des différences structurales bien définies comme la densité et l'orientation cellulaires, la nature, le contenu et la distribution en protéoglycanes, l'organisation du réseau fibrillaire de collagène, qui chacun varient en fonction de la distance les séparant de la surface articulaire.

La zone I, zone tangentielle (ou superficielle) est la plus exposée aux contraintes. C'est la surface de glissement qui représente 5 à 10% de la hauteur du cartilage. Les cellules y sont deux à trois fois plus nombreuses que dans les autres couches ; généralement isolées, elles apparaissent aplaties et allongées à la

surface articulaire ; en coupe horizontale, elles sont petites et arrondies (10 à 20 μ). Les fibres de collagène sont fines et disposées parallèlement à la surface articulaire. Le contenu en agrécane (protéoglycane principal) y est le plus bas à l'inverse de la décorine (petit protéoglycane) qui s'y trouve à la plus forte concentration, associée à des fibres de collagène.

La zone II, zone moyenne (ou intermédiaire), forme 40 à 45% de la hauteur cartilagineuse. Elle est constituée de cellules arrondies, plus grosses que celle de la zone I et souvent groupées par deux ou trois, entourées d'une matrice abondante. Les fibres enchevêtrées décrivent un réseau non orienté. On rencontre à ce niveau des fibres plus fines, ne présentant pas la périodicité caractéristique du collagène.

La zone III, zone profonde (ou radiale), constitue elle aussi 40 à 45% du cartilage. La quantité de cellules est la plus faible ; les chondrocytes s'y groupent volontiers en amas ("clusters"), constituant souvent des groupes agencés en colonne, verticaux et ressemblant à ceux du cartilage de croissance. La densité cellulaire augmente près de la couche calcifiée (zone IV).

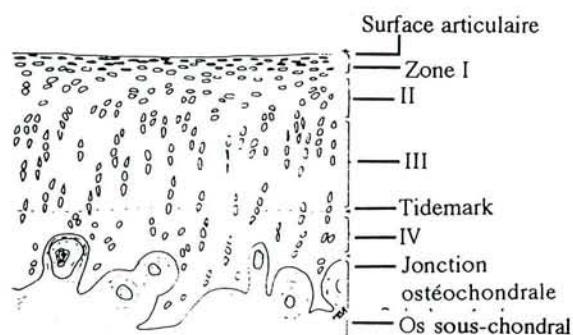
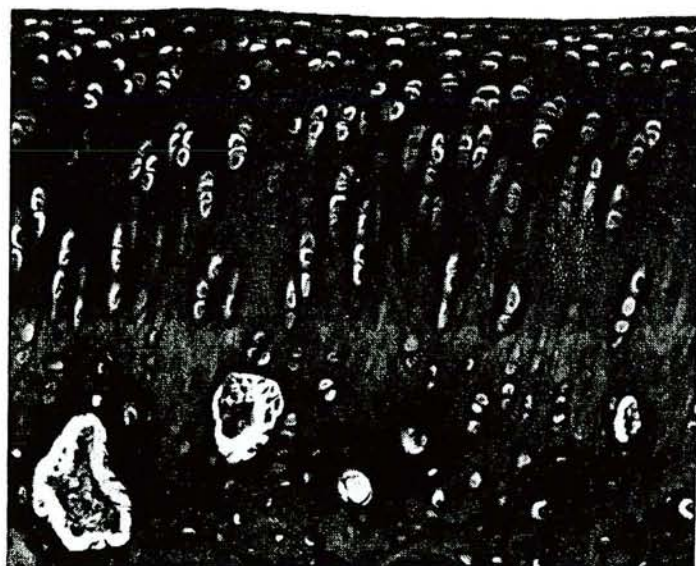


Figure 1 : Organisation générale du cartilage articulaire

La zone IV, zone calcifiée, est adjacente à la zone profonde dont elle est séparée par une ligne de démarcation basophile bien visible en coloration hématoxiline éosine, et baptisée "tidemark" par Fawns et Landell (1953) [Fawns,1953]. Elle résulte d'un mécanisme analogue à celui qui intervient au niveau du cartilage de croissance lors de l'ossification endochondrale. Alors que dans ce cas le cartilage est résorbé et remplacé par de l'os mature, ici il persiste et intervient comme une "zone tampon" entre l'os sous-chondral et le cartilage non calcifié. Cette couche calcifiée peut résister à l'invasion vasculaire par la présence de puissantes

molécules anti-angiogéniques tels les inhibiteurs des métalloprotéinases (TIMP). La couche calcifiée possède des propriétés mécaniques intermédiaires entre celles de l'os et celles du cartilage et offre ainsi la meilleure fixation possible du cartilage à l'os sous-chondral.

Au niveau des condyles fémoraux humains, les 4 zones de cartilage articulaire représentent une épaisseur totale de 2-3mm. Chez le lapin ou le rat, il faut diviser cette valeur par 10 (200-300 μ) [Hunsicker,1992]. La structure du cartilage articulaire est semblable chez tous les mammifères bien que des différences significatives existent dans l'organisation. Elles concernent essentiellement l'organisation anisotrope, la hauteur de zone, la taille cellulaire et la quantité de matrice par cellules. L'organisation du cartilage reflète les forces de tension, de compression et de cisaillement qui s'y exercent.

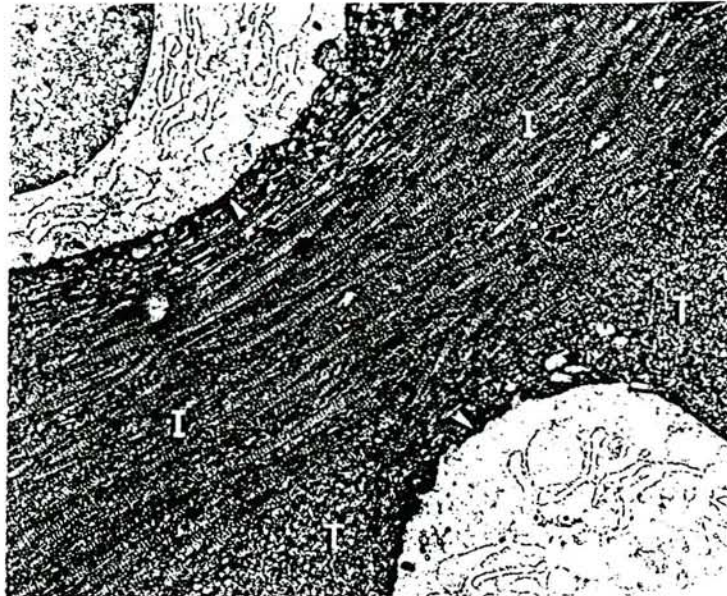


Figure 2 : Compartimentalisation de la matrice extracellulaire dans la zone radiale du cartilage articulaire (flèche : matrice pérircellulaire ; T : matrice territoriale ; I : matrice inter-territoriale) (D'après Hunsicker, 1992)

Dans les zones médianes et profondes du cartilage articulaire (zone II et III), on distingue une compartimentalisation de la matrice extracellulaire avec des régions dites pérircellulaires, territoriales et inter-territoriales (*figure 2*). La matrice pérircellulaire se caractérise par sa richesse en protéoglycanes et en acide hyaluronique et une relative absence de fibres collagènes. La matrice territoriale (ou capsulaire) riche en fibres collagènes qui forme un réseau autour des chondrocytes, entoure la matrice pérircellulaire tandis que la région inter-territoriale représente la matrice la plus éloignée des chondrocytes. La matrice inter-territoriale renferme un grand nombre de fibres de collagène et de

protéoglycanes. Le kératane sulfate, glycosaminoglycane constitutif du cartilage est plus concentré dans la matrice inter-territoriale et augmente avec l'âge alors que le chondroïtine sulfate est plus concentré dans la matrice territoriale et diminue avec l'âge. Des études récentes suggèrent que les chondrocytes exercent leur activité métabolique principalement dans la zone territoriale et que la matrice inter-territoriale est plus inerte [Hunsicker,1992].

I.2 LES CHONDROCYTES

Les chondrocytes du cartilage articulaire sont indispensables à la survie du tissu, comme en témoignent par exemple, les conséquences de leur destruction expérimentale par congélation [Simon,1976]. Cette destruction entraîne une perte rapide et importante des protéoglycanes de la matrice qui persiste quelques mois grâce au maintien de sa trame fibreuse mais finit toujours par se détruire.

I.2.1 LE CHONDRON

Les chondrocytes ou cellules cartilagineuses sont des cellules d'origine mésenchymateuse, enfermées dans des cavités, les chondroplastes. Le chondrocyte est entouré par une fine matrice péricellulaire (ou matrice lacunaire) spécialisée (2 μ d'épaisseur) et distincte de la matrice extracellulaire qui forme les 90% du volume tissulaire. Cet ensemble "chondrocyte-matrice péricellulaire" forme une unité baptisée "le chondron" par Bennighoff en 1920. Le chondron peut être composée de plusieurs chondrocytes. Le concept de chondron a été très discuté depuis puisque, sans pour autant nier l'existence d'un microenvironnement spécialisé autour du chondrocyte, certains auteurs considèrent ce complexe comme une "vésicule pleine d'eau" résistante à la compression et qui protège le chondrocyte lors des charges mécaniques. Toutefois d'après Poole, le chondron serait l'unité fonctionnelle et métabolique responsable de l'homéostasie du cartilage [Poole,1987].

I.2.2 MORPHOLOGIE DES CHONDROCYTES

Les chondrocytes sont sphériques ou ovoïdes et d'un diamètre pouvant atteindre 40 microns. L'étude microscopique des chondrocytes vivants séparés de leur matrice montre qu'ils sont animés de mouvements amiboïdes, changent de forme sans cesse, et émettent des pseudopodes. Observés en microscopie électronique, même lorsqu'ils sont groupés par deux dans une vaste logette, les chondrocytes

apparaissent toujours isolés, entourés d'une atmosphère riche en protéoglycanes et en microfibrilles, séparés de la matrice et les uns des autres par une condensation fibreuse (matrice péricellulaire) délimitant la lacune. La membrane cytoplasmique est généralement très irrégulière, formée de nombreuses microvacuoles, de courtes indentations et de prolongements plus ou moins développés qui pourraient correspondre à un mécanisme de remodelage de la matrice, remodelage uniquement péricellulaire ne dépassant jamais les limites des lacunes périchondrocytaires.

Les chondrocytes jeunes et actifs (zone profonde) qui synthétisent la matrice, possède un noyau central volumineux et sphérique, un réticulum endoplasmique granulaire relativement abondant, un appareil de Golgi bien développé, des mitochondries avec des crêtes indistinctes, des ribosomes libres, des vacuoles glycogéniques et lipidiques et des lysosomes. Au total, les chondrocytes ne possèdent guère de caractères particuliers, en dehors des fins filaments intracytoplasmiques à disposition périnucléaire dont la signification est inconnue. Les centrioles sont très rares et les mitoses jamais observées. Le cytoplasme, l'ergastoplasme, l'appareil de Golgi, les mitochondries et les lysosomes diminuent progressivement de la profondeur vers la surface du cartilage. Ainsi, les chondrocytes de la zone superficielle ressemblent à des fibrocytes peu actifs, pauvres en organites avec une accumulation de lipides sous forme de volumineuses vacuoles. Mazières distingue ainsi quatre types de chondrocytes dans le cartilage hyalin [Mazières,1985] :

- des **cellules actives** caractérisées par une membrane cytoplasmique hérissée, une dilatation parfois vacuolaire du réticulum, un Golgi très développé, de nombreuses mitochondries et peu de glycogène.
- des cellules de surcharge ou **de réserve**, absentes de la couche superficielle, volumineuses, dont le noyau est normal mais dont le cytoplasme ne contient que l'appareil de Golgi, des microfilaments, du glycogène et des lipides.
- des **cellules dégénérées**, surtout en surface ou en profondeur, caractérisées par un noyau encoché, électrodense avec désorganisation chromatiniennne, et par un cytoplasme ne contenant qu'un Golgi dilaté et des enclaves lipidiques.
- des **cellules nécrosées**, plus ou moins réduites à des débris cellulaires.

I.2.3 DIVISION ET RENOUVELLEMENT DES CHONDROCYTES

Mis en culture ou dans certaines conditions pathologiques, les chondrocytes peuvent se diviser par mitose. Les chondrocytes se divisent aussi dans le cartilage immature et le pourcentage de cellules en mitose diminue progressivement pendant la période de croissance. En revanche, chez l'adulte, il n'y a aucun

argument en faveur d'un renouvellement des chondrocytes dont on admet pourtant qu'il existe (présence de cellules en voie de nécrose sans diminution nette de la densité cellulaire) mais de façon tellement rare qu'il est impossible à déceler.

I.2.4 METABOLISME DES CHONDROCYTES

Le cartilage articulaire normal subit un renouvellement continu semblable à celui des autres tissus. Les chondrocytes sont individuellement très actifs mais, du fait de leur répartition clairsemée, l'activité métabolique totale du cartilage est relativement peu élevée. En raison du caractère avasculaire du cartilage, le métabolisme des chondrocytes est probablement surtout anaérobie. La consommation de glucose par les cellules du cartilage est comparable à celle des autres cellules, mais la consommation d'oxygène est cinquante fois inférieure à celle d'un hépatocyte. Les chondrocytes possèdent toutes les enzymes nécessaires à la glycolyse et au métabolisme du glycogène et des lipides.

Ils assurent en permanence une synthèse relativement faible des protéoglycanes ; la synthèse des protéines et la première étape de la formation des chaînes polysaccharidiques, représentée par la fixation du xylose, se déroulent au niveau des ribosomes. L'élongation et la sulfatation des polysaccharides se poursuivent dans l'appareil de Golgi. La protéine porteuse et la protéine de liaison sont ainsi synthétisées au sein de la cellule, tandis que l'acide hyaluronique est fabriqué par la membrane cellulaire. Les études avec le soufre radioactif montrent que les molécules marquées sont excrétées hors de la cellule et diffusent dans la matrice. On admet que l'agrégation des protéoglycanes (PG) est extracellulaire. Les chondrocytes de la couche moyenne apparaissent nettement plus actifs que ceux des couches superficielles ou profondes. Il est vraisemblable que seul un certain nombre de cellules assurent cette synthèse pendant une période définie. La fin de cette période serait commandée par la fixation de l'acide hyaluronique sur les protéoglycanes de la membrane cellulaire. La synthèse des PG serait donc régulée par sa propre concentration péricellulaire. Les contraintes mécaniques peuvent diminuer ou augmenter cette synthèse [Palmsky, 1984].

Les chondrocytes assurent la synthèse du procollagène et l'on admet que la formation des fibres est extracellulaire. Chez l'adulte, l'incorporation de la proline existe mais suggère une synthèse extrêmement lente et limitée du collagène. Le rôle de cette synthèse est inconnu mais ne permet pas le renouvellement de la trame fibreuse du cartilage au cours de la vie. En dehors de la synthèse du collagène et des PG, les chondrocytes assurent également la synthèse de lipides et de protéines non collagéniques de la matrice. Nous verrons

dans le chapitre suivant, les conditions susceptibles de faire varier la synthèse cellulaire des chondrocytes.

Les chondrocytes assurent également la dégradation de la matrice extracellulaire. Les lysosomes chondrocytaires contiennent des phosphatases acide, des protéases et diverses osidases capables de dégrader les molécules intracellulaires mais aussi les fragments de protéoglycanes ou de collagène dégradés hors de la cellule puis phagocytés. Les chondrocytes sécrètent également des protéases neutres et des collagénases. Ces métalloprotéases pourraient agir à distance des cellules et les produits de dégradation de leurs substrats pourraient soit diffuser à travers la surface articulaire, soit être captés par les chondrocytes. Il est vraisemblable que cette dégradation se produit principalement au voisinage des cellules. Nous étudierons en détail les mécanismes cellulaires de la dégradation de la matrice cartilagineuse.

I.2.5 NUTRITION

Les chondrocytes articulaires adultes se caractérisent par l'absence de contact direct intercellulaire, aussi les communications entre cellules ne peuvent se faire que par l'intermédiaire de la matrice extracellulaire. De plus, l'absence de vascularisation et de lymphatique dans le cartilage nécessite l'apport de nutriments et l'élimination de déchets par les cellules par diffusion à travers la matrice. Les chondrocytes reçoivent leurs apports nutritionnels par l'intermédiaire d'autres tissus vascularisés, fonction assurée par les microvaisseaux synoviaux. Le liquide synovial permet le transport des nutriments vers les chondrocytes et l'élimination des déchets vers la circulation sanguine. On insiste beaucoup actuellement sur l'importance des relations cellule/matrice. En effet, la matrice n'est pas seulement un produit de sécrétion "passif" de la cellule mais il existe entre ces deux structures des interactions très importantes conditionnant l'activité du chondrocyte. Ces relations cellules/matrice seront plus particulièrement détaillées dans le chapitre concernant la physiopathologie du cartilage.

I.3 ETUDE DU CARTILAGE PATELLAIRE CHEZ LE RONGEUR

Au cours de notre étude, nous nous sommes plus particulièrement intéressé au cartilage articulaire de la rotule chez le rat. La rotule fait partie intégrante de l'articulation du genou et possède la particularité d'être une unité fonctionnelle

anatomique. Lors de la dissection, la rotule paraît composée de deux parties (*figure 3*) : une partie fibrocartilagineuse et une partie osseuse recouverte de cartilage. En fait, seule la partie osseuse de couleur rose est identifiée comme étant la rotule. Le fibrocartilage baptisé "rotule supérieure" ou "suprapatella" rattaché à la face supérieure de la rotule est une spécialisation du tendon du quadriceps.

Après avoir justifié l'utilisation de la rotule comme source de cartilage articulaire, nous présenterons succinctement une description anatomique et histologique de ces deux structures.



Figure 3 : La rotule du rat (partie rose : rotule ; partie blanche : rotule supérieure)

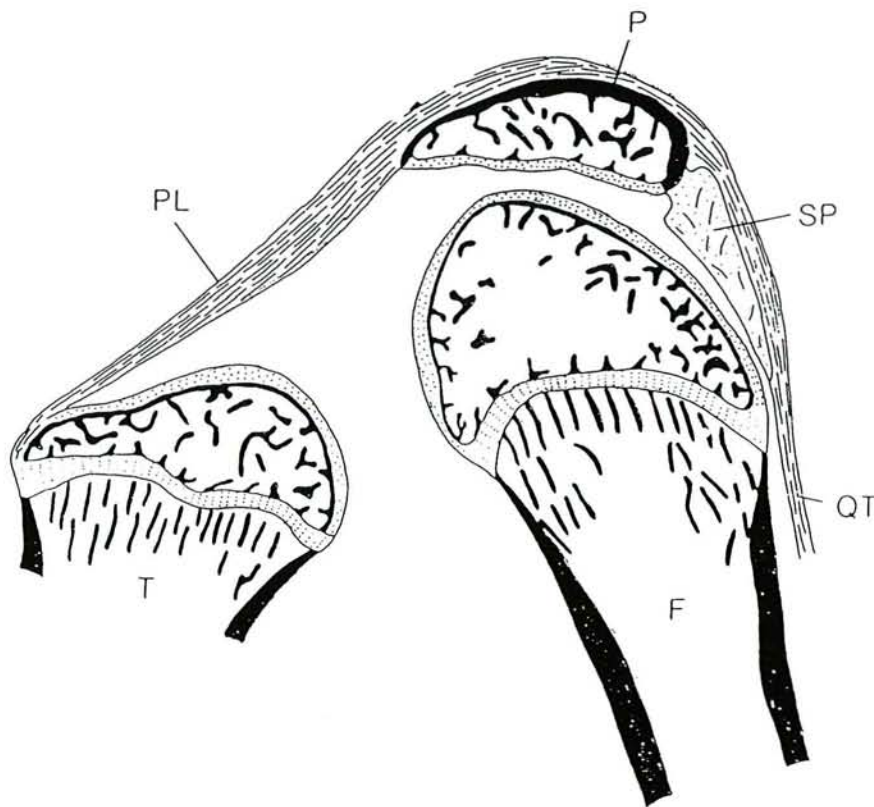
I.3.1 POURQUOI LA ROTULE ?

Les études du métabolisme du cartilage chez l'homme et l'animal sont souvent réalisées *in vitro* à partir de coupes ou d'explants de cartilage. Mais lorsque ces explants sont mis en culture, les propriétés métaboliques de la surface coupée sont modifiées (perte de PG, de collagène). De plus, la comparaison des différents échantillons de cartilage, nécessite que l'expression des résultats soit rapportée à d'autres paramètres (poids, ADN, acide uronique). L'épaisseur et la localisation exacte de ces explants de cartilage articulaire doivent être standardisées. On sait

en effet que le métabolisme des constituants du cartilage varie beaucoup dans les différentes zones du cartilage articulaire. Il est également modifié selon sa localisation dans l'articulation (zone portante ou non) [van Osch,1992].

Aussi, la rotule semble un échantillon privilégié pour l'étude du métabolisme du cartilage chez l'animal car elle pallie aux problèmes évoqués précédemment : 1) entité anatomique bien définie, sa dissection aisée n'entraîne pas de lésion du cartilage, 2) prélevée dans son intégralité, elle ne nécessite pas la détermination d'un paramètre biochimique supplémentaire. Depuis une dizaine d'années, le cartilage articulaire de la rotule fait l'objet de nombreuses études de métabolisme rendues possibles par les techniques de radiomarquage [van den Berg,1982].

I.3.2 LA ROTULE



*Figure 4 : Schéma de l'articulation fémoro-patellaire chez le rat (P: patella ; SP supra-patella; PL : ligament patellaire ; T : tibia ; F : fémur ; QT : tendon du quadriceps)
(D'après Ralphs, 1991)*

Chez le rat, la rotule est de nature cartilagineuse pendant les trois premières semaines de la vie post-natale. A la fin de la troisième semaine, elle est pénétrée par des bourgeons conjonctivo-vasculaires issus du périchondre devenu périoste.

Ces bourgeons envahissent et détruisent la maquette cartilagineuse, sauf au niveau de la future surface articulaire. Sur les débris cartilagineux, des cellules mésenchymateuses transformées en ostéoblastes déposent du tissu osseux constituant des travées osseuses enchondrales, tandis que sous le périoste se forme une très mince couche d'os d'origine périostique [Asch L,1991].

La rotule s'articule avec les condyles fémoraux au cours des mouvements de flexion et d'extension du genou (*figure 4*). La rotule est composée d'une partie osseuse de forme sésamoïde (2-3mm) recouverte d'une fine couche de cartilage articulaire (d'épaisseur 200-300 μ). La face postérieure de la rotule qui s'articule avec les condyles fémoraux présente un aspect homogène et brillant de couleur rose claire. Ses dimensions sont de 3,5 à 4mm de longueur sur 3mm de largeur (*figure 1*). Sur la face antérieure, l'os est directement en contact avec le tendon rotulien (ou ligament patellaire) par lequel il est totalement recouvert. Le tendon rotulien est également nommé FDP chez le rat pour "*flexor digitorum profundus*".

I.3.3 LA ROTULE SUPERIEURE

Il s'agit d'une structure spécifique trouvée chez les rongeurs et les carnivores ; elle est plus développée chez les animaux sauteurs. La rotule supérieure ou "*suprapatella*" est un fibrocartilage de forme sésamoïde et d'aspect blanc, accolé à la rotule (*figure 1*). La rotule et la rotule supérieure sont séparées par une petite quantité de tissu adipeux qui subit la compression et l'extension durant la flexion du genou. La rotule supérieure est localisée dans le tendon du quadriceps fémoral qui se décompose en trois parties ; le tendon du vaste interne, le tendon du droit antérieur et le fibrocartilage [Ralphs,1992]. Sa présence dans le tendon quadricipital du fémur est liée aux forces de pression et de tension existant dans le tendon durant la phase d'hyperflexion du saut. Ses fonctions sont similaires à celles des fibrocartilages des tendons qui passent autour des poulies osseuses.

La *suprapatella* fusionne avec les tendons en avant. L'aspect général des fibres et des cellules contraste de façon marquée entre la *suprapatella* et les tendons. La rotule supérieure contient plus de cellules que les tendons auxquels elle est associée et son arrangement de fibres est moins régulier dans la matrice. Les études histochimiques montrent dans la *suprapatella* une matrice riche en chondroïtine sulfate mais qui ne contient pas de kératane sulfate ni d'héparane sulfate. Les fibrocartilages des zones d'attaches des tendons sont riches en chondroïtine sulfate et en collagène de type II. La *suprapatella* apparaît comme une spécialisation du tendon bien adaptée au rôle de l'articulation (pression/résistance). Elle peut protéger à la fois la surface cartilagineuse

articulaire et les tendons des charges excessives. Elle peut également être considérée comme une extension de la surface articulaire de la rotule (*Figure 5*) [Ralphs,1991].

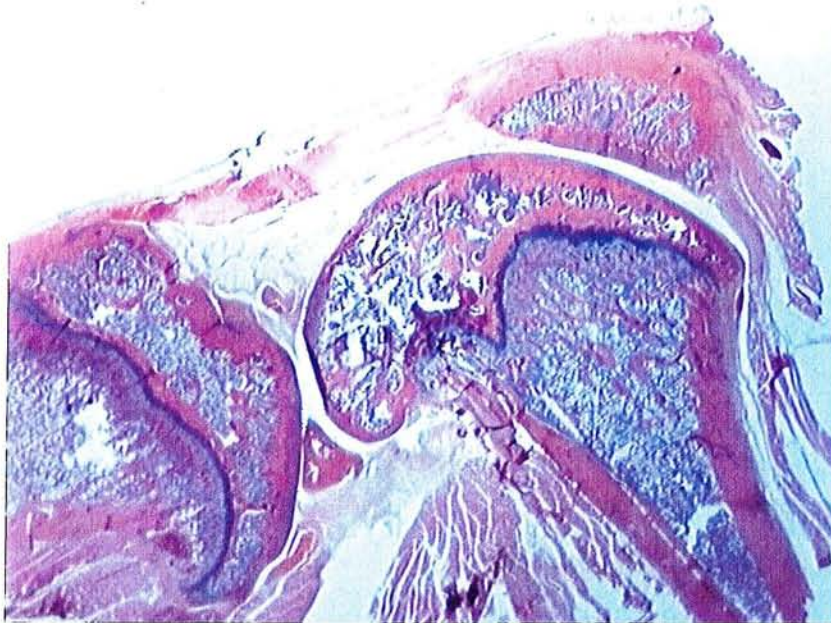


Figure 5 : Coupe histologique de l'articulation fémoropatellaire chez le rat

I.4 LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

En 1950, la matrice extracellulaire était simplement décrite ; elle était constituée de fibres de collagène et de substance colloïdale. D'immenses progrès ont été réalisés depuis. Aujourd'hui, on connaît plus de 25 types de collagène différents et la substance fondamentale est composée d'une douzaine de molécules de protéoglycanes et de glycoprotéines [Woessner,1993].

Il a fallu près d'un siècle de recherches pour que l'on identifie dans le cartilage les composants moléculaires responsables de la résistance à la traction et de l'élasticité. En 1837, Müller obtint une solution qu'il appela "la chondrine", en plaçant du cartilage dans de la vapeur à haute pression. Un demi-siècle plus tard, Krukengerg isola le composant principal de la chondrine, qu'il appela le "sulfate de chondroïtine". Puis en 1955, Davidson et Meyer montrèrent que le sulfate de chondroïtine était constitué d'un enchaînement de disaccharides. Plus

précisément, la structure du sulfate de chondroïtine est une alternance d'acide glucuronique et de sulfate de N-acétylgalactosamine.

On découvrit ensuite que l'une des extrémités de ce polysaccharide était liée à une longue protéine par une chaîne de quatre sucres, que l'on appela séquence de liaison. En 1964, Gregory, Laurent et Rodén établirent que cette séquence de liaison était formée par l'enchaînement de xylose (fixé sur la sérine, un acide aminé de la longue protéine), de galactose, encore de galactose et d'acide glucuronique (sur lequel se fixe le sulfate de chondroïtine). En 1953, Davidson, Meyer, Linker et Weissmann avaient caractérisé un autre composant du cartilage ; on supposa que cette substance, le sulfate de kératane, était un constituant intrinsèque du cartilage, mais on constata ultérieurement que le sulfate de kératane et le sulfate de chondroïtine sont tous les deux rattachés à la même longue protéine. Le sulfate de kératane est un polymère formé par la répétition d'un disaccharide, lui-même constitué par l'alternance de molécules de galactose et de sulfate de N-acétylglucosamine.

Le progrès décisif dans l'analyse du cartilage date de 1969 : à cette date, Hascall et Sajdera utilisèrent des méthodes d'étude des acides nucléiques pour extraire du cartilage les macromolécules contenant le sulfate de chondroïtine. Ces macromolécules, les protéoglycanes, sont très intéressantes parce que leur fonction reflète leur structure. En fait, l'étude des protéoglycanes a permis d'expliquer avec précision pourquoi le cartilage est élastique.

I.4.1 LES PROTEOGLYCANES

Les protéoglycanes (PG) sont ubiquitaires dans l'organisme et sont très abondants dans la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs et plus spécialement dans le cartilage. Le protéoglycane prédominant dans le cartilage articulaire est l'agrécan qui représente environ 90% de la quantité totale des PG. Trois autres molécules viennent se greffer à cette famille de protéoglycanes : le biglycane, la décorine et la fibromoduline.

I.4.1.1 Définition et nomenclature des protéoglycanes.

Un protéoglycane est constitué par l'association d'une protéine porteuse "core protein" liée de façon covalente à au moins une chaîne de glycosaminoglycanes (GAG). Les PG peuvent se trouver à l'état libre mais ils sont habituellement fixés à de longues molécules d'acide hyaluronique (AH) formant ainsi des agrégats d'un poids moléculaire élevé. La nomenclature est encore quelque peu confuse et aucune classification internationale pour la description des PG n'est encore établie. Autrefois les protéoglycanes étaient classés en fonction de la nature des chaînes de GAG. Depuis la découverte de la protéine porteuse, élément

relativement invariable des PG, de nouveaux noms ont été assignés aux PG faisant référence à leur fonction ("agrécan", forme des agrégats avec l'AH), leur lieu ("décorine", recouvre les fibres de collagène de type I), ou leur structure moléculaire ("biglycane" qui a deux chaînes de GAG, "serglycine" qui contient une longue séquence d'unités répétées de (Ser-Gly)). A l'avenir, plus les protéoglycanes seront caractérisés, plus la nécessité d'une classification reposant à la fois sur la nature de la protéine porteuse et la nature des chaînes de GAG, s'imposera. Dans notre étude bibliographique, nous classerons les PG suivant leur poids moléculaire.

I.4.1.2 Les glycosaminoglycanes

Composés	Disaccharide répétitif	Groupements sulfates		Moles SO4 / disacch.	Localisations principales
		O-S	N-S		
Hyaluronane	D-glucosamine + ac. D-glucuronique	-	+	0	liquide synovial, cordon ombilical, cartilage, vitré, peau
Chondroïtine 4 - sulfate	D-galactosamine + ac. D-glucuronique	+	-	0,1 - 0,3	cartilage, peau, cornée, os
Chondroïtine 6 - sulfate	D-galactosamine + ac. D-glucuronique	+	-	0,1 - 0,3	parois artérielles, leucocytes, plaquettes
Dermatane sulfate	D-galactosamine + ac. D-glucuronique ou ac. L-iduronique	+	-	1,0 - 3,0	peau, tendon, parois artérielles, valvules cardiaques
Héparane sulfate	D-glucosamine + ac. D-glucuronique ou ac. L-iduronique	+	+	0,4 - 2,0	parois artérielles, poumons
Héparine	D-glucosamine + ac. D-glucuronique ou ac. L-iduronique	+	+	1,6 - 3,0	mastocytes (foie, poumon, peau, intestin)
Kératane sulfate	D-glucosamine + galactose	+	-	0,9 - 1,8	cartilage, cornée, disques intervertébraux

Tableau 1 : Composition, structure et localisations des glycosaminoglycanes (d'après Lamberg et Stoomiller, 1974).

Les chaînes de GAG sont constituées de répétitions de disaccharides de longueur variable, sulfatés à différents degrés. Le disaccharide de base se compose généralement d'un acide uronique (ex : acide glucuronique) et d'un sucre N-acétylé (N-acétylglucosamine ou N-acétylgalactosamine). On distingue ainsi sept GAG différents par leurs disaccharides de base, le nombre de groupements sulfate ou la configuration des liaisons glycosidiques (*tableau 1*) : les chondroïtines 4 et 6-sulfate (C4S et C6S), le dermatane sulfate (DS), l'héparane sulfate (HS), le kératane sulfate (KS), l'héparine et l'acide hyaluronique (AH). L'acide hyaluronique constitue en quelque sorte une exception puisque c'est le

seul GAG synthétisé dans la membrane cytoplasmique qui ne soit pas sulfaté. N'étant pas lié à une protéine porteuse, il ne peut donc pas constituer de GAG. Quant au kératane sulfate qui ne contient pas d'acide uronique, il ne répond pas exactement à la définition d'un GAG.

I.4.1.3 L'agrécane

C'est le protéoglycane prédominant dans le cartilage puisqu'il représente environ 90% de la masse des protéoglycanes dans les tissus. Il est aussi le plus étudié car il peut être isolé en grande quantité (de l'ordre du gramme). L'agrécane est un agrégat multimoléculaire de nombreux monomères de protéoglycanes liés à l'acide hyaluronique [Hardingham,1992].

Le monomère d'agrécane ($2-3 \times 10^3$ kDa) est constitué d'une protéine porteuse sur laquelle se fixent de façon covalente de nombreuses chaînes de GAG. La protéine centrale porte latéralement environ 100 chaînes de chondroïtines 4- et 6-sulfate, 30 chaînes de kératanes sulfate, 50 oligosaccharides riches en acétylgalactosamine liés par une liaison O-glycosidique et 7-8 oligosaccharides riches en mannose liés par une liaison N-glycosidique (figure 6). Ces protéoglycanes constituent de

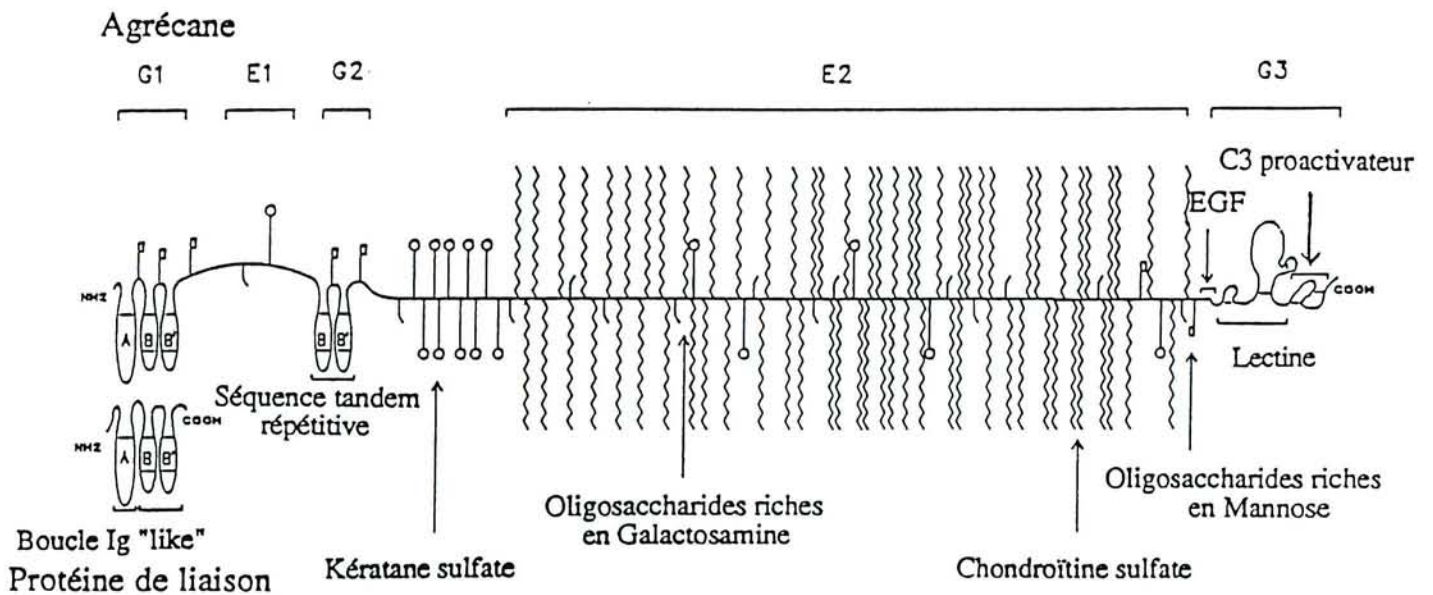


Figure 6 : Structure générale de la protéine porteuse et des résidus glycaniques des agrécanes (Ig= Immunoglobuline ; EGF= Epidermal Growth Factor) (d'après Hardingham, 1992)

volumineux agrégats en se fixant de façon non covalente à une molécule d'acide hyaluronique [Hascall,1974]. Cette fixation est stabilisée par une glycoprotéine de liaison ou "link protein" de PM de 40-50kDa. La taille des agrégats de PG ainsi

formés est petite (2-5 protéoglycanes) lorsque l'AH est en excès et de faible PM. A l'inverse, si l'AH est de haut PM et que les protéoglycanes sont en excès, les agrécans peuvent contenir entre 400 et 800 protéoglycanes [Hardingham,1992].

a) Structure de la protéine porteuse ("core protein")

La protéine porteuse a un poids moléculaire de 237-248kDa chez l'homme ; elle est codée par un seul gène dont la séquence de 16 exons est bien définie [Doege,1991]. Chez le rat, la protéine porteuse est plus petite (218kDa). De l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, on distingue trois domaines globulaires (G1,G2,G3) séparés par deux domaines interglobulaires (E1,E2). La région N-terminale contient les domaines G1 et G2 séparés par le segment linéaire E1 de 21nm. A l'extrémité C-terminale, G3 est séparé de G2 par la région E2, très étendue (260nm) qui porte les chaînes de KS et de CS (*figure 6*).

b) Domaine G1

Anciennement connu sous le nom de "HABR" (Hyaluronic Acid Binding Region), le domaine G1 fut localisé par Heinegard et Hascall à l'extrémité N terminale de l'agrécane [Heinegard,1974]. La digestion à la trypsine des protéoglycanes conserve de façon intacte le domaine G1 ainsi que la protéine de liaison qui restent fixés au hyaluronate. Le fragment G1 issu de cette hydrolyse contient 25% d'hydrates de carbone, quelques kératanes sulfate ainsi que des oligosaccharides. Le domaine globulaire G1 (de PM=38kDa), est composé de trois sous-domaines codés respectivement par les exons 3, 4 et 5. Il contient des oligosaccharides riches en mannose (liaison N-glycosidiques). G1 établit des relations étroites avec la glycoprotéine de liaison qui stabilise l'agrégat. En l'absence de cette protéine de liaison, les agrégats qui se forment sont plus petits et moins stables. La séquence de la protéine de liaison est très conservée entre les espèces [Neame,1993]. Le domaine G1 et la protéine de liaison qui se lient à l'AH durant la formation de l'agrégat de protéoglycanes possèdent deux structures communes (*figure 7*) :

1 - Une boucle (de Cys 46 à Cys 124) proche de la structure des immunoglobulines appelée "boucle Ig like" à l'extrémité NH₂ terminale du domaine G1 et de la protéine de liaison. Cette séquence est responsable de la liaison entre le domaine G1 et la protéine de liaison.

2 - Une séquence tandem répétitive organisée en une double boucle (entre Cys 166 et Cys 334) stabilisée par des ponts disulfures. Une structure proche d'une de ces boucles a été identifiée dans le récepteur du homing des lymphocytes (CD44) qui est également capable de se lier à l'acide hyaluronique. Ce motif est donc directement impliqué dans la liaison avec le hyaluronane, la liaison nécessitant un

hexasaccharide pour le récepteur CD44 et un décasaccharide pour le domaine G1 et la protéine de liaison [Hardingham,1992].

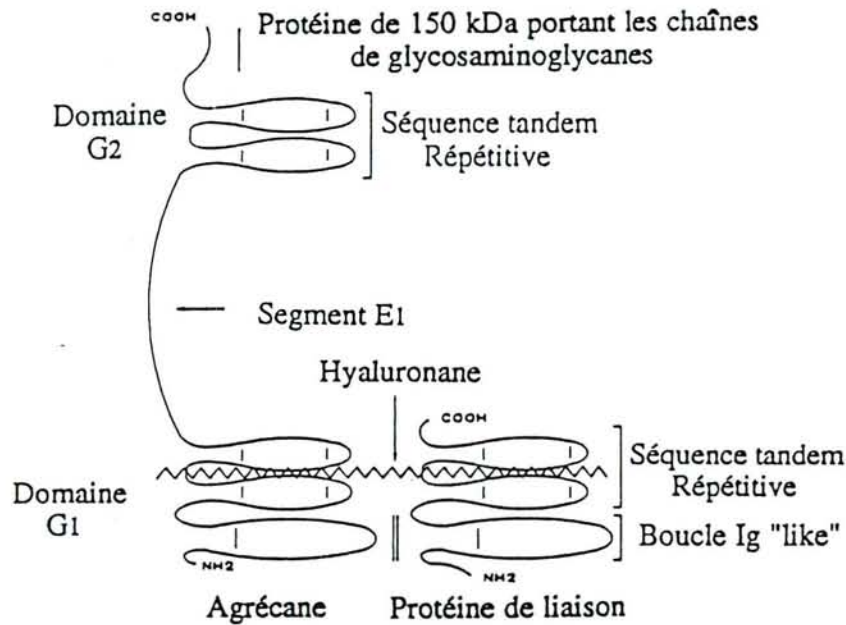


Figure 7 : Motifs structuraux et interactions entre les domaines globulaires des agrécane et de la protéine de liaison, avec le hyaluronane. (Ig=immunoglobuline) (d'après Hardingham, 1992)

c) Domaine interglobulaire E1 (ou IGD)

Le domaine E1 (12kDa), codé par l'exon 6 contient 130 AA. Il maintient, par sa structure rigide G1 et G2 séparés. Le domaine E1 est de taille variable et une ou deux chaînes de kératane sulfate lui sont associées [Neame,1993].

d) Domaine G2

Le domaine globulaire G2, (25kDa) est codé par les exons 7 et 8 (similaires à ceux de G1). On connaît peu de choses sur les fonctions de G2. Il possède une grande homologie avec la séquence tandem répétitive de G1 et de la protéine de liaison sans avoir la propriété de se lier à l'AH, à la protéine de liaison et au collagène. Il possède une structure en double boucle, et la troisième boucle "Ig like" n'est pas présente (figure 7). Les chaînes de KS attachées à cette structure semblent interférer avec la possibilité pour G2 de se lier à l'AH. Le domaine G2 possède également des oligosaccharides liés par des liaisons N-glycosidiques.

e) Région riche en Kératane Sulfate

Sa fonction exacte reste inconnue. Cette région est absente chez le rongeur dont les PG ne contiennent pas de chaînes de KS [Doege,1990]. La protéine porteuse comporte à ce niveau une séquence d'hexapeptides (avec un résidu sérine) répétée onze fois. Il semble que les chaînes de kératane sulfate se substituent aux sérines. La protéine porteuse lie environ 30 chaînes de KS. Ce n'est pas la seule région comportant des KS puisqu'ils sont présents dans la zone riche en CS ainsi que dans les domaines E1 et G2. Les chaînes de KS ont un poids moléculaire de 10kDa [Hascall,1972]. Leur structure varie en fonction de l'origine tissulaire ; les KS des cartilages des zones porteuses (cartilage articulaire et disques intervertébraux) comportent du 1-3 fucose et de l'acide 2-6 N-acétylneuraminique, alors que les KS des cartilages qui ne supportent pas de charge (nasal et trachéal) sont dépourvus de ces molécules.

f) Région riche en Chondroïtine Sulfate

Elle constitue la majeure partie de la protéine porteuse de l'agrécan ; elle contient plus de 100 paires d'acides aminés {ser-gly} qui constituent les zones d'attaches des résidus xylosyl initiant les chaînes de CS. Généralement, les chaînes de chondroïtine 4- et 6-sulfate coexistent dans la molécule de PG avec un ratio qui varie selon l'âge, l'origine tissulaire et l'espèce. Chez l'homme, il existe une séquence de 19 AA (nonadécamère) répétée dix-neuf fois dans la première partie de cette région (partie CS1). Cette séquence est plus longue que celle du rat puisque la première partie de cette région contient 77 séquences {ser-gly} alors que celle du rat n'en contient seulement que 49. La deuxième partie (partie CS2) est plus semblable entre les espèces. Entre les chaînes de CS, les résidus Ser et Thr sont substitués avec des oligosaccharides liés par des liaisons O-glycosidiques ou par des chaînes de KS. Les tissus jeunes contiennent de nombreux oligosaccharides qui sont remplacés par des chaînes de KS dans les tissus plus vieux.

g) Domaine G3

A l'extrémité C-terminale de l'agrécan, le domaine globulaire G3 (25kDa) a été identifié lors du premier séquençage de l'ADN de la protéine porteuse. Ce domaine est fréquemment retrouvé dans le cartilage immature, mais on estime que seulement 10 à 50 % des protéoglycanes extraits de cartilages matures possèdent un domaine G3 intact. C'est une structure complexe s'apparentant à la famille "LEC-CAMS" (lectine, EGF, "complement-regulatory-protein-cell-adhesion-molecules", c'est à dire C3 proactivateur) [Stoolman,1989]. Le domaine G3 comporte un domaine s'apparentant aux lectines ("lectine like domain") qui

limite le taux de diffusion des monomères de PG avant qu'ils ne s'agrègent. Il existe 10 cystéines dans le domaine G3 et la séquence d'AA est très conservée (>90%) entre les espèces. G3 présente aussi une grande similarité avec la séquence C-terminale du versicane (protéoglycane du fibroblaste). Il a un rôle dans l'organisation de la matrice durant la synthèse, la translocation intracellulaire, la glycosylation et la sécrétion des protéoglycanes.

Domaines protéiques	Poids moléculaires (kDa)	Hydrates de carbone	Motifs structuraux	Fonctions
Protéine de liaison	39	liaison N-	Boucle Ig like PTR	Liaison à G1 Liaison à AH
Protéoglycane G1	38	liaisons N- et O- Chaînes de KS	Boucle Ig like PTR	Liaison à LP Liaison à AH
E1	12	Chaînes de KS	--	
G2	25	liaisons N- et O-	PTR	Pas de liaison à l'AH?
KS	5-10	Chaînes de KS		
CS		Chaînes de CS Chaînes de KS liaison O-		fixation des GAG
G3	25	liaison N-	(EGF) Lectine Complément B	Liaison Gal/Fuc Interaction protéique?

Tableau 2 : Structures et fonctions des domaines de l'agrécane et de la protéine de liaison (LP : protéine de liaison ; liaisons N- ou O- : liaisons N- ou O-glycosidique ; PTR : séquence tandem répétitive ; GAG : glycosaminoglycanes ; AH : acide hyaluronique ; Gal : galactose ; Fuc : fucose ; lectine : récepteur hépatique de l'asialoglycoprotéine ; KS : kératane sulfate ; CS : chondroïtines sulfate) (d'après Hardingham, 1992)

I.4.1.4 Les petits protéoglycanes libres

On peut les classer en plusieurs groupes suivant la composition de leurs chaînes de GAG : les protéoglycanes à chondroïtines et dermatanes sulfates (DS-CS/PG ou DS/PG), les protéoglycanes à kératanes sulfates (KS/PG) et les protéoglycanes à héparanes sulfates (HS/PG).

a) Les protéoglycanes à dermatanes sulfate (DS/PG)

Le cartilage articulaire contient deux petits protéoglycanes qui portent des chaînes de dermatane sulfate (DS). Le DS est un GAG hybride composé de 2 types de disaccharides : l'un contient des unités répétées de glucuronate et de N-

acétylgalactosamine, et l'autre contient des unités d'iduronate et de N-acétylgalactosamine (*tableau I*).

Le **byglycane** et la **décorine** sont des protéoglycanes à dermatane sulfate avec une protéine porteuse riche en séquences répétées de leucine. Ces DS/PG représentent seulement une petite fraction des protéoglycanes du cartilage articulaire (0,2% du poids humide du cartilage) mais ils peuvent être présents en proportion molaire égale à l'agrécan. Les chaînes de GAG (40kDa) sont très variables dans leur taille, leur degré d'épimérisation et de sulfatation [Kresse,1993]. Le byglycane et la décorine (*figure 8*) ont des protéines porteuses différentes (extrémités N terminales) mais qui possèdent une grande homologie (55% environ). Le domaine G3 de la protéine porteuse (37kDa) est caractérisée par la présence de quantité importante de leucine qui s'inscrit de façon répétitive. Leur concentration augmente avec l'âge (surtout pour le biglycane dans les couches superficielles des tissus). Dans les tissus jeunes, les deux PG sont présents avec le même ratio ; dans les tissus plus vieux, la décorine est prédominante.

Les DS/PG se lient aux autres molécules de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, facteurs de croissance, cofacteur II de l'héparine) et régulent leurs propriétés biologiques. Les DS/PG se lient à la surface des fibres de collagène et inhibent la fibrillogénèse. En se liant au TGF- β , la décorine neutralise l'activité de ce facteur de croissance. Etant donné que le TGF- β régule la synthèse des DS/PG (GAG et protéine porteuse), la décorine peut exercer un rétrocontrôle négatif sur sa propre synthèse [Ruoslahti,1991]. Les DSPG sont impliqués dans tous les processus de développement et de réparation tissulaires. En se liant à la fibronectine [Lewandowska,1987], ils restreignent l'adhésion et la migration cellulaires et empêchent la formation de caillot par leur liaison au cofacteur II de l'héparine [Tollefsen,1986]. La capacité des DS/PG à inhiber les processus de réparation tissulaire peut en partie expliquer le fait que les lésions restreintes au cartilage articulaire ne cicatrisent pas. Au cours de l'arthrose, des fentes et des fissures apparaissent dans le cartilage articulaire. Aucun caillot de fibrine ne se forme dans ces fentes ; les cellules ne s'attachent pas à la surface des imperfections du cartilage ; il n'y a pas de migration cellulaire dans les fissures qui ne sont donc pas comblées par un tissu réparateur. Comme le cartilage articulaire contient des DS/PG inhibant la formation de caillot, ils peuvent également empêcher la fixation de caillot de fibrine au niveau des fissures. Les DS/PG se lient au domaine de liaison de la fibronectine et inhibent l'adhésion cellulaire à cette même fibronectine. Les DS/PG se lient alors à la surface des fibres de collagène et protègent ainsi ces sites de l'interaction avec d'autres cellules ou macromolécules, inhibant ainsi la fixation et la migration de cellules

sur les substrats de collagène. Aussi, la première étape de cicatrisation du cartilage ne peut avoir lieu en présence de DS/PG [Rosenberg,1992].

- **Le biglycane** (DSPG I ou PG1 ou PGS1) isolé du cartilage articulaire bovin contient deux chaînes de dermatane sulfate liées sur deux sérines (Ser 5 et Ser 10) proches de l'extrémité N-terminale de la protéine porteuse (*figure 8*). C'est le plus volumineux des deux DS/PG (100kDa) ; ses molécules peuvent s'associer entre elles par l'agrégation de chaînes de GAG. Le biglycane semble prédominer dans les régions péricellulaires et les tissus immatures. Sa fonction demeure méconnue et les données sur une éventuelle interaction avec le collagène sont contradictoires ; *in vitro*, aucun effet spécifique sur la formation des fibrilles de collagène n'a été démontré [Fleischmajer,1991] et pourtant dans les cellules d'ostéosarcome, il existe des biglycane adjacents aux fibres de collagène [Kresse,1993].

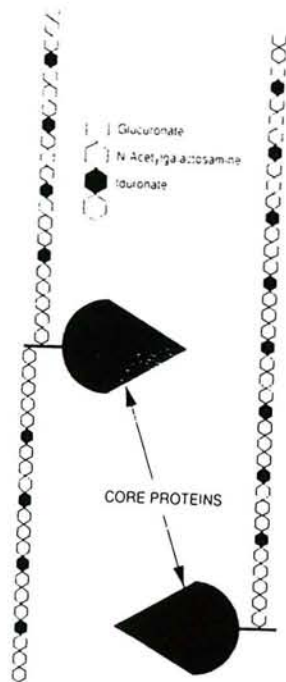


Figure 8 : Structures du biglycane (à gauche) et de la décorine (à droite) du cartilage articulaire. (d'après Rosenberg, 1992)

- **La décorine** (DSPG II ou PGII ou PGS2 ou PG 40) contient une seule chaîne de dermatane sulfate attachée sur une sérine en position 4 (70kDa) à l'extrémité N-terminale de la protéine porteuse (*figure 8*). La décorine est localisée à la surface des fibres de collagène (de type I et II) près des bandes d et e. La décorine inhibe la fibrillogénèse [Vogel,1984] et réduit ainsi le diamètre des fibres de collagène. La zone de liaison de la décorine est le lieu habituel de dépôt des cristaux d'hydroxyapatite dans l'os et il est probable que les

interactions décorine-collagène soient responsables de la prévention de la minéralisation. La protéine porteuse se lie au domaine de liaison de la fibronectine et empêche ainsi la liaison aux récepteurs de la surface cellulaire de la fibronectine (intégrines).

- **Le protéoglycane Lb** est un DS/PG isolé des tissus embryonnaires du cartilage épiphysaire de poulet. Le protéoglycane Lb est caractérisé par des séquences répétées de leucine, toutefois il montre plus d'homologie avec le facteur ostéoinductible humain qu'avec les petits protéoglycans [Shinomura,1992].

- **Le protéoglycane 100** fut découvert récemment par des techniques d'immunoréactivité croisée et peut être classé dans la famille des petits PG interstitiels [Witsch-Prehm,1992]. Il a été synthétisé *in vitro* dans des cultures de cellules d'ostéosarcome. L'expression des protéoglycans 100 dans les tissus fœtaux humains a été comparée à celle de la décorine ; ils sont tout deux localisés dans les ostéoblastes et occasionnellement dans les ostéoclastes. Les chondrocytes montrent une coloration positive pour le PG 100 et négative pour la décorine. PG 100 a été également localisé dans les muscles striés, les fibres nerveuses et le tissu synovial.

b) Les protéoglycans à kératanes sulfates

- **La fibromoduline** est un KS/PG d'un poids moléculaire de 59kDa (également appelée : "59kDa protéine") et compose 0,1 à 0,3% du poids sec du cartilage. La majeure partie de sa protéine porteuse (42kDa) qui comprend 4 segments, est similaire à celle des petits DS/PG, avec des motifs riches en leucine et deux ponts disulfures. Toutefois, la fibromoduline présente deux originalités : un domaine riche en tyrosine et 4 chaînes de KS, dont la présence n'est pas constante. La fibromoduline se lie au collagène et inhibe également la fibrillogénèse [Plaas,1992].

- **Le lumicane** appartient à la famille des KS/PG. Il doit son nom à son rôle dans l'acquisition et le maintien de la transparence de la cornée.

c) Les protéoglycans à héparanes sulfates

Les protéoglycans à héparane sulfate sont principalement associés aux membranes cellulaires. Ils interviennent dans les phénomènes de régulation et d'adhésion cellulaires. Durant la croissance fœtale des membres, ils participent au contrôle du processus de différenciation ; le syndécane, par exemple, est un HS/PG qui intervient précocement dans le développement de l'ébauche des membres puis disparaît des régions chondrogéniques [Hardingham,1992].

d) Les protéoglycanes à chondroïtines sulfates

Un grand CS/PG est également retrouvé dans le cartilage [Heinegard,1979]. Il peut s'agir, en partie du moins, d'une molécule d'agrécan ayant perdu son domaine G1 par protéolyse. Mais l'existence d'un gros PG, ne s'agrégeant pas, produit par un gène différent de celui de l'agrécan, est vraisemblable.

I.4.1.5 Rôle d'hydratation des protéoglycanes

La structure complexe des protéoglycanes détient une propriété importante grâce aux sucres, présents dans les chaînes de disaccharides répétés de chondroïtine sulfate et de kératane sulfate, qui comportent des charges électriques négatives. Dans les GAG, les charges négatives sont représentées par les groupes carboxyles COO^- de l'acide glucuronique et les groupes sulfates SO_4^{2-} présents sur les glucosamines et galactosamines. Ainsi, le protéoglycane est un immense réseau très ordonné de charges électriques négatives.

D'autre part, la molécule d'eau est un dipôle électrique, car les électrons, dans la molécule tendent à se regrouper autour de l'atome d'oxygène, situé entre les deux atomes d'hydrogène ; la charge négative s'y concentre et la charge positive est ainsi située du côté des atomes d'hydrogène. Ces propriétés électriques de la molécule d'eau font que les interactions entre les molécules d'eau et la réaction entre l'eau et les autres molécules électriquement chargées, sont dues aux forces électrostatiques d'attraction et de répulsion. Les molécules d'eau s'organisent notamment en plusieurs couches autour des charges électriques ; le nombre de ces couches dépend de l'intensité des charges électriques. Dans le cas des protéoglycanes, un très grand nombre de molécules d'eau entourent cette molécule : en fait, la masse de l'eau fixée est plusieurs fois supérieure à celle du protéoglycane lui-même. En outre, l'eau remplit les interstices de la matrice extracellulaire des chondrocytes, comme dans une éponge. Ainsi, les protéoglycanes s'entourent de tellement d'eau que l'eau est le principal constituant du cartilage.

L'élasticité du cartilage est directement due à cette capacité de fixer l'eau ; quand on comprime le cartilage, l'eau est chassée de la zone d'influence électrique des groupes sulfates et carboxyles ; les charges négatives de ces groupes se rapprochent et les forces répulsives qui apparaissent s'opposent à la compression. Quand on supprime la pression, l'eau revient dans la zone à polarité négative. La circulation des substances nutritives dans le cartilage articulaire n'est pas assurée par des vaisseaux sanguins mais par le mouvement du liquide produit par la compression et la décompression résultant des mouvements du corps. Pour cette raison, les longues périodes d'inactivité des articulations affaiblissent les cartilages articulaires en les rendant minces et fragiles.

I.4.2 LES COLLAGÈNES

Les collagènes jouent un rôle essentiel de soutien des tissus conjonctifs. Les molécules de collagène forment les éléments fibreux et sont les structures moléculaires les plus ubiquitaires présentes dans les espaces extracellulaires de la plupart des tissus conjonctifs. Un collagène est une protéine structurale de la matrice extracellulaire dont une grande partie est formée par une triple hélice de trois chaînes polypeptidiques entrelacées. Ces parties hélicoïdales ont une structure primaire répétitive $(\text{Gly-X-Y})_n$ dans laquelle X est le plus souvent une proline et Y une hydroxyproline. Les trois chaînes s'assemblent spontanément en triple hélice stabilisée par des liaisons hydrogènes. La présence d'hydroxyproline et d'hydroxylysine est habituellement un bon indicateur des molécules collagéniques. Un deuxième critère important permettant de classer une molécule dans la famille des collagènes est sa possibilité de former des agrégats supramoléculaires (fibrilles, filaments, réseaux, dimères) seuls ou en association avec d'autres composants matriciels. Enfin, la dernière condition est représentée par son rôle de structuration de la matrice extracellulaire, rôle n'excluant pas les fonctions de contrôle de l'adhésion, de la morphologie et de la croissance.

Les récentes publications font état de 18 types différents de collagènes comportant 32 chaînes codées par des gènes distincts [van der Rest,1993]. Dans le cartilage articulaire, les collagènes rencontrés sont essentiellement les types II, IX, X, VI et XI, mais on peut également y trouver les types I, V, VIII (Tableau 3). Les collagènes peuvent être regroupés en 3 classes :

- **Les molécules de collagène de classe I** consistent en l'assemblage de trois chaînes polypeptidiques (chaînes α) qui forment une triple hélice de 300nm par juxtaposition latérale de molécules décalées d'environ 67nm. Les chaînes polypeptidiques sont synthétisées par les cellules sous forme de précurseurs (molécules de tropocollagène). Les peptides qui se trouvent aux extrémités N- et C-terminales de la molécule de procollagène sont coupées par des enzymes durant la sécrétion et ceci avant que les collagènes ne forment des fibrilles extracellulaires.

- **Les molécules de classe II** se trouvent principalement associées avec la membrane basale et ne sont pas présentes dans les tissus cartilagineux.

- **Les molécules de classe III** sont des molécules avec de courtes hélices où la partie collagénique est interrompue par des segments non collagéniques et même des domaines globulaires.

Dans le cartilage articulaire, les collagènes sont les éléments structuraux essentiels aux propriétés biochimiques du tissu. Ils représentent environ 10 à 20% du poids humide du cartilage (50% du poids sec). Nous nous limiterons pour

Type	Forme moléculaire Poids moléculaire Longueur du domaine hélicoïdal	Distribution dans les tissus	Caractéristiques Organisation in situ
COLLAGÈNES SPÉCIFIQUES			
II ₁	[α_1 (II)] ₃ 290 000 daltons 300 nm	Cartilage hyalin, disques intervertébraux, humeur vitrée.	Fibres fines striées, D-67 nm, taux élevé de Hyl, Glc-Gal-Hyl et Gal-Hyl.
IX	[α_1 (IX)], α_2 (IX), α_3 (IX)] 250 000 daltons 170 nm interrompu	Tissus cartilagineux, disques intervertébraux et humeur vitrée.	Riche en Cys. Présence d'une chaîne de glycosaminoglycane. Associé aux fibrilles de Type II
1 $\alpha_2\alpha_3\alpha$ (XI)	[α_1 (XI), α_2 (XI), α_3 (XI)] 300 000 daltons 320 nm	Tissus cartilagineux, humeur vitrée. Autres tissus conjonctifs?	α_3 (XI) identique à α_1 (II) mais hyperglycosylée. α_1 (XI) et α_2 (XI) similaires à α_1 (V) et α_2 (V). Les peptides CNBr sont différents. Associé aux fibrilles de Type II.
X	[α_1 (X)] ₃ 170 000 daltons 140 nm	Culture de chondrocytes d'embryon de poulet. Car- tilage de croissance. Zone hypertrophique et de cal- cification.	Riche en Tyr, Met. 25 % d'imino- acides. Peu d'Arg.
COLLAGÈNES NON SPÉCIFIQUES			
I	[α_1 (I) ₂ α_2 (I)] 290 000 daltons 300 nm	Peau, tendon, os, cornée et la plupart des tissus con- jonctifs. Fibrocartilages. Surface du cartilage fœtal.	Grosses fibres bien structurées et striées D-67 nm. Peu de Hyl, peu de carbohydrates.
V	[α_1 (V) ₂ α_2 (V), [α_1 (V)] ₃ , [α_3 (V)] ₃ , [α_1 (V), α_2 (V) α_3 (V)] combinaison spécifique du tissu 300 000 daltons, 305 nm	Placenta, foie, peau, mus- cles. Cartilage adulte?	Matrice extracellulaire. Associé aux fibres de Type I. Pas de Cys, peu de Ala, teneur élevée en acides aminés basiques.
VI (intima collagen)	[α_1 (VI), α_2 (VI), α_3 (VI)] 500 000 daltons 105 nm	Intima de l'aorte, placenta, utérus, peau, cartilage fœtal, nucleus pulposus, poumon, foie.	Agrégats de hauts poids molécu- laires. Structure fibrillaire, fila- ments D-100 nm. Domaines non collagéniques importants. Riche en Cys-Tyr. Teneur élevée en Hyl et Hyl glycosylée faible en Ala et abaissée en Hyp. Pré- sence de glucosamine.
VIII	[α_1 (VIII)] ₃ 540 000 ou 183 000 daltons 450 nm interrompu ou 150 nm	Culture de cellules endothé- liales. Membrane de Des- cemet, périchondre, os, cartilage.	Riche en 3 Hyp, en Hyl glycosy- lée. Pas de ponts disulfures mal- gré la forte teneur en Cys. Très sensible aux protéases.

Tableau 3 : Les différents collagènes du cartilage (présence certaine ou suspectée)
(d'après Petit, 1989)

notre étude bibliographique, à l'étude des collagènes essentiels du cartilage articulaire à savoir les collagènes de types II, IX, X, VI et XI

I.4.2.1 Le collagène de type II

Environ 95% des collagènes présents dans le cartilage articulaire adulte sont des collagènes de type II. Il est également présent dans quelques autres tissus comme l'humeur vitrée, la notochorde ou le *nucleus pulposus*. Le collagène de type II (CII) appartient aux molécules de classe I ; il forme des fibrilles responsables de l'architecture basale.

C'est un homotrimère de trois chaînes polypeptidiques $\alpha 1(\text{II})$ identiques (PM=95kDa)(figure 9a), produit d'un seul gène, COL2A1 [Eyre,1991]. Ses dimensions moléculaires et sa forme, structure périodique (67nm) des fibrilles caractérisée par une alternance de bandes sombres et de bandes claires, ressemblent à celle des collagènes de type I et III (figure 9b).

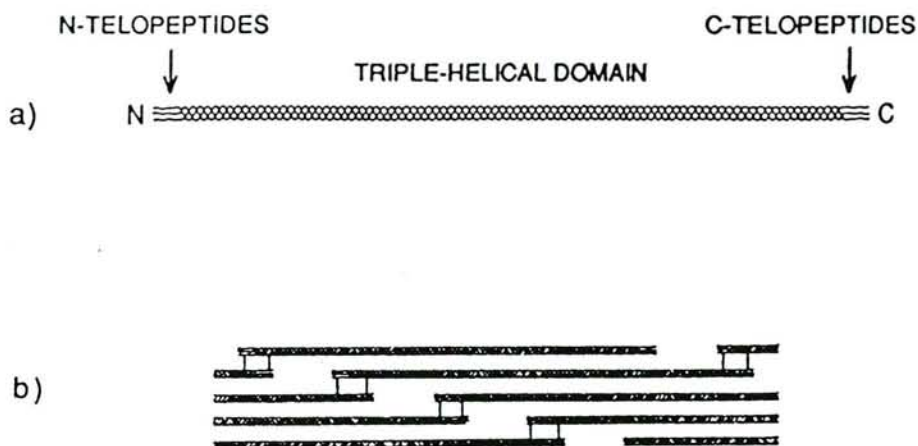


Figure 9 : a) structure de la molécule de collagène de type II et b) juxtaposition latérale des molécules de collagène de type II (300nm) décalées de 67nm dans le polymère avec ses cross-link. (d'après Eyre, 1991)

Les chaînes sont synthétisées et sécrétées en tant que précurseurs (procollagène) dont les domaines non collagéniques N- et C-terminaux sont éliminés par des enzymes (N- et C-protéinases) avant que la molécule ne soit incorporée dans la matrice extracellulaire. Les propeptides (35kDa) de procollagène de type II à l'extrémité C-terminale (anciennement appelés "chondrocalcine") sont libérés durant ce processus et peuvent servir de marqueur de l'anabolisme du collagène par les chondrocytes. La chondrocalcine se lie aussi avec une grande affinité aux cristaux d'hydroxyapatite et intervient dans les processus de calcification. Lorsque les molécules de collagène sont extraites de la cellule, elles forment des

fibrilles dans la matrice extracellulaire. Dans le cartilage articulaire adulte, le collagène de type II forme des arcades composées de fibrilles plus épaisses dans les couches profondes des tissus et de fibrilles fines arrangées horizontalement à la surface du tissu [Clark,1990 ; Aydelote,1988].

Le réseau de fibrilles de collagène de type II est responsable de la résistance à la traction et à la compression du cartilage ainsi que du maintien de la forme et du volume tissulaires. Cette résistance est renforcée par les liaisons intermoléculaires et covalentes appelées "cross-link" entre les collagènes de type II [Eyre,1988]. Les résidus hydroxylysyl pyridinoline sont les principaux résidus participant aux cross-link et constituent des marqueurs spécifiques du catabolisme du collagène de type II dans le liquide synovial. Les résidus de lysine ou d'hydroxylysine participent au lien unissant deux unités de collagène pour former la fibrille puis la fibre de collagène. La lysine doit avoir subi au préalable une désamination oxydative de sa fonction aminée formant au niveau du carbone 6 une fonction aldéhyde. L'oxydation de la lysine met en jeu la lysyl-oxydase dont l'activité est dépendante de la présence du cuivre et accessoirement de la vitamine B6. La fonction aldéhyde peut réagir avec la fonction amine d'une autre lysine ou d'une hydroxylysine placée à distance convenable par l'étagement de deux molécules de collagène. La liaison qui se forme est une liaison imine qui va ensuite subir des transpositions pour former des liaisons intermoléculaires plus stables [Frey,1991]. Les liaisons intermoléculaires assurent la solidité et la résistance mécanique des fibres sans lesquelles une atteinte pathologique survient. Les "cross-link" augmentent avec l'âge.

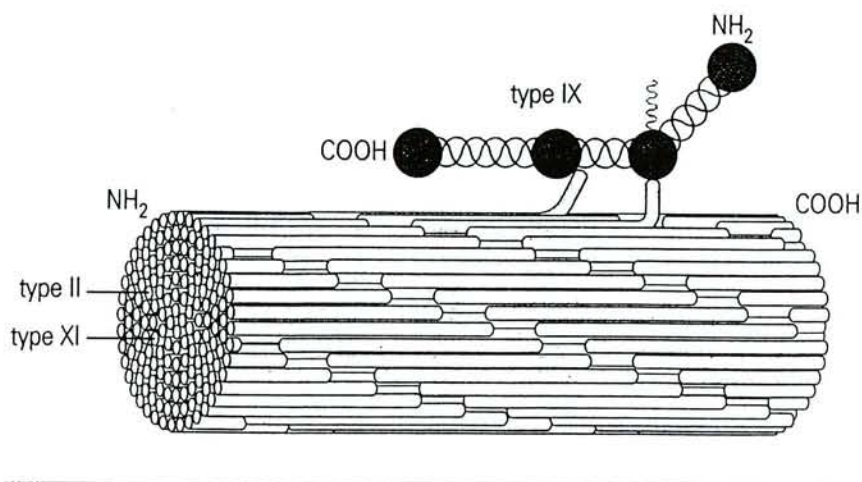


Figure 10 : Interactions des collagènes de type IX et XI avec les fibrilles de collagènes de type II (d'après Eyre, 1991)

Les collagènes de type IX et XI contribuent également à l'organisation et la stabilité mécanique du réseau de collagène de type II (*figure 10*).

I.4.2.2 Les collagènes mineurs

a) Le collagène de type XI

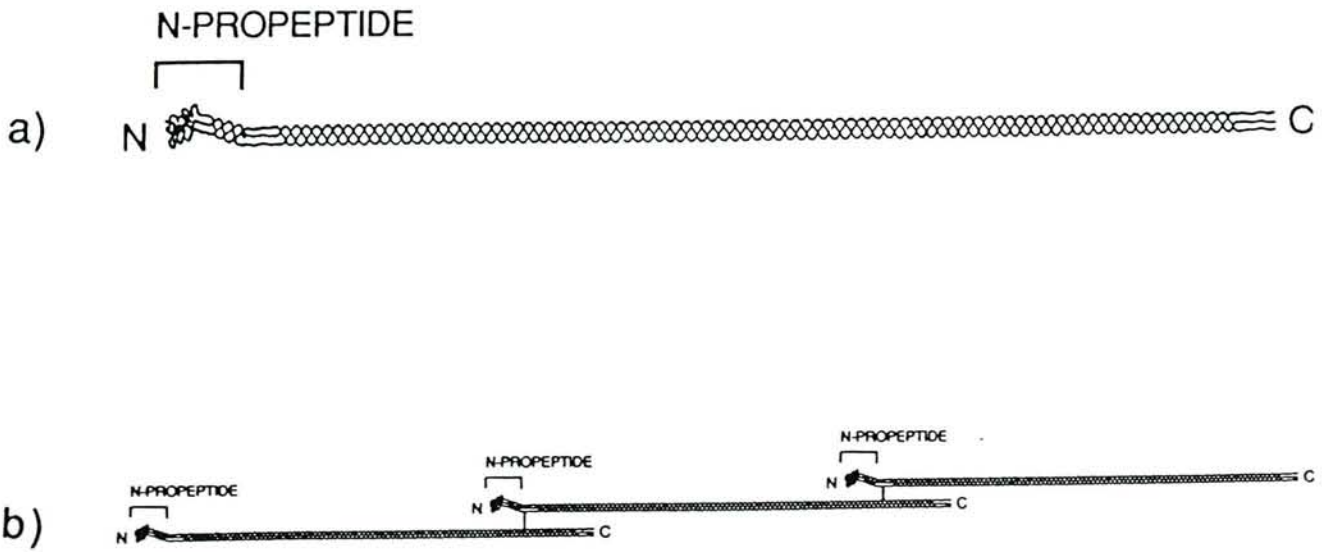


Figure 11: a) structure de la molécule de collagène de type XI et b) forme polymérique basée sur la position des cross-link. A la différence des collagènes de type I et II, les domaines propeptidiques N-terminaux sont maintenus dans la forme active de la molécule (d'après Eyre, 1991)

Appartenant à la classe I, le collagène de type XI (CIX) est un hétérotrimère composé de trois chaînes différentes : $\alpha 1(XI)$, $\alpha 2(XI)$, $\alpha 3(XI)$ [Morris,1987]. Les chaînes $\alpha 1(XI)$ et $\alpha 2(XI)$ ont une forte homologie avec les chaînes $\alpha 1(V)$ et $\alpha 2(V)$ mais proviennent d'un gène différent alors que la chaîne $\alpha 3(XI)$ est très proche de la chaîne $\alpha 1(II)$ du collagène de type II et provient du même gène. Initialement on considérait que le collagène de type XI ne se trouvait que dans les tissus cartilagineux (2-3% du collagène total) mais une étude a démontré sa présence dans le tissu osseux bovin [Niyibizi,1989]. Le collagène de type XI pourrait moduler le diamètre des fibrilles de collagène de type II. Comme les autres molécules de classe I, les polymères de collagène de type XI sont liés par des "cross-link" grâce à l'action de la lysyl-oxydase (*figure 11b*). Les principales liaisons intermoléculaires concernent des molécules de type XI entre elles, mais quelques liaisons hétérotypiques ont été observées entre les molécules de type XI et II [Mendler,1989]. Le collagène de type XI formerait initialement un

homopolymère (de très fines fibrilles) qui serait étroitement associé et semblerait fusionner avec les fibrilles de collagène de type II (*figure 10*) [Mayne,1993].

b) Le collagène de type IX

Le collagène de type IX (CIX) représente environ 1% des protéines collagéniques du cartilage articulaire humain et approximativement 10% des collagènes du cartilage fœtal. Sa quantité diminue parallèlement à la maturité du cartilage. Cette molécule appartient à la classe III (courtes hélices) et au groupe des collagènes associés à des fibres avec triples hélices interrompues (FACIT : fibril-associated collagens with interrupted triple helices).

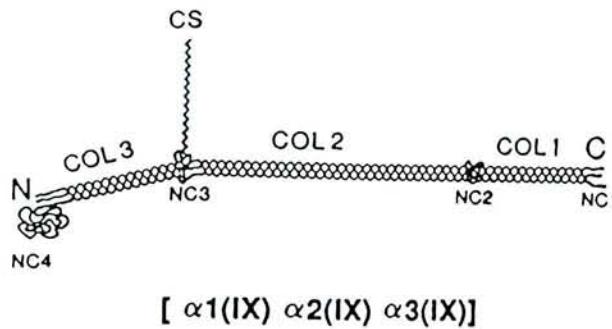


Figure 12 : Composition et structure de la molécule de collagène de type IX montrant les 3 domaines collagéniques (COL 1,2,3) séparés par les 4 domaines non collagéniques (NC 1,2,3,4) ainsi que le site d'attache de la chaîne de GAG sur la chaîne $\alpha 2(\text{IX})$ du domaine NC3. (d'après Eyre, 1991)

La molécule apparaît comme un hétérotrimère de trois chaînes distinctes de masse moléculaire 70kDa [$\alpha 1(\text{IX})$, $\alpha 2(\text{IX})$, $\alpha 3(\text{IX})$]. Elle possède trois domaines tri-hélicoïdaux (domaines collagéniques COL1, COL2, COL3) et quatre domaines non hélicoïdaux (domaines non collagéniques NC1, NC2, NC3, NC4) (*figure 12*). Le collagène de type IX est aussi un protéoglycane avec une chaîne de chondroïtine sulfate rattachée à une sérine de la chaîne $\alpha 2(\text{IX})$ du domaine NC3 [Mayne,1993]. Le collagène de type IX forme un coude accentué à la hauteur du domaine NC3. Il s'agit donc d'un collagène tout à fait particulier qui appartient à la fois à la famille des collagènes et à celle des protéoglycanes. Le CIX se distribue le long de la surface des fibres de collagène de type II (CII) comme l'ont montré les expériences d'ombrage rotatif [Vaughan,1988; Eyre,1987]. Il est lié de façon covalente par l'extrémité N-terminale de la chaîne $\alpha 2(\text{IX})$ du domaine COL2 au télopeptide amino-terminal non collagénique de CII (*figure 10*) ; de récentes études ont identifié des "cross-link" entre les segments hélicoïdaux de CIX et les télopeptides de CII [van der Rest,1989]. Ainsi l'ensemble CII-CIX formerait des fibres en forme d'écouvillon, dont les domaines NC4 et COL3 de CIX seraient les parties projetées vers l'extérieur qui

pourraient interagir avec les chaînes polyanioniques des GAG présentes au sein des mailles de ce réseau collagénique [Vaughan,1988].

Le CIX est localisé aux intersections des fibrilles et a pour fonction de stabiliser ce réseau de fines fibres de collagène. Il limite le diamètre des fibrilles et limite ainsi la croissance latérale des fibrilles. Cela correspondrait bien aux observations selon lesquelles les fines fibres de la matrice péricellulaire sont riches en collagène de type IX par rapport aux grandes fibres inter-territoriales. De plus, les cartilages qui contiennent beaucoup de fines fibres (comme le cartilage embryonnaire) apparaissent plus riches en collagène de type IX que les cartilages qui contiennent des grosses fibres. Dans les modèles d'étude du cartilage, le type IX est toujours disposé parallèlement aux fibres de type II. Sa présence à la surface des fibres du CII pourrait être un facteur important de régulation de l'agrégation fibrillaire contrôlant le diamètre des fibres [Mayne,1989]. De plus, la participation du CIX est impliquée dans le développement des arthrites rhumatismales ; il stimule la production de PGE2 et d'interleukine-1 par les macrophages [Dayer,1986], et des anticorps de CIX ont été retrouvés chez des patients atteints d'arthrite [Charrière,1988].

c) Le collagène de type VI

De petites quantités de collagène de type VI (0 à 1% du collagène total), molécule représentative de la classe III (molécules à courtes hélices), ont été découvertes dans le cartilage [Eyre,1991 ; Mayne,1989]. Il est constitué d'un court domaine en triple hélice entouré de grands domaines globulaires aux deux extrémités de la molécule. Ce collagène forme des microfibrilles distinctes qui s'agrègent (110nm de périodicité) et semble être spécifiquement concentré dans la matrice capsulaire entourant le chondrocyte [Poole,1988]. Une augmentation du collagène de type VI a été observée dans les zones inter-territoriales des cartilages arthrosiques chez l'homme et l'animal [McDevitt CA,1988]

d) Le collagène de type X

C'est un homotrimère [$\alpha 1(x)$]₃ qui appartient à la classe III (molécules à courtes hélices). Il représente environ 1% du collagène total. Son domaine hélicoïdal représente moins de la moitié de celui du collagène de type II. La molécule dans sa forme native comporte un domaine globulaire non collagénique à son extrémité C-terminale et des séquences non hélicoïdales plus courtes à l'extrémité N-terminale. Dans le cartilage articulaire, la synthèse du collagène de type X se déroule uniquement dans les chondrocytes hypertrophiques de la zone de cartilage calcifiée à un taux relativement constant. Il semble avoir un rôle dans le développement du cartilage de croissance et dans la calcification du cartilage [Eyre,1992 ; Mayne,1993].

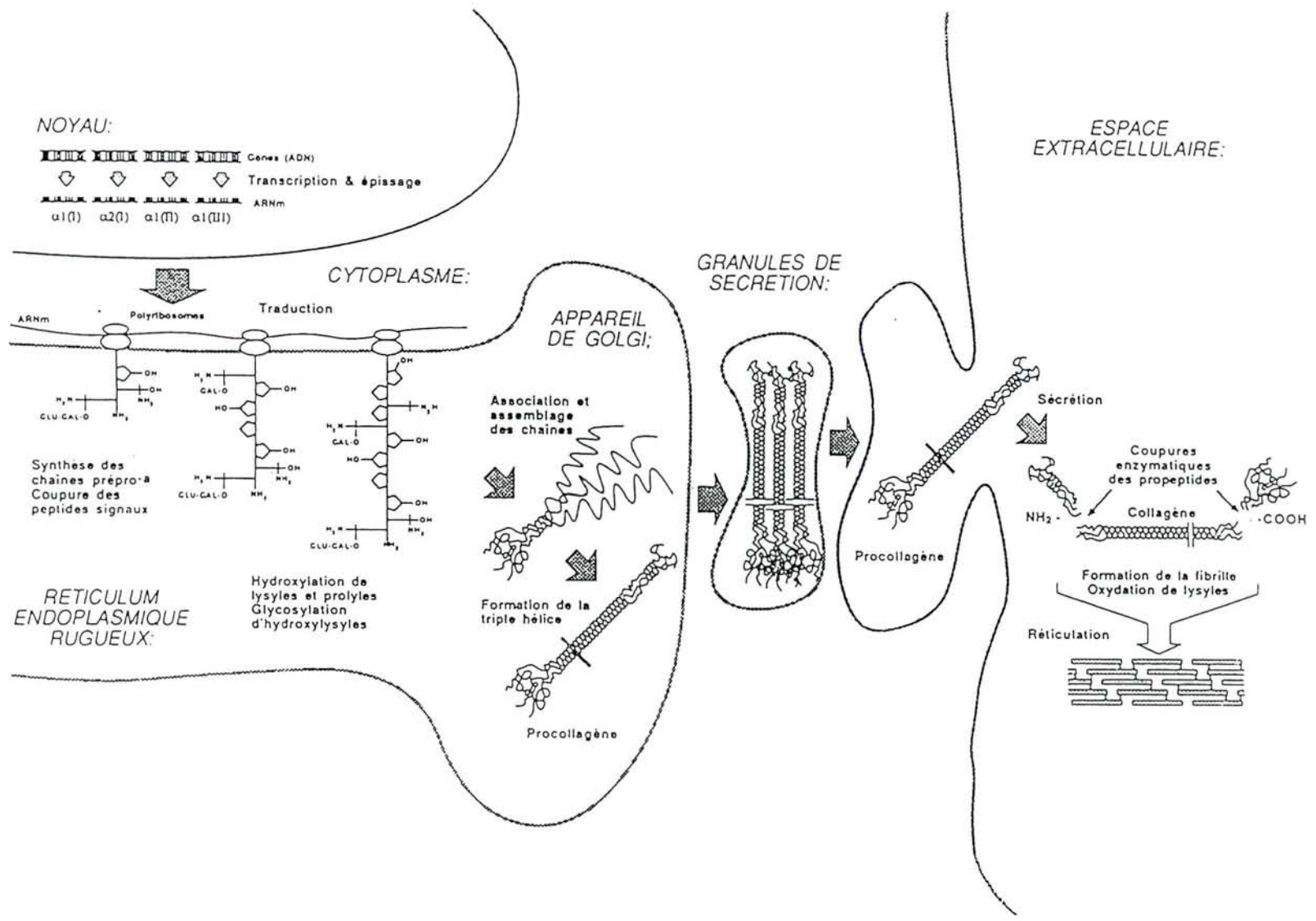
I.4.2.3 Biosynthèse du collagène

La synthèse des collagènes (*figure 13*) comporte de nombreuses étapes post-transcriptionnelles, qui semblent similaires pour tous les types de collagènes mais sont surtout bien documentées pour les collagènes fibrillaires majeurs (I, II et III).

Les acides aminés nécessaires à la synthèse sont prélevés par les chondrocytes et synthétisés dans le réticulum endoplasmique pour former des chaînes polypeptidiques. Certains AA comme la proline et l'hydroxyproline, sont hydroxylés à un moment où les chaînes polypeptidiques sont encore attachées aux ribosomes. Cette hydroxylation est indispensable pour la constitution de la triple hélice. Parallèlement à l'hydroxylation (ou peu après), la glycosylation de quelques résidus hydroxylsyles (du galactose et du glucose) se produit. Les galactosyl- et glucosyl- transférases catalysent le transfert du galactose et du glucose. La glycosylation semblerait nécessaire à l'excrétion du procollagène hors de la cellule. Après avoir pris sa conformation en triple hélice, la molécule de procollagène passe du REG au réticulum endoplasmique lisse puis aux vésicules de l'appareil de Golgi, d'où elle est sécrétée dans la matrice extracellulaire. Une procollagène N-protéinase clive le propeptide N-terminal et une procollagène C-protéinase distincte coupe le propeptide C-terminal. On obtient un monomère de collagène. Ces monomères s'assemblent spontanément en fibrilles à 37°C. Une microfibrille (ou filament) comprenant cinq molécules de collagène se forme (réticulation), puis d'autres molécules viennent s'ajouter sur ce noyau primordial assurant la croissance en longueur de la microfibrille. L'assemblage latéral des molécules de collagène se fait de façon telle que chaque molécule est décalée d'un quart de sa longueur par rapport à la molécule voisine, ce qui explique la striation périodique caractéristique observée en microscopie électronique de 640 Å°.

Les fibres de collagène vont subir une lente maturation qui les rendra insolubles grâce à la formation de nombreux "cross-links" entre les 3 chaînes polypeptidiques (niveau intramoléculaire) et entre les molécules de tropocollagène elles-mêmes (niveau intra-fibrillaire). Ces "cross-links" font intervenir la formation d'aldéhyde à partir de l'hydroxylysine qui entre en rapport avec l'hydroxylysine d'une molécule voisine. Les fibres de collagène ne sont pratiquement plus synthétisées chez l'homme adulte ; le turn-over du collagène du cartilage de la tête fémorale de l'adulte est de l'ordre de 400 ans.

Figure 13 : Biosynthèse du collagène de type I
(D'après van der Rest, 1987)



I.4.2.4 Dégradation du collagène

La demi-vie du collagène de type II est estimée à quelques années. Elle est due en grande partie au fait que la protéine fibreuse possède une conformation en triple hélice, résistante à la plupart des protéases (exception faite des collagénases). La présence de nombreuses liaisons intra et inter-moléculaires et l'épaisseur des fibrilles contribuent à une protection plus grande y compris vis-à-vis de la collagénase. La demi-vie et le turn-over des collagènes mineurs sont mal connus [Kuettner,1993]. La dégradation débute généralement par le clivage de la molécule par des collagénases spécifiques actives à pH neutre. L'attaque initiale de ces collagénases survient à un point situé aux 3/4 environ de la molécule. Les fragments (3/4 et 1/4) obtenus sont ensuite dégradés par des protéases non spécifiques telles que la stromélysine et la gélatinase.

I.4.3 LES GLYCOPROTEINES

Comme nous l'avons décrit précédemment, le cartilage articulaire est essentiellement composé d'eau, de protéoglycanes et de collagène. Il renferme également des glycoprotéines qui ne sont ni collagéniques, ni protéoglycaniques. Elles sont maintenant référencées comme les protéines du cartilage et le rôle de la plupart d'entre elles demeure inconnu.

I.4.3.1 La protéine de liaison "link protein"

Cette protéine particulière a été évoquée lors de la description des agrécane puisqu'elle sert de lien entre le monomère de protéoglycane et l'acide hyaluronique. Trois types de protéines de liaison (LP) ont été identifiées [Caterson,1985] de poids moléculaires respectifs de 41(LP3), 44(LP2), et 48(LP1)kDa. Elles proviennent toutes d'un même gène et diffèrent principalement par leur degré de glycosylation. La plus petite des trois (LP3) semble provenir du clivage de la plus volumineuse (LP1).

La structure de la LP est complexe. La séquence d'acides aminés de cette protéine est assez proche (avec des régions homologues) de celle de la protéine porteuse de l'agrécane, ce qui fait penser qu'elles proviennent de l'évolution d'un gène commun. Les LP et la partie N-terminale (se fixant à l'acide hyaluronique) de l'agrécane présentent une structure secondaire (*figure 7*) rappelant celles des immunoglobulines. Une molécule de protéine de liaison se lie à une molécule de protéine porteuse et à une molécule d'acide hyaluronique. Les études sur le chondrosarcome de rat ont montré que le chondrocyte sécrète un monomère de protéoglycane associé à une protéine de liaison. Ce complexe se lie ensuite à l'acide hyaluronique pour former un agrégat dans la matrice extracellulaire. La

PROTÉINE	P.M (daltons)	LOCALISATION	FONCTION
Protéine de liaison ("Link protein")	41000-48000	Cartilage, vaisseaux sanguins, synoviale, cerveau, etc.	Réunit acide hyaluronique et protéoglycanes, stabilise les agrégats, protège les PG de la protéolyse.
Chondronectine	180000	Cartilage, sérum.	Adhésion des chondrocytes au collagène de type II, aux surfaces.
Fibronectine	220000-250000 (sous-unités)	Foie, cartilage, etc.	Adhésion des cellules aux molécules, aux surfaces.
CGMP	550000 (sous-unités 100000-116000)	Cartilage, oeil.	Inconnue.
Thrombospondine	420000-450000	Cartilage, plaquettes, etc.	Adhésion, lie le calcium.
Anchorine CII	34000	Cartilage.	Se lie au collagène II.
S-100	21000	Plaque de croissance, tumeurs du cartilage, système nerveux central.	Lie le calcium, agirait sur la calcification de la matrice.
Facteur de croissance du cartilage	18000-20000	Cartilage.	Stimule la synthèse d'ADN, lie l'héparine.
Inhibiteur de l'angiogénèse		Cartilage.	Inhibe la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.
Facteur(s) anti-invasif(s)	2000-50000	Cartilage.	Inhibe la collagénase et la prolifération cellulaire.
CMP	148000(sous-unités 58000)	Cartilage non articulaire.	Inconnue.
Protéine de 59 kDa	59000	Cartilage, tissu mésenchymateux.	Se lie au collagène.
Protéine de 54 kDa	54000	Cartilage, tendon.	Se lie au collagène II.
Protéine de 36 kDa	36000	Cartilage.	Inconnue.
Chondrocalcine	70000 (sous-unités 35000)	Cartilage.	Extrémité C-terminale du collagène II, calcification de la plaque de croissance.
Molécules de la surface membranaire	Divers	Cartilage.	Récepteurs à hormones, cytokines, facteurs de croissance, etc.
Protéines structurales		Cartilage.	Inconnue.
Protéines de 69 kDa	35000	Cartilage, nucléus pulposus	minéralisation

Tableau 4 : Principales glycoprotéines non collagéniques et non protéoglycaniques du cartilage (D'après Fife, 1993)

LP se fixe de façon non covalente à un site spécifique voisin de l'extrémité N-terminale de la protéine porteuse et à l'acide hyaluronique ; elle stabilise ainsi la liaison entre les PG et l'AH, la protégeant des variations du milieu (pH, température, contraintes mécaniques, solvants...). La LP se lie également, de façon non covalente, au collagène de type II et participe ainsi à une plus grande stabilité de la matrice cartilagineuse. L'existence dans l'arthrose de modifications de l'agrégation des PG a conduit à rechercher des anomalies des LP, mais il n'a pas été possible de mettre en évidence des différences entre les LP provenant du cartilage arthrosique et celles du cartilage normal [Neame,1993].

1.4.3.2 Chondronectine

C'est une glycoprotéine à pont disulfure de poids moléculaire 180kDa (sous-unités de 70kDa) synthétisée en petites quantités par les chondrocytes. Les études en immunofluorescence révèlent que la chondronectine est davantage associée à la surface du chondrocyte qu'à la matrice extracellulaire [Hewitt,1982]. La chondronectine stimule l'adhésion des chondrocytes aux parois des puits de culture ; elle favorise également la fixation des chondrocytes aux fibres de collagènes de type II, cette fixation étant inhibée par des anticorps anti-chondronectine. Cette action est doublement spécifique puisque d'une part, la chondronectine ne l'exerce pas sur d'autres cellules que les chondrocytes (ni sur les fibroblastes, ni sur les cellules épithéliales), et que, d'autre part, ni la fibronectine, ni la laminine ne stimulent l'attachement du chondrocyte.

Des études récentes ont montré que les taux de chondronectine dans les liquides synoviaux de patients atteints d'arthrite étaient légèrement plus élevés (différence non significative) que ceux des patients atteints d'arthrose. Les taux plasmatiques étant plus élevés que les taux dans le liquide synovial, on peut suspecter une origine plasmatique pour la fibronectine dont les augmentations de concentration se rencontrent lors d'une inflammation synoviale [Carsons,1988].

1.4.3.3 La fibronectine

La fibronectine est une volumineuse glycoprotéine constituée de sous-unités de poids moléculaires apparents de 220 à 250kDa, présente dans de nombreux tissus et dans le sang circulant. La majorité de la fibronectine est synthétisée par le foie, mais les chondrocytes en produisent également en petites quantités [Brown,1990]. Les fibronectines des différents tissus ont des compositions similaires, de même que leur structure secondaire et tertiaire ; toutefois il existe de petites différences quant à leur poids, leur solubilité et certains de leur effets. La fibronectine plasmatique n'existe apparemment qu'à l'état de dimère, alors que la fibronectine cellulaire constitue également des polymères.

La fibronectine est une molécule complexe comprenant plusieurs domaines ayant des fonctions distinctes. Différentes régions de la fibronectine se lient à des molécules diverses telles que le collagène, l'héparine, la fibrine, l'acide hyaluronique et des constituants de la membrane cellulaire. La fibronectine a été appelée "le prototype de la molécule d'adhésion entre cellule et substrat" car elle est impliquée dans l'attachement de nombreuses cellules à diverses protéines et supports [Yamada,1983]. Dans le cartilage, la fibronectine participe aux interactions entre le chondrocyte et la matrice extracellulaire, notamment les protéoglycanes. Elle intervient comme un foyer de chondrogénèse au cours du développement des membres. Il était admis jusqu'à une période récente que la fibronectine liait aussi les chondrocytes au collagène ; en fait, il semble qu'elle ne puisse se fixer au collagène de type II, qui est le principal collagène articulaire alors qu'elle se lie au collagène de type III, auquel elle peut fixer les fibroblastes (ailleurs que dans le cartilage). La fibronectine est présente aussi bien à la surface cellulaire que dans la matrice extracellulaire de tous les tissus où elle est trouvée. Les études métaboliques du cartilage ont montré que les chondrocytes de patients arthrosiques synthétisaient davantage de fibronectine que les chondrocytes du cartilage normal. Des taux sériques élevés de fibronectine ont également été rapportés chez les chiens arthrosiques [Jones,1987 ; Lust,1980].

I.4.3.4 CGMP "Cartilage Matrix GlycoProtein"

D'un poids moléculaire de 550kDa, avec des sous-unités d'environ 116kDa [Fife,1984], cette molécule est vraisemblablement identique à celle décrite par Heinegard sous le nom de "Cartilage Oligomeric Matrix Protein" (COMP), sans pourtant que des preuves formelles de cette identité aient été publiées. Elle représente environ 10% des protéines non collagéniques et non protéoglycaniques du cartilage articulaire adulte et possède une demi-vie dans le cartilage sain de 48-72 h. Sa fonction est inconnue mais il semble qu'elle soit associée à la surface cellulaire. Dans le cartilage arthrosique, elle apparaît fragmentée et il se forme des peptides immunoréactifs de poids moléculaires apparents de 60 à 70kDa ; la CGMP peut être détectée dans le sérum et le liquide synovial de chiens et de patients arthrosiques [Fife,1989].

I.4.3.5 Autres glycoprotéines

a) CMP "Cartilage Matrix Protein"

Une protéine trimérique de poids moléculaire 148kDa peut être extraite du cartilage trachéal et du septum nasal de bovins et a été détectée par certains auteurs dans les disques intervertébraux mais jamais dans le cartilage articulaire [Paulsson,1982]. Les sous-unités de 58kDa sont appelées CMP. Sa fonction est

inconnue ; elle a été retrouvée dans le sérum de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde sans que la signification en soit connue.

b) Trombospondine

De récentes études ont montré que cette glycoprotéine de la surface cellulaire dont le poids moléculaire est de 420-450kDa est synthétisée par les chondrocytes [Miller,1988]. La thrombospondine, initialement décrite dans les plaquettes, joue un rôle important dans l'adhésion cellulaire et a été trouvée dans diverses cellules, telles les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules musculaires, les ostéoblastes et les cellules transformées. Elle comprend de nombreux domaines qui peuvent lier différentes molécules telles le calcium, la fibronectine, le fibrinogène, les glycolipides sulfatés et l'héparine. Dans le cartilage, elle peut être associée aux phénomènes de minéralisation et d'interaction cellulaires.

c) Anchorine CII

L'anchorine est une glycoprotéine de 34kDa qui se lie spécifiquement au collagène de type II [Fernandez,1988]. Elle se situe à la surface du chondrocyte où elle constitue un récepteur au collagène de type II [von den Mark,1985].

d) Protéine S100

C'est une protéine acide de PM 21kDa constituée de deux sous-unités. Son nom est dû à sa solubilité dans le sulfate d'ammonium en solution saturée à 100%. A l'origine, isolée du système nerveux central, elle a été également identifiée dans le cartilage (zone hypertrophique du plateau épiphysaire de croissance et tumeur cartilagineuse) [Weiss,1986]. Sa situation à proximité des zones de calcification de la matrice cartilagineuse suggère un rôle dans les processus de calcification. Une étude récente [Chen,1990] dans le cartilage arthrosique a montré sa présence en quantité plus abondante dans les ostéophytes et dans les zones de destruction cartilagineuse.

e) Facteur de croissance du cartilage "Cartilage Growth Factor"

D'un poids moléculaire de 18 à 20kDa [Sullivan,1985], cette protéine a été purifiée à partir du cartilage bovin et son activité a pu être mesurée dans des chondrocytes isolés ; cependant, sa synthèse par les chondrocytes n'a pas été rapportée et on ne peut donc exclure une contamination par un facteur de croissance d'origine exogène des échantillons de cartilage où elle a été retrouvée. Le facteur de croissance du cartilage stimule la synthèse d'ADN des chondrocytes et des fibroblastes 3T3.

f) *Inhibiteur de l'angiogénèse*

Cette molécule a été mise en évidence à la suite d'études montrant que le cartilage intact résistait à l'invasion vasculaire tandis qu'il perdait cette résistance après traitement par le chlorure de Guanidium (GuCl) ; des implants cartilagineux permettent même d'inhiber la néovascularisation de la cornée carcinomateuse de lapin. Ceci a conduit à rechercher au sein du cartilage un facteur inhibant l'angiogénèse. Cette protéine dont le poids moléculaire n'est pas encore défini a été purifiée initialement dans le cartilage de requin [Lee,1983] ; elle est également présente dans celui des mammifères mais à concentrations plus faibles. Le mécanisme par lequel cette protéine inhibe l'angiogénèse est inconnu mais elle ne semble pas agir comme inhibiteur de la trypsine ou de la collagénase.

g) *Facteurs anti-invasifs*

Leurs poids moléculaires sont estimés de l'ordre de 2 à 50kDa [Wezeman,1982]. Ils paraissent être impliqués dans la protection du cartilage contre les métastases tumorales. Inhibant l'activité collagénase et la prolifération cellulaire, ils peuvent servir de mécanisme naturel protégeant le cartilage de la dégradation enzymatique. D'après leur fonction, leur poids moléculaires, et les réactions immunologiques croisées, ils appartiennent à la famille des inhibiteurs de collagénase décrits par Kuettner ; ils peuvent aussi être rattachés à celles des TIMP (Inhibiteur Tissulaire des MétalloProtéinases).

h) *Protéine de 69kDa*

Cette glycoprotéine constituée de deux sous-unités (PM apparent de 35kDa) et possédant deux ponts disulfures est un composant majeur de la zone hypertrophique du cartilage épiphysaire bovin [Choi,1983]. Fortement liée à l'hydroxyapatite, c'est dans le cartilage de croissance que sa concentration est la plus élevée, et on pense qu'elle est impliquée dans la minéralisation durant l'ossification endochondrale. Elle a toutefois également été trouvée dans le *nucleus pulposus* chez l'adulte où la minéralisation n'apparaît pas dans les conditions normales.

i) *Protéine de 59kDa*

Une protéine de 59kDa se fixant au collagène a été décrite [Heinegard,1988] ; elle a été trouvée dans le cartilage et d'autres tissus mésenchymateux et paraît être synthétisée par les chondrocytes et les fibroblastes. Elle semble être la protéine porteuse de la fibromoduline. Elle se lie au collagène dont elle peut inhiber la formation des fibrilles.

j) Protéine de 54kDa

Elle a été identifiée dans le cartilage de chondrosarcome de rat Swarm [Chandrasekhar,1986]. Elle se fixe au collagène de type II natif et dénaturé. Quand cette protéine est ajoutée au collagène de type II et aux protéoglycanes, de petites fibrilles de collagène typiques du cartilage hyalin se forment, suggérant que cette protéine contribue à l'organisation de la matrice cartilagineuse.

k) Protéine de 36kDa

Composée d'une chaîne polypeptidique riche en leucine, elle est retrouvée dans le cartilage bovin articulaire et non articulaire [Paulsson,1984]. Sa quantité semble augmenter avec l'âge mais sa fonction demeure mystérieuse.

l) Chondrocalcine

Le propeptide C-terminal du collagène de type II a été initialement décrit comme une protéine cartilagineuse indépendante sous le nom de "chondrocalcine", avant que ne soit établie sa relation avec le collagène. Il s'agit d'un dimère de 70kDa qui paraît impliqué dans la calcification de la plaque de croissance fœtale. Sa synthèse par le cartilage est stimulée par la vitamine D. Une étude récente [Shinmei,1989] a montré des taux élevés de chondrocalcine dans le liquide synovial de patients arthrosiques ; un résultat analogue avait déjà été trouvé chez le chien arthrosique. Certains auteurs ont proposé cette molécule, qui est clivée lors de la formation de la fibrille collagénique, comme marqueur de la réparation cartilagineuse [Heinegard,1991].

m) Molécules de la surface membranaire

Des récepteurs membranaires d'un grand nombre de molécules ont été décrits dans les chondrocytes, tout comme dans les autres cellules. Il existe ainsi des récepteurs pour le collagène, l'élastine, la laminine, la fibronectine, les protéoglycanes, diverses hormones, des facteurs de croissance et des cytokines, notamment les interleukines. Parmi les autres molécules de surface trouvées sur les chondrocytes, notons la présence de phosphatase alcaline et les antigènes HLA-A, -B, -C [Fife,1993].

n) Protéines de structure

Comme dans tous les tissus, des protéines de structure ont été trouvées dans le cartilage ; on a ainsi décrit les glycoprotéines A et G, toutes deux insolubles, comme le sont souvent les protéines de structure. Elles paraissent s'associer aux lipides intercellulaires et ont été identifiées à la surface des fibres de collagène, mais leur fonction demeure inconnue [Shipp,1975].

I.4.3.6 Perspectives

De nombreuses glycoprotéines qui peuvent être identifiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à partir d'extraits cartilagineux n'ont pas encore été caractérisées. L'identification de ces fonctions pourrait également améliorer notre compréhension de l'organisation du cartilage et de la régulation de la synthèse protéique au sein de ce tissu. Dans l'arthrose et d'autres affections, les altérations des protéines cartilagineuses (protéases, récepteurs membranaires...) jouent un rôle dans la progression de la détérioration cartilagineuse, et la possibilité de modifier la synthèse protéique pourrait, dans le futur, constituer une modalité thérapeutique intéressante.

I.4.4 L'ACIDE HYALURONIQUE

I.4.4.1 Structure de l'Acide Hyaluronique (AH)

L'acide hyaluronique (ou hyaluronane) est un polysaccharide linéaire constitué par un enchaînement alternatif de deux disaccharides de base (ou acide hyalobiuronique) : le N-acétyl-D-glucosamine et l'acide D-glucuronique reliés entre eux par une liaison $\beta(1-3)$ glucuronidique. Les molécules d'acide hyalobiuronique s'enchaînent les unes aux autres par des liaisons $\beta(1-4)$ glucosaminidiques pour former un homopolymère de masse moléculaire variable selon les tissus (10^4 à 10^7 Da).

Le hyaluronane est un constituant essentiel du cartilage et de la matrice interstitielle du tissu conjonctif. Dans le cartilage, le hyaluronane forme avec les agrécans des complexes de masse moléculaire élevée (cf paragraphe I.4.1). Dans le cartilage normal, environ 75% des agrécans vont s'agréger autour d'une chaîne de hyaluronane (*figure 14*), les molécules se disposant régulièrement de part et d'autre de la chaîne pour former une macromolécule de masse moléculaire relative supérieure à 100kDa [Hardingham,1972]. La taille de ce complexe macromoléculaire dépend de la longueur de la chaîne de hyaluronane et du nombre d'agrécans disponibles. Chaque agrécane nécessite 5 à 10 unités disaccharidiques pour sa fixation et, bien qu'elles soient plus grandes dans leur forme native, les chaînes de hyaluronane isolées de la plupart des cartilages humains ont une masse moléculaire relative comprise entre 3 et 6×10^5 kDa. La longueur de cette chaîne n'est donc pas le facteur limitant, et la taille des agrégats est proportionnelle à la quantité de protéoglycans sachant que des contraintes stériques imposent 30 à 60 molécules d'acide N-acétylhyalobiuronique entre deux agrécans adjacents. Les liaisons ne sont pas covalentes et sont stabilisées par la protéine de liaison qui est capable de se lier conjointement au hyaluronane par sa

séquence répétitive et aux agrécanes par une interaction impliquant sa séquence "immunoglobuline-like". Cette protéine "vérouille" littéralement les protéoglycanes sur la chaîne de hyaluronate et confère aux agrégats une stabilité accrue à pH neutre, à température élevée (<50°C) et en présence d'une solution dénaturante d'urée [Hardingham,1979].

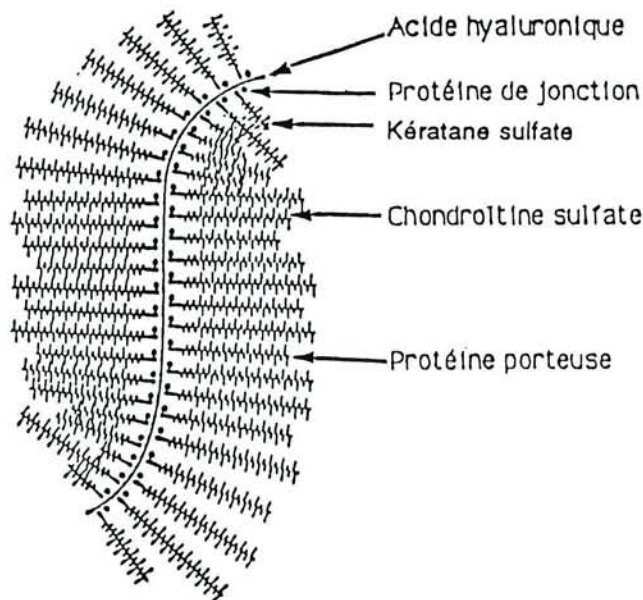


Figure 14 : Structure des complexes macromoléculaires entre les agrécanes et le hyaluronate (d'après Rosenberg, 1989)

I.4.4.2 Rôles de l'acide hyaluronique

Le hyaluronate a un intérêt potentiel en pathologie ostéo-articulaire qui est justifié par ses nombreuses propriétés. En effet, le hyaluronate, synthétisé par les synovioblastes de type B "fibroblastes cell like" [Simkin,1989] et accessoirement par les chondrocytes, assure la lubrification de la cavité articulaire où il est présent en grande quantité [Bothner,1987]. Le hyaluronate permet l'agrégation des agrécanes au sein du cartilage articulaire [Hardingham,1972] et son passage dans la circulation générale par drainage lymphatique peut témoigner de ses variations physiopathologiques dans l'articulation. De plus, sa production est stimulée *in vitro* par les cytokines pro-inflammatoires (IL1, IL6, TNF α , IFN γ) et certains facteurs de croissance (TGF β , EGF, FGF, PDGF) qui sont impliqués dans la physiopathologie de nombreuses affections ostéo-articulaires. Enfin, il se comporte comme une molécule d'adhésion et est un des ligands du récepteur cellulaire CD44 "lymphocyte homing factor" [Miyake,1990].

L'inflammation de la synoviale dans l'arthrite peut être détectée par le dosage de l'acide hyaluronique. Cette molécule synthétisée par un grand nombre de cellules

et de tissus est produite en grande quantité par les cellules synoviales. La quantité de hyaluronate libérable lors d'une dégradation du cartilage est faible et sa demi vie d'élimination dans le cartilage (20 jours) est trop longue pour pouvoir rendre compte de l'élévation des taux sériques d'AH. L'hypothèse de l'origine synoviale du hyaluronate circulant est donc plausible mais les processus impliqués sont encore mal connus ; il pourrait s'agir d'une modification du drainage articulaire associée ou non à une synthèse locale accrue. L'étude de l'hypothèse du hyaluronate circulant comme marqueur biologique de la prolifération synoviale [Jouzeau,1992 ; Jouzeau,1993] et non comme marqueur indirect de l'atteinte cartilagineuse a été vérifiée. Dans l'arthrite, l'augmentation de sa libération dans le liquide synovial est très certainement due à l'action des cytokines telles que l'IL-1 ou le TNF- α . Des taux plasmatiques élevés d'AH renseignent sur l'inflammation articulaire ainsi que sur la progression des atteintes érosives.

L'acide hyaluronique inhibe la synthèse des protéoglycanes [Bansal,1986] dans les cultures de chondrocytes par un mécanisme comportant trois étapes : transport de l'acide hyaluronique sur la surface des chondrocytes, détachement des PG de la protéine porteuse, puis dégradation éventuelle de l'AH dans le lysosome. Ainsi les molécules de surface réagissant sélectivement avec l'acide hyaluronique, seraient susceptibles de jouer un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme des PG.

I.5 SCHEMA GENERAL DE L'ORGANISATION DU CARTILAGE ARTICULAIRE

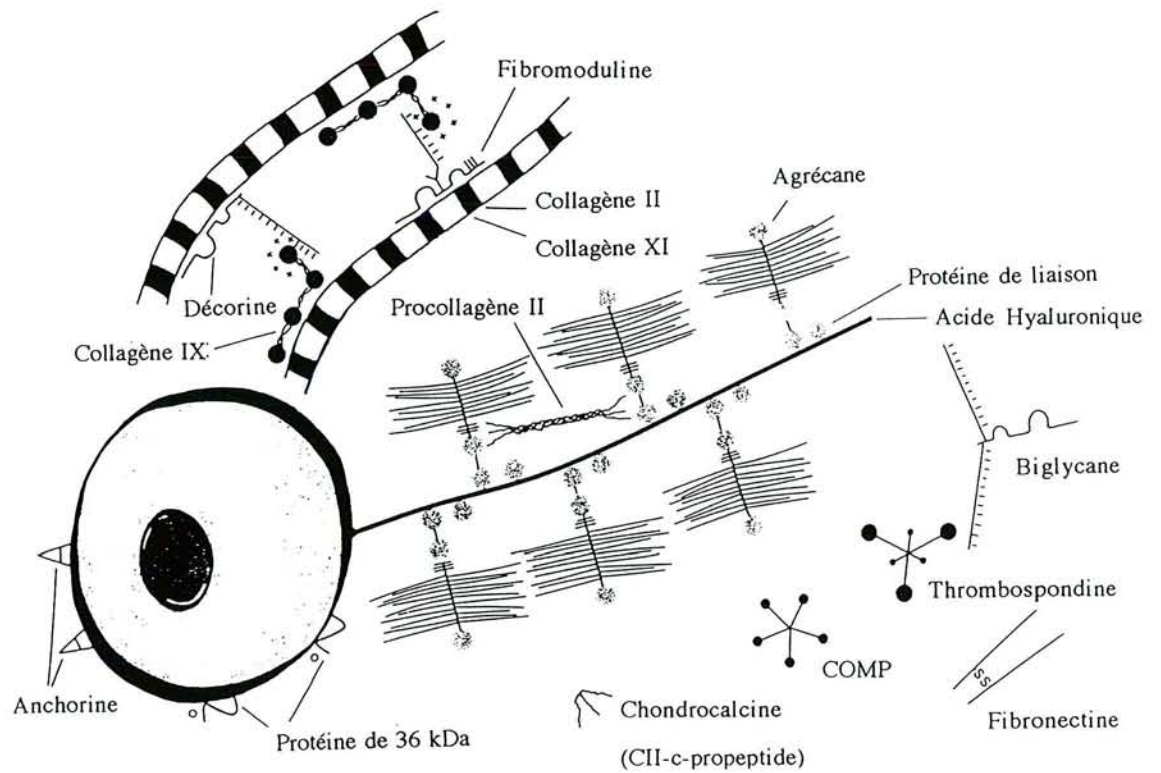


Figure 15 : Les constituants majeurs de la matrice extracellulaire du cartilage
(COMP: Cartilage Oligomeric Matrix Protein)
(d'après Heinegard, 1992)

CHAPITRE II

VARIATIONS PHYSIO- PATHOLOGIQUES

CHAPITRE II

VARIATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES

La destruction progressive des tissus conjonctifs articulaires est une caractéristique commune des maladies rhumatismales inflammatoires (arthrites) et dégénératives (arthrose). Bien que leurs étiologies soient totalement différentes, la déplétion de la matrice cartilagineuse engendrée dans ces deux cas, mène à une désorganisation totale de la structure matricielle conduisant à des dommages irréversibles de l'articulation et à une atteinte fonctionnelle. Même si les connaissances concernant les cellules et les médiateurs de l'inflammation se sont considérablement étayées ces dernières années, les phénomènes conduisant à la destruction du cartilage sont encore loin d'être élucidés.

Au cours de la polyarthrite rhumatoïde, l'inflammation et le pannus sont les principaux agents initiateurs de la dégradation du cartilage ; les leucocytes libèrent directement dans le cartilage des protéinases, des radicaux libres oxygénés, des cytokines et des prostanoïdes. Tous ces facteurs entraînent l'inhibition de la synthèse des protéoglycanes et la résorption de la matrice extracellulaire [Pettipher,1989 ; Tiku,1990].

Dans les étapes précoces de l'arthrose, les contraintes mécaniques anormales appliquées au cartilage sont les mécanismes initiateurs de l'hypertrophie chondrocytaire et de la mort cellulaire accompagnées d'une perte de protéoglycanes matriciels. Toutes les protéinases ont la capacité de dégrader les macromolécules matricielles *in vitro*, mais la détermination de leur rôle précis *in vivo* est plus difficile.

Toutefois, la dégradation des molécules constitutives du cartilage n'est pas seulement une caractéristique de son état pathologique mais aussi du remodelage tissulaire survenant au cours de la croissance et du développement, ainsi que du renouvellement de la matrice chez l'adulte. Un grand nombre de facteurs contribuent à assurer l'homéostasie du cartilage en interférant à la fois sur l'anabolisme et le catabolisme. Dans le cartilage articulaire, "cartilage qui survit", les cytokines exercent un contrôle très sensible entre l'anabolisme et le catabolisme en régulant la synthèse des protéinases, de leurs inhibiteurs et des molécules cartilagineuses.

Dans ce chapitre, nous ferons une revue de la plupart des médiateurs qui influencent le métabolisme du cartilage. Il semble admis que la dégradation des protéoglycanes constitue le mécanisme initial de l'atteinte du cartilage au cours des processus pathologiques. L'altération des PG permet l'accessibilité de la matrice à des enzymes chondrocytaires comme les collagénases qui, en raison de leur poids moléculaire élevé ne peuvent diffuser facilement. Les fibres de collagène ne sont dégradées que dans les états plus avancés de la maladie. En outre, une différence très nette de renouvellement a été observée pour ces deux macromolécules ; le renouvellement des protéoglycanes s'effectue à une vitesse relativement rapide [Maroudas,1975], alors que celui du collagène est extrêmement lent [Lipiello,1977]. Pour toutes ces raisons, l'étude bibliographique, tout comme nos travaux expérimentaux réalisés chez le rat se rapporteront plus particulièrement à l'étude des protéoglycanes.

II.1 LES CYTOKINES

Les cytokines jouent un rôle régulateur important dans le métabolisme des constituants de la matrice cartilagineuse et notamment des protéoglycanes. Les cytokines sont de petits médiateurs polypeptidiques (15-30kDa) produits par une grande variété de cellules. Leur petite taille leur permet de pénétrer facilement dans la matrice extracellulaire et d'atteindre les cellules cibles y compris dans les tissus dépourvus de vaisseaux comme le cartilage. Dans les tissus cartilagineux articulaires, les forces intermittentes de compression dues aux mouvements de l'articulation créent une circulation de liquide matriciel permettant un transport de cytokines plus rapide que celui dû à une simple diffusion. Bien qu'une quantité importante de cytokines soit produite dans des conditions pathologiques, les cytokines jouent également un rôle régulateur dans le renouvellement des molécules des tissus normaux. Toutes les cytokines agissent sur leurs cellules cibles grâce à des récepteurs. La liaison de la cytokine sur le récepteur de la cellule cible engendre plusieurs types de réponses possibles : les cytokines peuvent activer un second messager (AMP cyclique) par l'intermédiaire d'un complexe de transduction du signal dans la membrane plasmique qui intègre le signal dans la cellule, les cytokines peuvent être internalisées et transportées jusqu'au noyau où elles agissent sur le niveau de transcription.

Un grand nombre de cytokines agissent sur la synthèse des protéoglycanes et peuvent être classées en trois catégories (*Tableau 5*) :

- les cytokines cataboliques inhibent la synthèse des protéoglycanes et/ou induisent leur dégradation,

- les cytokines anaboliques stimulent la synthèse des PG et/ou inhibent leur dégradation,
- les cytokines modulatrices régulent les effets des cytokines des deux catégories précédentes [Nietfeld,1993].

Cytokines cataboliques	Cytokines anaboliques	Cytokines modulatrices
	EGF FGF	FGF G-CSF GM-CSF IFN- γ
GM-CSF	IFN- γ IGF-1	IL-1 IL-1RA
IL-1	IL-3	IL-4
	IL-5 IL-6	IL-6 M-CSF PDGF TGF- β
IL-6	PDGF TGF- β	TNF- α
TNF α		

Tableau 5 : Classement des cytokines en fonction de leurs effets sur le métabolisme des protéoglycanes (d'après Nietfeld, 1993)

La plupart des cytokines sont pléiotropiques car elles entraînent des effets différents sur une même cellule. Il s'avère donc difficile d'établir une classification rigoureuse puisque la majorité d'entre elles peuvent être classées dans plusieurs catégories (Tableau 5). De plus, leurs effets sont très complexes lorsqu'elles agissent ensemble, ce qui est le cas dans l'organisme. Les cytokines et facteurs de croissance agissent en se liant sur des récepteurs à la surface des cellules cibles et la sélectivité et la spécificité des réponses dépendent du nombre et de l'affinité des récepteurs pour le ligand.

L'interleukine-1 est un médiateur clé de l'inflammation articulaire. L'IL-1 joue un rôle central dans la destruction de la matrice cartilagineuse au cours de l'arthrite. D'autres cytokines comme l'interleukine-6 et le TNF- α interviennent également de façon importante dans les processus inflammatoires articulaires.

II.1.1 L'INTERLEUKINE 1

L'interleukine-1 (IL-1) est produite par une grande variété de cellules ; la source principale d'IL-1 est le monocyte/macrophage, bien que l'IL-1 puisse être synthétisée en moindre quantité par les chondrocytes, les fibroblastes synoviaux et les cellules endothéliales [Dinarello,1988 ; Dinarello,1992]. L'IL-1 fut à l'origine désignée sous le nom de facteur activateur des lymphocytes (LAF) et

aujourd'hui, un grand nombre de facteurs ont été identifiés comme étant identiques à l'IL-1 : la cataboline ou facteur catabolique du cartilage, le facteur de cellules monocytaires (MCF), le pyrogène endogène (EP), le médiateur endogène des leucocytes (LEM), le facteur activateur des ostéoclastes (OAF) et l'hématopoïétine. L'interleukine-1 est un des médiateurs centraux de la réaction inflammatoire. Elle exerce ses nombreux effets dans pratiquement toutes les parties du corps : système nerveux central (fièvre, perte de l'appétit, induction d'ondes lentes du sommeil), vascularisation (vasodilatation, induction des molécules d'adhésion et de facteurs chimiotactiques, extravasation des neutrophiles), foie (production des protéines de la phase aiguë), os, épithéliums et tissus conjonctifs (résorption osseuse, production de collagénase et de stromélysine, prolifération des fibroblastes et des kératinocytes menant au remodelage tissulaire).

L'interleukine-1 se présente sous deux formes : l'IL-1 α et l'IL-1 β , produits de deux gènes distincts présents sur le chromosome 2 et consistant en 7 exons. L'IL-1 α (159 AA) et l'IL-1 β (153 AA) présentent une homologie de séquence de 26% mais agissent sur les mêmes récepteurs (cf paragraphe II.1.1.3) et exercent ainsi les mêmes effets [March,1985 ; Smith,1989]. Les deux interleukines-1 α et β sont en compétition pour les mêmes récepteurs sur la membrane plasmique des cellules fibroblastiques, des macrophages, des lymphocytes T et B et des chondrocytes [Dinarello,1989 ; Saklatvala,1986].

L'IL-1 est à la fois une cytokine catabolique et modulatrice vis à vis du cartilage.

- **Cytokine catabolique** car l'IL-1 contribue à la dégradation des protéoglycanes en induisant la synthèse et l'activation de protéases [Pettipher,1986 ; van Beuningen,1991 ; Mauviel,1993 ; Neidel,1993 ; Verschure,1990]. L'IL-1 inhibe la synthèse des agrécans constitutifs du cartilage articulaire (activité anti-anabolique) [Tyler,1985 ; Chandrasekhar,1992 ; Benton,1988 ; Nietfeld,1990]. Ce double rôle de suppression de la synthèse d'augmentation de la dégradation de la matrice cartilagineuse est un des principaux mécanismes par lequel l'IL-1 favorise la dégénérescence du cartilage articulaire dans les arthrites inflammatoires.

De plus, l'IL-1 induit la dégradation protéolytique de la plupart des macromolécules matricielles. L'IL-1 inhibe la synthèse des collagènes caractéristiques du cartilage hyalin alors qu'elle stimule la synthèse des collagènes présents dans les fibroblastes [Goldring,1988]. Elle réduit également la sécrétion d'un inhibiteur de protéases, le TIMP (Inhibiteur Tissulaire des Métalloprotéases) [Martel-Pelletier,1991].

L'IL-1 inhibe ainsi la capacité du cartilage articulaire à résister aux forces de compression et compromet la fonction articulaire qui est normale lorsque les

agrégats de protéoglycanes sont intacts. De plus, dans des conditions de réparation tissulaire après action de l'IL-1, les chondrocytes ont plutôt tendance à synthétiser un tissu plus fibreux que hyalin.

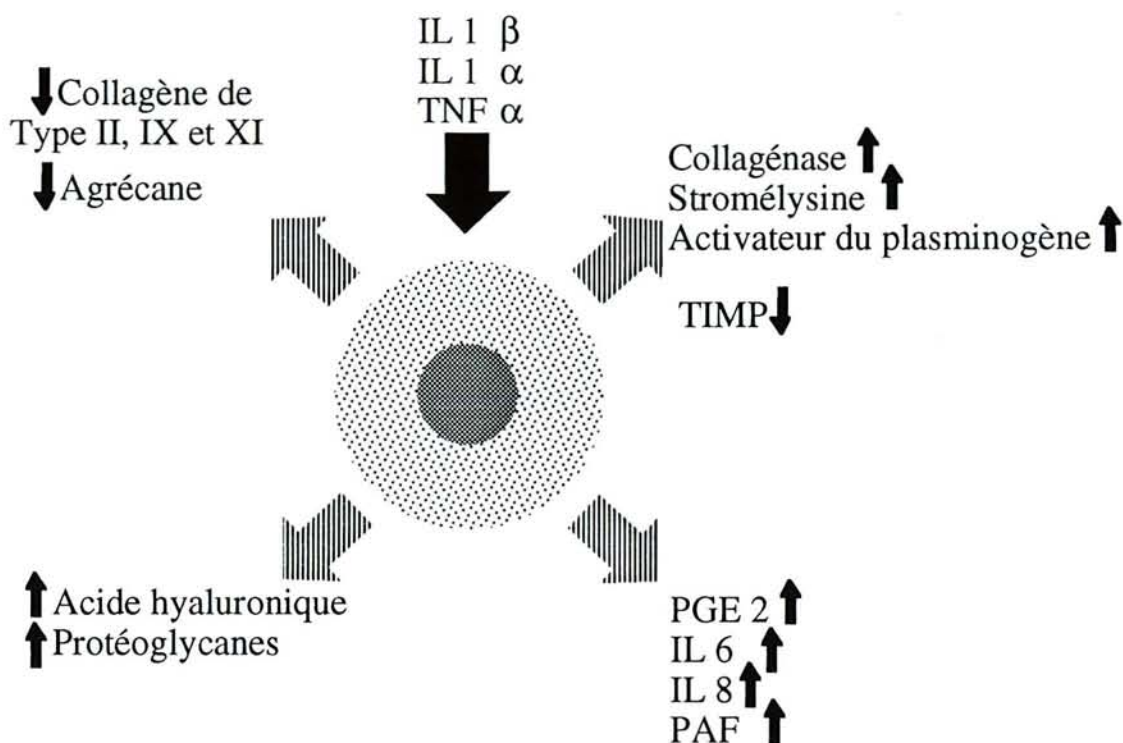


Figure 16 : Effets de l'IL-1 et du TNF- α sur la synthèse des macromolécules du cartilage

L'IL-1 est aussi une **cytokine modulatrice** car elle peut également stimuler sa propre production [Ollivierre,1986] et réguler l'expression de son propre récepteur. Selon le type cellulaire, l'IL-1 exerce un rétrocontrôle négatif de l'expression de son récepteur (fibroblastes) ou un rétrocontrôle positif (chondrocytes) [McCollum,1991]. Ainsi, dans certaines cellules, l'IL-1 est capable d'amplifier ses propres effets alors que dans d'autres cellules, un mécanisme de rétrocontrôle négatif prévient les effets trop marqués.

L'IL-1 module l'activité d'autres cytokines : elle exerce un contrôle positif sur le récepteur du PDGF "platelet derived growth factor" et induit sa production [Perrachia,1991]. L'IL-1 induit dans de nombreuses cellules, la production d'IL-6 [Nietfeld,1990 ; Bunning,1990], de TNF- α [Shinmei,1989], de G-CSF [Campbell,1991] et de GM-CSF [Campbell,1991]. Ainsi, l'IL-1 a la capacité de modérer les effets du FGF et d'amplifier les effets de l'IL-6, du TNF- α , du PDGF, du G-CSF et du GM-CSF. L'IL-1 est interconnectée avec au moins 7 autres cytokines. *In vivo*, on observe une synergie entre les actions de l'IL-1 et

du TNF- α , synergie non vérifiée *in vitro* et qui suggère l'implication d'autres facteurs [Nietfeld,1993].

II.1.1.1 Inhibition de la synthèse des protéoglycanes par l'IL-1

Les capacités de l'interleukine-1 à inhiber *in vivo* la synthèse des agrécanes du cartilage articulaire sont aujourd'hui bien établies [Verschure,1990 ; Pelletier,1993]. Les effets inhibiteurs observés *in vitro* sont reproduits *in vivo*, puisqu'une injection intra-articulaire d'IL-1 chez l'animal entraîne une inhibition de la synthèse des PG [Chandrasekhar,1992 ; Dingle,1987 ; van Beuningen,1991]. Il a été montré en particulier que l'IL-1 entraînait une réduction de la synthèse des PG de façon dose-dépendante [Chandrasekhar,1992], et que des concentrations élevées d'IL-1- β (150 μ g) appliquées à des cultures d'explants cartilagineux entraînaient une inhibition totale de la synthèse des PG [Nietfeld,1990]. Les administrations intra-articulaires répétées d'IL-1 (1 μ g) dans le genou du rat retardent le retour à une synthèse normale et entraînent une perte franche de protéoglycanes [van de Loo,1994]. Cette inhibition est indépendante de la voie des prostaglandines [Chandrasekhar,1992]. Dans les cultures de cartilage bovin, l'IL-1 est 50 fois plus efficace pour inhiber la synthèse de PG (ED50 = 4ng.ml⁻¹) que pour stimuler la dégradation du cartilage articulaire (ED50 = 200ng.ml⁻¹), données qui suggèrent que les deux phénomènes peuvent être régulés de façon indépendante [Neidel,1993 ; Van de Loo,1989 ; Arner,1989]. L'hypothèse de l'inhibition de la synthèse de la protéine porteuse [Benton,1988] est aujourd'hui remise en cause : il semble que l'IL-1 n'ait pas d'effet supresseur sur la synthèse des protéines chondrocytaires [van de Loo,1994 ; Reife,1993]. La structure des protéoglycanes synthétisés en présence d'IL-1 ne semble pas modifiée tant pour le taux de glycosylation que de sulfatation [Tyler,1985 ; van de Loo,1994]. Cependant, le nombre de chaînes de chondroïtines sulfates décroît.

II.1.1.2 Stimulation de la dégradation des PG par l'IL-1

La capacité de l'IL-1 à promouvoir la dégradation des molécules de la matrice cartilagineuse est généralement assimilée à sa capacité à stimuler la synthèse et la libération des protéinases par les chondrocytes. Les protéinases libérées après stimulation par l'IL-1 sont essentiellement les métalloprotéinases, telles que la collagénase et la stromélysine qui sont sécrétées sous forme inactive [Verschure,1990 ; Thomas,1991 ; Smith,1989]. La collagénase détruit le réseau de fibres collagènes du cartilage arthrosique et l'activité de la stromélysine est corrélée à la sévérité de l'arthrose. Ces deux enzymes sont présentes à des taux élevés dans le cartilage arthrosique [Pelletier,1993]. Les sérine-protéinases comme l'activateur du plasminogène ou la cathepsine B, stimulés par l'IL-1 activent les métalloprotéases [Campbell,1994]. L'activateur du plasminogène par

exemple, libère la plasmine qui stimule la dégradation des PG et active la collagénase latente.

Les cytokines exercent leurs actions en se liant à des récepteurs spécifiques sur les cellules cibles. Les mécanismes intracellulaires intervenant après la fixation de l'IL-1 sur les récepteurs à la surface des chondrocytes et par lesquels l'inhibition de la synthèse et l'augmentation de la dégradation des PG ont lieu sont encore mal connus. Afin d'apporter un début d'explication, il s'avère nécessaire de décrire les types de récepteurs à l'IL-1 et les mécanismes de liaison au récepteur.

II.1.1.3 Les récepteurs à l'IL-1

Deux types de récepteurs à l'IL-1 ont été identifiés. Le récepteur de type I (IL-1RtI) est une protéine de 80kDa exprimée à la surface des fibroblastes, des lymphocytes T et des chondrocytes. Le récepteur de type II (IL-1RtII) est une protéine plus petite (60-68kDa) située à la surface des lymphocytes B, des neutrophiles et des cellules de la moëlle osseuse. Le nombre de récepteurs à l'IL-1 varie de 50 à 50000 par cellule avec une constante de dissociation allant de 10^{-9} à 5.10^{-11} mol.l⁻¹. Les deux formes de l'IL-1 se lient aux deux types de récepteurs, mais généralement l'IL-1 α se lie préférentiellement aux récepteurs de type I alors que l'IL-1 β a plus d'affinité pour les récepteurs de type II.

Le récepteur de type I module les effets biologiques de l'IL-1 alors que le récepteur de type II agit comme un récepteur inactif : lié à l'IL-1, le récepteur de type II empêche la liaison de l'IL-1 au récepteur de type I et ne délivre pas de signal de transduction ou d'information dans la cellule [Sims,1994]. L'action du récepteur de type II est semblable à celle de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1ra) : en se liant au récepteur, il bloque l'accès de l'IL-1 au récepteur, et l'empêche d'atteindre la cellule. Des récepteurs solubles de l'IL-1 (sIL-1-RI et sIL-1-RII) ont également été mis en évidence, et sont potentiellement capables de réguler l'activité de l'IL-1. Ils sont constitués du domaine extracellulaire du récepteur à l'IL-1 et sont des inhibiteurs efficaces de l'action de l'IL-1 [Sims,1994].

Les fibroblastes et les chondrocytes humains en culture possèdent de 3000 à 10000 sites de liaison de haute affinité pour l'IL-1. En général, l'affinité des récepteurs est bien corrélée avec la capacité des cellules à répondre à l'IL-1. D'autre part, le nombre de récepteurs à l'IL-1 est souvent en excès mais la réponse cellulaire est maximale lorsque 5 à 10% seulement des récepteurs sont occupés. Dans les chondrocytes articulaires de lapin coexistent des récepteurs pour l'IL-1 α et β de faible et haute affinité mais c'est la liaison à haute affinité qui entraîne une augmentation de synthèse des prostaglandines E2.

II.1.1.4 Effets biologiques de l'IL-1

L'activation des métalloprotéinases et la production de PGE₂ sont deux des effets importants induits par l'IL-1 dans le cartilage. L'inhibition de la synthèse des protéoglycanes, l'augmentation de la dégradation des protéoglycanes ainsi que la production des prostaglandines sont trois mécanismes indépendants qui semblent médiés par des mécanismes post-transcriptionnels différents [Arner,1989].

Les effets inhibiteurs de l'IL-1 sur la synthèse des protéoglycanes pourraient être médiés en partie par l'interleukine-6 [Nietfeld,1990]. Des études récentes ont évoqué le rôle du monoxyde d'azote (NO) comme médiateur cellulaire induit par l'IL-1 et responsable de l'inhibition de la synthèse des protéoglycanes [Taskiran,1994]. L'IL-1 induirait par l'activation de son récepteur à la surface cellulaire, la synthèse de la NO synthase inductible (iNOS) intracellulaire qui catalyse la transformation de l'arginine en citrulline et la formation de NO [Knowles,1994].

La stimulation des chondrocytes du cartilage articulaire par l'IL-1 entraîne également l'activation de la phospholipase A₂ (PLA₂) [Knott,1994]. La phospholipase A₂ synthétise une quantité accrue d'acide arachidonique (AA) [Dayer,1986]. L'acide arachidonique est ensuite métabolisé en médiateurs inflammatoires tels que les leucotriènes et les prostaglandines (dont la PGE₂), le thromboxane B₂ (TXB₂) et la 6-kéto-prostaglandine F_{1α} (6-kéto-PGF_{1α}) [Chin,1988 ; Pujol,1987]. Les PGE₂ ont un rôle important puisqu'elles amplifient l'inflammation articulaire et stimulent la résorption osseuse [Campbell,1990]. Elles sont notamment responsables de l'augmentation de la perméabilité vasculaire des tissus adjacents, de la prolifération synoviale et de la mobilité des cellules inflammatoires. Ainsi, l'IL-1 active la production de prostaglandines E₂ qui, par un mécanisme de feed-back, inhiberaient l'expression même de l'IL-1 par les chondrocytes (vraisemblablement par augmentation de l'AMP cyclique). Toutefois, ce mécanisme est sujet à controverses puisqu'il a été montré que la production d'IL-1 par les monocytes humains est potentialisée par la PGE₂ et d'autres agents inducteurs d'AMPc [Kassis,1989]. La PGE₂ stimule l'adénylate cyclase et entraîne une élévation du taux intracellulaire d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique). L'élévation intracellulaire d'AMPc active la synthèse des protéines et peut être la cause d'une forte synthèse de protéinases [Verschure,1990]. Mais l'élévation des taux d'AMPc et des taux de calcium intracellulaire est très controversée dans les chondrocytes [Carrol,1986]. Le rôle secondaire de l'AMPc est suspecté, à cause de l'augmentation rapide de prostaglandines, mais cet effet ne serait pas lié à l'activation par l'IL-1. Récemment, il a été montré que l'IL-1 stimulait l'activité d'une cyclo-oxygénase

inductible (COX-II) (voir chapitre IV) de façon dose dépendante [Szczepanski,1994].

Parallèlement à l'activation de la PLA2, l'IL-1 entraîne également l'activation de la phospholipase C (PLC) qui stimule la protéine kinase C qui elle-même, par effet de feed-back négatif module les effets induits par l'IL-1 [Hulkower,1989]. L'IL-1 active également une protéine sérine/thréonine kinase qui induit la phosphorylation d'une protéine du choc thermique (hsp 27), du récepteur à l'EGF et même de son propre récepteur IL-1R. Ces trois protéines sont également phosphorylées par le TNF α [Dower,1992].

A l'inverse, les métabolites de la lipoxycgénase augmentent par un mécanisme non encore élucidé, la transcription du gène de l'IL-1. Les leucotriènes (LTB4 notamment) stimulent la production d'interleukine-1 par les monocytes [Rola-pleszczynski,1985]. Les leucotriènes semblent moduler les étapes précoces de la synthèse d'IL-1 et particulièrement la transcription [Dinarello,1989].

En résumé, l'IL-1 est capable d'activer différents mécanismes en fonction du type cellulaire concerné : l'IL-1 peut stimuler l'activité de la phospholipase A2 et de la phospholipase C, elle peut induire un flux de calcium, stimuler la production d'AMPc et l'augmentation du métabolisme du phospho-inositol phosphate. L'IL-1 peut stimuler la production de collagénase et d'autres protéases ainsi que de prostaglandines E2. Les effets de l'IL-1 sur les chondrocytes articulaires représentent un exemple de la dualité de influences agonistes et antagonistes qui surviennent de façon simultanée. En effet, les collagénases et leurs inhibiteurs peuvent être produits en même temps et leurs inductions respectives varient en fonction des stimuli impliqués. Le degré de destruction cartilagineuse survenant au cours de l'arthrite dépend en partie de la production relative de collagénase, d'inhibiteurs et des constituants de la matrice cartilagineuse et ces mécanismes sont étroitement dépendants de l'IL-1 qui joue un rôle clé dans la régulation de la destruction tissulaire.

II.1.1.5 Régulation de la transcription des protéases par l'IL-1

La séquence des événements suivant la liaison à l'IL-1 à son récepteur demeure inconnue mais il existe des éléments en faveur d'un transport du complexe IL-1-récepteur vers le noyau [Curtis,1990]. Les études chez les fibroblastes synoviaux du porc ont montré que le complexe formé par la fixation de l'IL-1 sur son récepteur membranaire, était internalisé avec une demi-vie de 10 minutes. L'IL-1 est dégradée lentement et son récepteur est réintégré dans la membrane cellulaire [Saklatvala,1989].

Le manque de connaissance concernant les événements postérieurs à la liaison de l'IL-1 sur son récepteur est partiellement imputable aux effets pléiotropiques de

l'IL-1. De plus, les deux types de récepteurs peuvent être indépendamment exprimés ou coexprimés dans la même cellule, compliquant les actions intracellulaires. De nombreuses études ont été réalisées sur les facteurs transcriptionnels et leurs séquences cibles de liaison du DNA et ces informations nous permettent de mieux appréhender les mécanismes par lesquels les cytokines régulent l'expression des gènes dans les chondrocytes. La régulation de l'expression des gènes des métalloprotéases se fait au niveau transcriptionnel. Les produits des proto-oncogènes *fos* et *jun* sont des facteurs transcriptionnels qui forment un complexe avec la séquence d'ADN appelée TRE ("TPA responsive element") ou AP-1 ("activator protein-1") qui est la région promotrice des MMPs. L'induction des protéines *fos* par les proto-oncogènes (phorbol esters, *h-ras*, *v-mos*, ou PDGF) est bloquée par les ARN antisens *c-fos*. L'induction de la collagénase, de la stromélysine est alors bloquée, preuve en est que la synthèse des ARNm de ces protéases doit être stimulée par *fos*. L'IL-1 qui active l'expression du site promoteur TRE induit transitoirement l'expression de *c-fos* et de *c-jun*. Ainsi, la phosphorylation semble médier l'expression des gènes de la collagénase régulée par le site AP-1 et l'expression de *c-fos* est requise pour l'induction de la collagénase. L'induction de la dégradation du cartilage et des protéinases est initiée par l'IL-1 et le TNF- α . Le TNF- α qui induit la synthèse de la collagénase produit une élévation durable de l'expression de *c-jun*. Le TGF- β inhibe la synthèse des MMPs en inhibant les effets de l'IL-1.

En fait, tous les activateurs de l'expression génique de la collagénase et de la stromélysine (IL-1, TPA, TNF- α , leucoréguline) induisent l'expression des oncogènes des familles Jun et Fos [Mauviel,1993]. L'induction de l'expression des gènes des métalloprotéases par ces cytokines est diminuée par les glucocorticoïdes et l'acide rétinoïque qui interagissent avec le site AP1 et bloquent sa liaison avec le TRE par des mécanismes encore inconnus [Krane,1993].

II.1.2 L'INTERLEUKINE 6 (IL-6)

C'est une glycoprotéine de 26kDa composée de 184 acides aminés. Produite par de nombreuses cellules, notamment les fibroblastes et les chondrocytes, l'IL-6 possède des propriétés anaboliques, cataboliques et modulatrices. Elle inhibe la synthèse des protéoglycanes (à l'exception des chondrocytes bovins) mais de façon moins importante que l'IL-1 ou le TNF α . L'IL-1 et le TNF α stimulent la synthèse d'IL-6 dans les chondrocytes articulaires humains ; l'inhibition de la synthèse des protéoglycanes par l'IL-1 semble médiée par l'IL-6 puisque les anticorps anti-IL-6 bloquent cet effet [Nietfeld,1990]. Par contre, l'IL-6 ne semble pas influencer la production des métalloprotéinases. Cette cytokine

diminue la dégradation des protéoglycanes en stimulant la synthèse *de novo* du TIMP [Lotz,1991]. Au total, la balance entre les effets anaboliques et cataboliques de l'IL-6 conduit plutôt à un ralentissement du renouvellement des PG. Cette cytokine semble moduler la plupart des effets cataboliques de l'IL-1 sur la transcription des gènes des chondrocytes.

II.1.3 LE TUMOR NECROSIS FACTOR α (TNF- α)

Comme l'IL-1, le TNF- α est une cytokine prédominante produite par les monocytes et les macrophages. Bien que l'IL-1 et le TNF- α n'aient que 3% d'homologie et se lient à des récepteurs différents, elles ont beaucoup de propriétés communes. Récemment, deux récepteurs ont été identifiés à la surface des chondrocytes articulaires humains ; le nombre de récepteurs p55 biologiquement actifs, est augmenté au cours de l'arthrose [Westacott, 1994]. Le TNF- α a des capacités anaboliques, cataboliques et modulatrices. En effet, il inhibe la synthèse des PG du cartilage [Saklatvala,1986] alors qu'il stimule la synthèse des PG des fibroblastes [Yaron,1989]. L'activité inhibitrice du TNF- α est 100 fois moins importante que celle de l'IL-1. Le TNF- α induit la dégradation des protéoglycanes du cartilage [Saklatvala,1986 ; Hickery,1990]. Le TNF- α diminue également la synthèse des collagènes du cartilage. Il stimule la production chondrocytaire de l'activateur du plasminogène, des PGE2 et de l'IL-6. Lorsque le TNF- α est injecté par voie intra-articulaire dans les genoux du lapin, il induit une réponse inflammatoire plus faible que l'IL-1, mais l'injection simultanée des deux cytokines amplifie la réponse [Henderson,1989].

Les effets modulateurs du TNF- α et de l'IL-1 sur les autres cytokines présentent davantage de similitudes ; le TNF- α stimule sa propre production dans les monocytes et induit la formation d'IL-1 dans les cellules endothéliales et d'IL-6 dans les fibroblastes. Comme l'IL-1, il stimule le récepteur à l'EGF dans les fibroblastes et le récepteur à l'IL-6 dans les cellules épithéliales. De plus, il inactive le récepteur à l'IL-1 des chondrocytes, stimule la synthèse de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1 RA) dans les neutrophiles et la synthèse de G-CSF et de GM-CSF dans les macrophages [Dinarello,1986]. Ainsi, le TNF- α peut amplifier ses propres effets en stimulant sa propre production et en induisant les effets cataboliques de l'IL-1. Toutefois, l'activité anabolique de l'EGF stimulée par le TNF- α peut contre-balancer ces effets cataboliques dans le réseau de cytokines [Nietfeld,1993].

II.1.4 L'IL-1 RA

L'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1 RA) est produit par les macrophages, les monocytes et les cellules épithéliales [Arend,1993]. Il existe sous deux formes de poids moléculaires différents (22 et 25kDa) dus à des degrés de glycosylation différents [Hannum,1990]. Il est considéré comme une cytokine car il est produit par une cellule et se lie à un récepteur sur une autre cellule ; l'effet produit est une inhibition compétitive de la liaison de l'IL-1 avec son récepteur. C'est un antagoniste pur puisque en se fixant sur les deux récepteurs à l'IL-1 (IL-1 R α , IL-1 R β), il n'induit aucune réponse (celles de l'IL-1 α et β). De nombreuses études ont montré l'efficacité de cette cytokine qui inhibe la synthèse chondrocytaire de la collagénase et la synthèse des PGE₂ par les synoviocytes. Une concentration molaire 100 fois plus importante d'IL-1 RA que d'IL-1 est requise pour l'inhibition de 50% de la réponse *in vitro*. Dans les cultures de cellules cartilagineuses, l'IL-1 RA inhibe la dégradation des PG et réduit l'inhibition de la synthèse des GAG induite par l'IL-1 α ou β [Smith,1991].

II.1.5 IL-3, IL-4, IL-5

L'IL-3 et l'IL-5 sont produites par les lymphocytes T et appartiennent à la catégorie des cytokines anaboliques puisqu'elles stimulent la synthèse des PG dans les éosinophiles et augmentent ainsi la taille des PG [Rothenberg,1988]. Ces deux cytokines ne semblent pas moduler d'autres cytokines qui agiraient sur le métabolisme des PG. L'IL-5, au même titre que l'IL-4 est produite par une sous classe de lymphocytes T auxiliaires CD4 qui sont les cellules TH2.

L'IL-4, cytokine régulatrice, est produite par les lymphocytes TH2 et les mastocytes [Jansen,1990]. L'IL-4 inhibe la synthèse des cytokines pro-inflammatoires et de l'interféron γ . L'IL-4 stimule la synthèse de l'IL-1RA par les monocytes et peut donc moduler les interactions entre IL-1 α et IL-1 β avec leurs récepteurs. Elle est de ce fait considérée comme une cytokine antagoniste à l'IL-1.

II.1.6 LIF : LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR

Cette cytokine a été dénommée ainsi car elle induit la différenciation des cellules leucémiques murines de la moelle. Produite par les tissus articulaires, elle est "surexprimée" dans l'arthrite. Le LIF est produit par les synoviocytes et les chondrocytes en culture et son expression est stimulée par l'IL-1 β , le LPS, et à moindre degré par le TNF- α [Lotz,1992]. L'induction de cette cytokine par les acteurs de l'inflammation et les effets du LIF sur les tissus conjonctifs suggèrent

que le LIF contribue à la pathogénèse de l'arthrite [Lotz,1992]. Etude confirmée par les travaux de Waring qui rapporte des taux élevés de LIF dans les liquides synoviaux de patients atteints d'arthrite (pas dans l'arthrose) suggérant l'implication probable de cette cytokine dans les phénomènes de destruction articulaire [Waring,1993].

II.2 LES FACTEURS DE CROISSANCE

La distinction entre une cytokine et un facteur de croissance est artificielle et a plus une origine historique que scientifique. Les facteurs de croissance ont été définis ainsi pour leur habileté à induire la prolifération de certaines cellules en culture. Objectivement, un grand nombre de cytokines possèdent cette propriété. Nous nous limiterons aux facteurs impliqués dans le métabolisme du cartilage.

II.2.1 PDGF : PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR

Le platelet derived growth factor (PDGF) est synthétisé par les plaquettes et les macrophages et appartient à la classe des cytokines anaboliques et régulatrices. Dans les chondrocytes, le PDGF stimule la synthèse des protéoglycanes [Schonherr,1991] et entraîne également une modification structurale des chaînes de GAG dont il multiplie par deux le rapport chondroïtine-6 sulfate sur chondroïtine-4 sulfate. Par ailleurs, il stimule la synthèse d'IL-6 par les fibroblastes et augmente l'activité de l'IL-1 par activation des récepteurs. Son activité est double ; d'une part, il augmente la synthèse des PG et d'autre part, il induit les activités cataboliques de l'IL-1.

II.2.2 TGF- β : TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β

Il peut être produit par de nombreuses cellules telles que les chondrocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les macrophages. Il existe 5 isoformes (dont 4 synthétisées par les chondrocytes) de TGF- β qui sont des homo- ou hétérodimères. Le TGF- β possède des propriétés anaboliques ; il stimule la synthèse des PG et modifie également leurs structures en diminuant le rapport C6S/C4S. Parallèlement, le TGF- β inhibe la dégradation des PG [Morales,1991], en réduisant le taux d'ARNm des enzymes cataboliques et en augmentant la production de TIMP. Il peut se lier de façon sélective dans la matrice extracellulaire avec la décorine et le biglycane et semble être présent sous une forme latente qui requiert une activation protéolytique. Aussi, il existe des sites

de stockage du TGF- β dans la matrice et l'accès y est permis lorsque la régulation et la restauration du métabolisme tissulaire sont nécessaires. L'injection intra-articulaire de TGF- β dans le genou des souris provoque une inflammation, la formation d'ostéophytes et une élévation prolongée de la synthèse et du contenu des PG du cartilage articulaire [van Beuningen,1994].

Le TGF- β stimule la synthèse du collagène de type II dans les chondrocytes. Le TGF- β peut aussi stimuler sa propre production et inhiber celle du PDGF. Il exerce un rétro-contrôle positif sur le récepteur de l'EGF et un rétro-contrôle négatif sur celui de l'IL-1. Le TGF- β est donc une cytokine antagoniste à l'IL-1 puisqu'il contrecarre les effets inhibiteurs de l'IL-1 sur les chondrocytes d'où la nécessité d'ajouter dans les cultures de cellules, le TGF β après l'IL-1 et non l'inverse [Nietfeld,1993].

II.2.3 EGF : EPIDERMAL GROWTH FACTOR

C'est une cytokine anabolique produite par les macrophages. L'EGF seul n'induit pas de prolifération chondrocytaire, et parfois il inhibe la synthèse des PG dans le cartilage normal de souris [Verschure,1994]. Cependant, l'EGF en synergie avec l'IGF-1, stimule la synthèse des PG et inhibe leur dégradation [Makower,1988]. Bien que les chondrocytes ne produisent pas eux-mêmes l'EGF, ils possèdent un récepteur pour l'EGF. Les protéoglycanes de la matrice extracellulaire sont modulés par l'EGF qui est synthétisé dans les tissus adjacents ou à distance du cartilage (synoviale). La capacité de l'EGF à agir en l'absence d'autres facteurs de croissance est due à ses potentialités à induire la synthèse du TGF- β et l'IGF-I dans les chondrocytes [Goldring,1993].

II.2.4 FGF : FIBROBLAST GROWTH FACTOR

Également connu sous le nom de "Endothelial Cell Growth Factor", le FGF est produit par les macrophages et les cellules endothéliales vasculaires. Il existe sous deux formes ; une forme acide (aFGF) et une forme basique (bFGF), qui présentent une homologie de séquence de 55%. La forme basique est la plus ubiquitaire.

Vis-à-vis de la synthèse des PG, le FGF fait partie de la catégorie des cytokines anaboliques et régulatrices. En effet, le bFGF stimule la synthèse des PG de son propre chef mais aussi en synergie avec l'IGF I [Nataf,1990]. De plus, le bFGF accroît les effets anaboliques du TGF- β . Inversement, il stimule l'action catabolique de l'IL-1 par un rétrocontrôle positif du récepteur à l'IL-1 [Verschure,1994]. L'action combinée de l'IL-1 et du FGF stimule la synthèse des enzymes qui dégradent les PG. La présence d'aFGF est directement corrélée avec

l'expression du gène cFos et l'infiltration de cellules mononuclées. Le facteur aFGF stimule le développement du cartilage et inhibe l'expression des gènes des chondrocytes durant la cicatrisation d'une fracture.

II.2.5 IGF : INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR

II.2.5.1 IGF-I

Cette cytokine anabolique auparavant désignée "somatomédine C" est produite par les macrophages. Il est généralement admis que l'IGF-1 est un facteur de croissance important dans la régulation de la synthèse des PG. Elle peut stimuler la synthèse des PG, mais elle peut aussi influencer sur la taille de ces derniers (et spécialement sa sulfatation). L'IGF-I peut également diminuer la dégradation des PG [Tyler,1989]. L'IGF-1 potentialise l'action d'autres facteurs comme le bFGF et le PDGF, mais pas celle des TGF- β ni de l'EGF. Les effets de l'IGF-I sont médiés par des récepteurs. L'IGF-1 peut contrecarrer les effets inhibiteurs dus à l'IL-1, mais pas ceux observés lors d'une arthrite expérimentale, où l'IGF-1 est inactif et qui suggère une faiblesse fonctionnelle du récepteur à l'IGF-1 [Verschure,1994]. L'IGF-1 est probablement synthétisé par les chondrocytes et lié à la matrice extracellulaire ; ses fonctions sont assimilées au système autocrine /paracrine. Dans le liquide synovial, l'IGF I est le stimulant majeur de la synthèse des PG alors que le cartilage des genoux inflammatoires de souris ne répondent pas à l'IGF I [Schalkwijk,1989]. Les taux élevés d'IGF dans le sérum et l'urine sont toujours corrélés avec la croissance et la taille du squelette.

II.2.5.2 IGF II

L'IGF II défini comme un activateur, montre une grande homologie avec l'IGF-1 au niveau des domaines A et B. L'IGF I et l'IGF II sont des simples chaînes de polypeptides avec des PM respectifs de 7,6 et 7,5kDa. L'IGF I est plus puissant que l'IGF II pour stimuler la synthèse des PG dans les chondrocytes articulaires adultes. L'IGF II possède son propre récepteur.

II.2.6 IFN γ : INTERFÉRON GAMMA

Produit par les lymphocytes TH1 qui sont impliqués dans l'induction de la chronicité des maladies autoimmunes et inflammatoires, l'interféron- γ est une cytokine anabolique et régulatrice. L'interféron- γ bloque les enzymes de dégradation des PG induites par l'IL-1 ou le TNF α [Andrews,1990]. Inversement, il stimule la synthèse et l'expression du TNF α et amplifie ainsi les effets du TNF α sur le métabolisme des PG. Il existe ainsi une action coordonnée

entre l'IFN γ , le TNF α et l'IL-1. D'autre part, l'interféron- γ inhibe la synthèse des collagènes de types I, II, III.

II.3 LES FACTEURS DE CROISSANCE HÉMATOPOÏÉTIQUES

II.3.1 M-CSF : MACROPHAGE COLONY STIMULATING FACTOR

Egalement connu sous le nom de colony stimulating factor 1 (CSF-1), il est synthétisé par les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales [Clark,1987]. Le M-CSF est une cytokine modulatrice car il stimule la synthèse de l'IL-1 et du TNF α . Plus volumineux que les autres, le M-CSF est également un protéoglycane puisqu'il possède une chaîne de glycosaminoglycanes [Price,1992]. Toutefois, il ne semble pas participer à la construction de la matrice extra-cellulaire, et on ne sait pas encore si sa fraction glucidique intervient dans sa fonction de cytokine.

II.3.2 GM-CSF : GRANULOCYTE MACROPHAGE COLONY STIMULATING FACTOR

Il a été ainsi défini pour son capacité à induire la maturation des cellules souches de la moelle osseuse dans les granulocytes et les macrophages. Il possède de nombreuses propriétés immunorégulatrices communes avec les autres facteurs stimulants (M-CSF, G-CSF et IL-3). Il active les macrophages et induit la sécrétion d'IL-1 et la libération de TNF α et de PGE₂. Il est produit par les lymphocytes T, les fibroblastes et les chondrocytes. C'est une cytokine modulatrice qui contribue à la dégradation des PG en stimulant la synthèse de l'activateur du plasminogène. Ses fonctions modulatrices consistent à stimuler la synthèse d'IL-1, d'IL-1RA ou encore d'IL-6.

II.3.3 G-CSF : GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR

Il est produit par les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les chondrocytes. Il appartient à la catégorie des cytokines régulatrices par son rôle suppresseur de la synthèse du TNF α [Görge,1992].

II.4 LES PROTÉASES

La dégradation irréversible de la matrice extracellulaire du cartilage est due en grande partie à l'action enzymatique des protéases. Parmi les quatre classes de protéases contribuant à cette destruction (sérine, cystéinyl, aspartyl et métalloprotéases), c'est celle des métalloprotéases qui joue un rôle essentiel. Les trois premières classes d'enzymes sont déterminées en fonction du résidu dont la présence est indispensable à leur action catabolique. La dernière classe concerne un groupe d'enzyme dont l'activité nécessite la présence de zinc, indispensable à la réaction, et la présence de calcium comme stabilisateur de la réaction enzymatique. Toutes ces enzymes sont sécrétées sous forme de proenzyme (zymogène) puis, dans un deuxième temps, sont activées dans la matrice extracellulaire pour aboutir à leurs formes finales. Les trois principales métalloprotéases (MMPs) sont la MMP-1 ou collagénase, la MMP-2 ou gélatinase, et la MMP-3 ou stromélysine. Les autres classes de protéases telles que les sérine protéases (élastase, cathepsine G, kallicréine, activateur tissulaire du plasminogène...) ou les cystéinyl et les aspartate protéases (cathépsine) trouvées dans le cartilage seront également décrites ainsi que leurs inhibiteurs respectifs.

II.4.1 LES METALLOPROTEASES

II.4.1.1 Caractères généraux des MMPs

Les métalloprotéases ("matrix metalloproteases", MPPs) sont des enzymes capables de dégrader la matrice des tissus à pH neutre et dont l'activité nécessite la présence de zinc et de calcium. Elles ne sont pas stockées dans la cellule sauf dans les granulations des polynucléaires, mais sécrétées sous forme de proenzyme inactive.

La famille des métalloprotéases contient au moins dix membres qui sont classés en trois groupes ; **le groupe 1** constitué de la collagénase interstitielle (MMP-1) et de la collagénase des neutrophiles (MMP-8), dont les substrats principaux sont les collagènes de types I, II et III. **Le groupe 2** contient les gélatinases ; la 72-kDa gélatinase ou gélatinase A (MMP-2) et la 92-kDa gélatinase ou gélatinase B (MMP-9) qui dégradent la gélatine et le collagène de type IV. **Le groupe 3** est constitué de stromélysines ; stromélysine 1 (MMP-3), stromélysine 2 (MMP-10) et pump-1 (MMP-7). Les stromélysines sont actives vis-à-vis d'une grande variété de substrats tel que les protéoglycanes, la laminine, la fibronectine et quelques collagènes. Dans les conditions normales, le taux de synthèse de ces enzymes est faible. Dans l'arthrite, les collagénases et stromélysines jouent un rôle important

et leurs taux augmentent en réponse à une variété de stimuli : l'IL-1 α et β , l'EGF, le PDGF et le TNF α , les cristaux d'urate monosodique, la phagocytose de débris cellulaires, ou la formation de cellules géantes multinuclées. Dans les cellules synoviales activées par le pannus, les collagénases et les stromélysines sont les produits majoritaires des gènes et représentent environ 2% des ARN messagers produits.

Des taux élevés de ces deux enzymes présents dans le cartilage de patients atteints d'arthrite ou d'arthrose sont corrélés à la sévérité des lésions [Dean,1989]. Elles sont inhibées par le TIMP ("Tissue Inhibitor of Metalloproteinase") et par l'alpha 2 macroglobuline (α 2M).

II.4.1.2 La collagénase

La collagénase interstitielle (MMP-1) des fibroblastes a un PM de 53kDa avec un forme mineure glycosylée de 59kDa (proenzyme inactive synthétisée dans l'appareil de Golgi). La collagénase active a un PM de 45kDa (48kDa pour la forme glycosylée). La collagénase interstitielle solubilise les fibres de collagène de types I, II et III en clivant spécifiquement les trois chaînes alpha de la triple hélice au niveau des liaisons GLY- ILE ou GLY-LEU situées au trois quarts de la molécule, côté NH₂ terminal. Son activité dépend de la glycosylation et des cross-link des chaînes alpha ; la collagénase est plus active sur les collagènes dénaturés ou natifs. La collagénase clive également les collagènes de types VII, VIII et X mais pas les collagènes de types IV, V ou VI [Werb,1993].

La collagénase des neutrophiles (MMP-8), présente dans les granules, a un PM de 75kDa. Son substrat spécifique reste le même mais son activité est plus spécifique vis-à-vis des collagènes de type I que ceux de type III.

L'activité inhibitrice du plasma pour la collagénase est due pour 95% à l' α 2M. L'inhibiteur tissulaire majeur est le TIMP, molécule de 28kDa qui, à la différence de l' α 2M, peut pénétrer dans les espaces intercellulaires de la matrice cartilagineuse. Un nouveau membre de la famille des TIMP, le TIMP-2 inhibe aussi la collagénase [Stetler-Stevenson WG,1989]. Les agents chélateurs du zinc (1,10-phenanthroline), les composés thiolés (penicillamine), les sels d'or (aurothiomalate) et les phosphonamidates ont également une action inhibitrice sur la collagénase.

II.4.1.3 Les stromélysines

Cette métalloprotéase majeure présente dans les cultures de fibrocytes et de synoviocytes est également appelée protéoglycanase, MMP-3, transine ou protéinase neutre. La forme active de 41kDa provient d'une proenzyme de 51kDa. La forme de 41kDa est ensuite dégradée en enzymes actives de 21 et 25kDa. La stromélysine possède une grande variété de substrats qui sont : les

protéoglycanes, les collagènes de types IV,V,VII et X, le collagène de type I dénaturé, la laminine, la fibronectine, l'élastine, l'inhibiteur de l'alpha-1 protéinase, les immunoglobulines et la substance P. La stromélysine dégrade les protéoglycanes au niveau de la protéine porteuse des PG : elle dégrade le domaine globulaire G1 des PG rendant impossible la formation d'agrégats avec l'acide hyaluronique, et le domaine G2 libérant ainsi de petits PG solubles. Les inhibiteurs sont le TIMP et l' α 2 macroglobuline. La stromélysine est fréquemment produite et sécrétée avec la collagénase bien que ces deux enzymes soient régulées de façon indépendante.

D'autres stromélysines ont été identifiées récemment; la stromélysine 2, la stromélysine-3 et la "Pump-1". La stromélysine-2 (MMP-10 ou transine-2) a une séquence très proche de celle de la stromélysine (80% d'homologie), mais sa régulation est très différente [Werb,1993]. Son rôle dans les maladies inflammatoires est encore inconnu.

La stromélysine-3 a été séquencée dans les rhumatismes associés au carcinomes mammaires [Basset,1990]. Elle a une structure générale semblable à la stromélysine et la collagénase bien qu'elle n'ait que 40% d'homologie. Ses substrats sont inconnus ; elle pourrait avoir un rôle dans les maladies inflammatoires car elle est exprimée dans les fibroblastes humains embryonnaires après traitements avec des facteurs de croissance ou des esters de phorbol.

La "pump-1" également dénommée "punctated metalloproteinase", "small uterine metalloproteinase" ou MMP-7, possède les même substrats que la stromélysine puisqu'elle dégrade la fibronectine, les protéoglycanes et la gélatine [Quantin,1989].

II.4.1.4 Les gélatinases

Deux types de gélatinases ont été isolées ; la 72kDa gélatinase et la 92kDa gélatinase. Elles dégradent les collagènes dénaturés (gélatine) de type I, II et III mais aussi les collagènes de type IV et V, l'élastine, la caséine et les protéoglycanes.

a) La 72kDa gélatinase

Encore appelée MMP-2, collagénase de type IV ou matrilysine, elle est sécrétée par un grand nombre de cellules en culture comme les fibroblastes et les macrophages. Elle est identifiée comme une enzyme qui dégrade spécifiquement les collagènes de type IV mais elle est aussi active sur les collagènes de type V, VII, et X (inactive sur les types I et VI) et la fibronectine. Sa séquence montre une grande homologie avec celles de la 92kDa gélatinase, de la stromélysine et de la collagénase. La différence de taille avec la collagénase (52kDa) est due au domaine supplémentaire homologue liant le collagène à la fibronectine situé près

du domaine liant le zinc. Elle requiert également un clivage protéolytique pour son activation et est inhibée par les TIMP-1 et 2.

b) La 92kDa Gelatinase

Egalement dénommée collagénase de type IV ou de type V, MMP-9 ou invasine, elle est le produit majeur de sécrétion des neutrophiles et des macrophages. Elle clive les collagènes dénaturés, la fibronectine, l'élastine et les collagènes de type IV, V, VII et XI [Hibbs,1985].

II.4.1.5 L'élastase des macrophages

Les macrophages stimulés sécrètent une métalloprotéase de 21kDa qui dégrade l'élastine, les protéoglycanes, le collagène de type IV, la fibronectine et les inhibiteurs d'autres protéases. La proenzyme de l'élastase a un PM de 50kDa et, si elle est produite par les synoviocytes de type b ("macrophage cell like"), elle doit contribuer à la destruction tissulaire.

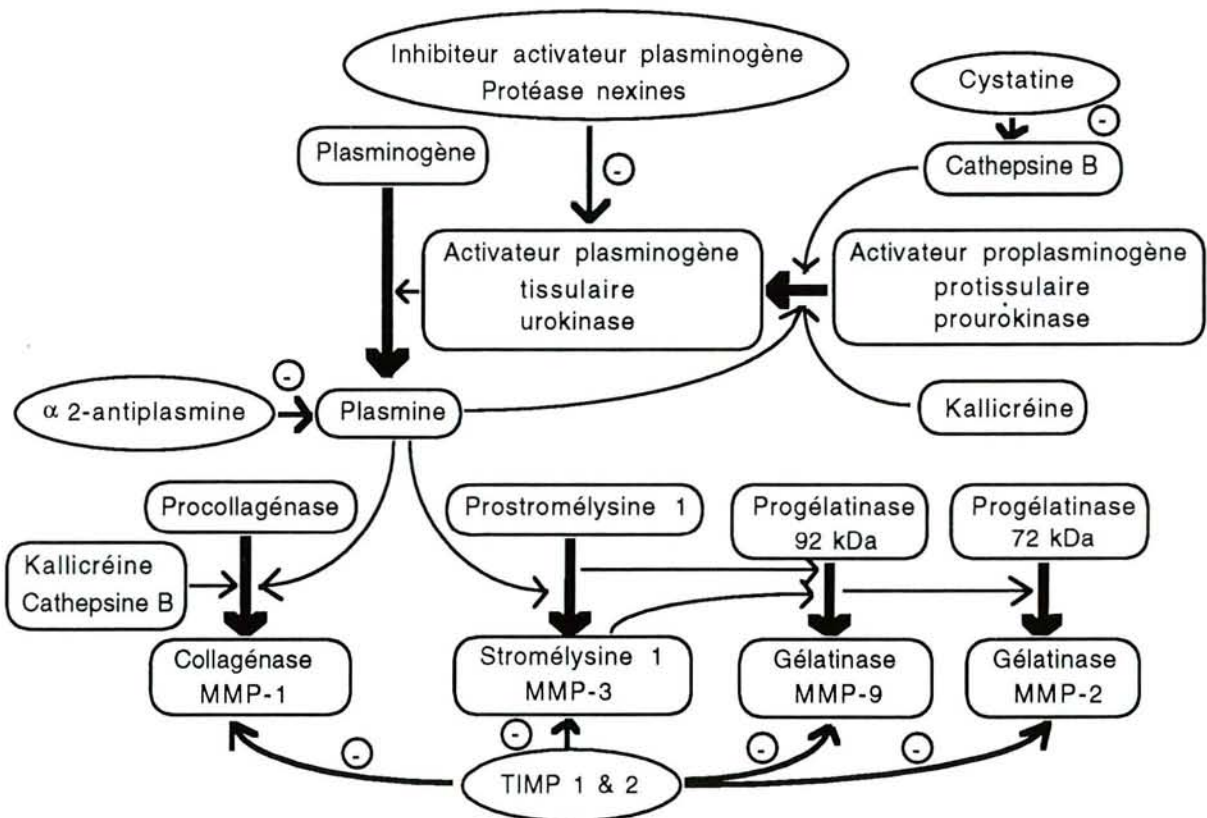


Figure 17 : Principales interaction entre les protéinases, leurs activateurs et leurs inhibiteurs physiologiques (d'après Poole, 1993)

II.4.2 LES CYSTÉINYL PROTÉINASES

La cathepsine B et la cathepsine L sont les protéinases lysosomiales les plus connues. Elles possèdent des résidus sérine et histidine au niveau de leurs sites catalytiques et sont actives à pH acide. Les deux cathepsines sont synthétisées sous forme de proenzyme et sont activées par une protéolyse limitée en enzymes de 25kDa. La cathepsine L est la plus active pour cliver les propeptides N-terminaux des collagènes. La cathepsine B clive les domaines G1 et E2 de l'agrécane. Elles sont inhibées par l' α -2 macroglobuline et les inhibiteurs de la famille des cystatines.

II.4.3 LES SÉRINE PROTÉINASES

Ces endopeptidases possèdent toutes en commun un résidu sérine au niveau de leur site actif et représentent la classe la plus importante de protéinases. La famille des sérine protéinases comprend les protéines de la coagulation, de la fibrinolyse et du complément ainsi que les kinines plasmatiques (thrombine), la plasmine, le C1s, le C1r, la kallicréine, la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase pancréatique. Elles sont toutes actives à pH neutre. Les inhibiteurs de ces protéases reflètent leur importance physiologique puisqu'ils représentent 10% de toutes les protéines plasmatiques. Nous développerons seulement les enzymes jouant un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire : la plasmine et l'activateur du plasminogène, la kallicréine plasmatique, les kallicréines tissulaires et les sérine protéinases des granules des neutrophiles, des lymphocytes T et des mastocytes.

II.4.3.1 L'activateur du plasminogène

Les activateurs du plasminogène (AP) sont des sérine protéinases sécrétées par les macrophages, les fibroblastes, les synoviocytes, les cellules endothéliales et les polynucléaires neutrophiles. Ils sont de deux types : les activateurs du plasminogène de type urokinase (**uAP**) et de type tissulaire (**tAP**). Ils contribuent tous deux à la conversion du plasminogène en plasmine, impliquée dans les phénomènes de destruction et de réparation tissulaires. L'interleukine-1 injectée dans le genou du lapin, stimule la synthèse et l'activation des AP dont la propre inhibition n'est pas suffisante pour empêcher la dégradation du cartilage [Ganu,1991]. Les AP et le plasminogène constituent des acteurs importants de la cascade enzymatique conduisant à la dégradation du cartilage puisqu'ils activent la plasmine responsable de l'activation des formes latentes de la collagénase et de la stromélysine. Le rôle de l'AP n'est pas totalement compris ; il semble qu'il digère directement les glycoprotéines du tissu conjonctif.

L'**uAP** est une sérine protéinase proche de la trypsine sécrétée sous forme de proenzyme de 55kDa qui est clivée ultérieurement en deux chaînes de 20 et 34kDa liées par un pont disulfure responsable de l'activité [Blasi,1987]. La kalllicréine et la plasmine sont capables d'activer l'uAP.

Le **tAP** est une sérine protéinase de 72kDa activée par la déplacement d'un peptide activateur. Il peut également être clivé en deux chaînes par la plasmine bien que les deux formes (1 chaîne ou 2 chaînes liées) soient actives. Le tAP et l'uAP activent le plasminogène, qu'il soit dans la matrice, lié à de la fibrine ou en solution. Les deux formes (proenzyme et forme active) se lient sur les récepteurs à la surface des macrophages et des fibroblastes et de ce fait focalisent l'activité enzymatique aux espaces péricellulaires et protègent les enzymes de l'action de leurs inhibiteurs. Les récepteurs sont des phospholipides ancrés dans la membrane plasmique et qui reconnaissent le domaine N-terminal de l'EGF.

Les inhibiteurs de l'uPA sont la nexine-1 synthétisée par les fibroblastes et les inhibiteurs de l'activateur du plasminogène (PAI-1 et PAI-2) produits par les macrophages, les cellules endothéliales, les fibroblastes ainsi que l'aprotinine (72kDa) synthétisée par les mastocytes. Le tAP est principalement inhibé par les PAI-1 et PAI-2. Ces inhibiteurs voient leurs actions modulées par des facteurs de croissance ; ainsi le TGF β et le bFGF augmentent la synthèse de PAI-1 par les chondrocytes alors que le TNF α la diminue [Campbell,1994]. Ainsi, l'inhibition des PAI par des cytokines qui stimulent la résorption du cartilage (IL-1, TNF α ...) et leur stimulation par des facteurs de croissance (TGF β , bFGF) impliquent la participation de l'activateur du plasminogène dans la destruction du cartilage.

II.4.3.2 La plasmine

La plasmine a pour rôle essentiel l'activation des métalloprotéinases et plus particulièrement de la collagénase et de la stromélysine. Le plasminogène, précurseur inactif de la plasmine qui se trouve dans le plasma à la concentration de 20 mg/dl est activé par l'uAP et le tAP. La plasmine dégrade la fibrine avec qui le plasminogène a une grande affinité. Elle clive préférentiellement les liaisons peptidiques contenant les résidus lysine du côté C-terminal. La plasmine dégrade également les protéoglycanes [Lack,1958]. Bien qu'elle n'ait pas d'action directe sur le collagène, la plasmine peut activer la procollagénase. Les inhibiteurs plasmatiques de la plasmine sont l' α -2 anti-plasmine, l' α -2 macroglobuline et l'aprotinine. L'inhibiteur tissulaire principal de la plasmine est la protéase nexine-1, sécrétée par les fibroblastes. Dans l'arthrose, des taux élevés d'uAP et de plasmine ont été observés dans le cartilage et corrélés avec l'activité de la collagénase.

II.4.3.3 La kallibréine plasmatique.

La kallibréine plasmatique provient de son précurseur inactif la prékallibréine par l'action du facteur XII (facteur Hageman) ou par la kallibréine elle-même. Le facteur Hageman peut être clivé par les molécules de chondroïtine sulfate. La kallibréine plasmatique agit sur les molécules de kininogène de haut poids moléculaire pour donner la bradykinine. La kallibréine active la procollagénase et la prostromélysine et bien que sa forme active soit présente dans le liquide synovial de patients arthritiques à de très faibles concentrations, elle s'avère être un activateur efficace.

II.4.3.4 L'élastase leucocytaire

L'élastase leucocytaire est présente dans les granules azurophiles des polynucléaires neutrophiles et des monocytes sous forme de précurseur contenant deux acides-aminés (Gly-Glu) supplémentaires par rapport à la forme active. C'est une protéine de 28kDa qui agit sur les protéoglycanes en leur supprimant le domaine G1 (HABR) et qui fragmente la protéine de liaison des GAG. L'élastine très résistante à la dégradation protéolytique, est dégradée par l'élastase. Les élastases ont un large spectre d'activité : elles dégradent aussi la fibronectine, la laminine, les fibres de collagène (clivage des peptides N terminaux et élimination des cross-link). L'élastase est plus active sur le collagène de type II que de type I. Elle dégrade également le collagène de type IV résistant à la collagénase. Ses inhibiteurs sont l' α -1 protéinase inhibiteur et l' α -2 macroglobuline.

II.4.3.5 La cathepsine G

La cathepsine G, enzyme "chymotrypsine-like" des polynucléaires neutrophiles est très liée aux chymotrypsines pancréatiques et aux chymases des mastocytes. Elle est synthétisée sous forme de proenzyme. Son action sur les agrécans est plus restreinte que celle de l'élastase et elle n'a pas d'effet sur l'élastine, ni sur le collagène de type I. La cathepsine G solubilise efficacement le collagène du cartilage et peut générer des produits actifs des composants du complément. L' α -1 antichymotrypsine, l' α -1 protéinase inhibiteur et l' α -2 macroglobuline sont ses inhibiteurs physiologiques. La cathepsine G est un activateur des MMPs.

II.4.3.6 La protéinase mastocytaire

Les mastocytes contiennent trois protéinases majeures : une chymase mastocytaire (protéinase mastocytaire, une chymase mastocytaire atypique (protéinase mastocytaire, et une tryptase qui est une trypsine qui forme un complexe avec la trypstatine (molécule identique à l'aprotinine). Les chymases ont un spectre d'activité large ; elles dégradent notamment le collagène de type IV et les

protéoglycanes. Elles sont inhibées par l' α -1 antichymotrypsine et l' α 2 M. Les substrats sont mal connus ; elle active la stromélysine mais pas la procollagénase.

II.4.3.7 La sérine estérase des lymphocytes

Les lymphocytes activés et cytotoxiques, les cellules NK ("Natural Killer") et les lymphocytes engagés dans la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps contiennent une quantité importante de sérine estérases récemment appelées "granzymes" de spécificité comparable à celles de la trypsine et de la chymotrypsine. Comme ces enzymes sont libérées après stimulation d'ionophores calciques et interactions avec les cellules cibles, leur rôle est suspecté dans la dégradation de la matrice extracellulaire [Pasternack,1986].

II.4.4 LES ASPARTYL- PROTÉINASES

La plupart des digestions protéiques intracellulaires dans les cellules des mammifères se déroulent à pH acide dans les lysosomes. La protéinase lysosomiale agissant à pH acide est la cathepsine D, une enzyme de la même famille multigénique que la pepsine et la rénine. Le résidu acide aspartique est indispensable à l'activité catabolique de l'enzyme. La cathepsine D est une glycoprotéine synthétisée sous forme de proenzyme de 42kDa. Elle est ensuite extraite des lysosomes et activée par un mécanisme inconnu. La cathepsine D est présente dans les lysosomes de nombreuses cellules (fibroblastes notamment) mais son activité est plus importante dans les macrophages. Dans les conditions inflammatoires et durant les périodes de destruction rapide de la matrice, la cathepsine D est sécrétée hors des macrophages et des cellules conjonctives principalement sous forme de proenzyme alors que, à pH neutre, elle ne devrait pas avoir d'activité protéolytique même sous sa forme activée. Il est possible que dans les sites inflammatoires, la production de CO₂ et d'acide lactique puissent créer un environnement péricellulaire où le pH serait suffisamment bas pour permettre l'activité protéolytique de la cathepsine D. La cathepsine D dégrade les protéoglycanes à pH 5 en clivant le domaine G1 et la région riche en polysaccharides. Les liaisons peptidiques du collagène natif sont également des sites catalytiques pour cette enzyme. L' α 2 macroglobuline (α 2M) peut se lier à cette enzyme mais cet inhibiteur est instable à pH acide. La pepstatine, un inhibiteur puissant et spécifique des aspartyl protéases, est utilisé expérimentalement pour inhiber la cathepsine.

CLASSE Nom	ACTIVATEURS	SUBSTRATS	pH	INHIBITEURS
Aspartyl prot. Cathepsine D	Non	Agrécane (G1,E2), C II dénaturé	3,0-6,0	α_2 -M
Cystéinyl prot. Cathepsine B	Non	Procollagénase, C. II (télopeptides) agrécane, LP	5,0-6,5	Cystatines
Cathepsine L	Non	LP, élastine, C I, PG	4,0-6,5	Cystatines
Sérine prot. Plasmine	Activ. du plasminogène	Métalloprotéases, PG, fibrine	Neutre	α_2 -anti plasmine, α_2 -M nexine 1, aprotinine
tPA	Activ. du proplasminog.	Plasminogène.	Neutre	Nexine1, PAI 1 et 2 aprotinine
uPA	Activ. du proplasminog.	Plasminogène.	Neutre	PAI 1 et 2, nexine1
Activateur du plasminogène	Cathepsine B	Proplasminogène.	Neutre	PAI 1, protéase nexine (?)
Elastase leucocytaire	Non	Pas de spécificité C I, II, IV, IX, X, et XI, agrécane, élastine, glycoprotéines de struct.	Neutre	α_1 -PI, α_2 -M
Cathepsine G	Non	TIMP, agrécane, C II.	Neutre	α_1 -PI, α_1 antichymotry- psine, α_2 -M
Kallicréine plasmatisque	Facteur XII _a , XII _f	Procollagénase, prostromélysine (?)	Neutre	α_1 -PI
Protéases mastocytaires		PG, CIV	Neutre	α_2 M, α_1 antichymotry.
MMPs - Collagénases : (MMP-1)	Stromélysine, plasmine, kallicréine, cathepsine B	C I, C II, et CIII > CVII, CVIII, CX, Collagènes dénaturés C I > CIII	Neutre	TIMP1 et 2
(MMP-8)				TIMP1 et 2
- Gélatinases 72kDa (MMP-2)	Plasmine	CIV, C II dénaturé, C XI, C V, CVII, agrécane.	Neutre	TIMP 1 et 2
92kDa (MMP-9)	Plasmine	Agrécane, fibronectine	4,8-8,0	TIMP, α_2 M
Stromélysine-1 (MMP-3)		C IV, V, VII, X, CI dénaturé LP, décorine, élastine.		
Stromélysine-2 (MMP-10)		Fibronectine.	4,8-8,0	TIMP
Stromélysine-3 Pump-1 (MMP-7)		?		non
Elastase macroph		PG, fibronectine PG, CIV, élastine		

Tableau 6 : Protéases, substrats et inhibiteurs du cartilage (PAI : inhibiteur de l'activateur du plasminogène. α_1 -PI : α_1 protéase inhibiteur. CI : collagène de type I. α_2 -M : α_2 -macroglobuline. MMPs : métalloprotéases. TIMP : inhibiteurs des MMPs. PG : protéoglycanes) (d'après Werb, 1993).

II.4.5 LES INHIBITEURS ENZYMATIQUES ENDOGÈNES

Les rôles primordiaux tenus par les protéases (notamment collagénase et stromélysine) dans la dégradation irréversible de la matrice expliquent les nombreuses stratégies destinées à diminuer leur taux dans les articulations malades. Pour ce faire, il faut soit augmenter la concentration d'inhibiteurs naturels (TIMP), soit introduire dans l'articulation des composés synthétiques qui se complexent avec les enzymes et les inactivent. D'autres études se focalisent sur l'inhibition de la synthèse des enzymes.

II.4.5.1 L'alpha-2 macroglobuline

Parmi les inhibiteurs naturels de l'activité protéolytique, le plus important est l' α 2 macroglobuline, une glycoprotéine de 750kDa synthétisée dans le foie. Elle est présente dans le serum normal et le liquide synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et d'arthrose. Elle n'inhibe pas seulement les MMP mais également les quatre classes de protéinases. L' α 2M possède une région amorce qui est clivée par l'enzyme. L' α 2M change alors de conformation et piège la protéinase bloquant ainsi l'accès aux substrats. Ainsi, dans les liquides synoviaux de patients atteints d'arthrite, le taux de protéinases des neutrophiles excède celui de l' α 2M et permet alors la dégradation de la matrice. Toutefois, la grande taille de l' α 2M empêche sa pénétration dans les tissus conjonctifs (spécifiquement dans les couches profondes du cartilage) et diminue ainsi son efficacité. Son rôle inhibiteur peut simplement s'exercer dans le liquide synovial où elle est présente en quantité significative.

II.4.5.2 Les inhibiteurs spécifiques des métalloprotéases : TIMP

Ces inhibiteurs spécifiques des MMPs sont produits localement par les chondrocytes et les synoviocytes de type B. Ces inhibiteurs se lient spécifiquement avec la MMP active par une liaison non covalente pour former un complexe inactif extrêmement stable qui bloque l'accès aux substrats. Ils régulent l'activation des métalloprotéinases et donc la protéolyse de la matrice extracellulaire notamment durant le remodelage tissulaire et les processus inflammatoires. Le fait que les TIMP soient produits par les mêmes cellules qui synthétisent la collagénase et la stromélysine suggère qu'ils doivent jouer un rôle important en protégeant la matrice extra-cellulaire de la dégradation. La destruction des tissus conjonctifs observée dans les phénomènes arthritiques peut être la conséquence d'un déséquilibre entre les MMPs et les TIMPs. En effet, il semble que les TIMP soient synthétisés à un taux constant contrairement aux MMPs dont la production augmente [Denhardt,1993].

Le TIMP est dégradé par diverses sérine protéases (notamment l'élastase leucocytaire), par la trypsine et par les radicaux libres. De nombreux agents stimulent la production de TIMP ; les analogues de la vitamine A (les rétinoïdes), les cytokines telles que le TGF β , l'IL-6, l'IL-11, l'IL-13, le LIF et l'oncostatine M. Trois inhibiteurs appartenant à la famille des TIMP ont été identifiés ; TIMP-1, TIMP-2 et TIMP-3 [Vincenti,1994].

a) TIMP-1

TIMP-1 est une glycoprotéine fortement glycosylée de 28kDa qui contient 6 ponts disulfures intramoléculaires conférant à la molécule une conformation en deux domaines majeurs. La partie N-terminale semble détenir l'activité inhibitrice. TIMP-1 forme également un complexe bimoléculaire avec la forme latente de la gélatinase (MMP-9).

b) TIMP-2

TIMP-2 (PM = 22kDa) possède 40% d'homologie avec TIMP-1 et n'est pas glycosylé. Le TIMP-2 forme un complexe avec la gélatinase 72kDa (MMP-2), complexe retrouvé dans le liquide synovial de patients atteints d'arthrite ou d'arthrose sans en connaître le rôle exact.

c) TIMP-3

Egalement appelé ("Chimp-3"), le TIMP-3 a récemment été décrit dans la matrice extracellulaire chez le poulet [Pavloff,1992].

II.4.5.3 Les serpinés

Les serpinés sont les inhibiteurs spécifiques des sérine protéinases appartenant à une superfamille multigénique. Les serpinés sont des glycoprotéines (PM=50-100kDa) qui comprennent les inhibiteurs plasmatiques suivants ; l'inhibiteur de l' α -1 protéinase (qui inhibe l'élastase leucocytaire et la cathepsine G), l'antithrombine III (qui inhibe la thrombine), l'inhibiteur C-1 (qui inhibe la kallikréine), l' α 2-antiplasmine (qui inhibe la plasmine) et l' α 1-antichymotrypsine (qui inhibe la cathepsine G) et les enzymes chymotrypsine-like. Les inhibiteurs tissulaires de la classe de la serpine comprennent la protéase nexine-1 (inhibe l'uAP, la plasmine et la trypsine), le PAI-1 des cellules endothéliales et des fibroblastes (inhibe tAP et uAP), et le PAI-2 des macrophages. L'inhibiteur de l' α -1 protéinase peut également être synthétisé localement dans les tissus par les macrophages

II.4.5.4 Les inhibiteurs des cystéine protéases

Les inhibiteurs extracellulaires majoritaires des cystéine protéinases sont l' α 2 macroglobuline et l'inhibiteur de l' α -cystéine protéinase (α -CPI). L' α -CPI est un inhibiteur de 60kDa qui possède des domaines fonctionnant comme le précurseur du kininogène. A l'inverse de l' α 2M, trop volumineuse, l' α CPI pénètre les espaces tissulaires. Dans les cellules humaines, deux inhibiteurs de cystéine protéinases, les cystatines toutes deux de poids moléculaire de 13kDa, présentent des activités inhibitrices dans le cartilage.

II.4.6 MECANISMES DE DEGRADATION DU CARTILAGE

La dégradation des molécules de la matrice ne caractérise pas seulement un état pathologique puisqu'elle participe au remodelage tissulaire durant la croissance ainsi qu'au renouvellement normal du cartilage. Dans le cartilage normal, il existe une balance continue entre les processus de dégradation et de synthèse de la matrice extracellulaire. La dégradation du cartilage est contrôlée par les cytokines qui régulent la synthèse des protéinases. Dans les conditions pathologiques (arthrite, arthrose) les protéinases provenant des neutrophiles et des synoviocytes ont un rôle majeur dans la destruction cartilagineuse [Poole,1993]. Dans la polyarthrite rhumatoïde, la synoviale est la source principale d'enzymes dégradatives alors que dans l'arthrose, ce sont les chondrocytes qui constituent la source majeure d'enzymes responsables du catabolisme du cartilage. La production locale d'IL-1 et de TNF- α mène à la destruction du cartilage par les chondrocytes. Le contact entre les cellules synoviales et le pannus entraîne la destruction de la matrice par les protéases. Les complexes immuns peuvent directement stimuler la production d'IL-1 par les monocytes et macrophages mais aussi par les neutrophiles. La production d'IL-8 par les chondrocytes stimulés par l'IL-1 peut attirer les leucocytes à la surface cellulaire et induire la dégranulation de ces cellules.

Les principales enzymes impliquées sont les métalloprotéases, les sérines protéases et les thiol protéases (*figure 18*). Les deux principales MMPs sont la collagénase et la stromélysine qui jouent un rôle prédominant dans la dégradation du cartilage. La collagénase est responsable de la dégradation du réseau de collagène. Elle est identifiée in situ dans le cartilage et son activité est corrélée avec la sévérité des lésions histologiques dans l'arthrose [Pelletier,1993]. La stromélysine dont l'activité est également étroitement liée à la sévérité des lésions histologiques est la protéoglycanase essentielle du cartilage articulaire. Elle est capable d'activer la dégradation de la protéine porteuse des monomères de protéoglycanes.

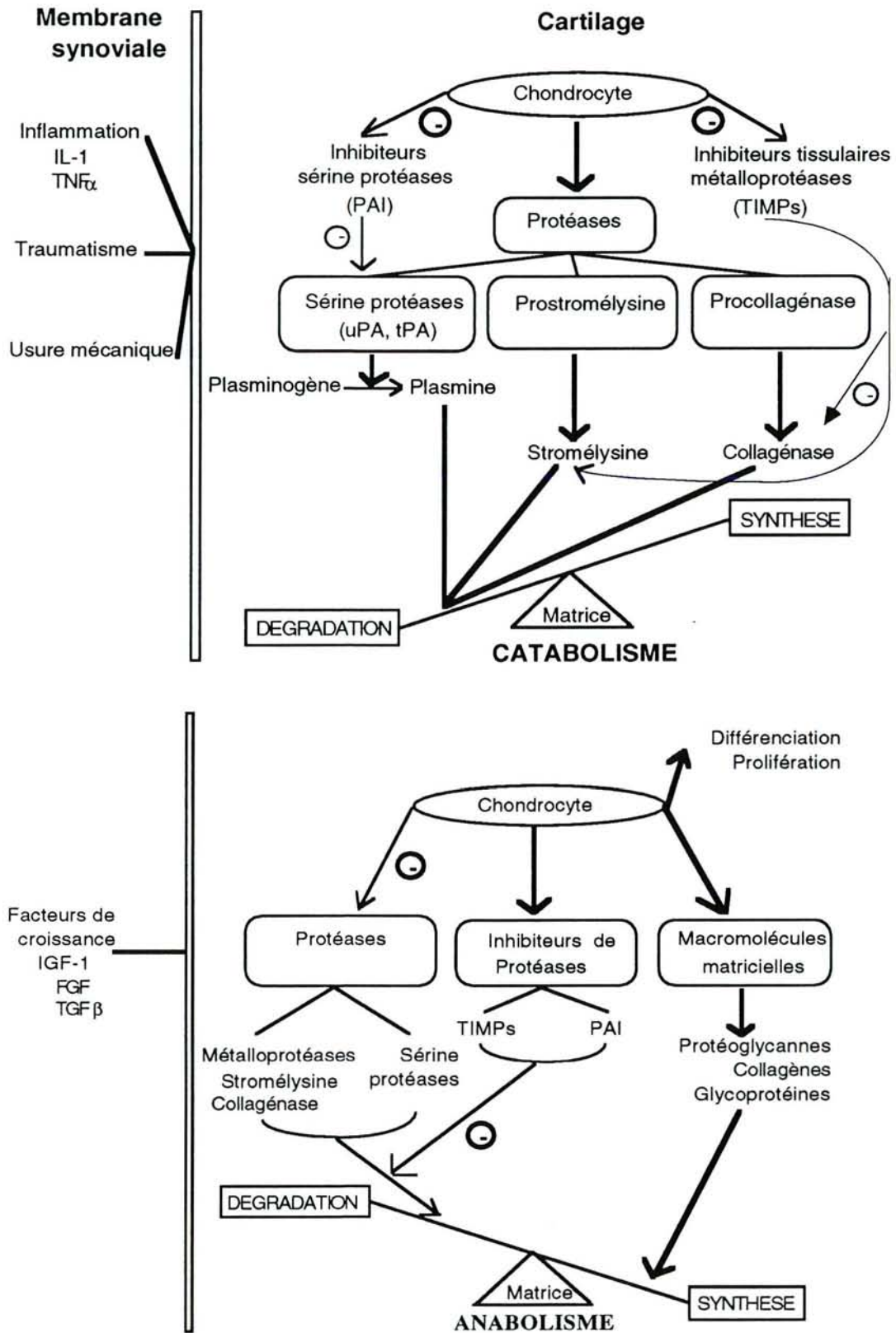


Figure 18 : Principaux facteurs impliqués dans l'homéostasie du cartilage articulaire (d'après Pelletier, 1993)

Le clivage initial des agrécanes par la stromélysine se situe entre les domaines G1 et G2, libérant ainsi des fragments G1 reliés à l'acide hyaluronique. La destruction des protéoglycanes paraît être l'élément initial puisqu'elle permet l'accessibilité de la matrice à d'autres enzymes chondrocytaires, comme les collagénases, qui en raison de leur poids moléculaire élevé ne peuvent diffuser facilement. Dans le cartilage âgé, on observe une accumulation de domaines G1. Seules les formes actives des MMPs sont capables de dégrader la matrice dans la mesure où elles ne sont pas inhibées par le TIMP. L'activation des MMPs nécessite un clivage enzymatique de la protéine réalisé par diverses sérine-protéases (kallitréine, trypsine, plasmine, cathépsines). La synthèse des MMP est stimulée par de nombreux médiateurs : TGF- β , rétinoïdes, IL-1, IL-6, LIF (leukemia inhibitory factor), EGF et divers facteurs de croissance, certains cristaux. Les principaux inhibiteurs sont les corticoïdes, le TGF- β et les rétinoïdes. Au niveau du cartilage, la plasmine est contrôlée par le système plasminogène / activateur du plasminogène. La cascade enzymatique se poursuit par l'activation de la collagénase par la stromélysine, une autoactivation des MMPs, une activation par les radicaux libres.

Ainsi, un équilibre très fin entre les protéinases et leurs inhibiteurs peut être perturbé par les cytokines et les hormones aboutissant alors à la dégradation ou à la synthèse de la matrice extracellulaire du cartilage(*figure 18*).

II.5 LES RADICAUX LIBRES

Les radicaux libres oxygénés jouent un rôle dans la dégradation de la matrice cartilagineuse. Ce sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux hydroxylés (OH^{\cdot}). Le radical hydroxyle est le plus réactif et peut dériver en présence d'ions métalliques de transition, du peroxyde d'hydrogène ou du superoxyde. La source extracellulaire la plus importante de métabolites oxygénés est constituée par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles. Il a été démontré que les chondrocytes eux-même produisent des peroxydes d'hydrogène.

II.6 LE MONOXYDE D'AZOTE : NO

Nous avons succinctement évoqué dans le paragraphe consacré à l'interleukine-1, le rôle possible du NO dans l'inhibition de la synthèse des molécules de la matrice du cartilage. Aussi, devant l'intérêt croissant manifesté pour le monoxyde

d'azote, nous envisagerons quelques rappels sur sa biosynthèse, ses fonctions biologiques et notamment dans l'inflammation articulaire.

II.6.1 BIOSYNTHÈSE DU NO

Le monoxyde d'azote est un gaz radicalaire inorganique de formule $\cdot\text{N}=\text{O}$ (abrégé NO). Le NO est produit par une famille d'enzymes, les NO synthases, à partir d'un substrat commun, la L-arginine. Les NO synthases catalysent l'oxydation de la L-arginine en L-NOHA, intermédiaire qui perd l'azote de la fonction guanidine terminale pour être transformé en L-citrulline et en NO (figure 19). L'oxygène moléculaire sert d'accepteur d'électrons. Les coenzymes impliqués dans cette réaction sont le tétrahydrobioptérine, le NADPH (nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate), le FMN (flavine mononucléotide) et le FAD (flavine-adénine dinucléotide).

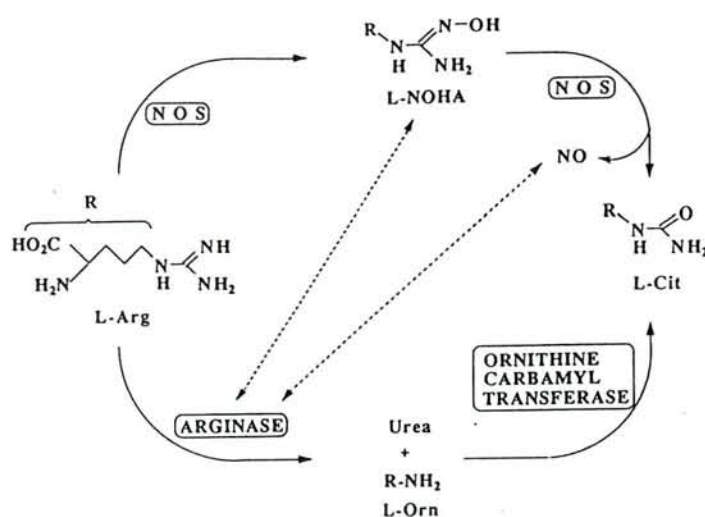


Figure 19 : Biosynthèse du Monoxyde d'azote (NO: monoxyde d'azote, NOS: NO synthase, L Arg: L arginine, L Cit: L Citrulline, L-NOHA: L-N-OH-arginine) (d'après Boucher, 1994)

La production du NO dépend de deux voies enzymatiques : l'une **constitutive**, dépendante du calcium, secrète du NO à l'état basal en petites quantités (picomoles), alors que l'autre est **inductible** par des stimuli tels que l'endotoxine, indépendante du calcium, et produite en grandes quantités (nanomoles). Cependant, la forme inductible de la NO Synthase (iNOS) trouvée dans les chondrocytes semble dépendre du calcium [Palmer, 1992]. Les principales propriétés et localisations des formes constitutives (cNOS) et inductibles (iNOS) des enzymes détectées dans de nombreuses cellules sont comparées dans le tableau 7.

	FORME CONSTITUTIVE	FORME INDUCTIBLE
Localisations	Endothélium, cerveau, plaquettes	Macrophages, hépatocytes, synoviocytes, cellules des muscles lisses, etc
Calcium dépendance	Oui	Non
Quantité de NO produite	Faible	Elevée
Durée de production	Courte	Prolongée
Temps de réponse	Immédiat	Avec délai

Tableau 7: Propriétés des formes inductibles et constitutives de NO synthase (d'après Stefanovic-Racic, 1994)

Trois isoformes de NOS ont été clonées : la NO-synthase inductible macrophagique, la NO-synthase constitutive du système nerveux central et la NO synthase constitutive spécifique de l'endothélium vasculaire.

Une variété d'analogues proches de l'arginine comme la N-monométhyl-L-arginine (L-NMMA ou NMA) ou la N-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME) inhibent la biosynthèse de l'arginine de façon non sélective vis à vis de cNOS ou de iNOS. Le 7 nitro-indazole est le premier inhibiteur de NO synthase qui n'induit pas de façon concomitante une élévation de pression sanguine.

II.5.2 FONCTIONS BIOLOGIQUES

Le NO est impliqué dans la régulation basale du tonus vasculaire, participe à l'activité cytotoxique des macrophages, désagrège les amas plaquettaires déjà formés et joue un rôle dans la neurotransmission. C'est également un agent cytotoxique et cytostatique ; il est produit par les macrophages activés (par le LPS). Le NO est administré par inhalation dans les syndromes de détresse respiratoire aiguë. Nommée "molécule de l'année" par *Science* en 1992, les nombreuses fonctions du NO ont donné lieu à un grand nombre de revues [Moncada,1993; Knowles,1994; Berdeaux,1993, Anggard,1994].

Le NO n'est pas stocké mais diffuse librement à partir de son lieu de formation. Sa réactivité est liée à ses propriétés réductrices pour former des couples redox. Il est soluble dans l'eau et les lipides. Les molécules de NO libérées sont très instables et possèdent une demi-vie courte de l'ordre de 3 à 5 secondes. Le NO réagit spontanément avec l'oxygène pour former des nitrites (NO₂⁻) qui par la suite se transforment en nitrates (NO₃⁻), molécules plus toxiques que le NO lui-même. Le NO possède une grande affinité pour l'hème et les atomes de fer non hémiques présents dans les groupes prosthétiques des protéines. La liaison du NO au groupement hémique de la guanylate cyclase active cette enzyme et augmente ainsi les taux intracellulaires de GMPc. Le NO a également la propriété de se combiner à l'anion superoxyde. Cette propriété dont on pensait initialement

qu'elle fournissait une protection lors de l'ischémie reperfusion semble maintenant être impliquée dans la production d'anion péroxynitrite ONOO- générateur de radicaux libres lors de l'inflammation.

II.6.3 NO ET ARTHRITE

L'implication du NO dans la régulation immunitaire, l'inflammation, l'autoimmunité et l'arthrite prend une part de plus en plus importante. Bien que l'implication du NO dans l'inflammation soit évidente, on lui attribue à la fois des activités pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Vasodilatateur, le NO augmente l'infiltration vasculaire dans un grand nombre de tissus (sauf l'intestin de rat). Son activité anti-inflammatoire pourrait s'expliquer par sa propension à inhiber la synthèse des PGE₂, de l'IL-6 [Stadler,1993] et du thromboxane. Les effets pro-inflammatoires du NO ont un rôle dans la destruction tissulaire puisqu'elle est exacerbée par l'arginine, à l'inverse du NMA qui semble plutôt protecteur. Du fait de sa courte durée de vie du NO, sa diffusion est limitée. S'il est impliqué dans la physiopathologie articulaire, il doit être synthétisé localement. Les sources potentielles intra-articulaires de NO sont : les cellules endothéliales, les leucocytes et les cellules synoviales.

Dans les articulations inflammatoires, de grandes quantités de NO sont synthétisées par les neutrophiles, les lymphocytes, les mastocytes et surtout les macrophages ainsi que par les chondrocytes : à chaque fois c'est la forme inductible de la NO synthase qui est impliquée [Stadler,1991]. De plus, sous l'influence de l'IL-1 et des endotoxines, la production de NO est stimulée mais pas en présence de FGF, de TNF- α ou d'interféron- γ [Stefanovic-Racic,1993].

Lors de la polyarthrite rhumatoïde, les taux synoviaux élevés de nitrite et nitrate suggèrent la synthèse intra-articulaire de NO [Farrell,1992]. Bien que le NO soit clairement impliqué dans les phénomènes inflammatoires, ses effets sur le métabolisme articulaire sont encore mal connus. Quelques études récentes ont décrit l'action du NO sur le métabolisme du cartilage chez l'homme [Rediske,1994], chez le rat [Stefanovic-Racic,1994,] et chez le lapin [Taskiran,1994]. Les chondrocytes articulaires stimulés par l'IL-1 synthétisent de grandes quantités de NO.

Des taux urinaires élevés de nitrate sont retrouvés chez le rat qui développe une polyarthrite à l'adjuvant [Stichtenoth,1994]. Les inhibiteurs de NO (L-NMA) préviennent la biosynthèse de NO, le développement de l'œdème ainsi que les lésions histologiques [Stefanovic-Racic,1994; McCartney-Francis,1993]. Le rôle potentiel du NO dans le remodelage tissulaire de l'articulation pourrait

s'expliquer par la diminution du flux sanguin artriculaire et par l'induction de la GMP cyclique.

Taskiran apporte un élément de réponse en affirmant que le NO endogène synthétisé est le médiateur responsable de l'inhibition de la synthèse des protéoglycanes en réponse à l'interleukine-1. L'IL-1 induirait la synthèse de la NO synthase par activation de ses récepteurs à la surface cellulaire. Ainsi, les antagonistes du NO (inhibiteurs sélectifs de iNOS) en rétablissant la synthèse des PG, pourraient être des agents chondroprotecteurs ou chondroréparateurs potentiels [Taskiran,1994]. De même, l'expression de la forme inductible de NOS est diminuée par divers cytokines et facteurs de croissance ; le TGF- β , l'EGF, le PDGF, l'IL-8 et l'IL-4. Les glucocorticoïdes sont des puissants inhibiteurs de l'expression des iNOS et il est concevable que cette propriété soit en partie responsable de leurs activités anti-inflammatoires et immunosuppressives.

II.7 RETINOÏDES ET CHONDROCYTES

Les rétinoïdes sont des analogues chimiques de la vitamine A (rétinol) obtenus par modification de différents radicaux. La première génération des rétinoïdes comprend tous les métabolites de la vitamine A en particulier l'acide tout-trans-rétinoïque et son métabolite l'acide cis-13-rétinoïque. Ils inhibent la chondrogénèse de façon dose-dépendante. En effet, dans les cultures cellulaires avec de très fortes doses de rétinoïdes, il existe une véritable destruction des cellules mésenchymateuses à différenciation chondrogénique. Dans les cultures de chondrocytes dérivés des articulations métacarpophalangiennes de bovin, les rétinoïdes induisent une déplétion irréversible des PG du cartilage (inhibition de la synthèse et perte de PG) ainsi qu'une perte de hyaluronate [van den Hoff,1993]. Dans les cellules synoviales et les chondrocytes induits par l'IL-1, les rétinoïdes inhibent l'activité des collagénases, gélatinases et stromélysines [Trechsel,1982]. De même, ils stimulent la résorption du cartilage. Les rétinoïdes semblent induire l'activation du système plasmine/activateur du plasminogène responsable des dommages cartilagineux observés *in vitro* [Meats,1985]. Les rétinoïdes peuvent bloquer la différenciation des cellules embryonnaires et sont ainsi rendus responsables des malformations osseuses fœtales. Le mécanisme procède probablement de l'inhibition de la synthèse et de la sécrétion des glycoprotéines et des GAGs. Ils inhibent également la transcription du collagène de type II et de l'agrécan dans les chondrocytes du cartilage de conjugaison.

II.8 REGULATION HORMONALE DU CARTILAGE

La régulation hormonale du métabolisme du cartilage peut s'exercer à différents niveaux. L'hypervitaminose A provoque la dégradation de la matrice cartilagineuse, la fibrillation du cartilage et l'arthrose chez le lapin. La carence en vitamine B6 semble altérer les cross-links du collagène. Les métabolites actifs de la vitamine D3 stimulent la sulfatation et la synthèse des PG tout en diminuant leur activité mitotique. D'où le rôle important joué par la vitamine D3 dans le maintien et la différenciation des chondrocytes. L'hormone de croissance (GH) joue un rôle prépondérant dans la croissance du squelette. La déficience en GH est à l'origine du nanisme hypophysaire, mais des taux excessifs d'hormone entraînent une arthrose du cartilage articulaire. *In vivo*, la GH accélère le développement et la maturation du cartilage articulaire jeune et entraîne chez l'adulte, une stimulation de la prolifération cellulaire avec hypertrophie des cellules et de leur organites, une stimulation de la production de la matrice avec épaissement des fibres de collagène. Par contre *in vitro*, la GH diminue la synthèse des GAG dans les cultures de chondrocytes articulaires. Il faut citer l'action anabolisante de la calcitonine, de la PTH et de la vasopressine sur les chondrocytes épiphysaires en culture. Les œstrogènes semblent agir en synergie avec la GH dans la régulation de la croissance. Un traitement par l'oestradiol chez la souris stimule la synthèse et l'épaississement des fibres de collagène mais inhibe la synthèse des PG. Une étude récente [da Silva,1993] a démontré des effets protecteurs de l'œstradiol et les androgènes sur la destruction cartilagineuse induite chez des rats femelles. La testostérone accélère le vieillissement du cartilage et augmente l'incidence de l'arthrose chez la souris. Enfin, les effets des glucocorticoïdes sur le cartilage sont très étudiés du fait de leur large prescription en rhumatologie. La cortisone provoque des changements structuraux du cartilage de la tête fémorale (atrophie des chondrocytes, mort cellulaire) qui sont bien corrélés avec un ralentissement du métabolisme cellulaire (diminution de la prolifération, diminution de l'incorporation des précurseurs radioactifs dans la matrice) [Tessler,1975]. La synthèse du collagène et sa maturation sont diminuées. Cet effet anti-anabolique est doublé d'une inhibition partielle de la dégradation et le renouvellement du cartilage est ainsi ralenti. Toutefois, la dexaméthasone et l'hydrocortisone ont également un rôle anabolique puisqu'ils stimulent la chondrogénèse *in vitro* [Kato,1985] et inhibent la synthèse des métalloprotéinases neutres.

CHAPITRE III

TECHNIQUES D'ETUDE DU CARTILAGE

CHAPITRE III

TECHNIQUES D'ÉTUDE DU CARTILAGE

III.1 ETUDES MORPHOLOGIQUES DU CARTILAGE

Le cartilage est la première structure atteinte lors de nombreuses affections rhumatologiques notamment au cours des rhumatismes dégénératifs ou inflammatoires. Nous développerons dans ce chapitre les méthodes d'évaluation globale du cartilage couramment utilisées en clinique ou en pharmacologie expérimentale. Puis, après avoir passé en revue les marqueurs biochimiques de l'atteinte cartilagineuse, nous nous intéresserons aux différentes techniques de dosage des protéoglycanes et de leur métabolisme.

III.1.1 RADIOLOGIE

En cas d'arthrite ou d'arthrose, l'atteinte du cartilage est habituellement estimée par le pincement de l'interligne articulaire. Sa mise en évidence nécessite une technique parfaite et reproductible ainsi qu'une mesure fiable et précise. Celle-ci est habituellement effectuée au milieu de l'interligne articulaire avec un compas à vis stabilisatrice ou une règle millimétrée. Sa reproductibilité inter et intra-observateur reste cependant médiocre. Aujourd'hui des systèmes de numérisation d'image se développent pour quantifier l'épaisseur et la surface de l'interligne. Cependant, la radiographie ne détectera les lésions du cartilage bien après que celles-ci se soient installées. Chez l'animal, les études radiologiques peuvent se faire grâce à un système de macroradiographie.

III.1.2 SCANNER

Le scanner permet d'apprécier un pincement de l'interligne articulaire invisible sur des radiographies et de mieux mettre en évidence les lésions et le remodelage osseux. Son application en pharmacologie expérimentale est restreinte à l'utilisation d'animaux plus gros comme le chien ou le cochon.

III.1.3 IRM

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) prend une importance sans cesse croissante car elle permet d'appréhender de manière non invasive les caractéristiques de certains tissus sains ou pathologiques. Les anomalies IRM des atteintes du cartilage hyalin sont les suivantes : pincement de l'interligne articulaire, amincissement de l'épaisseur du cartilage, variations d'intensité de signal du cartilage, modifications de l'os sous-chondral adjacent, prolifération synoviale, présence d'un épanchement intra-articulaire associé, anomalie de l'os juxta-articulaire.

Les ulcérations du cartilage peuvent être dépistées en IRM et leur identification nécessite cependant une résolution spatiale adaptée, un bon rapport signal-bruit et un contraste satisfaisant entre le cartilage et le liquide articulaire. La mesure de l'épaisseur du cartilage dépend de la résolution spatiale, du rapport signal-bruit, du contraste entre le cartilage et le liquide articulaire. En pratique lors des études expérimentales, l'exploration des articulations de petites taille nécessite l'utilisation d'appareil à haut champ.

III.1.4 HISTOLOGIE

L'étude histologique n'est possible qu'après le prélèvement de tissu cartilagineux lors d'un acte chirurgical chez l'homme ou après la mort chez l'animal. Pour l'étude en microscopie optique, les échantillons de cartilage bénéficient des procédures classiques de préparation ; après inclusion dans la paraffine, des coupes d'environ 8 microns sont réalisées et sont colorées avec la safranine O (colorant métachromasique) [Rosenberg,1971] et son contre-colorant l'hématoxyline (fémur, tibia, rotule) ou avec l'hématoxyline-éosine (membrane synoviale). C'est une méthode semi quantitative puisqu'elle permet l'établissement d'un score d'érosion cartilagineuse (côté de 1 à 5). De plus, la diminution de la coloration (bleu alcian, safranine-O ou bleu de toluidine [Poole,1970]) dans le cartilage qui est proportionnelle à la perte de PG peut être évaluée. L'histologie permet également la détermination de l'épaisseur du cartilage articulaire et du rapport matrice/chondrocytes [Rubin,1987]. La microscopie électronique à finalité plus fondamentale permet l'étude de l'ultrastructure du cartilage mais le plus souvent, elle ne permet pas la quantification de l'atteinte cartilagineuse.

III.1.5 DENSITOMÉTRIE OPTIQUE

Une nouvelle technique d'analyse d'image a récemment été mise au point chez la souris : elle consiste en une analyse densitométrique du cartilage articulaire

préalablement coloré à la safranine O [van der Kraan,1994]. La lecture des densités optiques dans les différentes couches du cartilage offre une bonne reproductibilité et une bonne sensibilité et élimine les variations entre les scores dues aux différents observateurs.

III.1.6 AUTORADIOGRAPHIE

Les techniques autoradiographiques chez l'animal permettent de visualiser les molécules cartilagineuses radiomarquées que l'on désire mettre en évidence. L'animal doit avoir subi au préalable une injection par voie systémique de molécules radiomarquées et après le sacrifice de l'animal, les articulations sont prélevées. La préparation des échantillons cartilagineux (fixation et décalcification) permet la réalisation de sections de 6 microns qui sont montées sur une lame enduite de gélatine. Les lames sont ensuite immergées dans une émulsion révélatrice et exposées pendant 3 à 5 semaines. Après cette période, les lames sont développées et colorées avec l'hématoxyline-éosine.

III.2 ETUDE BIOCHIMIQUE DU CARTILAGE

III.2.1 LES MARQUEURS BIOCHIMIQUES DU CARTILAGE

Des efforts considérables sont déployés pour découvrir un marqueur biochimique du cartilage qui soit spécifique, non invasif et dont la destruction puisse être contrôlée. La recherche d'un paramètre biochimique dans le diagnostic des lésions cartilagineuses peut se réduire aux constituants de la matrice du cartilage : collagène II, protéoglycanes, élastine, acide hyaluronique, glycoprotéines, chondronectine et fibronectine. Il existe trois types principaux de marqueurs : ceux dont la concentration dépend de leur dégradation dans la matrice extracellulaire, ceux contrôlant la synthèse de néoépitopes formés durant la maladie et ceux contrôlant le développement d'autoanticorps circulants aux composés de la matrice extracellulaire libérés dans le cartilage [Carney,1991 ; Poole,1994].

III.2.1.1 Marqueurs liés au collagène

Lors de la dégradation du cartilage, de nombreux fragments de molécules de collagène sont libérés du cartilage. Les groupements pyridinolines des cross-links du collagène sont présents à des taux urinaires plus élevés chez les patients atteints d'arthrose et d'arthrite mais ne sont pas corrélés à l'activité inflammatoire et ne

sont pas suffisants pour l'aide au diagnostic. Le peptide carboxy-terminal du procollagène de type II constitue un bon marqueur de la réparation de la matrice puisqu'il est libéré durant la fibrillogénèse et n'est pas retenu dans le tissu [Heinegard,1991]. Les collagènes de types IX, XI et II spécifiques du cartilage, peuvent aussi servir de marqueurs potentiels. Une technique immunohistologique intéressante a été développée grâce à des anticorps capables de reconnaître les fragments débobinés et les peptides CNBr (bromure de cyanogène) du collagène de type II témoins de leur dégradation [Poole,1989]. Le déroulement et l'exposition des épitopes dans les zones de dégradation ont permis de différencier nettement les atteintes arthrosiques des atteintes arthritiques.

III.2.1.2 Marqueurs liés aux protéoglycanes.

Les taux élevés de protéoglycanes dans le liquide synovial reflètent la destruction du cartilage articulaire et peuvent, au même titre que le hyaluronane, être des marqueurs de la sévérité de la polyarthrite rhumatoïde. Ces produits de dégradation sont des fragments de PG nouvellement synthétisés. Le cartilage présente une richesse en kératane sulfate plus importante que la plupart des tissus, c'est pourquoi ces molécules sont retrouvées en plus grande concentration dans les sérums de patients atteints d'arthrose, mais à des taux insuffisants pour être d'une grande utilité clinique. La détermination des kératane sulfates par les anticorps monoclonaux est délicate car la conformation des kératane sulfates présentée à l'anticorps influence beaucoup le résultat des dosages [Brandt,1989]. La protéine de liaison constitutive des agrécanes n'est pas spécifique du cartilage mais elle s'y trouve en excès. Dans l'arthrose, une protéolyse limitée de la protéine de liaison mène à l'exposition de ses épitopes qui peuvent être détectés par méthode immunologique .

III.2.1.3 Marqueurs liés aux protéines de la matrice

La COMP ("Cartilage Oligomeric Matrix Protein") très abondante dans le cartilage articulaire présente un grand intérêt bien que sa fonction soit inconnue. Cette protéine est un protéoglycane qui contient une chaîne de chondroïtine sulfate par sous-unité de PM 100kDa. Cette molécule est un bon candidat pour être un marqueur de l'arthrose. Une autre protéine, la CMP (148kDa), présente seulement dans le cartilage mais à des taux restreints, est absente du cartilage articulaire. Les protéines matricielles de 58 et 59kDa ainsi qu'une protéine de 50kDa sont des marqueurs potentiels [Carney,1991].

III.2.1.4 Marqueurs reliés aux chondrocytes et à leurs protéines membranaires

Lors de la destruction du cartilage, des cellules désolidarisées de la matrice ont la capacité d'initier une réponse immune. Le titrage d'anticorps dirigés contre les protéines de la membrane du chondrocyte montrent l'existence d'au moins 9 protéines impliquées dans la réponse immune [Carney,1991]. Une protéine semble avoir été identifiée comme l'anchorine II.

Marqueur	Signification principale	Arthrose		Polyarthrite rhumatoïde	
		Sérum	Liq. Syn.	Sérum	Liq. Syn.
Synoviale					
Ac. hyaluronique	Synovite	+	ND	+	+
Cartilage					
Peptide C-terminal du procollagène de type II	Synthèse du procollagène de type II	+	+	+	+
Chaîne α du collagène de type II	Dégradation du procollagène de type II	Etudes en cours			
Agrécanes					
(a) Kérotane sulfate	Synthèse et dégradation de l'agrécane	+	+	-	+
(b) Protéine porteuse	Dégradation	=	+	=	+
(c) Epitopes des chaînes de chondroïtine sulfates	Probablement synthèse	+	+	+ -*	+
COMP (Cartilage Oligomeric Protein)	Synthèse et/ou dégradation ?	ND	+	+	
CMP (Cartilage matrix protein)	Synthèse et/ou dégradation ? (cartilage non articulaire)	ND	ND	+	ND

Tableau 8 : Marqueurs synoviaux et cartilagineux du métabolisme articulaire
*affection aiguë uniquement, ND : non déterminé
(d'après Poole, 1994)

III.2.1.5 Marqueurs anaboliques de la progression de la maladie dans le cartilage articulaire

Les taux sériques élevés des marqueurs du cartilage peuvent être partiellement masqués par le renouvellement normal des tissus. Un marqueur plus spécifique du cartilage arthrosique tels que les épitopes présents sur les chaînes de chondroïtines sulfates des protéoglycanes sont reconnus par les anticorps monoclonaux. L'épitope 846 des chaînes de chondroïtines sulfates et l'épitope AN9PI sur les chaînes de kératanes sulfates sont identifiés grâce à des anticorps monoclonaux et pourraient constituer des marqueurs de la synthèse des agrécans [Poole,1994]

III.2.2 MÉTHODES DE DOSAGE DES PROTÉOGLYCANES

Dans ce chapitre, nous avons décrit les méthodes de dosages relatives aux protéoglycanes car nos études expérimentales sont essentiellement consacrées à l'étude du métabolisme des protéoglycanes du cartilage articulaire.

III.2.2.1 Sources de protéoglycanes et conditions d'extraction

La source de protéoglycanes détermine souvent l'approche initiale de la purification. Les tissus et organes peuvent généralement être obtenus en grande quantité pour permettre les techniques classiques de purification chimique. La solubilisation ou l'extraction des tissus implique la présence d'inhibiteurs de protéases. La procédure d'extraction standard pour les PG du cartilage est réalisée grâce à un tampon chaotropique avec du chlorure de guanidium (GuCl, 4M) dans l'acétate de sodium (pH6) qui à pour effet de solubiliser la matrice des tissus conjonctifs et les PG des membranes basales. Les inhibiteurs de protéases couramment utilisés sont : la benzamidine, la N-éthylmaléimide, l'acide 6-aminocaproïque, le PMSF (ou fluorure de phenyl-methylsulfonyl), l'EDTA, la pepstatine, la leupeptine et les sérines proche de la trypsine. En variant les conditions successives d'extraction, on peut obtenir des pools enrichis en un protéoglycane donné. Par exemple, les petits PG sont obtenus dans les faibles concentrations de GuCl ; à l'inverse, les grands PG requièrent des gradients élevés de GuCl pour une solubilisation efficace.

La précipitation est une des méthodes les plus employées pour la purification des protéines. Les protéines et les PG sont précipitées par l'addition de sulfate d'ammonium, d'éthanol, de polyéthylène glycol et d'acide trichloracétique. Les protéoglycanes, du fait de leur densité de charges négatives sont sélectivement précipités par les détergents cationiques comme le cétylpyridinium chloride (CPC) [Fedarko,1993].

III.2.2.2 Les méthodes colorimétriques

Les méthodes colorimétriques sont basées sur la formation de complexes colorés avec les sucres élémentaires communs à tous les glycosaminoglycanes (acide uronique et hexosamine). Elles offrent une faible sensibilité (limite de détection de 1 à 5 mg.l⁻¹). La plus utilisée est la réaction de Dische : hydrolyse acide à chaud suivie de la formation d'un complexe rose en présence de carbazole [Dische,1947]. L'addition de borate de sodium augmente la sensibilité de la réaction et stabilise le complexe coloré, mais elle n'élimine pas l'interférence des groupements thiols et des hexoses [Bitter et Muir]. Une autre méthode basée sur la formation d'un complexe avec le méthahydroxyphényl améliore encore la sensibilité, et réduit l'interférence par les hexosamines [Blumenkrantz,1973].

Les protéoglycanes sont des molécules chargées négativement (grâce à leur sulfate et à leur acide uronique) et le dosage des liaisons électrostatiques entre le colorant et les GAG est possible. Une réaction est basée sur la formation d'un complexe coloré avec le bleu alcian [Gold,1981]. Cette méthode est très utilisée pour doser les GAG dans les milieux biologiques et pour les mettre en évidence sur des coupes histologiques. Selon les conditions opératoires, il est possible de ne doser que les GAG sulfatés (pH acide) ou l'ensemble des GAG (pH basique). Pour le dosage des GAG sulfatés, la technique au bleu alcian est maintenant supplantée par la méthode au bleu de 1,9 diméthylméthylène [Farndale,1986], un colorant métachromatique qui se lie au GAG sulfatés. Cette technique que nous avons employée pour le dosage des GAG dans le cartilage rotulien des rats sera décrite plus précisément dans le chapitre VI. Dans les milieux biologiques, il est difficile d'identifier spécifiquement les protéoglycanes du cartilage avec cette technique puisqu'ils sont tous métachromatiques. Aussi les techniques d'immunodétection comme les dosages ELISA ou radioimmunologiques offrent des avantages supérieurs aux techniques biochimiques ; elles sont plus sensibles permettant ainsi la détermination dans des échantillons plus petits.

II.2.2.3 Marquage isotopique

Différents précurseurs radioactifs sont utilisés pour identifier les protéoglycanes. Le sulfate marqué au soufre 35 (³⁵S) couramment employé est incorporé presque exclusivement dans les sulfates des chaînes de GAG. La glucosamine marquée au tritium [(³H)glcN] est également utilisée comme précurseur métabolique puisqu'elle est transformée en UDP-(³H)glcNac et UDP-(³H)galNac, intermédiaires hautement énergétiques impliqués dans la synthèse des GAG. Les précurseurs radioactifs qui ciblent les protéines (acides aminés marqués) et d'autres parties spécifiques des PG comme la méthionine marquée au ³⁵S (³⁵S-méthionine) mettent en évidence les protéines porteuses des PG. L'incorporation

de ^3H -inositol dans les PG est utilisé comme marqueur des HSPG qui possèdent un groupement phosphatidyl-inositol. Une des grandes oppositions à l'utilisation du radiomarquage est qu'il doit être capable de renseigner précisément si les produits radioactifs, sont générés par incorporation dans la molécule, signe de leur biosynthèse ou s'ils sont le résultat de produits cataboliques marqués recyclés. Le problème peut être contourné en isolant et en déterminant la structure des composants radiomarqués et en analysant la provenance de la structure : anabolisme ou recyclage catabolique [Gysen,1984].

III.2.2.4 Electrophorèse

Cette méthode simple permet de déterminer et de contrôler les PG durant la purification. La séparation électrophorétique de macromolécules fait intervenir la migration dans un champ électrique de molécules chargées à travers un filtre poreux. La porosité du gel est fonction de la concentration d'agarose ou du pourcentage d'acrylamide et de liaisons croisées présentes. Ainsi, les macromolécules chargées négativement vont migrer vers la cathode. Un gel composite (acrylamide et agarose) a été développé pour séparer les PG du cartilage qui peuvent être visualisés par coloration avec du bleu de toluidine dans l'acide acétique 1%. Les PG radiomarqués peuvent être visualisés par fluorographie [Hermentin,1994].

III.2.2.5 Chromatographie

Les PG diffèrent par leur charge, leur taille, leur forme, leur hydrophobicité et leurs groupes fonctionnels spécifiques. Les PG sont fractionnés par chromatographie grâce à leur densité de charges (chromatographie par échange d'anions), leur taille, leur forme (chromatographie d'exclusion), par leur distribution d'AA spécifiques à la surface (chromatographie par affinité de ligand). La séparation des composés se fait par adsorption différentielle des solutés sur la résine chromatographique. La chromatographie d'adsorption se base sur le fait que les différents polymères présentent des répartitions différentes entre les deux phases. Les deux phases sont la phase stationnaire (la résine chromatographique) et la phase mobile (l'éluant). La partition entre les deux phases est régulée au niveau moléculaire par les interactions électrostatiques, les forces de dispersion, les ponts μ , les ponts hydrogène, les interactions de transfert de charges et la coordination des ligands.

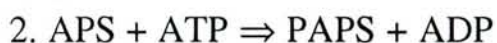
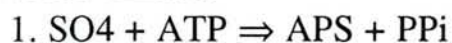
III.3 METABOLISME DES PROTEOGLYCANES

Le métabolisme des protéoglycanes est la résultante d'un équilibre entre les capacités anaboliques et cataboliques du cartilage. Aussi, la modification de cet équilibre lors d'une atteinte du cartilage articulaire peut être évaluée par la mesure de son anabolisme ou de son anabolisme.

III.3.1 ANABOLISME DES PROTEOGLYCANES

La synthèse des protéoglycanes peut être évaluée par la mesure de l'incorporation de précurseurs radioactifs dans les glycosaminoglycanes sulfatés de la matrice cartilagineuse. La synthèse des GAG sulfatés nécessite au préalable la synthèse de la protéine porteuse des PG. La protéine porteuse, peu après sa synthèse ou durant son transport intracellulaire initie la synthèse des chaînes de GAG.

Une des étapes clefs de l'anabolisme est l'activation métabolique du sulfate inorganique avant son incorporation dans la chaîne d'hydrates de carbone. La conjugaison du sulfate requiert le PAPS (3-phosphoadénosine-5-phosphosulfate) comme intermédiaire. La synthèse de PAPS se fait en deux étapes : activation du sulfate pour former l'APS (adénosine phosphosulfate) catalysée par l'ATP-sulfurylase suivie de la phosphorylation pour former le PAPS catalysée par l'ATP kinase.



(ATP: adénosine triphosphate, ADP: adénosine diphosphate, PPi: pyrophosphate).

La disponibilité de donneur de sulfate (le PAPS) pourrait être l'étape limitante du processus de sulfatation.

Puisque les GAG sulfatés sont pratiquement les seules molécules sulfatées présentes dans le cartilage et comme le processus de sulfatation est étroitement couplé à l'élongation de la chaîne polysaccharidique de GAG, le soufre radiomarqué est un bon indicateur pour l'étude de l'anabolisme des PG dans le cartilage [de Vries, 1986]. En effet, le ^{35}S -sulfate, est très rapidement conjugué aux GAG des PG via le pool de PAPS qui possède un turn-over élevé et qui est présent en petite quantité. D'autres précurseurs (*figure 20*) sont utilisés pour l'étude du métabolisme des GAG ; (^3H -glucosamine, ^3H -glucose, ^3H -acétate...) mais ils sont moins spécifiques des GAG car ils peuvent être incorporés dans les glycoprotéines présentes dans le cartilage ou dans les tissus gras environnants (^3H -acétate).

Dans les conditions expérimentales chez l'animal, la mesure de l'anabolisme du cartilage peut être abordée de différentes façons :

- l'animal reçoit une injection par voie systémique du précurseur radioactif et l'incorporation *in vivo* du précurseur radiomarqué dans le cartilage reflète la synthèse des protéoglycane pendant un temps défini.
- l'incorporation de molécules radiomarquées peut également se réaliser *ex vivo* dans un milieu de culture où l'explant cartilagineux, prélevé chez l'animal, est incubé en présence de l'isotope.
- l'incorporation *in vitro* est réalisée directement dans des cultures de chondrocytes provenant d'un explant de cartilage prélevé chez l'animal.

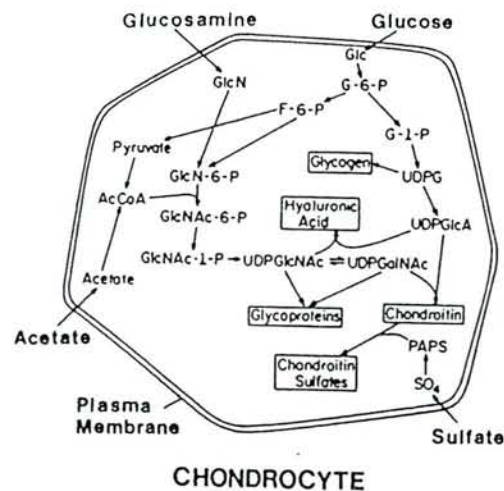


Figure 20 : Différents précurseurs pour l'évaluation du métabolisme chondrocytaire (d'après van de Loo, 1989)

III.3.2 CATABOLISME DES PROTEOGLYCANES

L'élévation des taux plasmatiques de GAG dans les conditions pathologiques constitue un indice de catabolisme accru des structures cartilagineuses. Cependant les GAG plasmatiques semblent être un paramètre peu spécifique du cartilage puisqu'ils sont présents dans un grand nombre de tissus de soutien et qu'ainsi les variations observables dans les modifications pathologiques seraient perdues dans un bruit de fond dû au métabolisme des GAG des autres tissus non concernés par l'atteinte articulaire.

Plusieurs techniques sont disponibles pour la mesure du catabolisme des PG dans le cartilage. Les protéoglycane du cartilage articulaire sont dégradés et libérés dans le liquide synovial. Chez l'homme ou le lapin, ce catabolisme peut être évalué *in vivo* en dosant les fragments de PG libérés dans le liquide synovial par dosage immunologique [Saxne, 1986]. Les désavantages de la mesure dans le

liquide synovial sont l'absence d'épanchement articulaire et le fait que la concentration du marqueur dépend de façon critique du flux de liquide synovial très variable d'une situation à l'autre. En outre chez le rat, le dosage des PG dans le liquide synovial est difficilement réalisable étant donné le trop faible volume de liquide articulaire.

La mesure du contenu résiduel en PG de l'échantillon cartilagineux reste un dosage de référence (méthode colorimétrique de Farndale) et rend compte de l'état de dégradation du cartilage. L'apport des techniques de radiomarquage et de culture cellulaire a permis de mieux appréhender le catabolisme des protéoglycanes chez le rat. Plusieurs protocoles d'études *in vivo* ou *in vitro* sont classiquement décrits dans la littérature :

Le rat subit une injection intraveineuse (ou intrapéritonéale) de précurseur radiomarqué. Après 24 heures, le marquage est considéré comme maximal et la majeure partie de la radioactivité est éliminée de la circulation. Une inflammation (aiguë ou chronique) est induite chez le rat par un agent phlogogène particulier et les sacrifices des animaux à des temps différents permettent le comptage de la radioactivité dans l'échantillon cartilagineux. La perte de GAG dans le cartilage est le reflet d'un catabolisme accru.

Dans un milieu de culture, de nombreuses possibilités sont permises avec ou sans l'utilisation d'isotopes :

- on peut quantifier les GAG sulfatés libérés par l'échantillon cartilagineux dans le milieu de culture après stimulation ou non par un agent phlogogène, grâce à la méthode au bleu de diméthylméthylène adaptée aux liquides biologiques [Goldberg, 1990].
- la libération des GAG ayant subi un marquage préalable peut rendre compte du catabolisme de l'échantillon de cartilage sain ou pathologique mis en culture.
- dans les expériences de cocultures d'échantillons cartilagineux sains et malades, on peut évaluer l'influence respective des facteurs cataboliques d'un cartilage malade sur un cartilage sain et évaluer à la fois la quantité de GAG libérés dans le milieu et les GAG résiduels des échantillons cartilagineux.

Au cours de notre étude expérimentale, nous avons étudié l'anabolisme des GAG sulfatés du cartilage grâce à la mise au point d'une méthode de dosage de l'incorporation de sulfate de sodium marqué au ^{35}S ($\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$) réalisée *ex vivo* chez le rat. Nous avons également dosé les GAG résiduels du tissu cartilagineux à l'aide d'une microméthode au bleu de diméthylméthylène. Enfin, le dosage sérique de l'AH comme marqueur de la synovite a été effectué.

CHAPITRE IV

EICOSANOÏDES ET INFLAMMATION

CHAPITRE IV

EICOSANOÏDES ET INFLAMMATION

Les eicosanoïdes sont des substances dérivant des phospholipides membranaires, principalement l'acide arachidonique ; ce sont les prostaglandines (PGs), les leucotriènes (LTs), les thromboxanes (TX) et les acides hydroxy-eicosatétraénoïques (HETEs) et les prostacyclines (PGI₂). Nous nous attacherons plus particulièrement à l'étude des médiateurs de la réaction inflammatoire articulaire que sont les prostaglandines et les leucotriènes.

IV.1 LES LEUCOTRIÈNES

Les leucotriènes sont des médiateurs pro-inflammatoires impliqués dans la pathogénèse des réactions d'hypersensibilité immédiate et dans les maladies inflammatoires. Les leucotriènes ont été découverts en 1979 par Borgeat et Samuelsson et ont été à l'origine identifiés sous le nom de SRS-A pour "Slow Reacting Substance of Anaphylaxis". Le terme "leucotriène" provient de "leucocyte" qui est la cellule d'origine et de "triène" car ils sont constitués de trois doubles liaisons conjuguées.

IV.1.1 BIOSYNTHÈSE

Les leucotriènes proviennent de l'acide arachidonique (AA) estérifié sous forme de phospholipide membranaire, et sont constitués d'une chaîne insaturée de 20 carbones comportant quatre doubles liaisons et deux substituants polaires dont une fonction hydroxyle en C₅. La transformation de l'acide arachidonique en son dérivé 5-hydroperoxyeicosatétraénoïque (5-HPETE) par une lipoxygénase, puis en leucotriène A₄ (LTA₄) par une deshydrase, sont les réactions initiales de la biosynthèse des leucotriènes (*figure 21*). Le leucotriène A₄, instable, est à l'origine de tous les autres leucotriènes. L'hydrolyse enzymatique du leucotriène A₄ par la LTA₄ hydrolase conduit d'une part à la formation du leucotriène B₄ (LTB₄) ou acide 5-12 dihydroxyeicosatétraénoïque. D'autre part, l'attachement du glutathion par la glutathion transférase en position 6 de la molécule conduit à la formation du leucotriène C₄ (LTC₄). Ce dernier peut être à son tour transformé en leucotriènes D₄ (LTD₄) et E₄ (LTE₄), suite à la perte successive de l'acide γ -glutamique et de la glycine par l'action de peptidases. Le LTC₄ peut

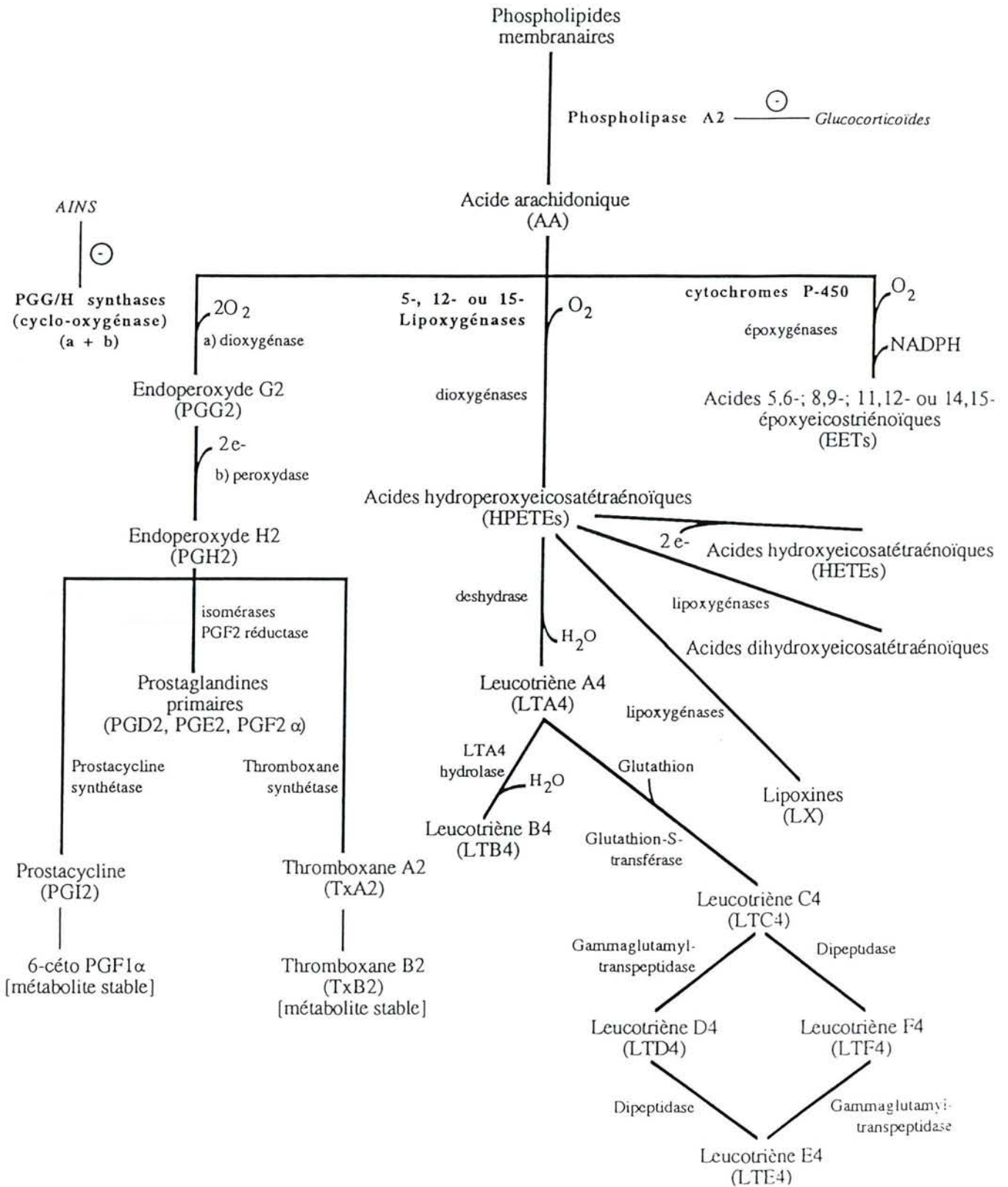


Figure 21 : Voies de biosynthèse des eicosanoïdes.

aussi être métabolisé en leucotriène F4 (LTF4) par une dipeptidase puis en LTE4 par une gammaglutamyl transpeptidase [Samuelsson,1987]. Les leucotriènes ont une durée de vie brève et une action essentiellement locale car ils sont très rapidement dégradés par les cellules après avoir exercé leurs effets. C'est pourquoi on peut rarement les mettre en évidence dans la circulation générale. Un seul passage au niveau de la circulation pulmonaire ou hépatique les inactive totalement.

Les principales cellules productrices de leucotriènes sont les leucocytes dont les monocytes, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles, les mastocytes et les basophiles. Les eicosanoïdes sont impliqués dans un grand nombre de maladies inflammatoires : asthme, syndrome de détresse respiratoire aiguë, bronchopathie chronique obstructive, dermatite de contact, mucoviscidose, maladies inflammatoires de l'intestin (rectocolite hémorragique, maladie de Crohn) goutte, ischémie myocardique, gastropathies induites par les AINS, psoriasis et polyarthrite rhumatoïde.

IV.1.2 FONCTIONS BIOLOGIQUES DES LEUCOTRIÈNES

Les différents rôles attribués aux leucotriènes ont clairement fait apparaître deux catégories de leucotriènes qui sont les cystéinyl-leucotriènes (LTC4, LTD4, LTE4) et les leucotriènes B4 (LTB4).

IV.1.2.1 Les cystéinyl-leucotriènes

Ils sont également connus sous le nom de "Slow Reacting Substance of Anaphylaxis" (SRA-S), grâce à leur capacité à induire une activité contractile antihistamine-résistante dans les muscles lisses. Leur cible d'action se situe essentiellement sur les muscles lisses et les cellules contractiles. Ces leucotriènes sont de puissants bronchoconstricteurs, ils augmentent la perméabilité vasculaire et stimulent la sécrétion de mucus. Les leucotriènes C4, D4 et E4 libérés par les tissus pulmonaires de sujets asthmatiques exposés à des allergènes spécifiques ont un rôle dans la physiopathologie de la réaction d'hypersensibilité immédiate [Samuelsson,1983].

Administré à l'animal, les leucotriènes du groupe C sont responsables d'hypotension. Ainsi, les manifestations cardiovasculaires observées initialement au cours du choc endotoxinique et du choc anaphylactique pourraient être dues en partie à leur libération. Au niveau pulmonaire, les effets des leucotriènes sont très importants. L'effet bronchospastique du LTC4 a été largement étudié chez l'animal. Les SRS-A apparaissent 100 à 1000 fois plus puissants que l'histamine dans le déclenchement d'un bronchospasme. Les leucotriènes affectent à la fois la trachée, les bronches de gros calibre et les bronchioles, avec la particularité par

rapport à l'histamine d'une action prolongée. Les leucotriènes exercent leurs effets directement sur la musculature bronchique. Ils augmentent également la perméabilité vasculaire de la microcirculation pulmonaire, et entraînent une vasoconstriction artériolaire. Les leucotriènes C augmentent la sécrétion de mucus par les bronches. Ainsi, la libération de leucotriènes au niveau pulmonaire pourrait rendre compte à elle seule des trois phénomènes observés dans l'asthme : la bronchoconstriction, l'œdème bronchique et l'hypersécrétion de mucus.

Sites d'action	Propriétés	Leucotriènes
PMN	chimiotactisme, chimiocinèse, agrégation, dégranulation, adhésion	LTB4
Monocytes	chimiocinèse	LTB4
Lymphocytes	Suppression de la mitogénèse des cellules T, augmentation de la production d'IgG, expression des CD23 accrue	LTB4
Bronches	contraction	LTC4, LTD4, LTE4
Trachée	contraction	LTC4, LTD4
Voies aériennes	sécrétion de mucus	LTC4, LTD4
Artères pulmonaires	contraction	LTC4, LTD4

Tableau 9 : Propriétés des leucotriènes

IV.1.2.2 Le Leucotriène B4

Le leucotriène B4 est un puissant médiateur pro-inflammatoire qui induit le chimiotactisme (migration dirigée), la chimiocinèse (migration au hasard), l'agrégation et la dégranulation des leucocytes ainsi que leur adhésion aux cellules endothéliales [Lam,1992]. Il contribue ainsi à l'amplification de la réaction inflammatoire et est associé aux lésions inflammatoires aiguës et riches en polynucléaires neutrophiles. Le LTB4 exerce aussi un chimiotactisme vis-à-vis des monocytes. Les leucocytes concernés sont les polynucléaires neutrophiles, les éosinophiles, les macrophages et les lymphocytes ; les plaquettes ne sont pas intéressées. Le LTB4 stimule l'activité répressive des lymphocytes T et augmente la synthèse des Immunoglobulines G par les lymphocytes B mais il est également formé par le système monocytes/macrophages ou par la transformation du LTA4 [McMillan,1988]. Les réponses cellulaires au LTB4 sont médiées par sa liaison avec un récepteur protéique membranaire lié à la guanidine nucléotide triphosphate (GTP). Le leucotriène B4 à forte dose provoque une extravasation plasmatique. La réaction se fait avec un petit temps de latence et requiert l'adhésion des leucocytes sur la membrane endothéliale.

L'enzyme initiale de la synthèse des leucotriènes est la 5-lipoxygénase qui nécessite du calcium pour son activité. Bien que la synthèse des leucotriènes soit

provoquée par différents stimuli dans un grand nombre de cellules, (zymosan dans les macrophages [Claesson,1981], FMLP (N-formyl-méthionine-leucine-phenylalanine) dans les neutrophiles), l'ionophore calcique est couramment employé pour stimuler la production de leucotriènes. L'ionophore calcique (A23187) stimule la synthèse des LTB₄ des leucocytes (due à l'élévation de la concentration intracellulaire de calcium) mais pas des lymphocytes (déficients en phospholipase A₂). Les ionophores calciques, en raison de leurs effets sur le transport du calcium à travers la membrane leucocytaire, stimulent les activités enzymatiques de la lipoxigénase et de la phospholipase. Le résultat net est, à partir des cellules traitées, un flux de métabolites dérivés la voie de la lipoxigénase.

A l'exception des données sur la présence d'une fraction ressemblant au LTB₄ dans le liquide péritonéal des rats sensibilisés de façon active [Bray,1981], les informations sur la détection de LTB₄ *in vivo* [Klickstein,1980] indiquent que les concentrations de leucotriènes dans le liquide synovial étaient significativement élevées chez les malades atteints de polyarthrite rhumatoïde. Dans les sites inflammatoires où il est retrouvé en faible concentration, le LTB₄ est converti en métabolites polaires, les dérivés ω -hydroxylés et carboxylés qui sont moins actifs que le leucotriène initial [Hansson,1981]. Il existe ainsi des mécanismes qui inactivent les leucotriènes aux sites inflammatoires.

Le leucotriène B₄ a de fortes raisons d'être pris en considération comme médiateur naturel de l'inflammation. Il apparaît comme un médiateur local, libéré par les leucocytes à la fois résidents et arrivant précocement dans les exsudats en formation, en réponse à une variété de stimuli inflammatoires. Ses effets majeurs sont d'augmenter la capacité des cellules inflammatoires à pénétrer l'endothélium vasculaire, de stimuler leurs mouvements vers le foyer inflammatoire et après leur arrivée, d'entraîner la dégranulation et la libération d'enzymes lysosomiales. De concert avec les prostaglandines, le leucotriène B₄ va agir indirectement par son activité chimiotactique ; il contribuera à l'augmentation de la perméabilité vasculaire et facilitera ainsi l'exsudation plasmatique. Le LTB₄ complète et amplifie les effets des autres médiateurs (histamine, kinine et C5a).

IV.1.3 RÉGULATION DE LA VOIE DE LA 5-LIPOXYGENASE

Il existe dans la voie de la 5-lipoxigénase (5-LO) de nombreux sites d'intervention qui constituent de véritables cibles pharmacologiques. On peut moduler la voie de la 5-lipoxigénase dans sa composante inflammatoire (production de LTB₄) à différents niveaux : diminution de la libération de l'acide arachidonique (inhibiteurs de phospholipase A₂), inhibition de la 5-lipoxigénase

(inhibiteurs de l'enzyme, inhibiteur du système FLAP), inhibition de la LTA₄ hydrolase, modulation de la voie de la 5-lipoxygénase (activation de la 15-LO ou inhibition de la 12-LO), utilisation d'antagonistes au récepteur du LTB₄.

Nous développerons plus particulièrement deux types de molécules modulant la voie de la 5-lipoxygénase : les inhibiteurs de 5-lipoxygénase et les antagonistes au récepteur du leucotriène B₄.

IV.1.3.1. La 5-lipoxygénase

La 5-lipoxygénase, purifiée dans plusieurs cellules, a une activité dépendante du calcium et de l'ATP. Chez l'homme et le rat, les 5-lipoxygénases (93% d'homologie) ont une séquence de 674 acides aminés et un PM de 78kDa. L'enzyme normalement présente dans le cytosol subit une translocation calcium-dépendante à travers la membrane plasmique. Cette translocation est réalisée grâce à l'action d'une protéine membranaire de 18kDa nommée "FLAP" ("Five-Lipoxygenase-Activating Protein") qui s'associe avec la 5-lipoxygénase et l'active [Ford-Hutchinson,1991]. Dixon a montré que cette association était indispensable à la synthèse des leucotriènes dans les cellules saines [Dixon,1990]. La découverte de cette molécule a été permise par l'utilisation du MK886, (un "inhibiteur de translocation") qui en se fixant sur la protéine FLAP inhibe spécifiquement la translocation de la 5-lipoxygénase et donc la libération de LTB₄.

Les lipoxygénases catalysent l'hydropéroxydation des systèmes cis-1,4 pentadiényle. L'acide arachidonique est oxydé en position 5, 12, 15 respectivement par les 5, 12, 15 lipoxygénases des mammifères et en position 15 par la lipoxygénase extraite du soja. Les 5- et 15-lipoxygénases des mammifères et la lipoxygénase extraite du soja contiennent un atome de fer non hémique. Elles présentent un haut degré d'homologie dans la région de liaison au fer avec 5 histidines conservées. La séquence d'acides-amino, la liaison au substrat et la structure en trois dimensions sont encore inconnues. Une hypothèse propose que l'enzyme soit activée grâce à l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} . Le Fe^{3+} oxyde alors spécifiquement le système 5,8 diène en un radical pentadiényle, qui génère les radicaux 5-hydroperoxy à l'origine des leucotriènes [Yamamoto,1992].

IV.1.3.2 Inhibition de la 5-lipoxygénase

D'après McMillan, les inhibiteurs de la 5-lipoxygénase sont classés en trois catégories basées sur leurs différents mécanismes d'inhibition supposés [McMillan,1992]. Toutefois, la détermination précise des mécanismes est difficile d'autant qu'elle est compliquée par l'intervention de la FLAP.

a) Les inhibiteurs redox

La 5-lipoxygénase et la cyclooxygénase peuvent être inhibées par des composés à faible potentiel redox. Les prototypes de cette classe d'inhibiteurs sont la **phénidone** et le **BW755C**. Ces molécules ont la capacité de réduire le Fe^{3+} en sa forme inactive, le Fe^{2+} , de réduire un des radicaux intermédiaires ou encore de laisser l'enzyme dans sa forme inactive. Ils ont une faible sélectivité pour la 5-lipoxygénase par rapport à la cyclooxygénase et bien qu'ils manifestent de puissantes activités *in vitro*, ils restent souvent inactifs *in vivo*. Les relations structure-activité de ces composés sont souvent confuses et leur lipophilie est primordiale pour leur efficacité. La liaison enzyme/inhibiteur n'est pas très forte et explique peut-être la faible sélectivité pour l'enzyme. De plus, ils peuvent interagir avec d'autres systèmes redox et devenir toxiques en formant par exemple la méthémoglobine.

b) Les inhibiteurs qui se lient au fer

Partant de l'hypothèse que le fer joue un rôle important dans l'activité catalytique de la lipoxygénase, des analogues amides de l'acide arachidonique se liant au fer ont été synthétisés. Ces analogues qui contiennent un groupement acide hydroxamique capable d'interagir avec le fer présent sur le site actif de la lipoxygénase, se sont révélés être de puissants inhibiteurs de la synthèse des leucotriènes. Les ligands métalliques les plus efficaces sont les **acides acétohydroxamiques**. Corey a décrit les propriétés inhibitrices *in vitro* de l'acide hydroxamique arachidonique et de ses dérivés N-alkylés [Corey,1984]. Le groupe Abbot a développé le **Zileuton** qui s'avère 15 fois plus efficace sur la 5-lipoxygénase que sur la cyclooxygénase et qui n'a aucun effet sur les 12- et 15-lipoxygénases. Le Zileuton est un inhibiteur actif par voie orale chez le rat et le chien ; il inhibe l'inflammation dépendante des leucotriènes chez la souris et l'afflux de cellules inflammatoires chez le rat [Carter,1991].

Wellcome a développé le **BWA4C** un composé de la famille des aryl-hydroxamates qui est 20 fois plus sélectif pour la 5-lipoxygénase que pour la cyclooxygénase. Le BW4AC inhibe également le bronchospasme allergique chez le cobaye ainsi que l'exsudation plasmatique et la migration cellulaire dans un modèle d'inflammation chez le rat [Higgs,1988]. Toutefois les dérivés N-hydroxyurées et les acides hydroxamiques sont faiblement sélectifs (10-40 fois) pour la 5-lipoxygénase comparés à la cyclooxygénase. Leurs relations structure-activité sont essentiellement influencées par leurs propriétés lipophiles et la compréhension de la liaison reste difficile d'autant que ces composés possèdent une légère activité redox stimulée par la présence du fer.

c) *Les inhibiteurs non redox*

Le laboratoire ICI a développé des inhibiteurs de lipoxigénase dépourvus de propriétés redox et ne se liant pas au fer. La liaison de l'inhibiteur est basée sur l'interaction avec la région C10-C20 du substrat, responsable de la stéréospécificité. Le but étant d'identifier des composés contenant un "site actif sonde" complémentaire des groupements enzymatiques présents au niveau du site actif. Ces travaux ont mené à la découverte de l'hydroxythiazole qui inhibe l'enzyme de façon compétitive. Bien que ce composé n'ait qu'une faible activité dans le sang, l'optimisation du "sondage" du site actif est permise par la progressive méthylation de cette molécule. Les méthoxyalkyl thiazoles furent ainsi découverts et le composé **ICI211965** est un puissant inhibiteur de la 5-lipoxigénase *in vitro*. [McMillan,1991]. Cette molécule substituée a donné naissance à une molécule non chirale, le **ICI2138** dix fois plus efficace que le ICI211965 et actif *in vivo* chez le rat et le chien. Dans les modèles d'inflammation dépendante des leucotriènes, ICI2138 est environ 10 fois plus efficace que le Zileuton et son action est comparable chez le rat et l'homme. D'autres inhibiteurs non redox ont été étudiés comme le **REV5901** et **WY50295** mais ils sont moins puissants que les inhibiteurs développés par ICI et ne sont plus développés.

d) *Conclusion et perspectives*

Sur le plan clinique, seul le Zileuton (2 x 800mg/jour) a été testé chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et entraîne une diminution significative de la symptomatologie. Les résultats cliniques obtenus avec le zileuton sont encourageants et les résultats des études à plus long terme sont attendus avec intérêt [Cohn,1994]. Abbot développe actuellement une molécule très proche du zileuton et à demie vie plus longue, le A79715.

IV.1.3.3 Les antagonistes des récepteurs aux LTB4

Les premiers antagonistes des récepteurs du LTB4 étaient très efficaces dans les modèles expérimentaux d'inflammations cutanée et pulmonaire et d'ischémie reperfusion. Cependant, ces antagonistes de LTB4 pouvaient interférer avec les inhibiteurs de lipoxigénase et de LTA4 hydrolase. Les antagonistes dont la synthèse est calquée sur la structure de l'agoniste sont le plus souvent des inhibiteurs mixtes de cyclooxygénase et de lipoxigénase. Sur le plan structural, les développements les plus intéressants concernent des molécules qui comportent au moins une liaison hydrogène polaire (donneur ou accepteur) attaché à la région lipophile. De nombreux laboratoires ont développé des antagonistes de LTB4 [Cohen,1994].

Un diacide, le ONO-4057 développé par le laboratoire Ono est actuellement en essai clinique de phase I pour le traitement du psoriasis et de la colite inflammatoire. Cette molécule inhibe la liaison du LTB₄ sur les neutrophiles, le flux de calcium induit par le LTB₄, l'agrégation des neutrophiles, le chimiotactisme et la dégranulation. Cependant lorsque cette molécule est administrée conjointement avec un AINS dans un modèle d'arthrite chez le rat, elle n'exerce pas d'effet significatif sur les paramètres étudiés (gonflement articulaire, perte de GAG et altérations osseuses) [Seed,1994].

Notre étude expérimentale a porté sur l'étude de deux antagonistes du récepteur au LTB₄ synthétisés par le groupe Rhône-Poulenc Rorer : le RP 66364 et le RP 69698. La division française du groupe RPR a également développé des inhibiteurs de la LTA₄ hydrolase (RP 64966) représentés par des composés thiophènes. La modification d'agents antithrombotiques de la série des oxazoles a mené à la découverte du RP 66364 qui est à la fois un antagoniste des LTB₄ et un inhibiteur de cyclooxygénase. Le RP 66364 possède des propriétés anti-inflammatoires puissantes dans des modèles *in vivo* chez le rat [DE₅₀ =30mg/kg] avec une bonne tolérance gastrique : il est actuellement en développement préclinique [Barreau,1992]. Le RP 69698, une diphenylpyridine inhibe la liaison du LTB₄ sur les neutrophiles humains et, à la dose de 6-7mg/kg (DE₅₀), inhibe la neutropénie induite par les LTB₄ chez le lapin [Labaudiniere,1992]. Il a été sélectionné pour une étude clinique bien que les cibles thérapeutiques ne soient pas révélées.

IV.1.3.4 Conclusion

Bien que le rôle définitif du LTB₄ dans les pathologies humaines ne soit pas définitivement établi, de nombreuses études font état de taux élevés de LTB₄ chez les patients atteints de maladies inflammatoires aiguës ou chroniques. Les taux de LTB₄ sont souvent corrélés avec la sévérité de la maladie et les médicaments qui réduisent l'inflammation diminuent également les taux de LTB₄. Etant donné l'implication importante du LTB₄ dans les maladies inflammatoires, des antagonistes du LTB₄ pourraient constituer de nouveaux médicaments anti-inflammatoires. En effet, il apparaît important de pouvoir bloquer les effets des leucotriènes sans pour autant perturber la synthèse des prostaglandines (qui peuvent avoir un rôle bénéfique) et sans provoquer les effets secondaires des corticoïdes. De plus, il existerait des possibilités de modulation de l'IL-1 directement ou par l'intermédiaire de l'IL-6 en modulant la voie de la 5-lipoxygénase. Aujourd'hui, seuls les corticoïdes ont démontré de réels effets inhibiteurs sur la synthèse des leucotriènes.

IV.1.4 LES LIPOXINES

Les lipoxines ("lipoxygenase interaction products") découvertes récemment, sont des dérivés trihydroxy de l'acide arachidonique possédant une structure tétraène conjuguée et trois groupements alcool [Samuelsson,1987]. Les deux lipoxines A (LXA) et B (LXB) activent les leucocytes et inhibent la cytotoxicité des cellules "natural killer". La lipoxine A a des effets dilatateurs sur la microvascularisation et contracte les lambeaux de tissu pulmonaire de cobaye. Leurs effets sont stéréospécifiques : par exemple, la LXA à la différence de son isomère 6(S)-LXA est chimiotactique. La lipoxine A semble exercer des rôles intracellulaires puisqu'elle stimule la protéine kinase C de façon plus efficace que le diacyl glycérol ou l'acide arachidonique [Yamamoto,1992].

IV.2 LES PROSTAGLANDINES

IV.2.1 HISTORIQUE

Les prostaglandines sont des substances ubiquitaires, polyvalentes, intervenant dans de nombreux mécanismes physiopathologiques, dotées d'effets biologiques multiples et souvent contradictoires. Elles appartiennent à la grande famille des métabolites de l'acide arachidonique. Elles ont été découvertes en 1930, suite à la mise en évidence de l'effet contractile du liquide séminal humain sur le muscle utérin. Von Euler identifia plus tard ces substances à des acides gras et les nomma prostaglandines, appellation impropre puisque la prostate n'est pas la source majeure de prostaglandines. Dans les années 60, les travaux conduits par Bergström permettent l'isolement, la caractérisation structurale et la synthèse chimique des premières prostaglandines. Dans les années 1970, Vane découvrit le mécanisme d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens basé sur l'inhibition de la biosynthèse des prostaglandines [Vane,1971]. On pouvait alors penser que l'étape majeure de la biotransformation de l'acide arachidonique avait été découverte et que l'on pouvait ainsi expliquer les propriétés antipyrétiques, anti-inflammatoires, analgésiques et inhibitrices plaquettaires des AINS, tout comme leurs effets indésirables gastro-intestinaux et rénaux. Ces nombreux travaux valurent à Vane, Bergström et Samuelsson le prix Nobel de Médecine et de Physiologie en 1982. Récemment, Vane s'est fait l'écho de recherches entreprises ces dernières années qui montrent l'existence d'au moins deux cyclooxygénases et que chacune d'entre elles exercent un rôle différent [Vane,1994].

IV.2.2 STRUCTURE DES PROSTAGLANDINES

Les prostaglandines primaires sont des acides gras insaturés en C20, cycliques polyoxygénés. Les prostaglandines dérivent toutes de l'acide prostanoïque, un acide gras insaturé à 20 atomes de carbone, replié sur lui-même au niveau du carbone 10, avec un pont entre les carbones 8 et 12 individualisant le noyau cyclopentane. Le squelette de la molécule renferme une double liaison en 13-14, un OH en C15 et un oxygène en C9.

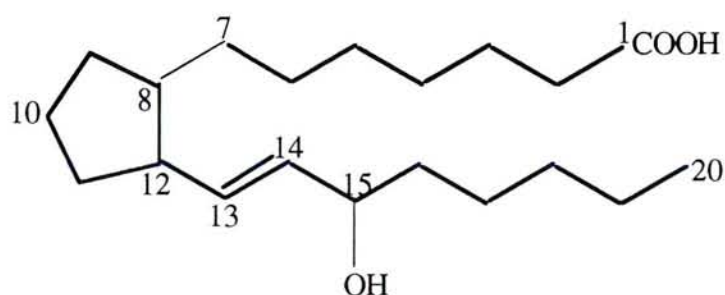


Figure 22 : Acide hydroxy-15 α trans prostène-13 oïque

L'acide de base commun est donc l'acide hydroxy-15 α trans-prostène-13 oïque (figure 22). La nature des substituants du noyau cyclopentane définit les différentes classes de prostaglandines A, B, C, D, E et F. Les prostaglandines A,B,C ont une fonction carbonyle en C9, les prostaglandines E ont une fonction cétone en C9 et une alcool en C11, les prostaglandines F naturelles ont deux fonctions alcool en C9 α et C11 α et enfin les prostaglandines D ont une fonction cétone en C11 et une alcool en C9. Les lettres affectées aux prostaglandines ne l'ont pas toutes été de façon arbitraire : les PGE sont solubles dans l'éther, les PGF sont solubles dans le tampon phosphate, les PGA sont dérivées des PGE en milieu acide, et les PGB dérivent des PGE en milieu basique. Dans chacune des classes définies par le cycle, le nombre de doubles liaisons détermine la série dénombrée 1, 2 ou 3. La position du radical OH en C11 définit le type α ou β .

IV.2.3 BIOSYNTÈSE DES PROSTAGLANDINES

Les prostaglandines (PGs) ne sont pas stockées dans les tissus, elles sont fabriquées et immédiatement libérées en réponse à un stimulus. Leur synthèse est ubiquitaire. Les précurseurs des prostaglandines sont des acides gras présents dans la membrane plasmique sous forme de phospholipides. La phospholipase A₂ libère de l'acide arachidonique à partir des phospholipides, point de départ des prostaglandines de la série 2 (les plus abondantes chez l'homme). L'acide arachidonique est rapidement transformé en endoperoxydes intermédiaires PGG₂

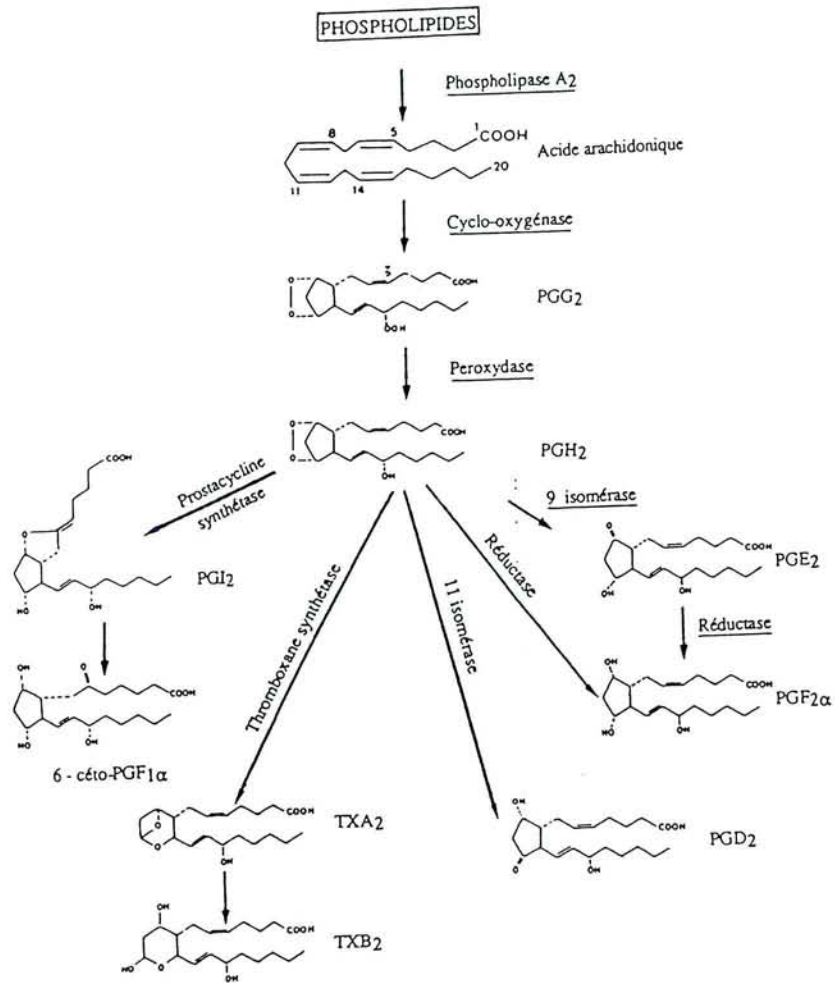


Figure 23 : Voie de la cyclooxygénase

et PGH₂ sous l'action d'un complexe enzymatique microsomial nommé "endoperoxyde synthétase". Ce complexe comporte deux activités enzymatiques distinctes : la cyclooxygénase et la peroxydase. La durée de vie des endoperoxydes est assez brève: 4 à 5 minutes, ils subissent alors l'action d'autres enzymes pour donner naissance aux divers représentants de la famille des prostaglandines.

La conversion des endoperoxydes en prostaglandines primaires D, E et F se fait sous l'influence de réductases et d'isomérases. Les prostaglandines des séries A, B et C sont ensuite formées à partir des prostaglandines E par déshydratation et isomérisation. La thromboxane synthétase transforme PGH₂ en thromboxane A₂ qui s'hydrolyse en thromboxane B₂ inactif. La prostacycline synthétase convertit PGH₂ en prostacycline (PGI₂), composé instable, très vite hydrolysé (en 6-kéto-PGF₁α).

Les PGs naturelles sont dégradées très rapidement dans l'organisme. Elles subissent comme tous les acides gras, une β -oxydation de la chaîne carboxylée et une ω -oxydation de la chaîne aliphatique. L'élimination des catabolites se fait essentiellement par voie rénale.

Les sources majeures de prostaglandines dans l'inflammation aiguë sont les cellules endothéliales qui produisent de grandes quantités de PGE₂ et PGI₂, les macrophages qui synthétisent les PGE₂ et PGI₂, et les thromboxanes. Les plaquettes et les monocytes sont les sources majeures de thromboxane A₂ alors que les mastocytes synthétisent des PGD₂. La prostacycline est produite par les cellules vasculaires (endothélium et cellules musculaires lisses). Les polynucléaires neutrophiles produisent de grandes quantités de leucotriènes mais peu de PGs et de thromboxane.

IV.2.4 RÔLES BIOLOGIQUES DES PROSTAGLANDINES

Devant la multiplicité des effets des PGs, nous nous sommes limités à la description des effets en relation avec notre étude expérimentale à savoir : les propriétés pro-inflammatoires et pyrogènes des prostaglandines ainsi que leurs actions potentielles sur le cartilage.

IV.2.4.1 Médiation de la douleur aiguë et de l'inflammation

Dans le domaine de la douleur, il est admis que les PGs agissent essentiellement en potentialisant l'action algogène d'autres médiateurs (histamine, bradykinine, sérotonine et substance P). Un des premiers rôles des PG dans l'hyperalgie est de sensibiliser les récepteurs de la douleur à ces médiateurs, qui activent les fibres afférentes de petit diamètre et génèrent une douleur. Injectées en perfusion sous-cutanée à des concentrations équivalentes à celles trouvées dans les foyers inflammatoires, les PGs n'induisent pas de douleur. Cependant, l'administration locale de PGs de la série E induit une réponse œdémateuse et cette région devient hyperalgique. L'hyperalgie consécutive à l'injection de PGs dure plus longtemps que celle induite par la bradykinine et l'histamine. La prostacycline (PGI₂) semble elle aussi jouer un rôle important dans le développement de la réaction douloureuse associée au phénomène inflammatoire. L'abolition de cet effet potentialisateur des stimuli douloureux explique le pouvoir antalgique des AINS. Celui-ci peut être qualifié de mineur puisqu'il ne fait que supprimer une potentialisation, ce qui le distingue des analgésiques majeurs de type morphinique qui agissent eux essentiellement au niveau des récepteurs dorigènes nerveux centraux, même si certains auteurs ont attribué à ces derniers une action périphérique par le biais d'une modification des taux intracellulaires d'AMP cyclique notamment dans les cellules inflammatoires [Ferreira, 1979].

Le rôle des PGs dans les phénomènes inflammatoires a pu être démontré grâce notamment à leurs taux élevés présents dans la plupart des liquides et extraits tissulaires inflammatoires. Les PGs sont produites par les cellules qui interviennent dans le développement de la réaction inflammatoire telles que les macrophages, les leucocytes et les polynucléaires. La biosynthèse accrue des prostaglandines, et particulièrement des PGE₂ par les tissus synoviaux joue un rôle dans l'érosion du cartilage et de l'os sous-jacent dans la polyarthrite rhumatoïde.

L'augmentation du débit sanguin, de la perméabilité vasculaire et l'œdème sont les caractéristiques communes de la réponse inflammatoire qui dépendent étroitement de l'action des PGs. L'œdème induit par les PGs exogènes chez l'homme et le rat est plus prononcé que celui chez le cobaye ou le lapin et il est potentialisé par d'autres médiateurs. Chez le lapin, Williams a démontré que l'augmentation de débit sanguin induite par les PGs exogènes était due à l'action primaire des PGE₂ et PGI₂ mais que l'augmentation de la perméabilité vasculaire était due à l'action synergique de la bradykinine, de l'histamine et de l'IL-1 [Williams,1981]. Les prostaglandines endogènes synthétisées au cours de l'œdème après l'injection locale de zymosan induit le même type de phénomène (perméabilité vasculaire élevée de la peau) inhibé par l'indométacine. Le zymosan agit par la voie alterne du complément en libérant une fraction du complément C5a qui agit de concert avec les prostaglandines.

Les doses pharmacologiques de prostaglandines exogènes de la série E possèdent également des propriétés anti-inflammatoires. Les divers effets observés sont : inhibition de l'arthrite à l'adjuvant chez le rat [Zurier,1971], de la glomérulonéphrite chez les souris NZB/W ou de la vasculite induite par les complexes immuns et, enfin, suppression de la perméabilité vasculaire induite par les bradykinines, histamine, sérotonine et C3a [Fantone,1980]. L'explication de ces effets n'est pas claire; les PGs pourraient inhiber la libération d'enzymes hydrolytiques et d'anions superoxydes par les polynucléaires neutrophiles [Davies,1992].

IV.2.4.2 Action pyrogène des prostaglandines

Les macrophages en réponse à divers stimuli tels que les endotoxines, les complexes immuns ou les lymphokines synthétisent des agents pyrogènes. Ces pyrogènes agissent sur les centres hypothalamiques de la régulation thermique et requièrent la voie des PGs. La pyrogénicité est médiée par l'IL1-β. Les macrophages en réponse à un stimulus exogène, produiraient de l'IL-1 endogène qui, véhiculée par la circulation jusqu'aux centres régulateurs de l'hypothalamus, induirait la production locale de PGE₂ au niveau des capillaires et artérioles cérébraux. Cette synthèse de PGs serait suivie d'une élévation de la teneur du

liquide céphalo-rachidien en PGs lesquelles agiraient ensuite sur les centres de la thermorégulation [Endres,1987]. La capacité de l'IL-1 à pénétrer la barrière hématoencéphalique (BHE) est controversée : Rothwell propose que l'IL-1 circulante pourrait pénétrer les centres nerveux au niveau de sites dépourvus de BHE (*organum vasculosum de la laminae terminalis* (OVLT)) et entraînerait la synthèse de PGE₂ [Rothwell,1992]. Les prostaglandines sont les derniers effecteurs de la réponse fébrile et agissent directement sur les neurones thermosensibles. Morimoto rapporte que l'injection locale de prostaglandines dans le cerveau de lapin induit une fièvre monophasique alors que l'IL-1, pyrogène endogène, induit une fièvre biphasique. Ainsi, les prostaglandines synthétisées à l'extérieur de la BHE agissent sur de multiples sites du système nerveux central et contribuent ainsi à la première phase de la fièvre, alors que les prostaglandines synthétisées près de l'OVLT en réponse à des pyrogènes endogènes seraient responsables de la seconde phase [Morimoto,1987].

L'injection directe de pyrogène endogène ou exogène (endotoxine) dans les ventricules cérébraux induit une réponse fébrile accompagnée d'une élévation du taux de PGs dans le liquide céphalo-rachidien. La fièvre est induite par l'injection de faibles quantités de PGE₁ ou PGE₂ dans le système nerveux central du chat où elles agissent sur les centres régulateurs situés dans l'aire préoptique de l'hypothalamus. Alors que les PGE₁ et PGE₂ ont une efficacité comparable, PGF_{1α}, et PGA₁ ne sont que légèrement pyrogènes. Ainsi, les prostaglandines jouent un rôle central dans l'apparition de la réponse fébrile.

IV.2.4.3 Effets des prostaglandines sur le cartilage

La synthèse des prostanoides par les chondrocytes du cartilage articulaire a été montrée par divers auteurs [Mitrovic,1982 ; Malemud,1980]. Les chondrocytes en culture synthétisent de grandes quantités de prostaglandines, surtout PGE₂, 6 kéto PGF_{1-α}, et en moindre quantité PGE₁, PGF_{2α}, PGD₂, 13-14 dihydroxy PGF_{1α} et TXB₂. Les prostaglandines participent à la destruction du cartilage : elles ont un effet globalement inhibiteur sur les chondrocytes et participent à la régulation de la collagénase [Lippiello,1978]. Les prostanoides inhibent la synthèse des glycosaminoglycanes par les chondrocytes de lapin en culture : ces effets sont observés avec PGA₁, PGB₁, PGE₁ et PGF₁. La PGF₂ n'a pas d'effet. La PGE₂ (25µg/ml) entraîne une inhibition significative de l'incorporation de ³⁵SO₄ dans les chondrocytes [Malemud,1977]. Les précurseurs des prostaglandines modifient également la prolifération chondrocytaire et la synthèse des protéoglycanes : l'acide arachidonique (1-100 µg/ml) ne modifie pas la prolifération chondrocytaire mais influe sur la synthèse des protéoglycanes : légère stimulation à faible concentration (1 µg/ml) et inhibition marquée à forte concentration (100 µg/ml).

Les concentrations de prostaglandines sont maximales dans les zones de cartilage hypertrophique. Les vésicules matricielles associées au processus de calcification contiennent des taux importants d'acides gras libres et de phospholipides partiellement déacylés précurseurs de PGs.

Aujourd'hui, la participation des métabolites de l'acide arachidonique et la régulation de la synthèse des prostaglandines dans les chondrocytes humains ne sont pas encore élucidées. Il est admis que l'IL-1 β humaine stimule la synthèse des prostaglandines dans les chondrocytes due à une synthèse *de novo* de la cyclooxygénase. Les chondrocytes humains stimulés par l'IL-1 synthétisent également la PGF_{2 α} et le 6-keto-PGF_{1 α} . Les chondrocytes jouent donc un rôle primordial dans les processus inflammatoires par leur capacité à synthétiser de grandes quantités de prostaglandines consécutives à l'induction de la cyclooxygénase [Knott,1994].

IV.2.5 LES CYCLOOXYGÉNASES

La cyclooxygénase (COX) ou PGH synthase (PGHS) est une enzyme bifonctionnelle qui assure sur des sites distincts mais proches, une activité de dioxygénase (formation de PGG₂) et une activité de peroxydase (transformation de PGG₂ en PGH₂). Les travaux sur le clonage et le séquençage de la cyclooxygénase ont permis de mettre en évidence chez plusieurs espèces, et chez l'homme en particulier, deux isoenzymes COX-1 et COX-2 ou PGHS-1 et PGHS-2. Chacune d'entre elles possède des sites d'activité de type dioxygénase et de type peroxydase. Ces deux enzymes proviennent d'un gène distinct qui est régulé différemment dans les cellules. COX-1 correspond à l'enzyme initialement mise en évidence dans les vésicules séminales de bélier et utilisée fréquemment pour étudier le pouvoir inhibiteur des AINS *in vitro*. COX-2 qui a été identifiée plus récemment présente certaines homologies avec COX-1 : les deux enzymes ont des séquences identiques pour plus de 60%. Les différences résident dans la partie C-terminale de la molécule où se trouvent 18 acides aminés et un site de glycosylation supplémentaires. La principale différence entre les deux isoenzymes réside dans la régulation de leur activité enzymatique. En simplifiant on peut considérer PGHS-1 comme une enzyme constitutive, exprimée dans la majorité des tissus, alors que PGHS-2, qui n'est exprimée que dans quelques tissus comme la prostate et le cerveau, est inductible par de nombreux composés synthétisés pendant la réaction inflammatoire, dont les cytokines (IL-1 α et IL-1 β) [Ristimäki,1994; Szczepanski,1994]. Cette induction de PGHS-2 est très rapide, transitoire et peut quantitativement être très importante (jusqu'à 80 fois). Elle peut néanmoins être inhibée par certains produits, en particulier par les glucocorticoïdes qui diminuent la transcription de PGHS-2 (réduction du taux

d'ARNm) et suppriment complètement l'expression de la protéine correspondante.

IV.2.5.1 Inhibition des Cyclooxygénases

a) Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les AINS sont classiquement utilisés dans le traitement des affections inflammatoires chroniques et aiguës comme la polyarthrite rhumatoïde. Le mécanisme d'action des AINS est basé sur l'inhibition de la biosynthèse des prostaglandines. Les données récentes concernant l'existence de deux cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) ouvrent la voie pour des nouvelles recherches comme par exemple, l'inhibition sélective de l'induction de la COX-2.

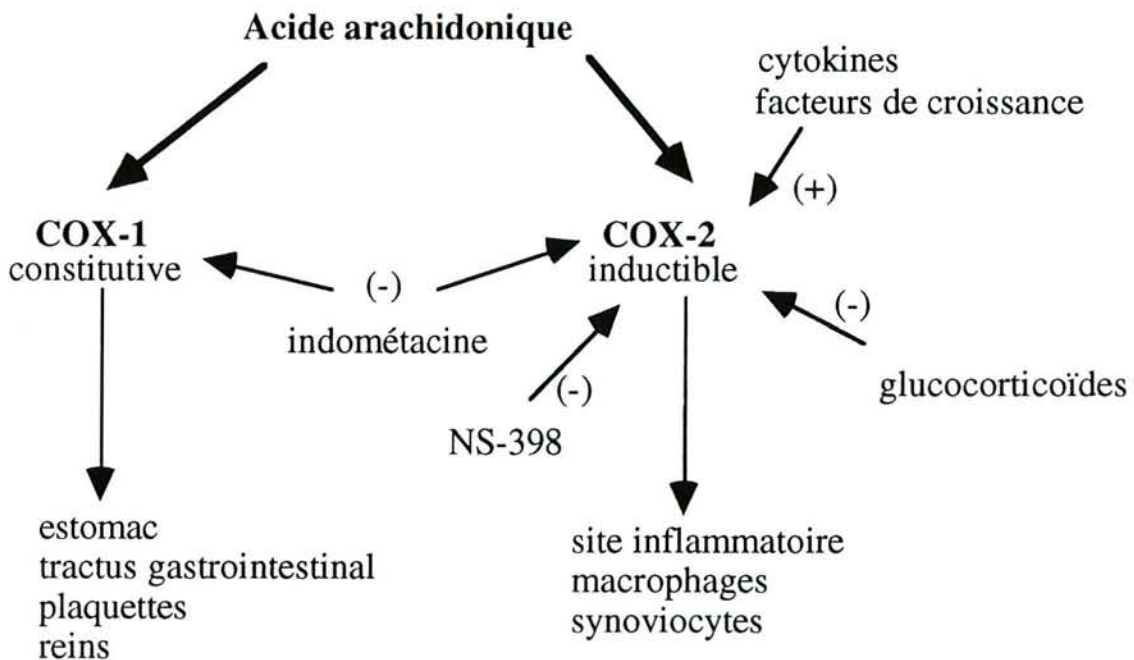


Figure 24 : Régulation de la synthèse des prostaglandines

Les AINS se comportent, pour la plupart, comme des inhibiteurs compétitifs vis à vis de COX-1 et les résultats actuels montrent que les AINS peuvent inhiber COX-2, qu'il existe des différences importantes dans le pouvoir relatif d'inhibition des AINS vis à vis de chacune des isoenzymes, et que les AINS sont des inhibiteurs plus puissants de COX-1 que de COX-2.

Plusieurs séries de résultats publiés comparent l'effet de quelques AINS. Dans tous les cas, les valeurs d'inhibition ont été obtenues *in vitro* et très souvent sur des préparations cellulaires (membranes microsomales issues de cellules humaines ou animales transfectées par COX-1 ou COX-2, d'origine murine le

plus souvent). D'après Meade [Meade,1993], on peut classer les AINS de la façon suivante :

- ceux qui inhiberaient indistinctement COX-1 ET COX-2 (flurbiprofène, S-ibuprofène, acide méclofénamique)
- ceux qui inhiberaient préférentiellement COX-1 (piroxicam, indométacine, sulindac)
- ceux qui inhiberaient préférentiellement COX-2 (métabolite actif de la nabumétone)

Un produit en cours de développement (NS-398) serait un inhibiteur de COX-2, pratiquement sans effet sur la COX-1 des tissus gastriques et rénaux, ce qui pourrait expliquer sa bonne tolérance [Masferrer,1994].

Un des mécanismes anti-inflammatoires des glucocorticoïdes semble être la suppression de l'induction de la COX-2 qui réduit la production de PGs inflammatoires sans pour autant affecter le taux de PGs tissulaires normal résultant de l'activité de la COX-1.

Chaque enzyme jouant un rôle différent, l'inhibition de COX-1 ou de COX-2 aura des conséquences qui ne sont pas identiques. L'inhibition de la COX-1 provoquera une diminution des prostaglandines participant à l'homéostasie, ce qui pourrait entraîner certains effets indésirables, celles de la COX-2 ne devrait provoquer qu'une diminution des prostaglandines produites en situation d'inflammation. L'inhibition sélective de la COX-2 et/ou de son induction pourraient donc être les cibles thérapeutiques optimales d'anti-inflammatoires bien tolérés. Les glucocorticoïdes possèdent cette dernière propriété, mais leur effet sur l'activité des phospholipases A2 leur confère également un pouvoir inhibiteur global sur la biosynthèse des prostaglandines, ce qui pourrait expliquer tout ou partie de leur relative gastrototoxicité [Terlain,1994].

b) AINS et métabolisme du cartilage

Les effets des différents AINS sur le cartilage sont très divers et font l'objet d'un grand nombre de controverses. En effet, les données de la littérature sont très discordantes entre les différentes études et varient selon la concentration de l'AINS employé, le mode d'administration et le système testé (culture cellulaire, culture d'organe, études *in vivo*...). Les études réalisées *in vivo* et *in vitro* dans les modèles expérimentaux d'arthrose montrent que certains AINS pourraient avoir des effets protecteurs sur le cartilage en modulant quelques mécanismes physiopathologiques qui mènent à sa destruction. A l'inverse, dans les modèles d'arthrite, il semble que les AINS soient inefficaces dans la prévention de la destruction du cartilage [Van den Berg,1991 ; Pelletier,1994]. Cependant, tous les AINS n'ont pas le même effet, et certains inhibent la synthèse des protéoglycanes

du cartilage (humain ou murin) et diminuent les capacités réparatrices du cartilage soumis à l'IL-1 alors que d'autres sont inactifs.

Les effets des molécules modulant à la fois la voie de la lipoxigénase et la voie de la cyclooxygénase semblent plus prometteurs. Certains de ces composés, comme le Ténidap semblent moduler les cytokines dans les macrophages. Le Ténidap se singularise par ses capacités à inhiber la lipoxigénase, diminuer la libération des collagénases et inhiber la résorption osseuse [Gosh,1993].

CHAPITRE V

ZYMOSAN ET INFLAMMATION

CHAPITRE V

ZYMOSAN ET INFLAMMATION

V.I INTRODUCTION

Les modèles expérimentaux d'arthrite apportent une contribution essentielle à la sélection des anti-inflammatoires et/ou des immunomodulateurs. Les modèles classiques de polyarthrite chez le rat (arthrite à l'adjuvant, arthrite au collagène de type II, monoarthrite à l'antigène...) couramment employés présentent certaines caractéristiques de la polyarthrite rhumatoïde (polysynovite destructrice notamment). Ces modèles sont caractérisés par une réponse inflammatoire très cyclooxygénase dépendante [Otterness,1985] et contribuent ainsi à la sélection d'AINS traditionnels. Or, les AINS traditionnels qui sont de puissants agents analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires n'ont pas de réelles potentialités chondroprotectrices [Gosh,1994].

Aujourd'hui, la mise au point de nouveaux inhibiteurs de lipoxycgénase et d'inhibiteurs mixtes de cyclooxygénase et de lipoxycgénase nécessite le développement de modèles d'inflammation privilégiant la voie de la 5-lipoxycgénase. Quelques modèles d'inflammation aiguë chez l'animal semblent satisfaire à ces critères : l'implantation d'éponge imprégnée de carragénine, l'injection intrapéritonéale de complexes immuns, l'inflammation de l'oreille induite par l'acide arachidonique ou encore la neutropénie induite par le LTB₄. Ces modèles contribuent à la sélection d'inhibiteurs de lipoxycgénase actifs sur les phénomènes inflammatoires aigus [Blackham,1985 ; Pellas,1993].

Aussi la sélection d'un modèle d'arthrite chronique privilégiant la voie de la lipoxycgénase dépendra de la faible sensibilité de l'arthrite aux AINS classiques. De plus, à la différence des modèles d'inflammation aiguë, l'érosion du cartilage articulaire sera un élément déterminant pour le choix de ce modèle. Nous avons porté notre choix sur un modèle d'inflammation chronique au zymosan chez le rat, décrit par Keystone chez la souris [Keystone,1997] qui semble répondre à ce cahier des charges. L'étude bibliographique nous permettra d'actualiser les connaissances sur les capacités phlogogènes du zymosan tant dans l'inflammation aiguë où il est largement employé, que lors de modèles d'arthrites chroniques moins étudiés.

V.2 ZYMOSAN ET INFLAMMATION AIGUË

V.2.1 INFLAMMATION AIGUË IN VITRO

Le zymosan A est un polysaccharide extrait des parois cellulaires de levures (*Saccharomyces Cerevisiae*). Il est composé de glucanes (55%), de mannanes (15%), de protéines (15%), de lipides (7%) de matériel inorganique (3%) et de moins de 1% de chitine. C'est le β -glucane qui apparaît comme l'agent biologiquement actif [Sawyer,1993].

Les propriétés pro-inflammatoires du zymosan ont fait l'objet de nombreuses études *in vitro*. Le zymosan active la voie alterne du complément [Williams,1981] qui conduit à la synthèse de facteurs chimiotactiques et d'anaphylatoxines C3a et C5a capables d'induire la libération d'histamine à partir des mastocytes et des basophiles [Schorlemmer,1977 ; Forrest,1986]. Les anaphylatoxines induisent également la synthèse des métabolites de l'acide arachidonique (leucotriènes en particulier) durant la phagocytose des particules de zymosan par les polynucléaires neutrophiles ou les macrophages [Claesson,1981 ; Smith,1978]. Enfin, la synthèse et la libération du platelet activating factor (PAF) [Imai,1991 ; Martins,1989], de radicaux libres [Goldman,1994] et d'enzymes lysosomiales [Bonney,1978 ; Folliard,1988] sont stimulées. Les enzymes lysosomiales (cystéine protéases et les glucosidases acides) activées par les macrophages, sont capables d'activer à leur tour le système du complément, de la fibrinolyse et de la coagulation [Safina,1994].

Les particules opsonisées de zymosan sont utilisées, au même titre que l'ionophore calcique A23187, comme agents phlogogènes pour stimuler la production de LTB₄ dans le sang total [Gresele,1986]. Cette production est stimulée par le TNF- α ; les neutrophiles incubés en présence de TNF- α ont une aptitude accrue pour phagocyter les particules de zymosan. La phagocytose de zymosan paraît se produire grâce aux récepteurs CR3 dont l'expression dépend de l'exocytose des granules secondaires, elle-même stimulée par le TNF- α [Petersen,1990]. Toutefois, les mécanismes de transduction initiés par l'interaction β -glucane-CR3 ne sont pas élucidés. Récemment, ces études ont montré que le zymosan induisait la libération d'IL-8 (pic à 24 h) et que le PAF était le médiateur central responsable de la synthèse d'IL-8 [Au,1994]. Le zymosan (et le β -glucane) provoquent l'activité du "burst oxydatif" [Phillips,1989], induisent la phosphorylation de la tyrosine [Green,1992], stimulent la synthèse de diacyl glycérol [Veis,1991], activent la phosphoinositide-phospholipase C [Hamilton,1989], la phospholipase A2 [Daum,1992] et sont

phagocytés par les macrophages et les neutrophiles de nombreuses espèces [Goldman,1988].

V.2.2 MODELES D'INFLAMMATION *IN VIVO*

Le zymosan est un agent phlogogène impliqué dans le développement de nombreux modèles d'inflammation aiguë et qui induit la synthèse de nombreux médiateurs.

V.2.2.1 Pleurésie et péritonite induite au zymosan

L'injection intrapéritonéale de zymosan (1mg) induit, chez la souris une inflammation et une douleur transitoire qui se manifeste par des contorsions [Doherty,1987]. Ce test permet de doser les métabolites de l'acide arachidonique tout en quantifiant la réponse inflammatoire et douloureuse. La PGI₂ est responsable de la réponse inflammatoire et algique.

Le zymosan injecté par voie intrapéritonéale (1mg) chez le rat, induit une **péritonite** et la synthèse d'acides gras libres et d'eicosanoïdes [Doherty,1985] avec un pic de LTB₄ maximal à 2-3 h généré par les neutrophiles [Rao,1994].

Le modèle de **pleurésie** induite par le zymosan (injection intrapleurale de 2mg) est très proche du modèle de la péritonite en terme de médiateurs libérés. Le zymosan induit la formation d'IL-1 endogène (pic à 4 heures) qui est étroitement liée à la migration des neutrophiles au site inflammatoire. Le chimiotactisme semble plutôt stimulé par le C5a que par le LTB₄ [Perretti,1992 ; Roberge,1991]. En effet, le LTB₄ est en concentration suffisante pour stimuler le flux de neutrophiles seulement la première heure [Simmons,1983] alors que la synthèse de C5a (qui stimule la production d'IL-1 *in vitro*) se prolonge pendant 1 à 4 heures. L'IL-8, autre agent chimiotactique induit par l'IL-1, semble prendre le relais et serait à l'origine du flux soutenu de polynucléaires. L'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1 RA) inhibe la pleurésie induite par le zymosan. Le système des kinines responsable du développement de la réaction inflammatoire induite par la carragénine n'est pas impliqué dans la péritonite [Damas,1990].

V.2.2.2 Inflammation de la poche à air par le zymosan

Konno crée une inflammation en injectant du zymosan dans une poche à air sous-cutanée chez le rat [Konno,1985]. La réponse inflammatoire obtenue se caractérise par un exsudat, une accumulation de polynucléaires qui s'agrègent à la surface interne des parois de la poche et la formation d'un granulome. L'agrégation de macrophages à la surface tissulaire est comparable à la colonisation des macrophages observée à la surface de la synoviale inflammatoire. De plus, le mouvement des particules de zymosan à la surface des

tissus pendant 30 jours est comparable à celui observé au cours de l'arthrite au zymosan [Dawson,1991]. Le taux de protéines élevé dans la poche indique l'augmentation de la perméabilité vasculaire due à la libération d'histamine dans la poche. Mais la dégranulation n'est pas le seul mécanisme impliqué dans la brutale élévation de la perméabilité vasculaire. Récemment, des taux élevés d'interleukine-1 α ont été dosés (pic à 24h et activité soutenue pendant 8 jours) dans l'exsudat de la poche à air induite au zymosan. Les glucocorticoïdes, à la différence des AINS, diminuent la synthèse d'IL-1 α [Erdo,1994]. Des résultats similaires sont rapportés dans un nouveau modèle d'inflammation induite dans une "chambre tissulaire" par le zymosan [Dawson,1993a] ; les taux d'IL-1 β très élevés ne sont pas diminués par les AINS ni par la prednisolone [Dawson,1993b].

V.2.2.3 Œdème de la patte au zymosan

En 1979, Gemmel a développé un test de screening d'anti-inflammatoires qui possède un mécanisme d'action différent de celui observé lors de l'inflammation à la carragénine (caractéristique des AINS) ; l'œdème de la patte induit par l'injection sous-plantaire de zymosan chez le rongeur [Gemmel,1979 ; Damas,1986]. L'inflammation subsiste 4 à 5 heures, elle est inhibée par les AINS classiques (indométacine, naproxène, aspirine, phényl-butazone et acide fuclénamique), par le lévamisole alors que la D-penicillamine est inefficace. Tarayre [Tarayre,1989] et Calhoun [Calhoun,1987] ont cerné les mécanismes physiopathologiques de ce modèle en comparant l'œdème de la patte chez le rat et la souris. Les cinétiques chez la souris sont différentes de celle du rat : l'œdème est maximal après 30 mn chez le rat et il est plus soutenu (6 h) chez la souris. La réaction inflammatoire chez la souris s'estompe en 24 heures et elle n'est pas ou peu dépendante de l'histamine à la différence du rat. La sérotonine participe à la phase inflammatoire précoce et semble être l'amine principale libérée par les mastocytes chez la souris. Les LTB₄, les PGE₂, et les thromboxanes augmentent 3 à 6 heures après l'injection de zymosan alors que le LTC₄ atteint son taux maximal la première heure. Les leucotriènes sont considérés comme des médiateurs importants de la phase précoce de la réaction inflammatoire et les inhibiteurs de 5-lipoxygénase inhibent l'œdème alors que les inhibiteurs de cyclooxygénase sont inefficaces. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Gado : l'augmentation maximale (90%) du volume de la patte 30 minutes après l'injection de zymosan (2mg) est inhibée par la phénidone et le NDGA (inhibiteurs mixtes de COX/LO) ainsi que par les corticoïdes. Les AINS classiques sont sans effet [Gado,1991]. Le FUT-175, un inhibiteur de protéases aux propriétés anti-complémentaires est actif de façon dose dépendante sur l'œdème de la patte contrairement aux AINS [Sato,1986].

V.2.2.4 Autres modèles

Le zymosan est également connu pour induire d'autres modèles d'inflammation comme une pneumopathie interstitielle [Edward,1976], une hypersensibilité pulmonaire [Barrios,1980], une inflammation musculaire chronique [Green,1980] ou encore un œdème cutané chez le lapin [Williams,1981]. L'injection intraveineuse de zymosan (2 à 16mg.kg⁻¹) induit une neutropénie, une thrombocytopénie, une diminution de la pression artérielle et une extravasation plasmatique périphérique induites par le complément. Les manifestations vasculaires pulmonaires induites par l'activation du complément sont médiées par les neutrophiles et les prostaglandines alors que les effets systémiques vasculaires sont très dépendants du PAF, des amines mastocytaires et des leucotriènes [Damas,1991].

Des taux maximaux de TNF et d'IL-6 sont retrouvés dans le sérum une heure après le choc septique induit par le zymosan (injection *ip* de 25mg) chez le rongeur [von Asmuth,1990].

Un nouveau modèle d'inflammation aiguë de l'oreille au zymosan a été décrit chez la souris : l'œdème est maximal 4 à 6 heures après l'injection intradermique de zymosan (0,2mg) et disparaît totalement après 3 jours [Erdo,1992]. Les inhibiteurs de cyclooxygénase (indométacine et piroxicam), la dexaméthasone, et un inhibiteur d'IL-1 diminuent de façon significative l'œdème alors que les inhibiteurs de lipoxygénase, les antagonistes de récepteur à la sérotonine et aux récepteurs H1 et H2 sont inactifs. Ainsi, l'action anti-inflammatoire des premiers produits est certainement due à leur capacité à inhiber la cyclooxygénase alors que la lipoxygénase ne semble pas jouer un rôle important dans le développement précoce de l'œdème [Erdo,1993].

V.2.3 L'ARTHRITE AU ZYMOSAN CHEZ LE RONGEUR

Les capacités inflammatoires du zymosan n'ont été que peu exploitées dans les modèles expérimentaux d'arthrite et le plus souvent les expériences ont été menées chez la souris. La monoarthrite induite par le zymosan a été décrite initialement chez la souris par Keystone en 1977. L'injection intra-articulaire unique de zymosan dans le genou induit en moins de 7 jours, une synovite proliférative chronique avec une infiltration de polynucléaires neutrophiles, une hypertrophie synoviale avec pannus érosif.

Les données cliniques montrent que la tuméfaction des genoux est maximale dans les 48 heures suivant l'injection de zymosan et persiste pendant 14 jours. L'examen histologique révèle que la phase précoce (3 jours) est caractérisée par un exsudat purulent dans la cavité synoviale avec une infiltration massive par les

polynucléaires neutrophiles et une prolifération synoviale. La deuxième semaine (J7-14), il existe un infiltrat d'histiocytes dans les régions périarticulaires et dans le tissu subsynovial aréolaire comportant des aires d'agrégation de neutrophiles.

Biologiquement, l'arthrite au zymosan est initiée par l'activation de la voie alterne du complément et la libération secondaire d'enzymes lysosomiales. Ces enzymes peuvent activer le système du complément pour générer du C3b et activer à nouveau la libération d'enzymes lysosomiales des macrophages. Elles participent ainsi à la chronicité de l'inflammation. Ces enzymes peuvent cliver C5 et générer des facteurs chimiotactiques qui facilitent le recrutement de macrophages dans le tissu synovial.

La monoarthrite au zymosan est un bon modèle pour l'étude du métabolisme du cartilage chez la souris arthritique car ce modèle n'a pas de composante immunologique et permet la comparaison d'un genou injecté avec le zymosan au genou controlatéral sain du même rat [van den Berg,1981]. Dans la phase inflammatoire initiale (J1-4), ces auteurs rapportent une légère perte de chondrocytes et une réduction marquée des protéoglycanes dans le cartilage articulaire arthritique. Les données histologiques (coloration au bleu alcian) montrent une diminution transitoire du contenu en PG concomitante à l'érosion cartilagineuse dans les articulations atteintes. Une corrélation entre la quantité de PG radiomarqués et la sévérité de la réponse inflammatoire est établie puisqu'une seconde injection de zymosan (J7) amplifie la réponse catabolique. Les études de marquage *in vitro* ont permis de conclure que la diminution de l'incorporation de ³⁵S dans le cartilage patellaire pathologique (41%) était due à une inhibition de la synthèse des chondrocytes plutôt qu'à un catabolisme accru des PG nouvellement synthétisés [van den Berg,1982]. Ce phénomène est transitoire puisque lorsque les effets suppresseurs liés à l'inflammation disparaissent, les capacités de synthèse de la matrice cartilagineuse se restaurent [van den Berg,1981]. Mais l'inhibition de la synthèse observée au cours de la phase aiguë de l'arthrite semble plus complexe que l'effet causé par une simple injection intra-articulaire d'IL-1-β. En effet, les chondrocytes semblent être dans un état de non réponse vis à vis des facteurs de croissance [Verschure,1994].

Schalkwijk montre que la dégradation du cartilage observée dans l'arthrite au zymosan était indépendante de l'action de deux protéases : l'élastase leucocytaire et la cathépsine G. En effet, ces enzymes libérées par les polynucléaires stimulés *in vitro* ont la propriété de dégrader le cartilage et sont déficientes chez les souris Chediak-Higashi. L'arthrite au zymosan, caractérisée par un infiltrat riche en polynucléaires a été induite chez des souris normales et des souris déficientes en protéases. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les deux souches tant du point de vue histologique que métabolique [Schalkwijk,1988].

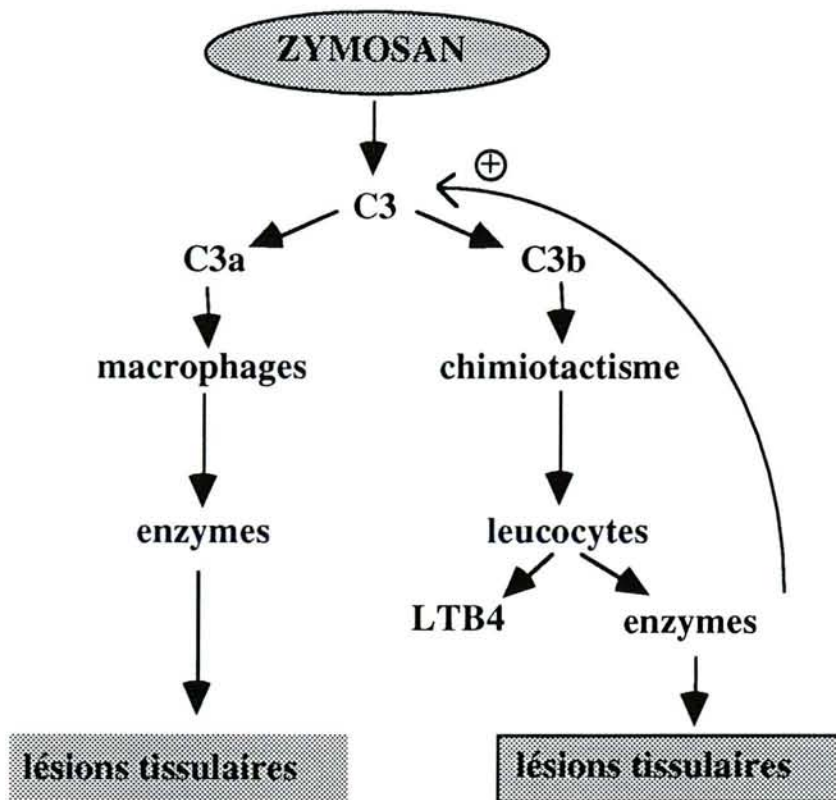


Figure 25 : Voies d'activation au cours de l'arthrite au zymosan

L'immobilisation prolongée chez la souris aggrave les dommages cartilagineux occasionnés par l'arthrite induite au zymosan [van Lent,1990]. En effet, les polynucléaires neutrophiles adhèrent à la surface du cartilage des articulations immobilisées et amplifient la réponse inflammatoire.

L'activité de la β -glucuronidase synoviale, une enzyme lysosomiale, est corrélée à la sévérité de l'arthrite au zymosan chez la souris. Le traitement par un anti-inflammatoire stéroïdien (triamcinolone acétonide) tout en améliorant les lésions histologiques, diminue l'activité enzymatique [Folliard,1988]. Un traitement local par l'hexacétonide triamcinolone diminue la prolifération synoviale observée au cours de l'arthrite au zymosan chez le rat [O'Toole,1987].

La plupart des études concernant l'arthrite au zymosan sont réalisées chez la souris. Une étude chez le lapin montre que l'injection intra-articulaire de 70mg de zymosan dans le genou entraîne la formation d'un pannus et une réaction granulomateuse accompagnée de dépôts de fibrine et de foyers nécrotiques [Weinberger,1990]. Contrairement à la souris, l'auteur rapporte la présence de cellules lymphoïdes, de cellules géantes d'Aschoff ainsi que des plasmocytes dans le tissu synovial.

Une des rares études réalisée chez le rat [Griffiths,1991] analyse la réaction inflammatoire à court terme suite à l'injection intra-articulaire de zymosan dans le genou. La réaction inflammatoire initiale se décompose en deux phases : une rapide augmentation de la perméabilité vasculaire (15-30mn) suivie d'une seconde (2-3h) associée à un influx de leucocytes. Parallèlement, une rapide augmentation du gonflement articulaire (15mn) est corrélée à la libération de LTB₄ dans le liquide synovial. Après 3 heures, l'œdème maximal observé est associé à la production maximale de PGs et LTB₄. Les inhibiteurs spécifiques de la lipoxigénase, la dexaméthasone et la colchicine sont inefficaces sur la phase initiale d'élévation de la perméabilité vasculaire dans le genou. Par contre, tous ces produits inhibent la deuxième phase de l'élévation de la perméabilité vasculaire et l'infiltration des leucocytes dans l'articulation. L'effet thérapeutique de la dexaméthasone et de la colchicine est principalement dû à l'inhibition de l'accumulation de leucocytes. L'action de la dexaméthasone peut s'expliquer par l'inhibition de la synthèse des cytokines (IL-1, IL-8), chimiotactiques pour les neutrophiles. Le C5a paraît également être un médiateur clé car il entraîne l'accumulation des neutrophiles lorsqu'il est injecté dans l'articulation [Hasslet,1989].

En conclusion, les propriétés phlogogènes du zymosan ont fait l'objet d'un grand nombre de travaux. Le zymosan est très utilisé dans les études *in vitro* pour stimuler la production de LTB₄. Il provoque la libération de leucotriènes, de prostaglandines et de cytokines par les polynucléaires et les macrophages. Le zymosan est à l'origine d'un grand nombre de modèles d'inflammation *in vivo* chez l'animal ; les plus couramment employés sont les modèles de péritonite, de pleurésie, œdème de la patte, inflammation de l'oreille, inflammation de la poche à air.

L'injection intra-articulaire de zymosan dans le genou entraîne une synovite proliférative caractérisée par un infiltrat riche en polynucléaires, une hyperplasie synoviale. Cette synovite s'organise progressivement en un pannus agressif pour les structures articulaires adjacentes. Cette monoarthrite non immunologique est initiée par l'activation de la voie alterne du complément et l'induction des enzymes lysosomiales qui participent à la chronicité de l'inflammation. La monoarthrite au zymosan constitue un modèle intéressant pour l'étude du métabolisme cartilagineux car elle permet la comparaison de l'articulation malade à l'articulation saine.

CHAPITRE VI

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE VI

MATERIEL ET METHODES

VI.1 LA BIOTELEMÉTRIE

Dans le cadre de nos travaux expérimentaux, nous avons été amenés à développer une technique originale pour l'évaluation des phénomènes inflammatoires lors de l'arthrite au zymosan. La biotéléométrie est une méthode de mesure d'introduction récente en pharmacologie de l'inflammation. Elle permet de suivre en continu la mobilité spontanée et la température d'un rat soumis à des conditions expérimentales variées. Son intérêt lors des arthropathies expérimentales a récemment été souligné [Terlain,1993].

VI.1.1 INTÉRÊT DE LA BIOTÉLÉMÉTRIE

La réaction inflammatoire fait appel à des régulations biologiques particulièrement complexes. Nous développons une approche originale, la biotéléométrie, qui permet l'évaluation globale de ces phénomènes. Cette méthode non invasive, déjà utilisée en pharmacologie cardio-vasculaire autorise le transfert de signaux divers par système émetteur/récepteur et assure un suivi continu de la mobilité spontanée et de la température de l'animal.

La miniaturisation croissante des systèmes électroniques a permis le développement de méthodes téléométriques adaptées à la pharmacologie animale. Cette technique, peu exploitée en pharmacologie expérimentale, laisse pourtant entrevoir des perspectives tout à fait intéressantes. Il est ainsi possible, lors de différents modèles expérimentaux, de mesurer en continu chez un animal, placé dans des conditions optimales et sans manipulation, des paramètres très proches de certains index cliniques [Blin,1990].

Cet axe de recherche n'a encore fait l'objet d'aucun travail pharmacologique systématique. Nous avons développé cette approche qui permet entre autres une étude originale de l'inflammation, pour améliorer nos connaissances des anti-inflammatoires et décrire des modèles *in vivo* innovants destinés à de nouvelles cibles pharmacologiques. Nous allons décrire cette méthode, ses modalités d'utilisation, évaluer la signification des paramètres étudiés et évoquer quelques perspectives originales de recherche.

VI.1.2 PRINCIPES GÉNÉRAUX

La télémetrie, technologie qui repose sur l'émission d'une onde radio, comporte :

- un système émetteur, implanté par voie intra-péritonéale chez le rat,
- un système récepteur, placé sous sa cage pour le recueil des données.

Les informations sont transmises à un système informatique qui intègre les données selon des modalités variables, au choix de l'opérateur. Ainsi, certains paramètres biologiques sont transformés en données numériques, purement quantitatives. L'unité de télémetrie que nous avons utilisée pour ce travail est de type Mini Mitter (Sunriver, Oregon, USA). Les émetteurs émettent une onde de radiofréquence de 500 à 1000 Hz pour les températures utilisées (35-42°C). Leur taille est adaptée à une implantation chez le rat ou le cobaye. Il existe en outre des émetteurs adaptés à de plus petits animaux (souris), ou à une implantation en d'autres sites (peau, cerveau...).

Les paramètres évalués (température centrale, mobilité, tension artérielle, électrocardiogramme, électroencéphalogramme), sont propres à chaque émetteur. Nous utilisons des émetteurs de type VM-HF adaptés à la mesure de la mobilité et de la température centrale. Le signal de l'émetteur, implanté *in vivo*, est transmis à une antenne réceptrice placée sous la cage de l'animal. Les informations sont ensuite collectées par une matrice de consolidation qui regroupe les informations de 12 cages. L'unité centrale permet de traiter les données de l'ensemble des animaux observés (48 pour notre unité).

VI.1.2.1 L'émetteur

Implanté dans la cavité abdominale de chaque rat, l'émetteur transmet les données sous forme de signaux constitués d'une série de courtes impulsions d'énergie radiofréquence. Ces signaux typiquement de 300 à 700 impulsions par seconde se partagent une porteuse commune de 400 KHz. Ceci permet de faciliter la réception puisque les récepteurs respectifs correspondant ne nécessitent aucun réglage spécifique. De plus, le signal peut être entendu en divers points de la bande AM, ce qui permet d'en vérifier le bon fonctionnement en les approchant d'un poste radio.

Pour les données collectées, la température et l'activité motrice, le signal code les informations concernant la température en modulation d'intervalle entre les impulsions et en déduit l'activité par les différences d'intensité dues aux mouvements, donc aux changements d'orientation de l'émetteur, et ceci par rapport à un certain seuil. Les températures les plus élevées correspondront alors aux intervalles les plus courts et inversement, les plus longs aux températures les plus basses.

Afin d'éviter toute interférence entre les différents récepteurs, ces émetteurs ont une faible portée, ce qui permet de disposer les cages les unes à côté des autres. Une autre caractéristique particulière est que le signal émis pénètre le plastique, le verre, la terre, le sable, l'eau et les litières mais pas le métal ou tout autre matière conductrice. Ainsi, ils sont enveloppés dans une capsule de matière plastique, puis enduits d'une fine couche de paraffine pour améliorer leur biocompatibilité.

Les émetteurs proposés par le constructeur sont de modèles assez variés. Aussi, les choisit-on, en fonction des critères suivants :

- *taille de l'animal* : elle est très importante car pour des animaux trop grands, elle impose une plus grande distance de transmission des signaux mais aussi une forme préférentielle (cylindrique ou aplatie).
- *taille et type de la cage* : dans le cas où la cage est soit trop grande, soit avec une roue tournante ou encore avec un fond grillagé, elle impose des spécificités pour une réception optimale.
- *durée de vie de la pile* : selon les études faites et les températures relevées, la durée de vie de la pile, qui est typiquement donnée à 37°C, va augmenter ou diminuer inversement à la température du milieu.
- *orientation de l'émetteur* : elle est capitale pour l'optimisation des résultats car le système d'antenne réceptrice est conçu dans une position horizontale.

Nous utilisons actuellement le modèle d'émetteur VM-FH. Ses caractéristiques sont les suivantes :

- taille : 12 mm de diamètre, 19 mm de longueur.
- poids : 2,2 grammes.
- sensibilité : 0,1°C.
- échelle de température : 15°C à 45°C.
- pile : pile de montre (S 13).
- durée de vie minimale : 3 mois.
- taille maximale de la cage : 24 x 33 cm.
- espèce type : petit rongeur.
- applications : température et activité
- implantation : intra-péritonéale.

L'émetteur est encapsulé dans un cylindre de matière plastique, ce qui lui donne les dimensions données ci-dessus. Ce cylindre contient également la pile nécessaire à l'alimentation de ce capteur. Hors de son boîtier, les éléments qui le composent sont noyés dans de la résine sur laquelle repose un bobinage permettant l'accord avec le récepteur. Ces éléments sont composés d'une

thermistance qui fait varier la valeur de la fréquence émise en fonction de la variation de température.

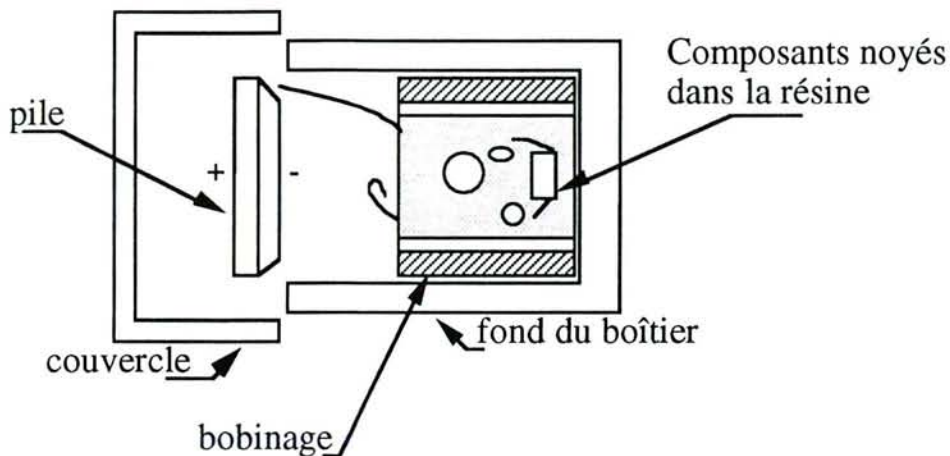


Figure 26 : Schéma en coupe sagittale d'un émetteur VM-HF entouré de sa capsule. Le tout est habituellement enrobé de paraffine puis désinfecté pour en améliorer la biocompatibilité.

VI.1.2.2 Les récepteurs et la matrice de consolidation

Les récepteurs utilisés sont du type RTA-500. Ils reçoivent les signaux radiofréquence issus des émetteurs implantables. Pour se faire, ils utilisent un système d'antenne horizontale. Ceci permet la détection de mouvements qui sont signalés par une diode électroluminescente. En effet, cette méthode de réception réagit sur l'amplitude du signal détecté. Cette antenne permet de détecter également la fréquence dépendant de la température que l'on désire mesurer.

Chaque matrice de consolidation est du type MP-12. Regroupant les signaux de 12 récepteurs, elle utilise un système de multiplexeurs qui lui permet de consolider et de regrouper les informations issues des différents récepteurs. Elle les achemine vers la carte d'acquisition, puis le logiciel qui comprend le système de traitement de données.

VI.1.2.2 Le logiciel

Associée à une carte d'acquisition sur un ordinateur (type PC), le logiciel permet de collecter et d'analyser les mesures centralisées par les 4 matrices (48 postes). Il gère chaque émetteur en lui attribuant un numéro d'ordre correspondant à celui de l'animal analysé. Ces numéros sont définis lors de la configuration grâce à laquelle on signale les références du matériel utilisé, mais aussi, on impose les paramètres à mesurer.

Chaque émetteur, dont la fréquence est propre, est préalablement étalonné à des températures seuils (35 et 39°C). Ces valeurs de calibrage sont programmées dans l'unité centrale, pour être transformées en température selon un algorithme

intégré dans le système d'exploitation. Cette relation tient compte des caractéristiques des thermistances qui confèrent aux valeurs mesurées une grande précision due à leur bonne sensibilité thermique. En ce qui concerne l'activité, elle correspond à la somme des variations d'intensité du signal à partir d'un certain seuil et cela pendant un intervalle de temps prédéterminé.

Toutes ces valeurs (température et activité), une fois converties sont stockées dans la mémoire tampon puis dans des fichiers. Ces derniers sont accessibles en utilisant les capacités d'analyse du logiciel ou encore par sauvegarde sur disquette en vue d'être traitées par analyse statistique. Pour le traitement de ces valeurs, le logiciel laisse le choix à l'utilisateur de sélectionner la période désirée.

Une fois ce paramètre enregistré et les mesures établies, le logiciel offre la possibilité de faire des analyses directes. Ceci est possible par la réalisation de courbes sur différentes échelles (décimales ou logarithmiques), ou alors des histogrammes, des calculs statistiques, mais encore des analyses pour les phénomènes rythmiques tels que le pouls, à savoir des transformées de Fourier rapide (FFT), des actogrammes...

VI.1.2.3 Organisation générale du système

Le logiciel, installé sous MS DOS, permet un recueil des informations en continu, ainsi que leur sauvegarde sur un disque dur. Le traitement des résultats se fait grâce au logiciel DQ Sort, qui autorise le transfert des données, prédéterminées au choix de l'expérimentateur, sur un tableur (Excel IV, Microsoft) installé sur système 7.1 Macintosh (programme Exchange Mac-PC). Les résultats statistiques sont traités par le programme Statview IV (Abacus Concept) installé sur un Macintosh Quadra (figure 27).

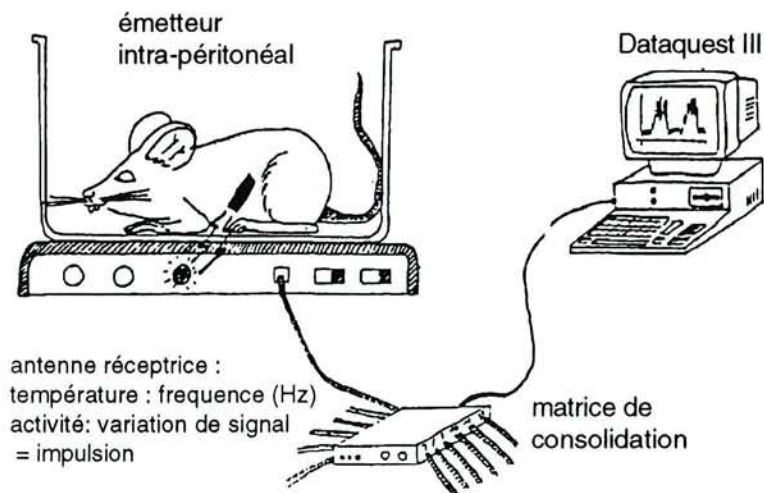


Figure 27 : Schéma général d'une installation de biotélémetrie. Le signal transmis par l'émetteur, implanté par voie intra-péritonéale chez le rat est reçu par une antenne placée sous la cage. Les signaux de 12 différentes cages sont centralisés par des matrices de consolidation. Ces informations sont intégrées à des intervalles variables par une unité centrale qui permet le traitement des données (fièvre et mobilité spontanée).

VI.1.2.4 Paramètres étudiés

Nous avons étudié la mobilité spontanée et la température centrale chez le rat. Rappelons que le signal de l'émetteur étant hautement directionnel, tout changement d'orientation provoqué par l'activité locomotrice de l'animal provoque un changement d'intensité du signal qui se traduit par une impulsion. La somme des impulsions par unité de temps rend compte de la mobilité spontanée de l'animal.

D'autres évaluations sont possibles : distances parcourues sur une roue tournante (distance, vitesse horaire...), mesure de la consommation de boisson (dypsométrie) ou d'oxygène. Celles-ci sont évaluées de façon continue et dans des intervalles de temps variables allant de quelques minutes à plusieurs heures selon l'effet pharmacodynamique étudié. La durée totale de l'expérimentation n'est limitée que par la longévité de la pile (4 à 6 mois).

VI.1.2.5 Modalités pratiques

Nos expériences de biotélémetrie sont réalisées dans une animalerie thermorégulée autour de 24°C, température proche de celle de la neutralité thermique chez le rat. Cette pièce est protégée des bruits extérieurs et bénéficie de cycles d'éclairage jour-nuit (lumière de 6h à 18h). Il est bien entendu possible d'adapter ces cycles d'éclairage pour que le début des phases d'obscurité (hyperactivité chez le rat, animal nocturne) corresponde à l'effet que l'on souhaite observer. Le plan expérimental se déroule habituellement en 4 phases :

- *calibrage* des émetteurs pour la température centrale des animaux (35-39°C)
- *implantation* des émetteurs sous anesthésie générale induite par l'injection intramusculaire d'un mélange acépromazine (Vétranquil®) et kétamine (Imalgène® 500) 0,25/0,75 v/v injecté par voie IM (0.1 ml/100g). Les émetteurs préalablement enrobés de paraffine (Elwax coating kit) sont désinfectés dans un bain de chlorhexidine (Hexomédine®) puis implantés par voie intra-péritonéale (laparotomie sus pubienne); la paroi abdominale est suturée en 2 plans, musculaire puis cutané.
- *phase de régulation* de 3 à 5 jours pour obtenir des paramètres de référence stables.
- *phase expérimentale* proprement dite.

Le travail pharmacologique suppose donc une adéquation de la méthodologie au comportement du rat car les possibilités d'évaluation varient selon la phase étudiée, elle même tributaire du nyctémère du rat, animal nocturne. Ainsi, l'hyperactivité du rat, contraste nettement avec la phase de sommeil diurne. Le

cycle nyctéméral du rat est bien connu et ces deux phases se distinguent nettement, contrairement au cobaye. La température des rats suit l'évolution de la mobilité car il existe une hyperthermie nocturne supérieure à 38°C contingente de l'hyperactivité (figure 28).

Dans ces conditions il convient de distinguer ces différentes phases en fonction de l'effet pharmacologique que l'on souhaite observer. Ainsi durant la phase d'éclairage la température est plus basse, alors que la mobilité est diminuée (période de sommeil). Durant la phase nocturne, l'hypermobilité s'accompagne d'une discrète hyperthermie.

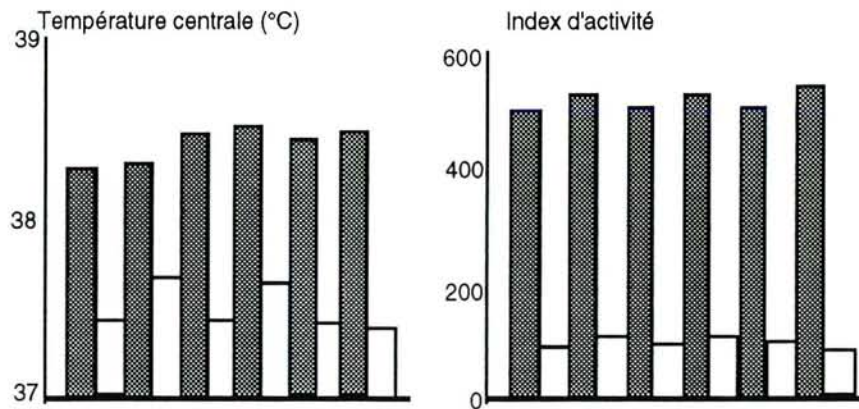


Figure 28 : Variation de la température et de la mobilité du rat normal en fonction des périodes d'éclairage (□ de jour) et d'obscurité (■ de nuit).

Dans ces conditions et dans un environnement normal, les diverses évaluations qui peuvent être faites sur les rats, à savoir température, mobilité spontanée et exploration, varient avec la phase d'obscurité et de lumière comme indiqué dans le tableau 10.

Mesures	Température	Mobilité	Exploration
Phase d'éclairage	oui ^a	non	oui
Phase d'obscurité	oui ^b	oui	non

Tableau 10 : Possibilités d'évaluation en télémétrie
 a : la température diurne est régulée vers 37°C
 b : la température nocturne n'est pas régulée à 37°C

VI.1.2.6 Expression et exploitation des résultats.

Pour quantifier les variations de mobilité et de température, différentes modalités sont possibles :

- comparaison à des données basales de référence durant la même période d'éclairage à la même heure,
- comparaison à un lot témoin,
- comparaison aux données précédant immédiatement l'expérimentation (T0).

Cette technologie permet donc de mesurer en continu, pendant des périodes brèves ou longues (phénomènes aigus ou prolongés), plusieurs paramètres. Les avantages de cette technique sont les suivants :

- résultats plus sûrs et plus nombreux,
- résultats continus, intégrés dans des intervalles variables,
- recueils des informations dans les différentes conditions de vie de l'animal (jour, nuit, à jeun, nourri...),
- utilisation plus rationnelle des animaux (par exemple l'animal est son propre témoin),
- meilleure déontologie animale (économie d'animaux, minimum de stress).

a) Étude de la température

Plusieurs modalités d'expression sont possibles en fonction du phénomène que l'on souhaite mettre en évidence. La température centrale peut s'exprimer en valeurs brutes, ou en valeurs normalisées (ΔT_0) comparativement à la valeur initiale du début d'expérimentation. Il est également facile d'exprimer la température comparativement à une valeur enregistrée à une même heure la veille, afin de s'affranchir de la variation du nyctémère, si le phénomène étudié dure plus d'une demi journée. L'amplitude, la durée et l'intensité de la réponse peuvent être quantifiées selon les paramètres suivants :

- pic de la réaction fébrile : E max
- moment ou celui-ci survient : T max
- aire sous la courbe de la fièvre : ASC (méthode des trapèzes)
- durée de l'effet biologique

Les données obtenues sont comparées entre les différents groupes par un test de Student ou une analyse de la variance, suivie d'un test de Dunett au seuil de significativité de 5%.

b) Étude de l'activité locomotrice

Cette approche peut être similaire pour l'étude de la mobilité, en pratique compte tenu de la variabilité plus importante de ce paramètre on peut raisonner soit :

- en terme de mobilité spontanée brute moyenne (nombre d'impulsions/heure au cours de la nuit)

- ou en terme de pourcentage d'incapacité comparativement à la nuit ou à la demi nuit de référence selon la formule suivante :

$$\% \text{ incapacité} = \frac{(\text{Impulsions } T_{\text{obs}} - \text{Impulsions } T_{\text{ref}}) / \text{Impulsions } T_{\text{ref}} \times 100}{}$$

T_{ref} = période de la nuit de référence (total de la nuit ou de la demi nuit)

T_{obs} = période de la nuit d'étude

Cette dernière évaluation permet de s'affranchir en partie de la variabilité interindividuelle (rats plus ou moins "actifs ou agités" durant la nuit).

VI.1.3 SIGNIFICATION PHYSIOPATHOLOGIQUE EXEMPLES D'APPLICATION

La télémétrie est une méthode encore peu répandue et imparfaitement explorée. Dans ces conditions, bien des questions peuvent encore se poser concernant sa valeur prédictive en pharmacologie expérimentale. Nous allons donc, à partir de quelques unes de nos applications expérimentales, essayer de déterminer la signification physiopathologique des paramètres de télémétrie que nous exploitons (température et mobilité) dans le domaine de l'inflammation et de la pathologie articulaire.

La température peut être mesurée dans des conditions variables : soit en phase d'obscurité ou nocturne (T.N.), soit en phase d'éclairage ou diurne (T.D.) Il existe alors une différence entre ces deux valeurs telle que la température diurne est habituellement inférieure d'un degré Celsius à celle de la température nocturne, correspondant à un rythme circadien, bien connu chez le rat [Scales,1987]. D'après de nombreux auteurs [Feng,1989], la valeur supérieure de la TN s'expliquerait plus par une augmentation de température régulée que par une augmentation régulée de la température (valeur du seuil). Cette hyperthermie relative semble davantage due à une augmentation de production de prostaglandines (PGE2 principalement) dans la phase nocturne qu'à l'hyperactivité nocturne en relation avec la prise de nourriture, les deux éléments étant toutefois en cause.

La différence entre températures nocturnes et diurnes (TN et TD) revêt donc une certaine importance qu'il convient de prendre en compte :

- en précisant l'horaire de l'expérimentation par rapport à la phase d'éclairage (TN ou TD) pour interpréter l'effet d'un antipyrétique,

- en sachant qu'un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) administré chez le rat normal va diminuer la valeur de la TN sans modifier significativement la valeur de la TD [Scales,1987],
- en sachant qu'une perturbation de l'animal, même minime, en phase diurne (manipulation, gavage, prélèvements...) va changer momentanément la valeur de la TD,
- en considérant qu'il existe chez le rat normal une certaine relation, en phase nocturne, entre l'augmentation de l'activité et celle de la TN (*figure 28*) toute hyperthermie s'accompagnant d'une diminution de l'activité signifie que le processus fébrile provoqué chez l'animal correspond à un processus pathologique, vraisemblablement inflammatoire ou infectieux.

L'analyse globale du comportement thermique normal ou pathologique nécessitera donc la prise en compte de ces paramètres et l'étude de leurs modifications réciproques en relation avec la bonne connaissance du modèle et les effets dose-dépendants exercés par les produits. La facilité d'utilisation de la méthode permet donc aisément d'apprécier la participation ou l'absence d'intervention des prostaglandines dans l'hyperthermie, comme par exemple dans le cas d'injection d'IL-8 [Rothwell,1990]. Il est ainsi possible de faire la part entre les effets antipyrétiques qui résultent d'une inhibition de la cyclo-oxygénase ou d'une d'autre cible, d'un effet toxique ou de l'utilisation de doses excessives.

La mesure de la mobilité, qui est largement tributaire de la fonction articulaire, peut également faire intervenir de nombreux autres facteurs qu'il faut prendre en compte. Ainsi, le rythme circadien du rat, animal nocturne, fait que seule sa mobilité nocturne spontanée (MN) est interprétable. (*figure 28*). Il est cependant possible d'utiliser son activité exploratoire diurne (E.D.), qui se traduit par une activité intense lorsque l'animal est placé dans un endroit qu'il découvre ou qu'il méconnaît (nouvelle cage), même si cette dernière est assez brève. Enfin une exploration nocturne se révèle d'interprétation plus complexe car elle fait intervenir à la fois des activités exploratoires et une mobilité spontanée.

Quel que soit le paramètre choisi, M.N. ou E.D., la mobilité normale du rat peut être modifiée par des agents pharmacologiques variés, entraînant :

- des modifications locales, articulaires, circulatoires, en relation avec des processus algiques, inflammatoires, dégénératifs ...
- une réaction systémique, plus ou moins liée aux processus inflammatoires ou immunologiques, provoquant sommeil, somnolence, fièvre, cachexie, stress, comme les effets généraux et centraux des cytokines impliquées dans le processus inflammatoire (IL-1, TNF, IL-6, interférons...)

- des effets pharmacodynamiques, bénéfiques ou délétères, principaux ou ancillaires, des produits utilisés (relation dose-effet) qui peuvent améliorer ou aggraver une hypomobilité. Ainsi un anti-inflammatoire peut restaurer une hypomobilité secondaire à une arthrite des genoux. La mobilité spontanée de l'animal peut également être influencée par les propriétés psychotropes d'un médicament (sédatives ou excitantes).

L'interprétation des résultats des études de mobilité exige donc que l'on tienne compte de nombreux éléments, parmi lesquels (tableau 11) :

- le modèle utilisé et le processus pathologique qu'il tente de reproduire,
- la voie d'administration locale, notamment intra-articulaire (genou, cheville), ou systémique de l'agent pharmacologique,
- les intervalles et la durée des mesures de l'évolution de la mobilité et de la température, en prolongeant la phase d'observation pour suivre la cinétique sur chaque paramètre.

A la lumière des différents travaux que nous avons conduits, nous pouvons déduire que :

- la réponse algogène et/ou phlogogène des animaux varie nettement selon la nature des agents pharmacologiques utilisés,
- l'effet de la carragénine, qui active principalement la voie de la cyclooxygénase chez le rat, varie selon le site d'injection, modérément la première nuit, mais plus nettement lors de la seconde.

L'utilisation de certains médiateurs de l'inflammation comme l'IL-1 ou le TNF peut s'avérer plus complexe à analyser. En effet l'IL-1 (IL1- β humaine recombinante), administrée chez le rat exerce des effets centraux (fièvre, somnolence, perte d'appétit etc...), des effets périphériques (inflammation, chimiotactisme, dégradation articulaire etc...) et des effets mixtes procédant à la fois d'un mécanisme d'action central et périphérique (induction de PGE2, douleur etc...).

Ainsi, l'étude des différentes voies d'administration montre que, l'IL-1 β injectée par voie intra-articulaire provoque, à faible dose, une hypomobilité qui rend davantage compte de son action locale articulaire (douleur et inflammation) que d'un effet central sur la somnolence.

Comme le montrent ces résultats, le zymosan injecté par voie intra-articulaire est capable d'induire de façon constante une baisse de la mobilité et une fièvre. Le handicap dure quelques jours, alors que la réaction fébrile ne persiste que la première nuit.

La mesure de la température et de la mobilité par téléométrie comme composante d'un processus inflammatoire, comme moyen d'étude d'un produit, peut donc être mise en oeuvre dans des circonstances très diverses, par exemple :

- après injection d'un médiateur connu (IL1- α , IL1- β , TNF...),
- après injection d'un agent à effets plus complexes : endotoxines, poly IC, muramyl dipeptide, immuno-stimulants divers etc...
- après induction d'un processus inflammatoire aigu local (carragénine, zymosan) ou systémique (levure de bière ...) ou subaigu (adjuvant complet de Freund par voie locale ou générale),
- après modification des conditions de circulation chez des animaux, par exemple ischémie/reperfusion de la patte postérieure etc...

Dans ces conditions, l'effet d'une molécule anti-inflammatoire, administrée à titre préventif ou curatif, peut être évaluée en terme d'efficacité (DE50...), de cinétique et /ou de durée d'action, sur la fièvre et/ou la mobilité.

Agents	Hypomobilité	Hyperthermie
CARRAGENINE	+	+
ZYMOSAN	+	+
IL-1 (humaine)	+	+
ENDOTOXINES (<i>S. marcescens</i>)	+	+
LIPOPEPTIDE INDUCTEUR DE CYTOKINES	+	+
ACIDE URIQUE /URATE	+	+
LTB ₄	0	0
XYLENE (25 μ l dilués au 1/2)	+	0
AgNO ₃ (1 mg/0,2 ml)	+	+
FORMOL (5%/0,2 ml)	+	-
PAF	0	0
PGE ₂	0	0
SUBSTANCE P (20 μ g/0,2 ml)	0	0
SEPTIDE (<i>analogue substance P</i>) (40 μ g/0,2 ml)	0	-(1h)
MONO-iodo ACETATE	+	0

Tableau 11 : Incidence de l'hypomobilité et de l'hyperthermie en fonction des agents administrés par voie intra-articulaire (pendant les 12 heures de la phase obscure) : hypomobilité et hyperthermie = + ; pas de modification = 0 ; hypothermie = -

VI.1.4 CONCLUSION

L'utilisation de la biotéléométrie en pharmacologie articulaire, source de progrès considérables en recherche sur l'inflammation et la physiopathologie articulaire, complète nos connaissances sur les anti-inflammatoires et les antalgiques de référence. Elle autorise également une évaluation novatrice de produits originaux, issus de la recherche et du génie génétique, agissant sur de nouvelles cibles biologiques.

De plus, la biotélémetrie permet une approche plus fine des mécanismes d'action centraux et périphériques des anti-inflammatoires, en dissociant les propriétés anti-pyrétiques, anti-inflammatoires et antalgiques. La surveillance est continue, éventuellement prolongée, sans manipulation inutile de l'animal qui est son propre témoin. Ceci valorise l'expérimentation animale, en assurant au rongeur des contraintes minimales par une utilisation plus rationnelle des lots étudiés.

D'autres domaines restent à explorer comme l'évaluation de modèles d'arthropathies dégénératives du rongeur (arthroses chimiques par exemple), les phénomènes d'exploration (et leur régulation) tout comme la mise au point et le développement d'émetteurs de surface ne nécessitant pas d'implantation.

La télémetrie est donc un excellent moyen d'évaluer le handicap fonctionnel survenant au cours d'une arthrite expérimentale. L'utilisation de la biotélémetrie nous a permis une approche originale du modèle d'arthrite induite au zymosan chez le rat et nous nous sommes attachés à améliorer la connaissance de sa physiopathologie, notamment en terme de cinétique de l'effet phlogogène, algogène et pyrogène.

VI.2 ETUDE DU METABOLISME DU CARTILAGE ARTICULAIRE

L'évaluation de l'atteinte du cartilage au cours de l'inflammation articulaire a été réalisée grâce aux études conjointes de l'anabolisme et du catabolisme du cartilage articulaire. Les propriétés métaboliques du cartilage ont été évaluées par le dosage des protéoglycanes qui sont les constituants majeurs du cartilage et qui présentent un taux de renouvellement élevé. Nous avons développé une méthode radiométrique chez le rat qui permet d'évaluer *ex vivo* les capacités anaboliques du cartilage articulaire (synthèse des glycosaminoglycanes sulfatés) d'une entité anatomique définie chez le rat, la rotule. Nous avons également évalué le catabolisme de façon indirecte par le dosage du contenu en protéoglycanes de la rotule grâce à une microméthode colorimétrique issue de la méthode de Farndale.

VI.2.1 ETUDE DE L'ANABOLISME DU CARTILAGE

L'anabolisme des protéoglycanes cartilagineux est évalué par le dosage de l'incorporation *ex vivo* de sulfate de sodium marqué au soufre 35 ($\text{Na}_2 \text{}^{35}\text{SO}_4$) dans le cartilage articulaire de la rotule du rat. Nous avons mis au point cette méthode de dosage chez le rat à partir d'une méthode décrite chez la souris [van den Berg, 1982].

VI.2.1.1 Matériel et méthodes

Les rats sont sacrifiés par décérébration sous anesthésie à l'éther et les rotules sont isolées des articulations et disséquées de façon à éliminer le maximum de tissu non cartilagineux environnant sans léser le cartilage. Les rotules sont mises à incuber 3 heures, à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂ dans des puits contenant 2,5ml de RPMI Hepes et HCO₃ supplémenté avec de la L-Glutamine (2mM) et une solution d'antibiotiques (1% penicilline 100 UI/ml et streptomycine 100 µg/ml) qui proviennent de chez Sigma (St Quentin Fallavier, France). Le milieu d'incubation contient 2,5 µci de sulfate radiomarqué par puits (Na₂ ³⁵SO₄, Amersham, Les Ulis, France). A la fin de la période d'incubation, les rotules sont lavées avec du sérum physiologique (20ml) à 4°C et sont fixées toute la nuit dans un tampon formol phosphaté (10%) supplémenté avec le cétylpyridinium chloride (0,5%, Sigma). La décalcification dans l'acide formique (5%) pendant 6 heures permet la réalisation de biopsie à l'aide d'un poinçon de deux millimètres de diamètre ("biopsy punch"; Stiefel, Nanterre, France) au centre de la rotule. Après solubilisation des rotules dans 0,5 ml de Soluène-350 (Packard, Rungis, France) toute une nuit à 37°C et ajout de 5 ml de liquide de scintillation Hionic Fluor (Packard, Rungis, France), le comptage de la radioactivité est effectué à l'aide d'un détecteur à scintillation à l'obscurité (Compteur Tri-Carb 4000, Packard). Les procédures de lavages, fixation et décalcification permettent de s'assurer que la quantité de soufre radiomarqué incorporée dans la rotule reflète bien la synthèse des protéoglycanes sulfatés.

VI.2.1.2 Expression des résultats

Pour s'affranchir des variations inter-individuelles, l'anabolisme est exprimé par rapport à la rotule controlatérale. Lors de la monoarthrite au zymosan chez le rat, la rotule droite arthritique est comparée à la rotule controlatérale gauche saine. Afin de standardiser la taille de l'échantillon nous utilisons un "punch" qui permet de diriger la biopsie et d'obtenir des échantillons homogènes de cartilage. Les résultats obtenus permettent ainsi de différencier l'incorporation de ³⁵S dans les parties centrales et périphériques des rotules. Les résultats sont exprimés en pourcentages de variation d'incorporation de ³⁵S entre les rotules droites et gauches d'un même animal de la façon suivante :

$$\frac{(^{35}\text{S de la rotule droite} - ^{35}\text{S de la rotule gauche}) \times 100}{(^{35}\text{S de la rotule gauche})}$$

On réalise la moyenne des pourcentages de variations pour chaque lot correspondant aux différents temps de l'arthrite que l'on désire étudier. Ce mode de calcul permet également de s'affranchir des variations d'incorporation du cartilage dues à la demi vie de l'isotope étudié (³⁵S : 87,4 jours).

VI.2.2 ETUDE DU CATABOLISME DU CARTILAGE

VI.2.2.1 Matériel et méthodes

Le catabolisme est évalué par la diminution du contenu en protéoglycanes constitutifs du cartilage patellaire. Le dosage du contenu en protéoglycanes est réalisé par une microméthode issue de la méthode colorimétrique au bleu de 1,9 diméthylméthylène [Farndale,1986]. En effet, la miniaturisation de cette méthode a permis une détermination plus sensible de la quantité de protéoglycanes des échantillons cartilagineux du rat.

Après sacrifice des rats par dislocation cervicale sous anesthésie, les rotules isolées des articulations sont décalcifiées toute une nuit dans une solution d'acide formique à 5% (Sigma, St Quentin Fallavier, France). On réalise alors la neutralisation de l'acide formique présent dans les échantillons de cartilage par saturation des vapeurs d'ammoniaque en vase clos pendant une heure. Le pH se stabilise à l'air ambiant à une valeur égale à 7-8. La décalcification des rotules permet la dissociation des structures osseuses et cartilagineuses par une technique de pelage. La détermination du poids sec des échantillons est effectuée après dessiccation des échantillons de cartilage. La digestion enzymatique réalisée par l'addition de 10 µl de tampon papaine (60µg/rotule) (Sigma, St Quentin Fallavier, France) pendant une heure à 65°C, est arrêtée par l'ajout de 10 µl d'acide iodoacétique (220mM). Le volume est ajusté à 1 ml par l'addition de 780µl de tampon Tris/Hcl (pH 8,0) et le dosage des échantillons (100µl) se fait par la lecture des densités optiques à une longueur d'onde de 525 nm, après l'ajout d'une solution de bleu de 1,9-diméthylméthylène (2,5ml, pH3). La gamme d'étalonnage (5 à 100µg/ml) est réalisée à partir d'une solution de chondroïtine 6 sulfate sulfate extrait d'aile de requin (Institut Jacques Boy, Reims, France).

VI.2.2.2 Expression des résultats

Les concentrations de chondroïtine sulfate (µg/mg de poids sec de cartilage) des échantillons sont calculées à partir de la courbe d'étalonnage et ramenés à leurs poids secs respectifs. Les résultats sont exprimés sous la forme de pourcentage de glycosaminoglycanes sulfatés des rotules droites arthritiques par rapport aux rotules gauches controlatérales saines.

CHAPITRE VII

RESULTATS

CHAPITRE VII

RÉSULTATS

VII.1 L'ARTHRITE AU ZYMOSAN CHEZ LE RAT : ÉTUDES PRÉLIMINAIRES

Le développement de nouvelles thérapeutiques en pharmacologie articulaire nécessite l'apport de modèles expérimentaux plus adaptés et mettant en cause des mécanismes physiopathologiques différents de ceux classiquement observés dans un modèle d'arthrite à l'adjuvant. Nous avons ainsi développé chez le rat un modèle d'arthrite au zymosan qui mime, d'après les données de la littérature, certains traits des rhumatismes inflammatoires [Keystone,1977] et nous avons tenté de cerner plus précisément sa physiopathologie. Dans cette première partie, nous décrivons l'influence de la dose de zymosan dans le développement de l'arthrite. Nous avons également dosé les taux sériques de hyaluronate en tant que marqueur de la sévérité de cette monoarthrite.

VII.1.1 ÉTUDE DES EFFETS DE LA DOSE DE ZYMOSAN

Nos travaux préliminaires ont porté sur les relations doses-effets générées par le zymosan dans le modèle d'arthrite. Nous avons développé ce modèle chez le rat, qui à notre connaissance, est simplement décrit chez la souris. Nous avons cherché à définir la dose optimale de zymosan nécessaire au déclenchement d'une arthrite chez le rat. Pour cela, nous avons étudié les effets de trois doses de zymosan (1, 2 et 4 mg/genou) sur les paramètres évalués par biotéléométrie (handicap locomoteur et réponse fébrile) ainsi que par des techniques plus classiques d'investigation (tuméfaction articulaire et lésions histologiques)

Le déclenchement de l'arthrite au zymosan est réalisé par l'injection intra-articulaire unique de zymosan (en suspension dans du sérum physiologique stérile) dans le genou à travers le tendon sous-rotulien, à mi chemin entre la tubérosité tibiale antérieure et la pointe de la rotule. Nous avons également testé les effets d'une deuxième injection de zymosan par voie intra-articulaire sept jours après l'injection initiale.

VII.1.1.1 Effets de la dose de zymosan sur la tuméfaction articulaire

La figure 29 montre que l'œdème déclenché par l'injection intra-articulaire dans le genou est d'autant plus marqué que la dose de zymosan est forte. L'œdème maximal (33%) est obtenu après 24 heures avec la dose la plus forte de zymosan (4 mg). La tuméfaction articulaire persiste de façon importante jusqu'au septième jour.

La seconde injection de zymosan (à des doses similaires) le septième jour reproduit un œdème de même amplitude que l'œdème initial qui s'atténue mais persiste pendant 15 jours. Toutefois, la seconde injection de 2 mg amplifie l'œdème qui est du même ordre que celui obtenu avec la dose de 4mg.

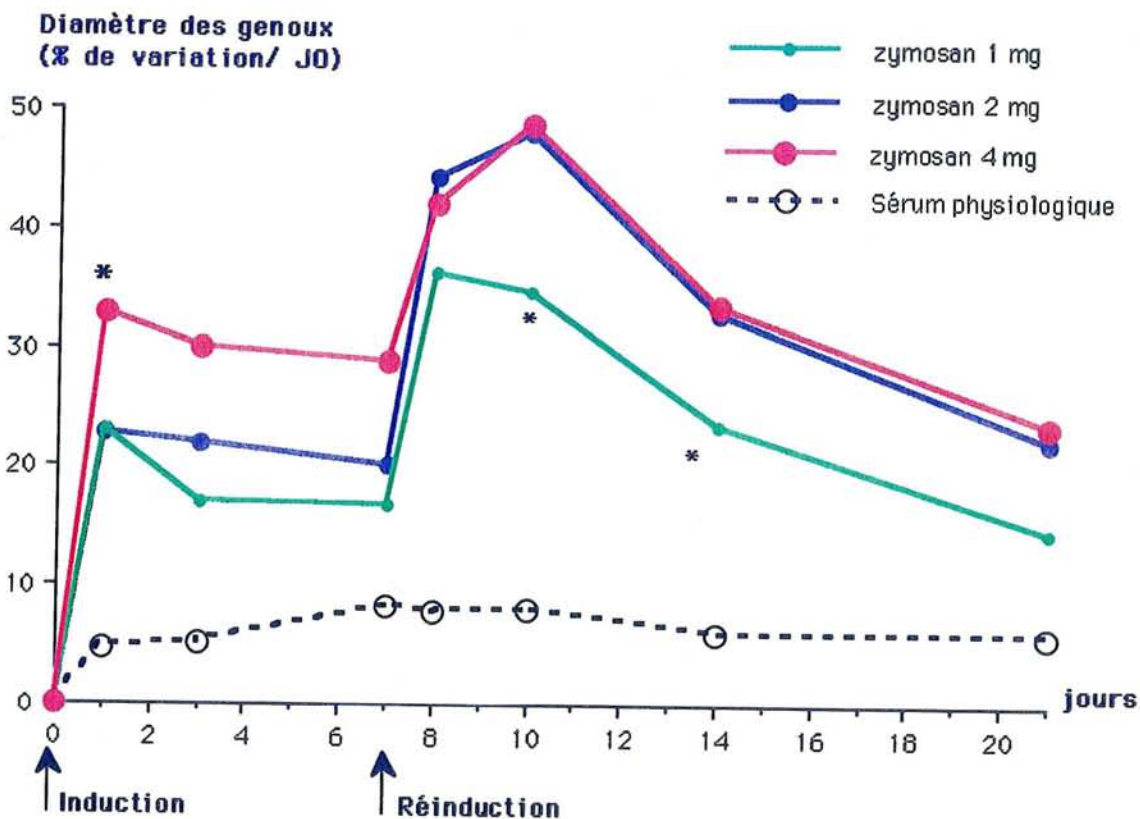


Figure 29 : Effets des différentes doses de zymosan sur l'œdème articulaire évalué par la mesure des diamètres des genoux. Les résultats sont exprimés en pourcentages moyens de variation (n=8) du diamètre du genou comparé au diamètre initial (JO). [$*p \leq 0,05$; groupes comparés par Anova]

VII.1.1.2 Effets de la dose de zymosan sur l'activité locomotrice

L'injection intra-articulaire de zymosan induit une forte hypomobilité le premier jour (-70%). Les différentes doses de zymosan injectées ont sensiblement le même effet, toutefois, le handicap le plus sévère est obtenu avec l'injection de 2 mg de zymosan. La deuxième injection de zymosan par voie intra-articulaire reproduit une hypomobilité de même intensité que la première et empêche le retour à une activité normale dans les jours qui suivent.

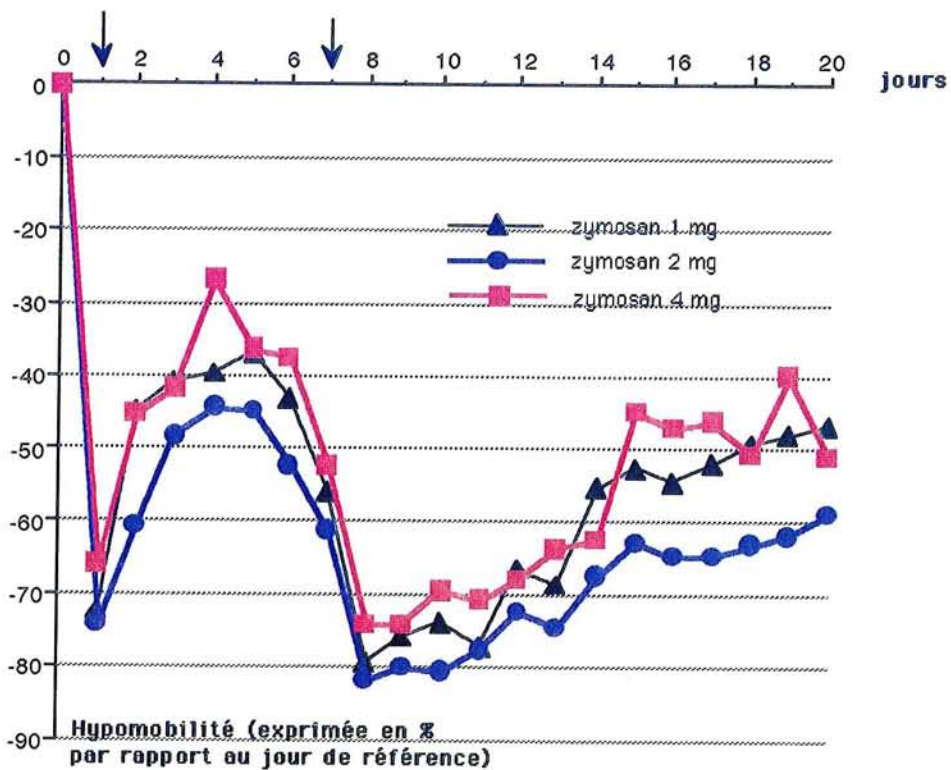


Figure 30: Influence des doses de zymosan sur l'hypomobilité induite chez le rat. Une deuxième injection intra-articulaire de zymosan (mêmes doses) est effectuée à J7. Les valeurs d'activité locomotrice sont exprimées en pourcentages moyens de variation par rapport au jour de référence (J-1)[N=8]

VII.1.1.3 Effets de la dose de zymosan sur la réponse fébrile

La réponse fébrile consécutive à l'injection des différentes doses de zymosan est caractérisée par un pic d'activité à 5 heures (T max) et une durée inférieure à 12 heures. La fièvre induite par l'injection intra-articulaire est très dépendante de la dose de zymosan (*figure 31*). La réponse fébrile reproduite une semaine plus tard, présente une amplitude et une durée similaires.

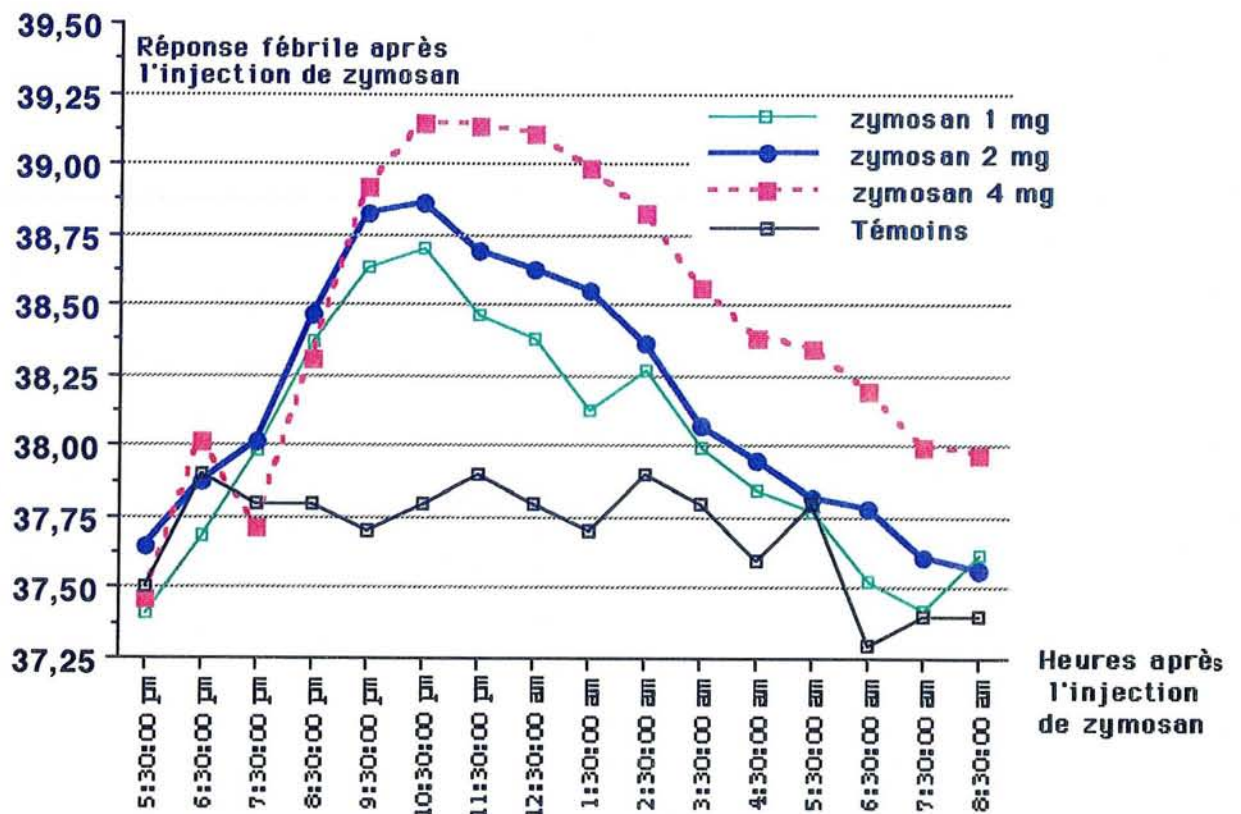


Figure 31 : Intensité de la réponse fébrile en fonction de la dose de zymosan. L'injection ia est réalisée à 5.30 pm et les valeurs représentées sont les moyennes des températures de 8 rats.

VII.1.1.4 Conclusion

Ces études nous ont permis de déterminer que la dose de 2mg de zymosan était la plus adaptée pour l'induction de l'arthrite chez le rat. Effectivement, en terme de cinétique d'action, la dose de 2 mg entraîne des réponses correspondant à l'effet moyen si l'on considère la réponse fébrile et la tuméfaction articulaire. Le handicap locomoteur généré par les trois doses de zymosan ne permet pas de différencier les effets toutefois, la réinduction amplifie le handicap. Le fait que la seconde injection de zymosan par voie intra-articulaire reproduise simplement les effets de l'injection initiale n'est pas en faveur d'un phénomène immunologique dans ce modèle. Au cours de nos travaux, nous avons également vérifié qu'une seconde injection de zymosan par voie systémique (*ip*, *iv*) n'induisait pas de perturbation du métabolisme du cartilage. L'étude histologique n'a pas révélé de différence dans les lésions articulaires engendrées par les différentes doses de zymosan. Aussi, toutes les études ultérieures seront réalisées avec la dose moyenne de 2mg de zymosan injecté par voie intra-articulaire.

VII.1.2 L'ACIDE HYALURONIQUE AU COURS DE L'ARTHRITE AU ZYMOSAN

VII.1.2.1 Introduction

La recherche de marqueurs biologiques pertinents d'origine articulaire fait l'objet d'un grand nombre de travaux tant en clinique qu'en recherche expérimentale. L'acide hyaluronique (AH) est proposé en rhumatologie comme marqueur de l'inflammation synoviale car ses taux sériques sont élevés au cours des rhumatismes inflammatoires chroniques s'accompagnant d'une polysynovite destructrice. Des résultats similaires ont été rapportés chez le rat lors de certains modèles expérimentaux (arthrite à l'adjuvant, arthrite au collagène de type II [Bjork,1989]), au cours desquels il existe une bonne corrélation des taux circulants d'AH avec l'intensité des phénomènes inflammatoires articulaires. Notre étude préliminaire a porté sur la valeur prédictive du hyaluronate comme marqueur de la sévérité de l'arthrite au zymosan.

VII.1.2.2 AH : Marqueur de la sévérité de l'arthrite au zymosan ?

Le dosage des taux sériques d'acide hyaluronique a été réalisé à différents temps de l'arthrite au zymosan (J0,J3,J14) induite chez des rats soumis à différents traitements anti-inflammatoires (dexaméthasone: 0,1 et 0,5 mg/kg/jour et indométacine: 1 et 3 mg/kg/jour) administrés précocement (de J-1 à J14: préventif) ou plus tardivement (de J3 à J14 : curatif) (*figure 32*).

Les prélèvements sanguins ont été réalisés par ponctions intra-cardiaques sous anesthésie à l'éther. Le dosage du hyaluronate est réalisé à l'aide d'un test radiométrique par compétition, faisant appel à l'affinité importante du hyaluronate pour la protéine porteuse des protéoglycanes extraits du cartilage nasal bovin (HABP). Le principe en est simple: le hyaluronate de l'échantillon à doser est incubé en présence d'une quantité connue de HABP radiomarquée (¹²⁵I-HABP), puis la HABP en excès est fixée sur du hyaluronate couplé à des microsphères de sépharose (AH-sépharose).

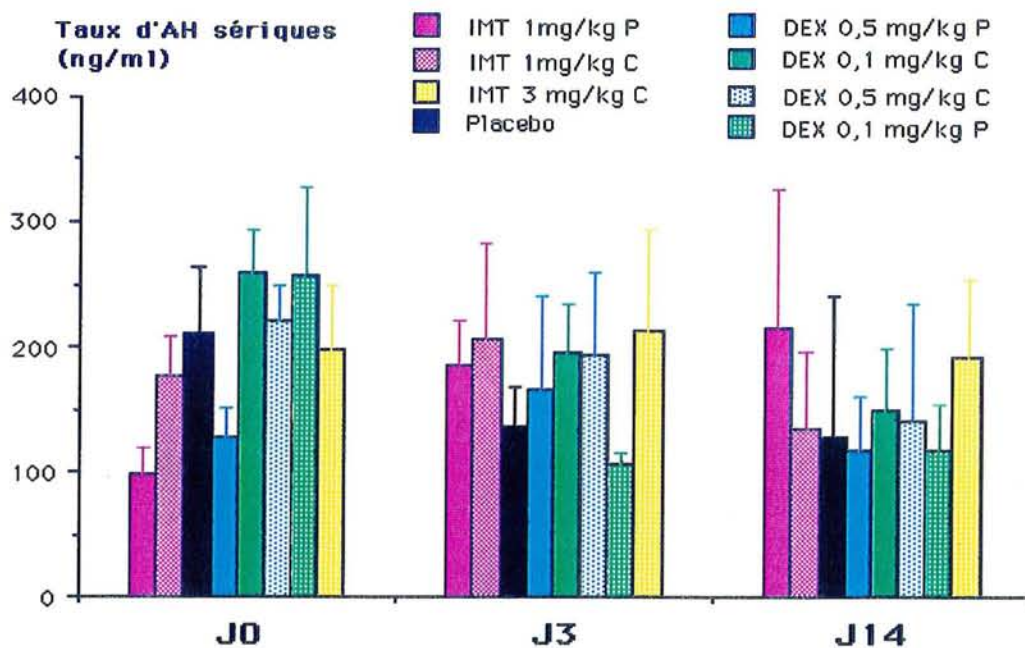


Figure 32: Taux sériques d'acide hyaluronique (ng/ml) à différents temps au cours de l'arthrite au zymosan chez des rats soumis à plusieurs traitements anti-inflammatoires : IMT : Indométacine; DEX dexaméthasone; P: Traitement préventif C: Traitement curatif

Nous constatons que les valeurs basales d'AH déterminées avant l'induction de l'arthrite (J0) sont très différentes en fonction des groupes et généralement très élevées. Aussi, elles rendent l'interprétation des résultats très délicate. De plus, les rats arthritiques non traités (placebo, n=16) présentent des taux plus élevés à J0 que lorsque l'arthrite est déclarée. L'évaluation de l'efficacité des traitements est donc difficile. Les différents traitements administrés préventivement ou après l'induction de l'arthrite (à partir de J3) n'apportent pas de signification supplémentaire.

VII.1.2.3 discussion

Aussi, dans nos conditions expérimentales, l'acide hyaluronique ne semble pas informatif en tant que marqueur de l'inflammation articulaire dans l'arthrite au zymosan chez le rat. Aucune élévation significative des taux n'est observée chez

les rats arthritiques non traités. Les valeurs de référence très élevées (JO) gênent l'interprétation des résultats et pourraient masquer une possible élévation des taux d'AH chez les rats arthritiques à J3.

Plusieurs arguments sont avancés : la synovite induite au zymosan n'est pas assez marquée pour pouvoir rendre compte d'une élévation sérique de l'AH, les variations de mobilité dues au stress chez l'animal (manipulation, prélèvements de sang...) sont telles qu'elles peuvent être responsables des taux élevés d'AH observés à J0. En effet, nous avons montré que les taux de hyaluronate chez le rat sain étaient susceptibles de varier en fonction des mouvements articulaires et nos études entreprises nous ont, dans un premier temps permis de préciser les conditions de prélèvement sanguin pour le dosage du hyaluronate sérique chez le rat sain [Gegout,1991, cf publication dans bibliographie]. Nous avons montré qu'une ponction intra-cardiaque sous anesthésie à l'éther était nécessaire pour obtenir des mesures reproductibles de la concentration d'AH. En effet, le stress provoqué par le prélèvement conduit l'animal à se débattre, ce qui élèverait les taux sériques d'AH en accroissant le drainage lymphatique des articulations. Les variations de hyaluronate sérique observées lors des mouvements involontaires de l'animal après ponction intra-cardiaque sans anesthésie nous ont conduit à vérifier si les taux d'AH étaient modifiés au cours de l'exercice physique [Jouzeau,1992, cf abstract dans bibliographie].

Cette étude nous a permis de confirmer le rôle important de la mobilisation articulaire puisque des animaux soumis à une séance unique de natation augmentent significativement leur hyaluronate sérique. De plus, nous avons montré que les rats vivant en groupes ont des taux d'acide hyaluronique circulants plus importants que les rats isolés dans les cages à métabolisme. Ainsi, l'exercice physique est un facteur important qu'il est nécessaire de prendre en compte lors du dosage des taux sériques d'AH chez le rat sain. Chez les rats arthritiques (arthrite au collagène de type II), les taux d'AH pendant la phase active de la maladie sont également augmentés de façon significative par l'exercice physique (natation).

Toutes ces données peuvent justifier l'élévation anormale des taux basaux (JO) dans notre étude de l'arthrite au zymosan. Ainsi, l'acide hyaluronique proposé comme marqueur articulaire dans les modèles expérimentaux de polyarthrite ne semble pas adapté pour l'étude d'une monoarthrite.

VII.2 L'ARTHRITE AU ZYMOSAN CHEZ LE RAT : CARACTÉRISTIQUES

VII.2.1 INTRODUCTION

Les modèles expérimentaux d'arthrite chez l'animal apportent une contribution essentielle à la sélection des anti-inflammatoires. Les modèles classiques de polyarthrite chez le rat (arthrite à l'adjuvant de Freund, arthrite au collagène de type II, arthrite à l'antigène) présentent certaines caractéristiques de la polyarthrite rhumatoïde (polysynovite destructrice notamment). Dans ces modèles, les lésions osseuses juxta-articulaires, prépondérantes, semblent dépendre majoritairement du système des prostaglandines et sont améliorées par les inhibiteurs de cyclo-oxygénase [Otterness,1985]. Ainsi, l'arthrite à l'adjuvant est un des modèles expérimentaux le plus couramment employé pour l'étude des propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives des médicaments. Cependant, ce modèle s'avère quelquefois inadapté à l'étude des molécules présentant des propriétés distinctes de celles des AINS. Aussi, le développement de nouvelles thérapeutiques en pharmacologie articulaire nécessite l'apport de nouveaux modèles d'arthrite présentant des mécanismes physiopathologiques différents de ceux classiquement décrits dans la littérature. Le but principal de notre étude est de trouver un modèle sensible aux molécules agissant sur la réaction inflammatoire par un autre mécanisme que celui des AINS classiques.

Les propriétés phlogogènes du zymosan ont fait l'objet de nombreux travaux. Ce polysaccharide, extrait des parois cellulaires des levures, active la voie alterne du complément, stimule la sécrétion d'enzymes lysosomiales et provoque la libération de leucotriènes, de prostaglandines et de cytokines par les polynucléaires et les macrophages [Gado,1991 ; Griffiths,1991]. Ses capacités pro-inflammatoires n'ont été que peu exploitées dans les modèles expérimentaux d'arthrite et le plus souvent les travaux ont été réalisés chez la souris [Keystone,1977 ; Folliard,1988]. Afin de développer des modèles d'arthrite permettant d'évaluer les potentialités anti-inflammatoires de molécules originales (anti-LTB₄, inhibiteurs de 5-lipoxygénase), nous avons étudié un modèle de synovite au zymosan chez le rat. En outre, nous avons comparé les paramètres inflammatoires (handicap locomoteur, fièvre) et les capacités métaboliques du cartilage observés au cours de l'arthrite au zymosan à ceux observés au cours d'une arthrite induite à l'interleukine-1. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Life Sciences* que nous vous présentons.

Les travaux expérimentaux issus de cette thèse ont fait l'objet de trois publications de langue anglaise dans une revue à comité de lecture et sont intégralement retranscrites dans ce manuscrit.

Publication 1

P GEGOUT, E DRELON, J-Y JOUZEAU, E PAYAN, JP PAYAN, D CHEVRIER, P GILLET, P FENER, P NETTER. Assay of circulating hyaluronic acid in the rat: study of diurnal variation and effect of anesthesia. *Life Sciences*, 1991, **49**, 31-35.

Publication 2

P GEGOUT, P GILLET, D CHEVRIER, C GUINGAMP, B TERLAIN, P NETTER. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: Effects on joint inflammation and cartilage metabolism. *Life Sciences*, 1994, **55**, 321-326.

Publication 3

P GEGOUT, P GILLET, B TERLAIN, P NETTER. Zymosan-induced arthritis in rats II. Effects of anti-inflammatory drugs. *Life Sciences*, 1995, **56**, 389-394.

VII.2.2 CARACTÉRISATION DE L'ARTHRITE AU ZYMOSAN CHEZ LE RAT : EFFETS SUR L'INFLAMMATION ARTICULAIRE ET LE MÉTABOLISME DU CARTILAGE

Publication 2

CHARACTERIZATION OF ZYMOZAN-INDUCED ARTHRITIS IN THE RAT :
EFFECTS ON JOINT INFLAMMATION AND CARTILAGE METABOLISM

P GEGOUT, P GILLET, D CHEVRIER, C GUINGAMP, B TERLAIN, P NETTER

Laboratoire de Pharmacologie, URA CNRS 1288, Faculté de Médecine,
Université Henri Poincaré Nancy I, BP 184, F 54505 Vandœuvre Lès Nancy(Submitted June 10, 1994; accepted June 29, 1994;
received in final form August 12, 1994)

Abstract. A single intra-articular (*ia*) injection of 2 mg zymosan on D0 led to the production of acute periarticular edema followed by subacute erosive synovitis. The development of the zymosan-induced arthritis was associated with an initial loss of running activity and with an initial decrease of proteoglycan synthesis. Febrile response was present only on D1. In addition, on D20 synovial pannus led to a marked depletion of the proteoglycan content in the articular cartilage. When injected *ia*, IL1 β (1 μ g) provoked similar fever and similar changes in cartilage anabolism, but did not affect cartilage proteoglycan content (D20). These results suggest that zymosan-induced synovitis in the rat combines early prostaglandin-dependent processes (edema, pain, fever) with IL1-related effects on cartilage metabolism, thus allowing evaluation of chondroprotective drugs.

Key Words: zymosan, articular cartilage, experimental arthritis, interleukin-1

Introduction

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are effective analgesic, antipyretic, and anti-inflammatory agents, but they do not achieve all therapeutic goals in rheumatic diseases, and in particular they do not protect cartilage during inflammatory arthritides [1]. With this in mind, several pharmacological targets are being studied, such as cytokine modulators, 5-lipoxygenase inhibitors, and leukotriene B4 antagonists [2,3]. For such studies, an experimental model is needed that closely resembles rheumatoid arthritis, both in prostaglandin response and in cytokine-dependant connective tissue degradation, in order to confirm the effectiveness of compounds protecting cartilage.

Models of chronic experimental arthritis such as adjuvant- or collagen-induced arthritides, usually in rats, are widely used to assess the response to anti-inflammatory or immunomodulatory drugs. The antiphlogistic properties of these compounds are traditionally evaluated using, for example, an arthritic index, paw edema, or a histological score. The degenerative impact of chronic synovitis on cartilage metabolism, however, is still unknown. Thus, the antiphlogistic agents chosen for their effectiveness in these traditional models, which are characterized by a prominent cyclooxygenase-dependent inflammatory response, are often traditional NSAID's which do not prevent cartilage degradation. Monoarthritides used as experimental models for evaluating joint cartilage metabolism, have a major advantage over the polyarthritic models mentioned: monoarthritides allow control of a local arthritic process and offer a contralateral control joint, thus avoiding interindividual variations. An animal model less sensitive to cyclooxygenase antagonists and characterized by a persistent cartilage degradation will be relevant to the selection of novel agents (5-LO inhibitor, LTB4 receptor antagonists, LTA4 hydrolase inhibitor, PAF and TNF antagonists...) which target other pathways involved in cytokine-mediated destruction of cartilage.

Zymosan, a glycan derived from yeast cell walls, when injected *ia* in rats, mice, and rabbits [4,5,6] induces inflammation in the injected joint, typically a mononuclear cell infiltration in response to mast cell degranulation and to the production of eicosanoids by PMNs and macrophages.

Correspondence to Pr Patrick NETTER, MD, Dpt of Pharmacology, BP 184, F 54505 Vandœuvre

Zymosan also activates complement by the alternative pathway, induces the secretion of macrophage lysosomal enzymes, and induces IL1 production from macrophages and neutrophils [7,8]. When injected *ia*, zymosan induces subacute, persistent proliferation of synovial lining cells and cartilage degradation, reproducing most features of rheumatoid arthritis [9,10]. As zymosan-induced arthritis in rats has rarely been described, we have characterized the inflammatory index, the locomotor activity, and the cartilage metabolism during zymosan-induced synovitis in rats, comparing these parameters with the effects of IL1-induced arthritis.

Methods

Animals Male Wistar rats (140-160g) obtained from Iffa Credo (L'Abresle, France) were housed in plastic cages and were given a standard laboratory diet and water *ad libitum*. They were kept in a 12:12 light-dark cycle (light on: 6:00am-6:00pm) in a temperature controlled chamber (25±1°C).

Induction of arthritis with zymosan.. After a preliminary dose-ranging study (1, 2 or 4mg), arthritis was induced by intra-articular injection of 2 mg of zymosan (Sigma, St Louis, USA) in 50 µl sterile saline through the infrapatellar ligament into the right knee joint space. The contralateral left knee was injected with 50 µl sterile saline. For greater sensitivity in telemetric studies, both knees were injected intra-articularly with zymosan (2 mg).

Induction of arthritis with IL1. Human recombinant IL1β was a gift from Rhône Poulenc Rorer. IL1β was dissolved in a mixture of RPMI 1640 medium with HSA (20%) and L-glutamine (Gibco, Oxbridge, UK). IL-1β (1 µg) was injected intra-articularly into the right knee joint. The contralateral joint received an equal volume (50 µl) of RPMI-HSA. For greater sensitivity in telemetric studies, both knees were injected intra-articularly with IL1β.

Assessment of the arthritis. The width of the knee joints was measured immediately before and at various intervals after the injection of zymosan with an Oditest caliper (Kroepelin, ±0.01mm). Soft-tissue swelling was expressed as percentage change relative to the change in the control joint. Rats from different groups were killed at regular intervals and knee joints were removed and processed for histological examination (staining with haematoxylin and eosin).

Body temperature and locomotor activity were measured using battery operated biotelemetry devices (Mini-Mitter, Sunriver, OR, USA) implanted intraperitoneally. Temperature and activity were monitored and recorded at various intervals. Activity measurement is based on the principle that the orientation of the telemetry device transmitters implanted in the rat changes over the receivers. The transition results in a signal strength as detected by the receiver card and hence a pulse of activity is recorded. The activity index is expressed as a percentage of the activity on the control day (just before the experiment began).

Cartilage metabolism was investigated in terms of proteoglycan (PG) loss and inhibition of chondrocyte PG synthesis using the patella, a readily defined cartilage structure of the knee.

Cartilage proteoglycan measurements. Patellae dissected from the knee joints were decalcified in 5% formic acid to remove any remaining bone from the cartilage. The proteoglycan content was determined by microassay of sulfated glycosaminoglycans (GAG) after digestion with papain for 1 hour at 65°C. GAGs were measured by the 1.9 dimethylmethyleneblue (DMB) binding assay as described elsewhere [11].

In vitro ³⁵S incorporation in patellar cartilage. A proteoglycan synthesis assay was performed as described by Van Den Berg [12] with some modifications. Briefly, after the rats had been killed, the patellae from the arthritic joints and the saline-injected control joints were dissected leaving as little non-cartilaginous tissue around the cartilage as possible. The patellae were incubated for 3 h at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere in 2.5 ml of a medium consisting of RPMI Hepes and RPMI-HCO₃ supplemented with penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml), L-glutamine (2mM) (Sigma, St Louis, MO, USA) and 2.5 µCi ³⁵S-sulfate per patella (Radiochemical Centre, Amersham, UK). At the end of the incubation period, the patellae were washed with saline at 4°C and fixed overnight in 0.5% cetylpyridinium chloride in phosphate-buffered formalin. After decalcification in 5% formic acid, the patellae could be easily punched out from the surrounding tissue with a biopsy punch (Stiefel, 2 mm diameter). After solubilization in Soluene, the ³⁵S content of each patella (both the punched-out and the peripheral patellae), which is a reliable measure of the sulfated GAG content, was measured by liquid scintillation counting (Hionic Fluor, Packard).

Statistical analyses. The different groups were compared using a 2-ways Anova test. The significance of the results of the knee widths, PG synthesis, and telemetric parameters between groups was calculated using Student's unpaired 2-tailed t test, and p<0.05 considered as significant.

Results

Time course of zymosan-induced arthritis. In preliminary studies we investigated the phlogistic response following intra-articular challenge with various doses of zymosan (1, 2, or 4 mg). Though the 4 mg dose induced the greatest initial phlogistic response (soft-tissue edema and fever), results found with loss of spontaneous locomotor activity and histopathological scores were similar with the 3 doses. We therefore used the average dose of 2 mg/knee for the following experiments.

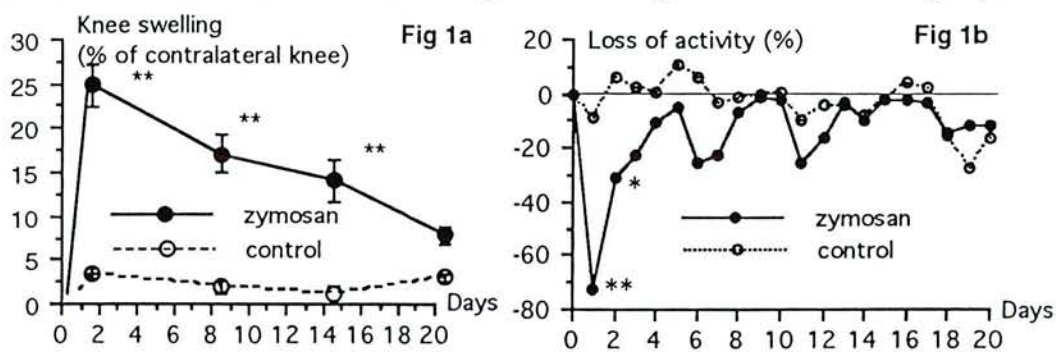


Fig. 1

Time course of knee swelling and locomotor activity during zymosan-induced arthritis. Rats were injected *ia* with 2 mg of zymosan into the right knee (for comparison of knee diameter, n=10) or both knees (to assess activity, n=12). Control rats (n=10) were injected *ia* with saline. [mean±SEM(diameter). *p<0.05, **p<0.001 (Student's t test)]. **1a)** Values are percentages of knee diameter increase relative to the contralateral knee. **1b)** Values are percentages of change of activity relative to the control day before *ia* injection (D0).

As shown in Figure 1a, knee swelling peaked 24 h after *ia* injection of zymosan. The swelling had largely subsided by 21 days after the injection. No joint swelling was seen in control rats. Fever was present only on the day of the injection, peaking after 4 h. (Figure 3). In rats which are nocturnal animals, administration of *ia* zymosan led to a marked decrease in spontaneous locomotor mobility principally on the first night, with significant functional impairment (70% reduction of activity; Figure 1b). The arthritic profile had returned to control levels within 4-6 days. The mobility of the control rats was reduced by only about 10%, the first day.

Time course of IL1-induced arthritis. Intra-articular injection of 1 µg IL1β did not induce any joint swelling. In contrast, function was about less than 70% returning to normal within 3 days (Figure 2). The body temperature profile was similar to that in zymosan-induced arthritis, peaking after 5 h with increase of 1.8°C, lasting less than 24 h (Figure 3).

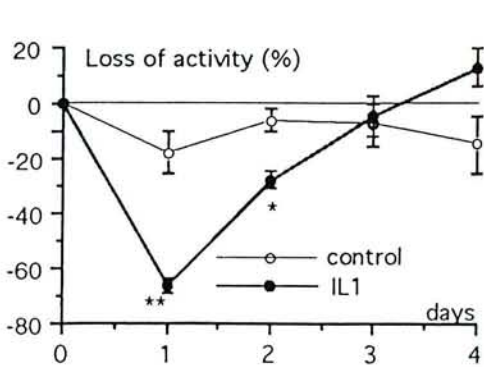


Fig. 2

Locomotor activity after *ia* injection with 1µg of IL1β in both knees. Control rats received equal volume of RPMI-HSA. Results are expressed as mean±SEM (n=8). *p<0.05, **p<0.01 (Student's t test).

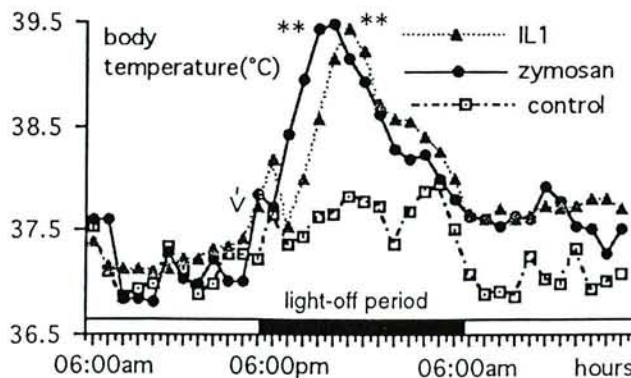
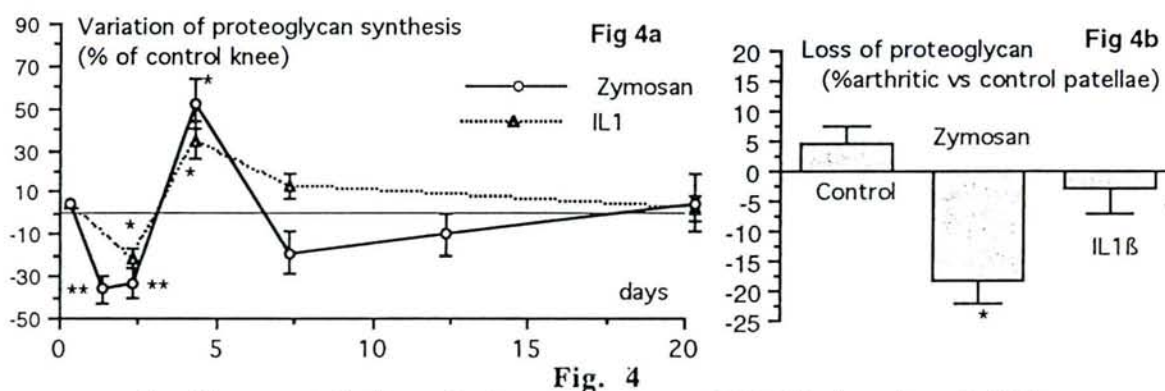


Fig. 3

Effects of *ia* injections (at arrow) into rat's knee joints of zymosan (2 mg), IL1 (1µg) and saline at 5.00 pm on temperature. Values are means (n=8) of body temperature recorded every hour via biotelemetry devices. For sake of clarity error bars have not been depicted. **p<0.01 (Student's t test)

Inhibition of proteoglycan synthesis by zymosan and IL1. In these studies, the effects of zymosan are expressed relative to the values in the contralateral joint of the same animal injected with saline. This approach minimizes interindividual variations due to differences in ^{35}S incorporation. To study the *ex vivo* profile of zymosan-induced arthritis on chondrocyte metabolism, we measured the ^{35}S sulfate incorporation in patellar cartilage at various intervals after the induction of arthritis. Changes in control rats (2 knees injected with saline) never exceeded 5%.

As demonstrated in Figure 4a, proteoglycan synthesis in patellar chondrocytes decreased at D1. Within 48 h, proteoglycan synthesis in cartilage of the zymosan-injected knees was about 40% less than that from the control knees. However, at D4, synthesis rose to 47% above the normal level, suggesting the onset of a repair process which, had returned to normal values on D20. These variations were concordant in central and peripheral parts of arthritic patellae. On the other hand, in the knee joints injected with IL-1 β (1 μg in each knee), the time course of proteoglycan metabolism had the same profile as in zymosan-injected joints until D20.



Cartilage metabolism during zymosan- and IL1-induced arthritides

Fig 4a. Proteoglycan synthesis in the punched-out patellar cartilage was measured by ^{35}S incorporation after zymosan and IL1 *ia* challenge in the right knee. The contralateral joint received saline. The values are the mean percentage of changes (\pm SEM) in ^{35}S incorporation from 2-3 experiments ($n=6$). * $p<0.05$; ** $p<0.01$ are calculated for cpm values with Student's *t* test.

Fig 4b. Cartilage proteoglycan loss 20 days after IL1 (1 μg) and zymosan (2 mg) *ia* challenges. The GAG content of the patellae was measured by the 1.9 DMB assay. Patellar cartilage proteoglycan content is expressed as % of GAG in the right arthritic knee ($n=10$ for each batch) relative to that in the left cartilage. * $p<0.01$ (Anova)

GAG content. The assay was performed at D20, when the anabolism had returned to normal (-2.7% with zymosan challenge; +0.4% with IL1 challenge). We thus compared the total patellar content of sulfated GAG of the arthritic and the control knees in zymosan-induced and IL1-induced arthritides rats. As shown in Figure 4b, the total GAG content of patellae from the zymosan-injected knees was significantly different from that in the control knees, unlike the IL1 injected knees, which showed no significant difference from the controls.

Histological examination demonstrated an early intense inflammation (by 24-72h) with PMN infiltration in synovial tissue, hyperplasia, and intra-articular exudate. Severe histiocytic cell infiltration appeared gradually over 7 days in periarticular areas. Zymosan-induced changes in synovial hypertrophy and pannus formation characteristic of a subacute arthritis appeared gradually over 14-20 days. This synovitis led to adjacent cartilage erosions and bone changes, thus mimicking rheumatoid lesions. No difference in histological response to the various doses of zymosan (1,2, or 4 mg) was observed.

Discussion

Zymosan, an insoluble polysaccharide extracted from yeast cell walls, is widely used experimentally as an acute or subacute phlogistic agent in various species such as mice, rats, and rabbits. All these studies contribute to the establishment of different phases of the inflammatory process triggered by zymosan. The acute process is characterized by an increase in vascular permeability, cellular infiltration and eicosanoid production. The subacute processes, especially in

joints, concern synovial enzymes, histological changes, and pannus formation. There have been few previous studies of impairment of cartilage metabolism during zymosan-induced arthritis in rats. Our data indicate that a challenge dose of 2 mg of zymosan induces chronic proliferative arthritis as assessed by knee swelling, fever, locomotor activity, and histopathological changes. Such an *ia* injection induces proliferation of synovial lining cells, formation of pannus, and infiltration of mononuclear cells. As in mice, zymosan-induced arthritis is a highly reproducible model in both male and female rats. Systemic rechallenge with zymosan 7 days later (ip, iv) neither worsens nor extends the severity of arthritis, whereas an *ia* booster injection of 2 mg given on D7 after the initial challenge induces a resumption of arthritis (data not shown).

After *ia* injection of zymosan, swelling of the injected knee reaches a maximum on the first day, as do fever and functional impairment. On successive days (until D20), body temperature falls towards normal on D2 and mobility is restored over 4 to 5 days. The knee swelling regresses slowly indicating a persistent subacute phlogistic process leading to cartilage degradation. Chondrocyte proteoglycan synthesis is therefore assessed by ³⁵S-sulphate uptake in the patella. The patella permits the assay of chondrocyte metabolism in small animals with small amounts of radioisotopes. To obtain better reproducibility of this method, we now routinely use a biopsy punch in the middle of the patellae. In these experimental conditions, we observe that the *ia* injection of 2 mg zymosan has a biphasic effect both on centropatellar and peripheral patella: an inhibition of proteoglycan anabolism is followed by enhanced synthesis, and then by stabilization.

To better understand this phenomenon, as zymosan is known to be an IL1 inducer [13], and because several zymosan-induced modifications mimic the IL1-induced phlogistic response, we compared the inflammatory profiles following IL1 and zymosan *ia* challenges in male Wistar rats. Unlike the case with zymosan, *ia* injection of IL1 (1 µg) induces neither knee swelling nor local joint effusion. In contrast, the fact that fever (a central process) and loss of activity (a peripheral effect) are present in both models suggests that IL1 is involved in these arthritic processes and reinforces the hypothesis that zymosan is a potent inducer and releaser of endogenous IL1. As reported here, it is noteworthy that zymosan-induced inflammation is more severe and longer-lasting. Interestingly, IL1 and zymosan inhibit proteoglycan synthesis in patellar chondrocyte patellar cartilage with a similar profile.

Several authors have already observed a lack of correlation of functional impairment, the main complaint during the arthritic process, with clinical, histological, or biochemical parameters (edema, cell infiltration, cartilage proteoglycan depletion) [14]. In contrast, our results show that knee swelling (zymosan-induced arthritis) and fever (in IL1-induced and zymosan-induced arthritis) on the first day correspond to the initial loss of mobility. In particular, we have confirmed that spontaneous mobility in rats appears closely related to the variation of chondrocyte anabolism in patellar cartilage: both parameters were depressed 2 days after *ia* zymosan injection, and restoration of mobility coincided with enhanced proteoglycan synthesis in patellar cartilage. Thereafter, mobility rose towards normal as proteoglycan synthesis was restored. As previously reported during lipopolysaccharide-induced arthritis in the hamster, we can say that the course (suppression and restoration) of proteoglycan synthesis was the biochemical parameter measured that most closely correlated with the course of mobility.

Contrasting with these similar effects on cartilage anabolism, one main point is the difference in terms of catabolism as assessed with patellar GAG content 3 weeks after *ia* injection. Unlike IL1, zymosan led to a marked depletion of GAG content in arthritic patellae as measured by colorimetric assay. Thus, in our experimental conditions, patellar GAG content appears to be the main biochemical parameter that distinguishes between the two models. When injected *ia*, IL1 induces only minor inflammation, too slight or too short to account for a detectable decrease of proteoglycan content. Furthermore, a single injection of exogenous IL1 does not induce synovial pannus formation despite reduced proteoglycan synthesis. Exogenous IL1 exerts its inhibitory effects directly on the cartilage [15]. In contrast, like previously described in mice [4], during zymosan-induced arthritis in rats, a persistent subacute synovitis lasting for at least 3 weeks leads to the organization of an aggressive pannus eroding adjacent articular cartilage and to degradation of cartilage matrix. After reaching a maximum, the chondrocytes appear unable to compensate for the proteoglycan depletion, with a net loss of matrix as an end result. This lack on cartilage is not related only to a sustained release of IL1 occasioned by the synovitis, because the effects of IL1, both

articular (handicap, GAG depletion) and systemic (fever), disappear within 2-3 days of the *ia* challenge.

The preliminary data presented here confirm that zymosan-induced arthritis is relevant to the study of the metabolism of inflamed cartilage, using a punch [12] to quantify ³⁵S incorporation in the central patella, anabolism varying in the same way in the central area as in the periphery. This arthritic profile, showing a decrease of incorporation throughout the patellar cartilage, contrasts with that observed in osteoarthritic models, with a hyperanabolic effect at the periphery of the patella (probably reflecting osteophyte formation). Finally, the normal values of radiosulphate incorporation on D20 account for a predominating catabolism rather than a marked decrease of anabolism in determining the negative balance of GAG content. It may also result from an arthritic-related qualitative abnormal anabolism. This deleterious effect is probably related to the induction of protease following IL1 injection and to the potentiation with other cytokines (eg TNF, IL6, growth factors...).

In conclusion, zymosan-induced arthritis is a potentially useful model of experimental arthritis for the study of cartilage destruction and for the evaluation of the putative action of anti-inflammatory and/or chondroprotective drugs on hyaline cartilage. Cyclooxygenase products appears to play mainly a role in early events (edema, fever, and handicap), because indomethacin affects these prostaglandin-related parameters (manuscript in preparation). In contrast, impairment of cartilage metabolism seems to depend on prostaglandin-independent pathways, as zymosan produces several phases involving leukotriene production [8,9], *ie* an increase in vascular permeability, cell arrival, and an increase in cytokine production. This last effect, potentially modulated by 5-LO inhibitor or LTB4 antagonist, should be studied to determine the potency of this pharmacological target to protect cartilage in chronic inflammation.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from INSERM, Région Lorraine, and Rhône Poulenc Rorer Unit Research.

REFERENCES

1. P. GHOSH, *Drugs*. **46** 834-846 (1993)
2. C. BRIDEAU, C.C CHANG, D GUEVREMONT, J.H. HUTCHINSON, J. MCDONELL and V. MOORE. *Dugs. Dev. Res.* **29** 188-194 (1993)
3. D.E. GRISWOLD, L.M. HILLEGASS, J.J. BRETON, K.M. ESSER and J.L. ADAMS. *Drugs. Exptl Clin. Res.* **19** 243-248 (1993)
4. E.C. KEYSTONE, H.U. SCHORLEMMER, C. POPE and A.C. ALLISON, *Arthritis Rheum.* **20** 1396-1401 (1977)
5. R.J. GRIFFITHS, S.W. LI, B.E. WOOD and A. BLACKHAM, *Agents actions* **32** 312-320 (1991)
6. W.B. VAN DEN BERG, M.W.M KRUIJSEN, L.B.A. VAN DE PUTTE, H.J VAN BEUSEKOM, M. VAN DER SLUIS-VAN DER POL and W.A ZWARTS, *Br. J. Exp. Path* **62** 308-316 (1981)
7. J DAWSON, A.D. SEDGWICK, J.C.W. EDWARDS and P. LEES. *Int. J Tiss. React.* **13** 171-185 (1991)
8. K. GADO and G. GIGLER, *Agents actions* **32** 119-121 (1991)
9. S. KONNO and S. TSURUFUJI, *Japan. J. Pharmacol.* **38** 177-184 (1985)
10. F. FOLLIARD AND B. TERLAIN, *Agents Actions* **25** 139-145 (1988)
11. R.W. FARNDAL, D.J. BUTTLE and A.J. BARRET, *Biochim. Biophys. Acta.* **883** 173-177 (1986)
12. W.B. VAN DEN BERG, M.W. KRUIJSEN and L.B. VAN DE PUTTE, *Rheumatol. Int.* **1** 165-169 (1982)
13. M PERRETTI, E SOLITO and L PARENTE, *Agents Actions* **35** 71-78 (1992)
14. I.G. OTTERNESS, A.J. MILICI and M.L. BLIVEN, *Agents Actions* **40** 224-227 (1993)
15. A.A.J. VAN DE LOO AND W.B. VAN DEN BERG, *Ann. Rheum. Dis.* **49** 238-245 (1990)

VII.2.3 DISCUSSION

Notre étude révèle que l'injection intra-articulaire unique de 2 mg de zymosan induit la formation d'une synovite subaiguë érosive. Dès les stades initiaux, on note un afflux massif de polynucléaires, un exsudat et une hyperplasie synoviale. Cette synovite s'organise progressivement en un pannus agressif pour les structures adjacentes.

Le développement de l'arthrite au zymosan est associé à une perte initiale de l'activité locomotrice contingente à la tuméfaction articulaire du genou injecté. L'hypomobilité induite par l'injection de zymosan régresse spontanément en 4 jours et l'œdème du genou s'atténue pour laisser place à un gonflement modéré mais persistant de l'articulation. La réponse fébrile induite par le zymosan est maximale après 4 heures et ne dure pas plus de 12 heures.

Nous avons évalué l'atteinte du cartilage articulaire de la rotule qui nous a permis d'établir le profil triphasique de la cinétique de l'anabolisme des protéoglycanes puisque l'inhibition de la synthèse des protéoglycanes (J1-J2) consécutive à l'injection de zymosan est suivie d'une reprise marquée de la synthèse (J4) puis d'une stabilisation. Ce profil est étroitement lié aux variations de l'activité locomotrice observées et, à l'instar de travaux similaires reportés chez le cobaye [Otterness,1994], nous pouvons confirmer que les variations de l'anabolisme des protéoglycanes est le paramètre biochimique le plus proche des variations de mobilité chez le rat arthritique.

Afin de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques, nous avons également étudié la réponse inflammatoire induite par l'injection intra-articulaire d'interleukine-1. En effet, l'inflammation induite par le zymosan est responsable de la production d'IL-1 endogène [Perretti,1992] et nous avons cherché à établir la comparaison entre ces deux modèles. A la différence du zymosan, l'IL-1 (1µg) injecté dans l'articulation n'entraîne pas de tuméfaction articulaire. Cependant, la similitude des réponses observées avec l'IL-1 et le zymosan (réponse fébrile et hypomobilité) renforce l'hypothèse d'une production endogène d'IL-1 stimulée par le zymosan. En outre, les variations de synthèse des protéoglycanes dues à l'injection d'IL-1 sont très semblables à celles observées avec le zymosan.

Toutefois, l'évaluation indirecte du catabolisme par la mesure du contenu en protéoglycanes résiduels est le paramètre biochimique essentiel qui permet de différencier ces deux modèles. En effet, le zymosan à la différence de l'IL-1, entraîne une déplétion marquée du contenu en protéoglycanes dans le cartilage articulaire des rotules au vingtième jour de l'arthrite. Cette différence peut être attribuée au fait que l'inflammation induite par l'IL-1, est trop faible ou trop brève pour rendre compte d'une diminution notable du contenu en protéoglycanes. L'IL-1 exogène n'entraîne pas la formation de pannus synovial et

semble exercer ses effets directement sur le cartilage [van de Loo,1990]. A l'inverse, la synovite persistante observée lors de l'arthrite au zymosan mène à la formation d'un pannus agressif qui érode le cartilage adjacent et entraîne la dégradation de la matrice cartilagineuse. Ainsi, la déplétion du contenu en protéoglycanes semble préférentiellement attribuée à un catabolisme important plutôt qu'à une inhibition de la synthèse des protéoglycanes comme en témoignent les valeurs normales d'incorporation de radiosulfate à J20. Elle peut également résulter d'un anabolisme rendu qualitativement anormal par le processus arthritique. Cet effet délétère est probablement lié à la production de protéases induites par l'IL-1 et leur potentialisation par d'autres cytokines (TNF- α , IL-6, IL-8, facteurs de croissance...).

Aussi, l'arthrite au zymosan constitue un modèle de choix pour l'étude de la dégradation du cartilage ainsi que pour l'évaluation des potentialités anti-inflammatoires ou chondroprotectrices de médicaments.

VII.3 L'ARTHRITE AU ZYMOSAN : EFFETS DES ANTI-INFLAMMATOIRES

VII.3.1 INTRODUCTION

Après avoir défini les conditions d'études du modèle de monoarthrite induite au zymosan chez le rat, nous nous sommes attachés à évaluer plus précisément la signification physiopathologique de ce modèle et de ses paramètres. A cette fin, nous avons étudié l'influence de plusieurs molécules aux propriétés pharmacologiques connues comme les corticostéroïdes et les anti-inflammatoires non stéroïdiens.

En effet, le modèle retenu semble répondre à certaines de nos exigences de part ses nombreuses propriétés : existence d'une synovite "chondro-agressive", arthrite touchant une seule articulation et permettant ainsi le suivi de l'atteinte du cartilage par comparaison avec le cartilage controlatéral sain, caractérisation de la réaction inflammatoire par une approche biotéléométrique originale, et enfin prédominance de phénomènes peu cyclo-oxygénase dépendants dus aux propriétés phlogogènes du zymosan. Aussi, la détermination de l'influence respective de deux traitements anti-inflammatoires (indométacine et dexaméthasone) devrait nous permettre d'une part, de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques responsables de l'atteinte articulaire et d'autre part de

valider ce modèle pour l'étude ultérieure de molécules originales possédant des propriétés différentes de celles des anti-inflammatoires classiques.

VII.3.2 EFFETS DES ANTI-INFLAMMATOIRES DANS L'ARTHRITE AU ZYMOSAN

Publication 3



0024-3205(95)00145-X

PHARMACOLOGY LETTERS

Accelerated Communication

ZYMOSAN-INDUCED ARTHRITIS IN RATS
II. EFFECTS OF ANTI-INFLAMMATORY DRUGS

P GEGOUT, P GILLET, B TERLAIN, and P NETTER

Laboratoire de Pharmacologie, URA CNRS 1288, Faculté de Médecine,
Université Henri Poincaré Nancy I, BP 184, F54505 Vandoeuvre les Nancy(Submitted January 2, 1995; accepted January 19, 1995;
received in final form March 1, 1995)

Abstract. As zymosan-induced arthritis in rats combines dual activation of early prostaglandin-dependent processes (edema, fever, pain) and IL-1 related effects on cartilage metabolism, we compared the respective influences of indomethacin (IMT) and dexamethasone (DEX) on its course. Different parameters were assessed: knee swelling, febrile response, loss of activity, cartilage metabolism and histology. DEX improved all these parameters, while IMT exerted only light beneficial effects on fever and knee swelling without obvious beneficial influence on cartilage metabolism and histological lesions. These results suggest that anti-inflammatory activities of DEX and IMT are due to interferences with different pathways during zymosan-induced arthritis in rats.

Key Words: zymosan, arthritis, NSAID, LTB₄, cartilage

Introduction

Cartilage destruction is a common feature in patients with chronic arthritides. One of the earliest signs in this arthritic process appears to be the depletion of proteoglycans (PG) from the cartilage matrix, progressively leading to irreversible joint damages. In addition, the proliferating chronic synovitis can release proteases, cytokines and prostanoids from resident leukocytes, thus determining resorption of extracellular matrix. It is thus widely accepted that during arthritic process, IL1 plays a important role, inducing experimentally *in vitro* and *in vivo* enhanced PG catabolism and inhibition of chondrocyte PG synthesis (1).

NSAIDs produce symptomatic improvement in terms of joint swelling and pain relief in modulating synovial inflammation. However, their positive influence on the integrity of cartilage during inflammatory arthritides remains still debatable (2,3). Previous *in vitro* and *in vivo* studies in experimental models of arthritis seem to support the fact that the conventional NSAIDs, although helpful in relieving some of the symptoms of the disease, are less effective in preventing progression of cartilage degradation (4).

In order to evaluate the effectiveness of compounds protecting cartilage, we have developed an experimental model of zymosan-induced subacute arthritis in rats that mimics some features of rheumatoid synovitis as previously described in mice by Keystone (5). In this non-immune model, we observed that intra-articular injection into the knee joint led to a subacute proliferative arthritis characterized by a persistent synovitis, following an acute fever and a subacute functional impairment (6). In addition, after 3 weeks, zymosan induced-synovitis led to a marked depletion of the cartilage proteoglycan content. In this study, following the course of zymosan-induced arthritis in rats, we studied the influence of such anti-inflammatory compounds as indomethacin and dexamethasone, on swelling, febrile response, loss of initial activity, histologic lesions and cartilage metabolism.

Methods

Animals Male Wistar rats (150g, Iffa Credo) were housed in plastic cages and kept in a 12:12 light-dark cycle in a temperature-controlled chamber (25±1°C). They were given a standard laboratory diet and water *ad libitum*. Guidelines for Laboratory Procedures were respected at all times.

Induction of arthritis was achieved by intra-articular (ia) injection of 2 mg of zymosan (Sigma, St Louis, USA) in 50 µl sterile saline through the infrapatellar ligament into the right knee joint space (Day 0, D0). The contralateral left knee joint was injected with 50 µl of saline. For greater sensitivity in telemetric studies, both knees were injected ia with 2 mg of zymosan.

Knee joint widths were measured with an Oditest caliper (±0.01mm) before induction and at various intervals after induction of the arthritis. Knee swelling was expressed as the variation in percentage change vs left control joint.

Body temperature and locomotor activity were assessed using battery-operated biotelemetry devices (Mini-Mitter, Sunriver, OR, USA) implanted intraperitoneally. Temperature and activity were monitored and recorded at various intervals for one week. Activity measurement is based on the principle that the orientation of the telemetry devices transmitters implanted in the rat changes over the receiver card and hence a pulse of activity is recorded. The activity index is expressed as a mean percentage of the nocturnal activity on the control night (just before the experiment began).

Cartilage metabolism was investigated in terms of proteoglycan loss (D20) and inhibition of chondrocyte proteoglycan synthesis (D2) using the patella, a readily defined cartilage structure of the knee, as we previously described in the first part of our study (6).

In short, for **cartilage proteoglycan (PG) content**, patellae were dissected and decalcified in 5% formic acid overnight. The PG content was determined on patellar cartilage by microassay of sulfated glycosaminoglycans (GAG) adapted from the colorimetric method of Farndale (7).

Proteoglycan synthesis was estimated by *ex vivo* ³⁵S incorporation in patellar cartilage from dissected arthritic and saline-injected control joints. Patellae were incubated in a medium of RPMI Hepes and RPMI-HCO₃ supplemented with penicillin, streptomycin, L-glutamine and 2.5µCi ³⁵S per patella. Patellae were then washed with saline at 4°C and fixed overnight in 0.5% cetylpyridinium chloride in phosphate-buffered formalin. After decalcification of the patella in 5% formic acid, a 2 mm diameter punch was used to divide the patellar cartilage into a central (or "punched-out") and a remaining peripheral part. After solubilization in Soluene, the ³⁵S content of each patella (both central and peripheral patellae), which is a reliable measure of the sulfated GAG content, was measured by liquid scintillation counting (Hionic Fluor, Packard, Groningen, The Netherlands).

Histological studies were processed on D20, after fixation of knees in Bouin's solution. Joints were then decalcified, embedded in paraffin, cut and stained with haematoxylin and eosin. Histological score was based on a score of 0-5 for 5 parameters: synoviocytes hyperplasia, inflammatory infiltrate, synovial pannus, cartilage erosion, and bony changes. The maximum possible score for each joint was 25.

Drugs studies. Drugs were administered orally in suspension in 1% Tween water from the day of intra-articular injection of zymosan and every day until death. Indomethacin (IMT, 3 mg/kg/d) and dexamethasone (DEX, 0.1 mg/kg/d) were provided by Sigma Chemical Company. Control and naive rats received Tween water only. Effective dosing of drugs was selected according to our previous studies (8), to avoid spontaneous marked reduction of mobility inherent to toxic profiles.

Statistical analyses The different groups were compared using a 2-way Anova test. The significance of the results in knee widths and proteoglycan synthesis between groups was calculated using Student's unpaired 2-tailed t test, with p<0.05 as significance level.

Results

Effects of anti-inflammatory drugs on knee swelling

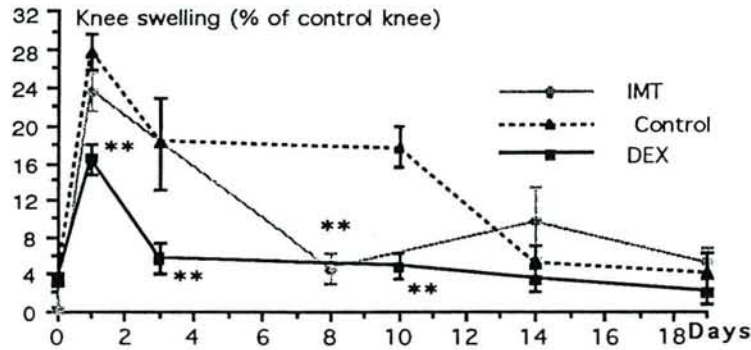


Fig. 1

Effects of DEX and IMT on zymosan-induced knee swelling. DEX (0.1 mg/kg/d) and IMT (3 mg/kg/d) were given daily per os. Values are percentages of knee diameter increase vs contralateral knee (mean±SEM. ** $p < 0.001$ (Student's *t* test), $n = 10$ for each group).

As shown in Fig 1, knee swelling reached its maximum at D1 (+28%), and then progressively decreased until D20. DEX was effective immediately, as an inhibitor of knee joint swelling (16% on D1) and this beneficial effect lasted throughout the experiment. In contrast, beneficial effect of IMT was detectable only after D8.

Effects of drugs on fever and loss of activity.

As shown in Fig 2a, *ia* injection of zymosan-induced fever (+2.1°C) peaked after 5 h, and lasted less than 24 h. Rats treated with DEX and IMT had a different body temperature profile: fever was significantly lower in the DEX treated group than in the IMT treated group. DEX and IMT exerted different activity profiles on arthritic-induced loss of mobility (Fig 2b). In control rats, *ia* administration of zymosan led to a marked decrease in spontaneous nightly activity (-70%) on D1, this fall in activity lasted for 5-7 days. DEX had no effect on D1 but was effective on activity profile from D3; this group rose towards normal and the arthritic profile returned to control levels. In contrast, IMT was only effective as a motion inhibitor on D2.

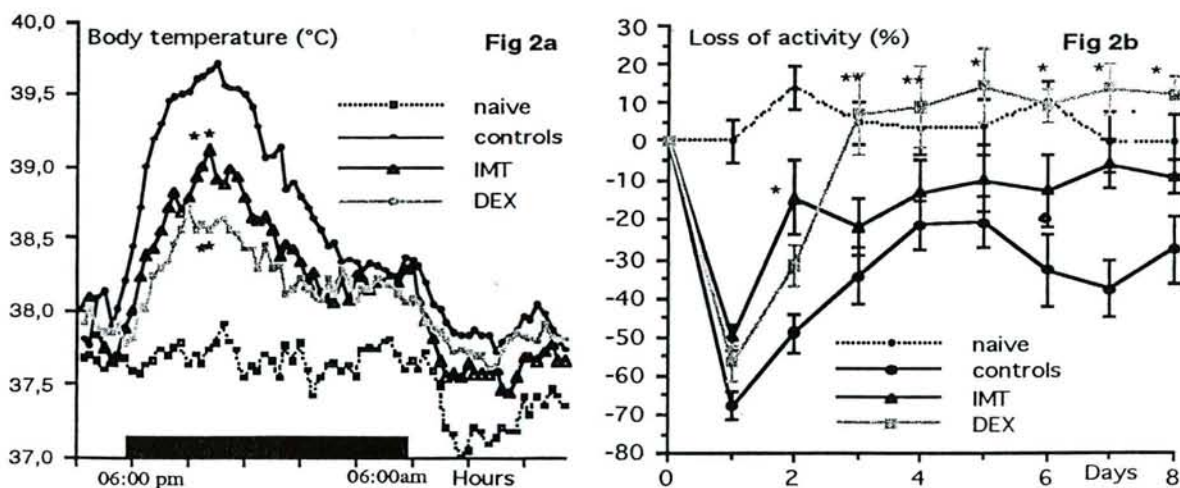


Fig. 2

Effects of DEX (0.1 mg/kg/d) and IMT (3 mg/kg/d) given daily po (D0-D8) on zymosan-induced fever and loss of mobility. Zymosan was injected *ia* (2mg) in both knees at 06.00 pm (D0) of control and treated rats. Saline was injected *ia* in both knee of naive rats.

Fig. 2a: Effects of drugs on zymosan-induced fever; body temperature was recorded each 15' (mean, $n = 8$, * $p < 0.05$ (Anova). (06.00 pm - 06.00 am : light off period)

Fig. 2b: Effects of drugs on zymosan induced loss of mobility. Values are percentages of loss of activity ($n = 8$, mean±SEM; ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ Anova)

Effects of drugs on inhibition of proteoglycan synthesis

Our previous reports have demonstrated that zymosan-induced arthritis is associated with a significant inhibition of PG synthesis in the patella, peaking on D2. Under these conditions, zymosan induces a severe inhibition of proteoglycan synthesis ($-41.5\% \pm 3.61$) in the central area of the patella (Fig.3a). In the peripheral area of the patellar cartilage, chondrocytes responsiveness was significantly lower ($-20\% \pm 4.37$) than in the central area. Small variations of proteoglycan synthesis observed with physiological saline in both knees ($7\% \pm 4.6$) are within the range of interindividual variations.

IMT had no influence on the initial loss of proteoglycan synthesis ($-45.7\% \pm 3.05$) in the punched-out and peripheral patellae when compared with control rats (Fig 3a). On the other hand, DEX had significant beneficial effects on cartilage on D2 : chondrocyte synthesis was significantly stimulated in the central part of the arthritic patella in comparison to the peripheral patella where the stimulation of synthesis was more prominent.

Effects of drugs on Patellar cartilage PG content.

The assay was performed on D20, after the anabolism had raised to normal (6), to estimate the metabolic properties of arthritic cartilage and the subsequent effects of drugs. As shown in Fig 3b, the total PG content of arthritic patellae was significantly different from the control patellae ($-18.1\% \pm 4.1$) and IMT was ineffectual on GAG depletion ($-9\% \pm 3.35$). In contrast, PG content was significantly increased with DEX ($+20.2\% \pm 7.8$).

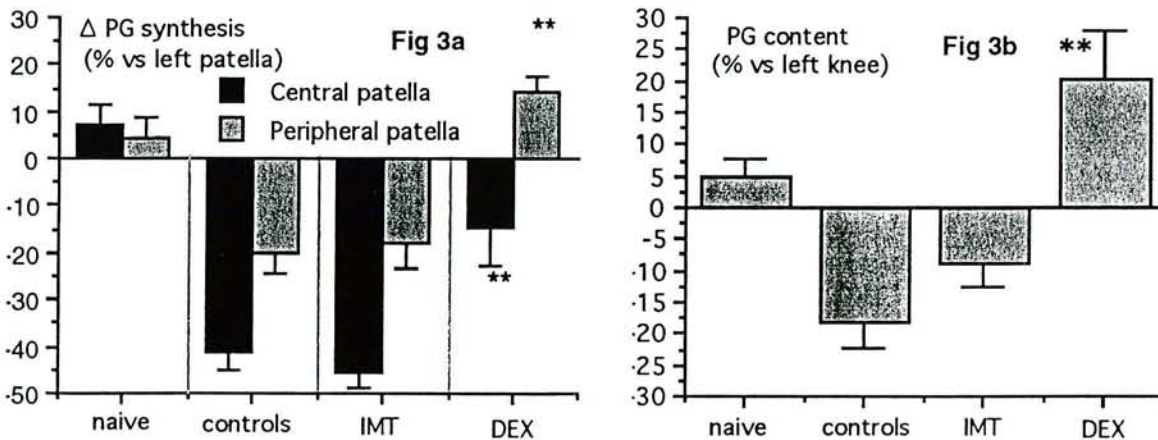


Fig. 3

Effects of anti-inflammatory drugs on cartilage metabolism.

Zymosan (2mg) was injected *ia* in the right knee (D0). Both knees of naive rats were injected *ia* with saline. DEX (0.1 mg/kg/d) and IMT (3 mg/kg/d) were given daily po. Control and naive rats received tween water.

Fig. 3a. Influence of drugs on cartilage PG synthesis (^{35}S incorporation on D2). Values are the mean percentage of changes (\pm SEM, n=10) in ^{35}S incorporation between the right arthritic and the left control patella. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ calculated for cpm values with Student's t test.

Fig 3b. Influence of drugs on PG patellar content on D20. Patellar cartilage content is expressed as % of PG in the right arthritic knee (n=10 for each group) vs left control knee.* $p < 0.01$ (ANOVA).

Histological examination

DEX reduced the severity of histological lesions by about 50% (2.85 ± 1.66) compared to control rats (6.94 ± 2.89). In contrast, IMT had no effect on histological score (6.61 ± 2.51) as assessed on D20.

Discussion

Zymosan, is widely used as an acute systemic phlogistic agent in various pharmacological studies. In contrast, studies using zymosan as an arthritis inducer are scarce. In our study, we observed that a single *ia* injection resulted in a subacute monoarthritis characterized by persistent proliferation of synovial lining cells, formation of pannus and infiltration of PMN leading to cartilage degradation. In our previous studies (6), we reported that knee swelling, fever, and functional impairment reached a maximum on D1. Body temperature also raised towards normal on D2 and spontaneous mobility was restored on D4 as knee swelling decreased slowly.

There are only few studies concerning drug effects on zymosan-induced arthritis (9,10,11). Our data indicate that DEX reduces knee swelling significantly and this inhibition is well correlated with restoration of spontaneous mobility. Treatment with IMT is only effective on fever (D1) and knee swelling (D8); moreover, with exception of D2, functional impairment is not significantly improved by IMT.

Zymosan is well known as a potent releaser of arachidonic metabolites which contribute actively to the early phase of inflammatory reaction (11). Our most positive findings with DEX which inhibits indirectly both the generation of prostaglandins and leukotrienes, compared to those found with IMT, which is a classical cyclooxygenase inhibitor, suggest that these processes are not only cyclooxygenase dependent. Thus, in this model, inhibition of hypomobility is certainly more relevant to anti-inflammatory effect than to analgesic properties. Furthermore, zymosan induces numerous other inflammatory mediators such as PAF (12) and cytokines like IL1(13,14), IL6, IL8 (15) and TNF, involved in the early arthritic process.

Surprisingly, antipyretic effects of DEX observed in the present study are more pronounced than those observed with IMT. So, it would seem that PGE₂ is not the only mediator relevant to zymosan-induced fever but other mediators probably related to TNF α (16) and IL1 activation (IL6, chemokines as IL8, MIP..., COXII) are modulated by DEX. Thus, in our specific experimental conditions, we confirm that biotelemetry provides a novel approach to the study of inflammatory reaction in rats: it records simultaneously fever and mobility which allow to differentiate local and systemic properties of anti-inflammatory drugs. Effectively, telemetry can record loss of mobility with or without fever relative to the nature of the phlogistic agent.

We have previously characterized cartilage anabolism impairment in zymosan-induced monoarthritis in rats (6). In our experiments, proteoglycan synthesis of the contralateral control knee (left) is not affected by the arthritic inflammatory process, as compared with PG synthesis in the knee of other animals. In the present study, we describe the effects of two anti-inflammatory drugs on cartilage metabolism. By using a biopsy punch in the middle of the patella, we differentiate central and peripheral cartilage anabolism profiles. In the zymosan-induced arthritic process, anabolism follow the same variation pattern in both areas. Nevertheless, chondrocytes PG synthesis of the central part of the patella, more mechanically vulnerable, appears more sensitive to zymosan than peripheral chondrocytes does. In osteoarthritic patellae, metabolic differences between various cartilage sites have also been demonstrated (17,18).

In our study, beneficial effects are principally observed in the peripheral patella of arthritic rats treated with DEX: completely reversing PG synthesis inhibition (+13.9%). In fact, this beneficial effect in peripheral patella is overstated because results are expressed in percentage variation versus control left knee where PG synthesis is lightly inhibited by DEX. Simultaneously, in the punched-out central patella, inhibition of anabolism, although significantly attenuated (-14.7%), remains lower than in peripheral patella. This beneficial effect of DEX is followed by the improvement of total patellar GAG content (peripheral and central) in arthritic patellae (beneficial effect) with respect to control patellae (light detrimental influence) on D20 (+20.2%).

In contrast, IMT has no effect both on anabolism impairment and on depletion of PG content. Patellae from rats treated with IMT underwent the same PG inhibition as untreated rats on D2. During the course of arthritis, IMT exerted no beneficial effect on PG anabolism, furthermore on D4, indomethacin inhibited the overshoot of PG synthesis (sign of replenishment) observed in untreated arthritic rats (data not shown). These results are supported by our histological studies which showed that DEX, unlike IMT, reduced cartilage alterations and synovial pannus observed in arthritic rats.

Mechanisms leading to cartilage degradation are still poorly understood. Numerous studies describe the central role of IL1 in cartilage metabolism impairment by enhanced breakdown of PG and

inhibition of PG synthesis. It is likely that zymosan induces cartilage alterations by generating endogenous IL1 and other cytokines which could potentiate IL1 effects. The beneficial action of DEX could be explained by the inhibition of induction of cytokines synthesis. In contrast, IMT does not influence this pathway (19), and inhibits only prostaglandin-dependant activities from pro-inflammatory cytokines. Nevertheless, other mediators could be involved in IL1-mediated PG anabolism inhibition, as suggested by recent reports involving ia production of NO as a putative mediator of anabolism inhibition(20,21). Such an involvement of NO could account for the beneficial effects of DEX which, in contrast to IMT, inhibit the induction of NO synthase (22).

In these above mentioned conditions, DEX could provide a powerful drug for preventing cartilage destruction and for diminishing early signs of inflammatory conditions. However, these benefits should be cautiously interpreted as secondary effects are noted such as a loss of weight gain (-30%) a light inhibition of anabolism proteoglycan synthesis in healthy cartilage, as well as detrimental effect on bone matrix. We nevertheless believe that the development of drugs acting on CO and LO pathways, without the side effects of steroids, should be given strong consideration as potentially useful chondroprotectors of cartilage. Presently, our studies involving new compounds like 5-LO inhibitor and LTB4 antagonists aim at determining the relevance of this pharmacological target to protect cartilage in chronic arthritides.

Acknowledgments

This study was supported by grants from INSERM, Région Lorraine, and Rhône Poulenc Rorer Unit Research. Thanks are due to M TIBARI for her excellent technical assistance and to M THIERY for taking good care of the animals.

References

1. AAJ. van de LOO, WB. van den BERG, *Ann Rheum Dis* **49** 238-245 (1990)
2. P. GHOSH, *Drugs* **46** 834-846 (1993)
3. WB. van den BERG, *J.Rheumatol.* **18** 122-123 (1991).
4. JP. PELLETIER, JH. MARTEL-PELLETIER and CJ. MALEMUD, *NSAID. mechanisms and clinical use*. AJ LEWIS and D FURST (Eds), M Dekker, New York S5-S25 (1994)
5. EC. KEYSTONE, HU. SHORLEMMER, C. POPE and AC. ALLISON, *Arthritis Rheum.* **20** 1396-1401 (1977).
6. P. GEGOUT, P. GILLET, D. CHEVRIER, C. GUINGAMP, B. TERLAIN and P. NETTER, *Life Sci.* **55**, 321-326 (1994).
7. RW. FARNDALE, DJ. BUTTLE and AJ. BARRET, *Biochim. Biophys. Acta.* **883** 173-177 (1986)
8. P. GILLET, P. GEGOUT, E. DRELON, JY. JOUZEAU, B. TERLAIN, and P. NETTER *Fundam.Clin. Pharmacol.* **7** 202.(1993)
9. F. FOLLIARD and B. TERLAIN, *Agents Actions* **25** 139-145 (1988)
10. E. O'TOOLE and FR. COMERFORD, *Ir. J. Med. Sci* **156** 228 (1987)
11. R.J. GRIFFITHS, S.W. LI, B.E. WOOD and A. BLACKHAM, *Agents Actions* **32** 312-320 (1991)
12. MA. MARTINS, PMR. SILVA, HC. CASTRO FERIA NETO, PT. BOZZA, PMFL. DIAS, MCR. LIMA, RSB. CORDEIRO and BB. VARGAFTIG, *Br. J. Pharmacol.* **96** 363-371 (1989)
13. M. PERRETTI, E. SOLITO and L. PARENTE, *Agents Actions* **35** 71-78 (1992)
14. F. ERDO, K. TOROK and JI. SZEKELY, *Agents Actions* **41** 93-95 (1994)
15. BT.AU, PD.COLLINS and TJ.WILLIAMS, *Agents Actions* **41**, C185-C187 (1994)
16. AL. COOPER, S. BROWER, AV. TURNBULL, GN. LUESHI, SJ. HOPKINS, SL. KUNKEL, and NJ. ROTHWELL, *Am J Physiol* **267** R1431-R1436 (1994)
17. PM. van der KRAAN, EL. VITTERS, HM. VAN BEUNINGEN, WB. van den BERG, *Int. J. Exp. Pathol.* **73** 335-350 (1992)
18. GJVM. van OSCH, PM. van der KRAAN and WB. Van Den BERG, *J. Rheumatol.* **21** 1107-12 (1993)
19. AK. BAHL, MM. DALE and JC. FOREMAN. *Br. J. Pharmacol.* **113** 809-814 (1994)
20. HJ. HAUSELMANN, L. OPPLIGER, BA. MICHEL, M. STEFANOVIC-RACIC and CH. EVANS, *FEBS Letter* **352** 361-364 (1994)
21. D. TASKIRAN, M. STEFANOVIC-RACIC, H. GEORGESCU and C. EVANS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200** 142-148 (1994)
22. RG. KNOWLES, M. SALTER, SL. BROOKS and S. MONCADA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172** 1042-1048 (1990)

VII.3.3 DISCUSSION

L'influence de deux traitements anti-inflammatoires (indométacine 3 mg/kg/j et dexaméthasone 0,1 mg/kg/j) sur le développement de l'arthrite au zymosan chez le rat a été évaluée grâce à plusieurs paramètres : tuméfaction articulaire, réponse fébrile et hypomobilité (évaluées par mesures biotéléométriques), capacités métaboliques du cartilage et lésions histologiques.

La phase précoce de la réaction inflammatoire observée au cours de l'arthrite au zymosan est inhibée de façon importante par la dexaméthasone. En effet, la dexaméthasone réduit de façon significative la tuméfaction articulaire du genou et cette inhibition semble très liée à la restauration des capacités locomotrices observées chez le rat. A l'inverse, l'indométacine est moins efficace puisqu'elle diminue l'œdème de façon significative seulement la deuxième semaine de l'arthrite et qu'elle exerce peu d'effet sur l'hypomobilité (excepté le deuxième jour).

Il est admis que le zymosan provoque la libération des métabolites de l'acide arachidonique qui participent activement à la phase précoce de la réaction inflammatoire [Griffith,1991 ; Gado,1991]. La plus grande efficacité de la dexaméthasone qui inhibe la production des leucotriènes et des prostaglandines, comparée aux effets de l'indométacine indique que les processus impliqués ne sont pas seulement médiés par la voie de la cyclo-oxygénase et que en outre, l'inhibition de l'hypomobilité relève plus d'un effet anti-inflammatoire que de propriétés antalgiques. Toutefois, les métabolites de l'acide arachidonique ne sont pas les seuls médiateurs impliqués dans la phase précoce de l'arthrite car le zymosan induit également la production de nombreux médiateurs inflammatoires comme le PAF [Martins,1989] et les cytokines (IL-1 [Perretti,1992 ; Erdo,1994], IL-6, IL-8 [Au,1994], TNF- α ...) qui participent au processus arthritique.

De façon étonnante, les propriétés antipyrétiques de la dexaméthasone à la dose employée dans notre étude semblent plus puissantes que celles de l'indométacine. Ainsi, les PGE₂ ne semblent pas les seuls acteurs responsables de la réponse fébrile induite par le zymosan. D'autres médiateurs (IL-6, IL-8, COX II...) probablement induits par l'IL-1, sont impliqués et seraient uniquement régulés par la dexaméthasone. Effectivement, les propriétés antipyrétiques de la dexaméthasone pourraient s'expliquer par sa capacité à inhiber certaines cytokines [Jafari,1994]. De plus, une étude récente a démontré les propriétés inhibitrices de la dexaméthasone sur l'induction de la cyclo-oxygénase de type II induite par l'IL-1 [Szczechanski,1994].

La biotéléométrie constitue une approche originale pour l'étude de la réaction inflammatoire : elle apporte par la mesure simultanée de deux paramètres différents (température et activité locomotrice), des informations pertinentes et

continues qui permettent de mieux distinguer les propriétés de deux composés anti-inflammatoires. De plus, elle permet d'établir des relations entre la restauration du handicap et la réduction de la tuméfaction articulaire sous l'effet de composés anti-inflammatoires. Toutefois, dans nos conditions d'études, l'informativité des données biotéléométriques semblent se restreindre à la phase inflammatoire précoce de l'arthrite puisqu'elles ne rendent pas compte des modifications du métabolisme du cartilage observées au terme de l'arthrite.

L'étude de l'influence des anti-inflammatoires sur le métabolisme du cartilage est réalisée par la mesure de l'anabolisme à J2 (inhibition maximale) et l'évaluation du contenu résiduel de protéoglycanes à la fin de l'étude (J20). La réalisation d'une biopsie au centre de la rotule permet de différencier l'anabolisme dans la partie centrale et périphérique du cartilage rotulien. Dans notre modèle d'arthrite, les variations de synthèse observées dans les deux zones étudiées évoluent dans le même sens mais à des degrés divers. En effet, les chondrocytes de la partie centrale de la rotule (zone portante) semblent plus vulnérables que les chondrocytes situés à la périphérie. Ces phénomènes se différencient de l'atteinte du cartilage patellaire arthrosique où l'inhibition marquée de la synthèse des protéoglycanes au centre de la rotule contraste nettement avec l'hyperanabolisme observé à la périphérie qui semble correspondre la formation d'ostéophytes [van der Kraan,1992 ; van Osch,1993]. La dexaméthasone exerce des effets bénéfiques plus marqués dans la partie périphérique de la rotule puisqu'elle stimule l'anabolisme des protéoglycanes des chondrocytes périphériques et atténue l'inhibition de la synthèse des chondrocytes centraux. La restauration de la synthèse des chondrocytes sous l'effet de la dexaméthasone observée à J2 est une des causes de l'amélioration du contenu en protéoglycanes résiduels à J20.

A l'inverse, l'indométacine à la dose de 3 mg/kg/j n'exerce aucun effet à la fois sur l'inhibition de la synthèse (J2) et sur la perte de protéoglycanes au cours de l'arthrite. De plus, les variations de l'anabolisme observées pendant 20 jours nous indiquent que l'indométacine, inactive tout au long de l'arthrite, semble même empêcher la restauration de l'anabolisme observée vers le quatrième jour chez les rats arthritiques non traités. Nous constatons que l'indométacine n'exerce aucun effet bénéfique sur le métabolisme du cartilage, sans pouvoir pour autant affirmer avec certitude que ses effets sont néfastes. Nos résultats semblent concorder avec l'impression générale émanant de la littérature où il est précisé que les anti-inflammatoires non stéroïdiens, tout en améliorant les index cliniques de l'arthrite s'avèrent inefficaces dans la prévention de la dégradation du cartilage [van den Berg,1991 ; Pelletier,1993 ; Gosh,1994].

L'examen histologique des articulations au 20ème jour confirme l'efficacité thérapeutique de la dexaméthasone qui à l'inverse de l'indométacine est un

puissant inhibiteur de la prolifération synoviale et qui réduit les lésions cartilagineuses et le pannus observés chez les rats arthritiques.

Les mécanismes qui entraînent la dégradation du cartilage sont encore imparfaitement connus. De nombreuses études incriminent le rôle central de l'interleukine-1 dans l'altération du métabolisme du cartilage due à la fois à l'augmentation du catabolisme et à l'inhibition de l'anabolisme des protéoglycanes [van den Berg,1991 ; van de Loo,1994]. Le zymosan provoque cette atteinte du cartilage en induisant de l'IL-1 ainsi que d'autres cytokines ou médiateurs qui peuvent compléter ou potentialiser l'effet de l'IL-1. L'action bénéfique de la dexaméthasone, à la différence de l'indométacine, peut être attribuée aux propriétés inhibitrices connues de la dexaméthasone sur l'induction des cytokines. L'indométacine n'inhiberait que les effets prostaglandines dépendants des cytokines pro-inflammatoires [Bahl,1994]. Cependant, d'autres médiateurs peuvent être tenus comme responsables des effets de l'IL-1 sur les modifications de la biosynthèse des protéoglycanes du cartilage. C'est ainsi que des publications récentes attribuent à la production articulaire de monoxyde d'azote (NO) une partie de l'inhibition de l'anabolisme des protéoglycanes du cartilage [Taskiran,1994 ; Hauselmann,1994]. L'implication de ce nouveau médiateur peut expliquer plus complètement l'effet bénéfique de la dexaméthasone et l'inefficacité de l'indométacine puisque les corticoïdes sont des puissants inhibiteurs de l'induction de la NO synthase (iNOS), l'enzyme responsable de la synthèse du NO [Knowles,1990]. Dans nos conditions expérimentales, la dexaméthasone pourrait être considérée comme un médicament de choix vis à vis des effets de l'IL-1 sur le cartilage. Cependant, il convient d'être prudent à cet effet, puisque la dexaméthasone entraîne après 20 jours et à la dose utilisée, une diminution pondérale de 30% et une légère diminution de l'activité anabolique du cartilage sain.

En conclusion, on constate que le modèle d'arthrite au zymosan chez le rat se caractérise par des altérations importantes du cartilage et, de par sa faible sensibilité aux antagonistes de la cyclo-oxygénase, il constitue un modèle de choix pour la sélection de molécules originales comme les antagonistes de LTB₄ et les inhibiteurs de 5-lipoxygénase. En effet, la destruction du cartilage induite par le zymosan semble impliquer des mécanismes liés à la production de leucotriènes et de cytokines pro-inflammatoires et le modèle au zymosan pourrait permettre l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires et potentiellement chondroprotectrices de produits anti-LTB₄.

VII.4 EFFETS DES ANTAGONISTES AUX RECEPTEURS DU LTB₄ : RP 66364 ET RP 69698

VII.4.1 INTRODUCTION

Les études réalisées avec des produits de référence (indométacine et dexaméthasone) vis à vis de l'arthrite au zymosan ont clairement démontré que du point de vue de la chondroprotection, il existait une différence notable entre l'indométacine dénuée d'effets bénéfiques et la dexaméthasone qui exerce un effet protecteur tant vis à vis de la phase précoce (diminution de l'anabolisme des protéoglycanes) que de la phase tardive (diminution des protéoglycanes résiduels). Plusieurs propriétés pharmacologiques, présentes chez la dexaméthasone et absentes chez l'indométacine sont susceptibles d'expliquer cet effet bénéfique. Elles peuvent concerner soit le métabolisme de l'acide arachidonique soit en être indépendantes, mais il était tentant de vérifier la première hypothèse puisque l'on sait que l'inhibition classique de la cyclooxygénase par un produit de type indométacine peut exacerber la biotransformation de l'acide arachidonique résiduel en d'autres composés biologiques divers, notamment par la voie de la lipoxygénase. C'est cette hypothèse que nous avons voulu prospecter en premier, en étudiant dans ce modèle l'impact de produits susceptibles de modifier la production ou les effets de métabolites inflammatoires issus de la 5-lipoxygénase.

Schématiquement, nous rappelons que la voie de la 5-lipoxygénase peut être divisée en 2 voies principales : l'une conduit aux métabolites plus particulièrement impliqués aux niveaux pulmonaire et bronchique (LTC₄, LTD₄, LTE₄, LTF₄) et l'autre conduit à des métabolites pro-inflammatoires comme le LTB₄. Cette dernière voie nous semblant plus concernée par la régulation des cytokines et leurs interrelations avec le cartilage, nous avons cherché à évaluer l'effet de produits susceptibles d'agir à ce niveau. L'inhibition de la production du LTB₄ peut intervenir à plusieurs niveaux : soit en inhibant l'activité 5-lipoxygénase directement (inhibiteurs de 5-LO) ou indirectement (inhibiteur de FLAP), soit en agissant plus en aval au niveau du LTA₄ (inhibiteurs de LTA₄ hydrolase), soit en agissant directement au niveau des sites effecteurs du LTB₄ (antagonistes des récepteurs au LTB₄).

Compte tenu de certains problèmes toxicologiques engendrés par certains inhibiteurs de 5-LO (BW755C) ou de la relative faible activité des inhibiteurs de LTA₄ hydrolase (CI₅₀=10⁻⁶M), nous nous sommes adressés à des antagonistes du

LTB4 puissants et biodisponibles tels que ceux qui ont été décrits par Rhône Poulenc Rorer à partir de deux familles chimiques différentes.

En effet, à partir d'un screening in vitro, utilisant une préparation riche en récepteurs au LTB4 de haute affinité (rates de cobayes broyées et préparées selon la technique de Cheng [Cheng,1986]), plusieurs familles ont été sélectionnées et optimisées dans des modèles in vitro et in vivo.

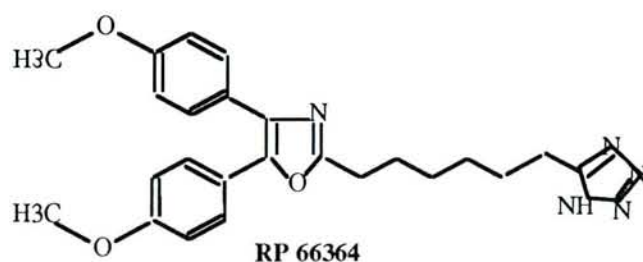
L'optimisation de ces séries s'est déroulée de la façon suivante:

Soit in vitro : binding sur divers types de récepteurs du LTB4 (rates de cobayes-polynucléaires neutrophiles humains) - inhibition de l'activité COX et 5-LO (RBL sonicat-polynucléaires neutrophiles humains) - inhibition de l'élastase induite par le LTB4 sur des neutrophiles humains - inhibition de la contraction du tissu pulmonaire de cobaye induite au LTB4.

Soit in vivo : œdème induit au LTB4 (souris) - œdème de la patte à la carragénine (souris) - neutropénie induite au LTB4 (lapin) - polyarthrite à l'adjuvant (rat lewis) - writhing test (PBQ) - afflux cellulaire péritonéal induit par le zymosan (souris).

Deux familles chimiques distinctes ont été ainsi optimisées, la famille du diphenyl oxazole et celle du diphenyl pyridyl dans lesquelles ont été sélectionnés, respectivement le RP 66364 et le RP 69698 qui présentent des profils pharmacologiques différents.

Famille des diphenyl oxazole : RP 66364



Le RP66364 est un antagoniste assez puissant du LTB4 (IC50/membrane de rates de cobaye = 10nM), légèrement inhibiteur de cyclooxygénase (IC50 = 0,4µM/ PMN rats). Il exerce une inhibition fonctionnelle du LTB4, tant in vitro qu'in vivo :

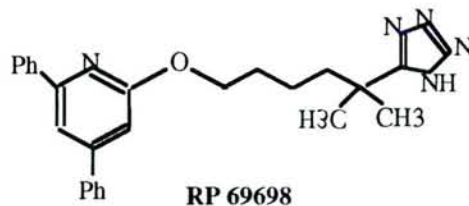
- Inhibition de l'élastase induite par le LTB4 (polynucléaires humains) : IC50=150 nM
- Inhibition de la contraction du parenchyme de cobaye induite par le LTB4 : IC50 = 150 nM
- Neutropénie induite chez le lapin par injection de LTB4 : DE50 = 3 mg/kg iv
DE50 = 30 mg/kg po

In vivo, le RP66364 est un anti-inflammatoire assez puissant dans les tests classiques :

- Test PBQ (phénylbenzoquinone) : DE50 = 7 mg/kg po (souris)
- Œdème à la carragénine : DE50 = 20 mg/kg po (rat)
- Arthrite à l'adjuvant : DE50 = 30 mg/kg po (rat)

Par rapport aux anti-inflammatoires classiques, le RP 66364 apparaît nettement mieux toléré sur le plan gastrique (dû peut-être à un effet plus sélectif vis à vis de COX II). Il diminue in vitro l'excrétion et/ou la formation d'IL-1 β (IC50=10⁻⁶M /cellules mononuclées humaines). Il exerce un effet protecteur au niveau articulaire et osseux (10mg/kg po - polyarthrite à l'adjuvant) [Barreau,1992].

Famille des diphenyl pyridine : RP 69698



Le RP 69698 est un **antagoniste très puissant** du binding du LTB4 sur ses sites récepteurs :

- CI50 (membranes de rates de cobayes) = 7 nM
- CI50 (polynucléaires humains) = 20 nM

ou des effets du LTB4 (inhibition de l'élastase libérée par le LTB4 sur les polynucléaires humains) = 8 nM.

In vivo, le RP 69698 inhibe la neutropénie induite au LTB4 chez le lapin (DE50 =0,3 mg/kg iv ; DE50 =6,7 mg/kg po). Le RP 69698 est pratiquement dénué d'effets anti-inflammatoires dans les modèles classiques. Il exerce un effet significatif chez la souris sur l'afflux cellulaire dans les modèles induits au zymosan et sur le taux de libération de certaines cytokines inflammatoires (communications personnelles Pr B. Terlain).

Nous avons alors étudié les potentialités de chacun de ces produits dans notre modèle d'arthrite au zymosan chez le rat pour évaluer d'une part, l'impact d'un produit mixte antagoniste LTB4 et inhibiteur de cyclooxygénase (RP 66364) et d'autre part d'un antagoniste LTB4 puissant dénué d'effet vis à vis de la cyclooxygénase (RP69698).

Plusieurs paramètres nous ont permis d'apprécier l'efficacité thérapeutique de ces molécules : l'activité spontanée et la réponse fébrile évaluées grâce aux données biotéléométriques, l'œdème du genou, le score histologique ainsi que les capacités métaboliques du cartilage estimées par l'anabolisme et le contenu en protéoglycanes du cartilage articulaire de la rotule.

Tous ces paramètres ont été évalués comparativement à un inhibiteur de cyclooxygénase (indométacine) et à un produit pluripotent agissant sur la cyclooxygénase et sur la 5-lipoxygénase (dexaméthasone).

VII.4.2 ADMINISTRATION ET POSOLOGIE

Les deux produits en suspension dans une solution aqueuse à 1% d'eau tweenée sont administrés par gavage à heure fixe. La dose de RP 66364 est de 30 mg/kg/jour. Le RP 69698 est administré deux fois par jour à la posologie de 10 mg/kg/jour.

VII.4.3 EFFETS DES ANTAGONISTES DE LTB₄ SUR L'ŒDÈME DU GENOU

L'injection intra-articulaire de 2 mg de zymosan dans le genou droit entraîne une nette tuméfaction du genou qui est maximale lors des 24 premières heures (figure 33). Elle s'atténue ensuite pour laisser place à un gonflement modéré de l'articulation qui disparaît au vingtième jour. Les deux antagonistes aux récepteurs de LTB₄ n'exercent pas d'action bénéfique sur la tuméfaction articulaire tout au long de l'étude.

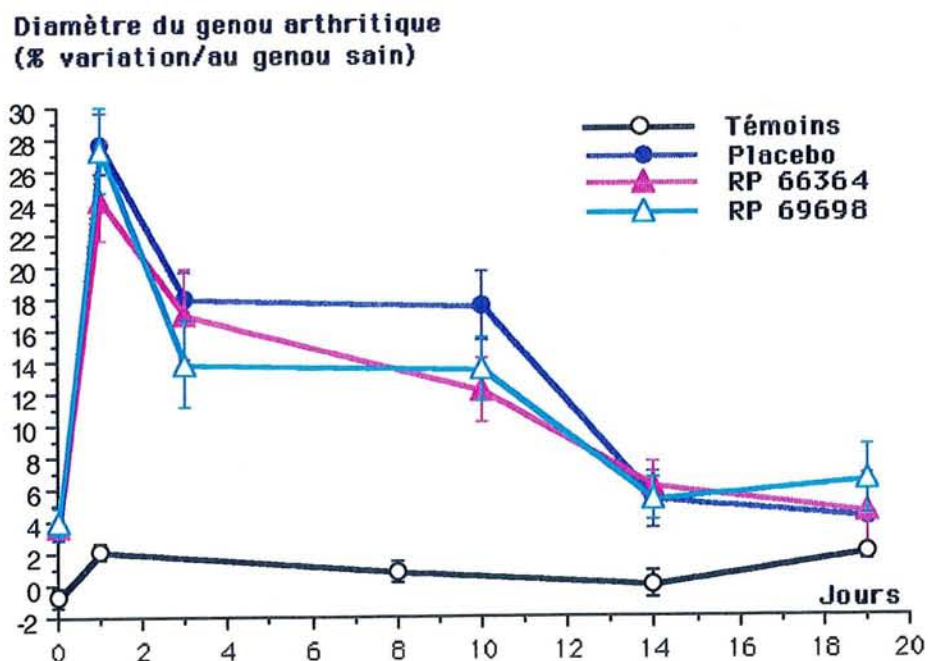


Figure 33 : Effets des antagonistes de LTB₄ sur la tuméfaction articulaire au cours de l'arthrite au zymosan chez le rat. Tous les lots reçoivent une injection intra-articulaire de zymosan dans le genou droit (2mg/50µl) et de NaCl stérile dans le genou gauche (50µl) sauf le lot témoins qui reçoit deux injections ia de NaCl. Les traitements sont administrés tous les jours par gavage aux doses suivantes : RP 66364 : 30mg/kg/jour et RP 69698 : 10mg/kg, 2 fois par jour. Les rats placébo ne reçoivent que le véhicule.

VII.4.4 EFFETS DES ANTAGONISTES DU LTB4 SUR L'HYPOMOBILITÉ INDUITE PAR LE ZYMOSAN

Afin d'améliorer la sensibilité des études biotéléométriques, chaque genou est induit avec 2 mg de zymosan. Nos travaux précédents (publication 1) ayant montré que la mobilité était restaurée en moins d'une semaine, cette étude est réalisée durant les huit premiers jours de l'arthrite. L'administration de sérum physiologique quant à elle ne provoque pas de diminution des capacités fonctionnelles chez le rat. L'hypomobilité maximale observée le jour suivant l'injection intra-articulaire de zymosan (-70%) n'est pas améliorée par l'administration de RP 66364 ni par le RP 69698 (figure 34). Seul le RP 69698 réduit significativement l'hypomobilité le deuxième jour (* $p < 0,05$; Anova). La courbe du RP 66364 se calque sur celle du lot placebo et aucun effet n'est observé sur l'hypomobilité.

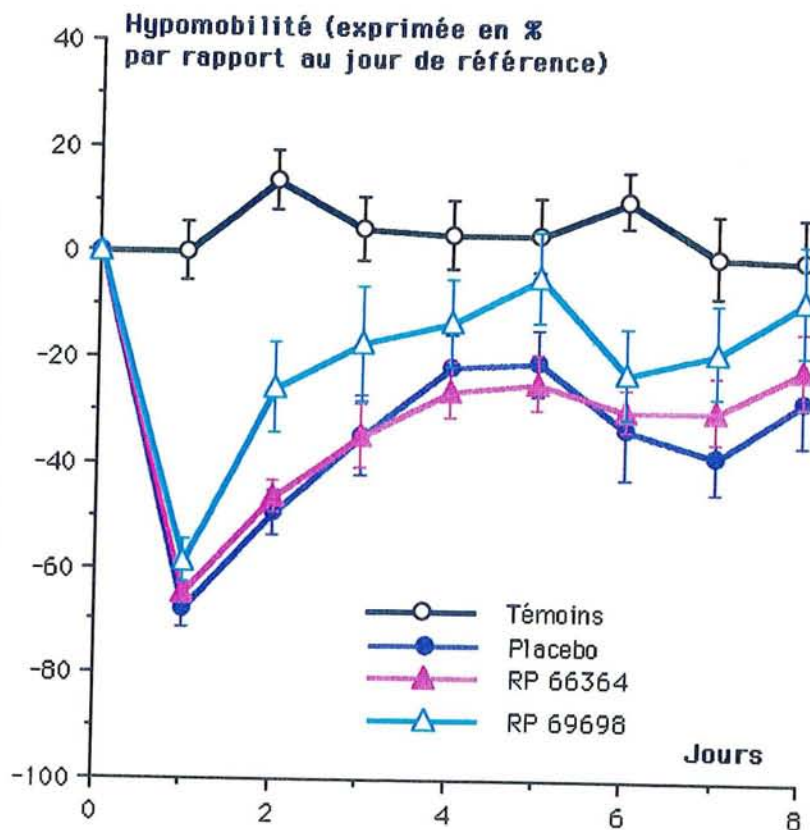


Figure 34 : Effets des antagonistes de LTB4 sur l'hypomobilité induite par l'arthrite au zymosan. Tous les lots reçoivent des injections ia de zymosan dans chaque genou (2mg/50 μ l) à J0 sauf le lot témoins qui reçoit deux injections ia de NaCl. Les traitements sont administrés tous les jours par gavage aux doses suivantes : RP 66364 : 30 mg/kg/jour et RP 69698 : 10 mg/kg, 2 fois par jour. Les rats placebo ne reçoivent que le véhicule. Les valeurs représentent les pourcentages moyens d'activité locomotrice exprimés par rapport à une activité de référence mesurée avant l'injection de zymosan (J-1) (* $p < 0,05$: anova, $n=8$)

VII.4.5 EFFETS DES ANTAGONISTES DE LTB4 SUR LA RÉPONSE FÉBRILE INDUITE PAR LE ZYMOSEAN

L'injection intra-articulaire de zymosan induit une augmentation de la température qui est maximale après 4 à 5 heures (+2,1°C). Le retour à une température basale se produit en moins de 24 heures (*figure 35*). Seul le RP 66364 réduit de façon significative la réponse fébrile observée chez les rats arthritiques ($p \leq 0,05$; Anova) lorsqu'on la compare à la réponse fébrile du lot placebo. Le RP 69698 semble agir sur l'hyperthermie mais la réponse n'est pas statistiquement différente de celle du lot placebo.

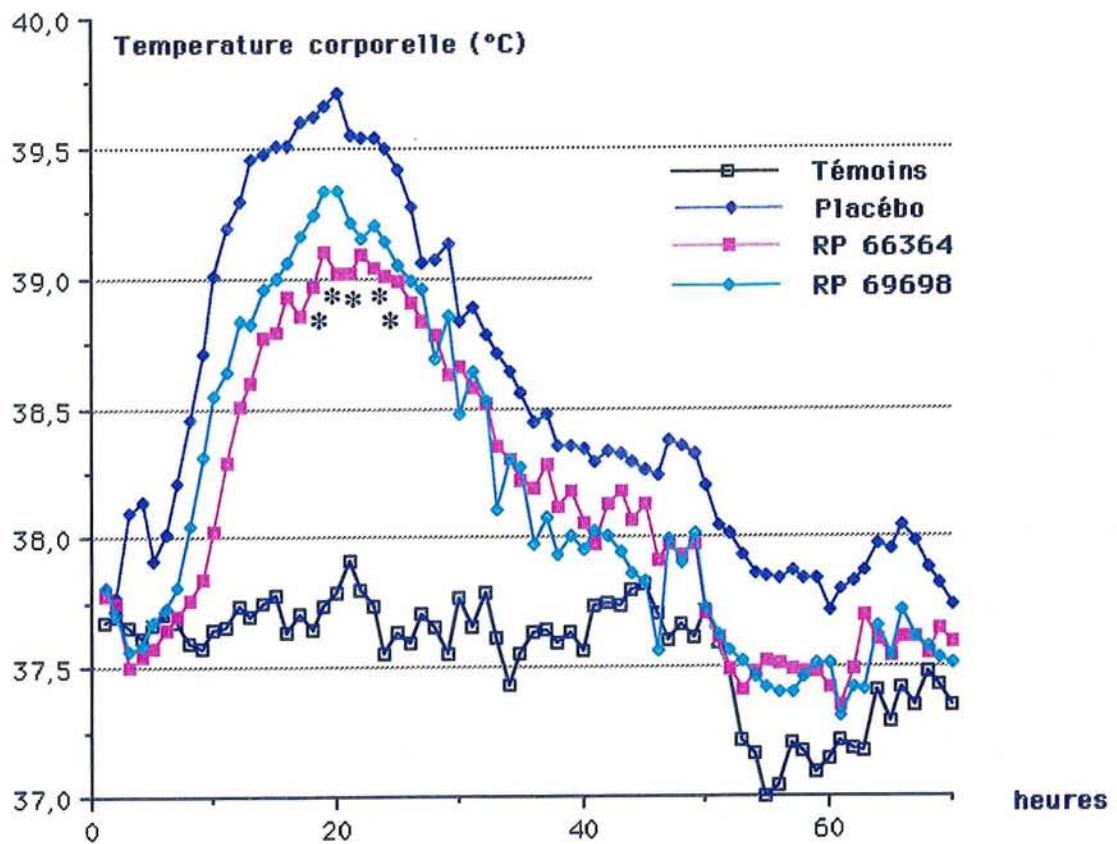


Figure 35 : Effets des antagonistes de LTB4 sur la réponse fébrile induite par l'arthrite au zymosan. Injections ia de zymosan dans chaque genou (2mg/50µl) pour tous les lots sauf pour le lot témoin qui reçoit 2 injections intra-articulaires de NaCl. Les traitements sont administrés une heure avant l'induction de l'arthrite par gavage aux doses suivantes : RP 66364 : 30 mg/kg et RP 69698 : 10 mg/kg. Les rats placébo ne reçoivent que le véhicule. Les valeurs représentent les moyennes des températures de 8 rats, les écart-types ne sont pas figurés par souci de clarté. (* $p \leq 0,05$; anova)

VII.4.6 EFFETS DES ANTAGONISTES DE LTB₄ SUR L'INHIBITION DE L'ANABOLISME INDUITE PAR LE ZYMOSEAN

La cinétique de l'anabolisme du cartilage articulaire des rotules induites au zymosan est biphasique (2mg) : l'inhibition marquée de la synthèse des protéoglycanes (-40%) les deux premiers jours est suivie d'une phase de restauration de la synthèse (+47%) les jours suivants et enfin, d'un rétablissement vers des valeurs normales (publication 1). Aussi, nous avons étudié les effets des antagonistes de LTB₄ deux jours après le développement de l'arthrite lorsque l'inhibition de la synthèse des protéoglycanes est maximale. L'inhibition de l'incorporation de ³⁵S dans les rotules arthritiques n'est pas modifiée par les antagonistes de LTB₄ tant dans la périphérie que dans le centre de la rotule.

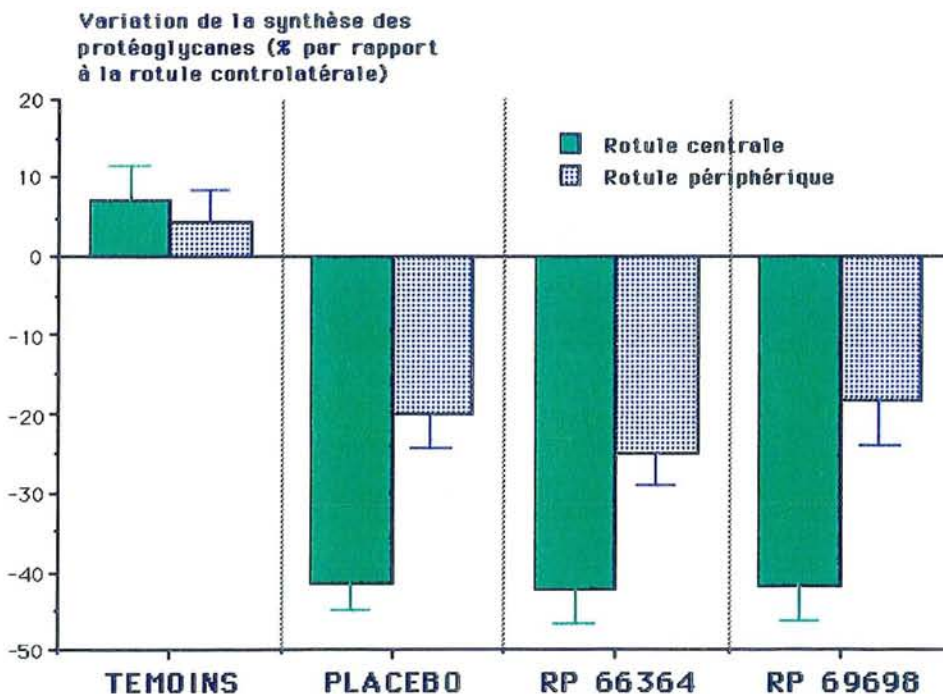


Figure 36: Effets des antagonistes de LTB₄ sur l'inhibition de l'anabolisme des protéoglycanes du cartilage rotulien 2 jours après l'induction de l'arthrite au zymosan (injection ia de zymosan dans le genou droit (2mg/50µl) et de 50µl de NaCl dans le genou gauche pour tous les lots sauf le lot de rats témoins qui reçoit une injection ia de NaCl dans chaque genou. Les traitements sont administrés par gavages aux doses suivantes : RP 66364 : 30 mg/kg/jour et RP 69698 : 10 mg/kg, 2 fois par jour. Le lot placebo ne reçoit que le véhicule. Les valeurs représentent les pourcentages moyens d'incorporation de radiosulfate des rotules droites arthritiques comparées aux rotules controlatérales saines (n=10)

VII.4.7 EFFETS DES ANTAGONISTES DE LTB₄ SUR LA PERTE DE PROTÉOGLYCANES DU CARTILAGE INDUITE PAR LE ZYMOSEAN

La monoarthrite au zymosan conduit à une diminution de la quantité de protéoglycanes du cartilage rotulien du genou arthritique comparé au genou controlatéral sain (cf lot zymosan). La perte du contenu en protéoglycanes résiduels mesurée grâce à la méthode colorimétrique au bleu de 1-9 diméthylméthylène ($-18 \pm 4,1\%$) permet l'évaluation indirecte du catabolisme du cartilage articulaire de la rotule entière. Les antagonistes des LTB₄ ont un rôle protecteur vis à vis du cartilage puisqu'ils normalisent et même augmentent le contenu en protéoglycanes du cartilage rotulien. L'efficacité du RP 69698 ($p \leq 0,001$, test de Student), plus marquée que celle du RP66364 ($p \leq 0,05$, test de Student) est comparable aux effets bénéfiques de la dexaméthasone ($0,1 \text{ mg/kg/j}$).

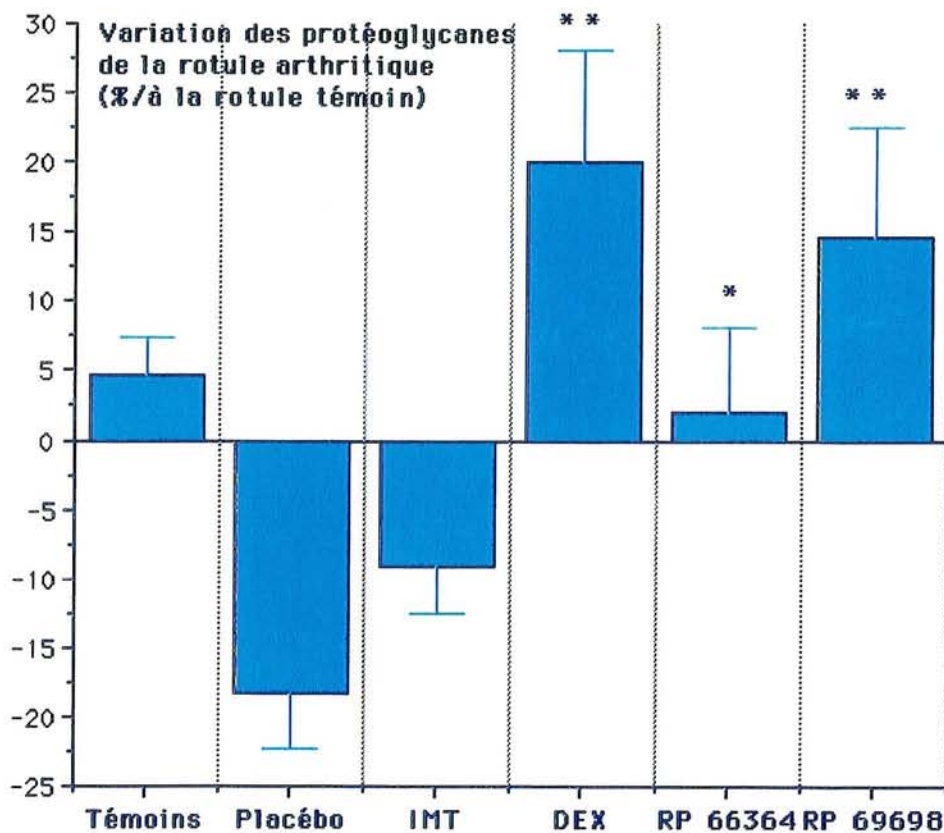


Figure 37: Effets des antagonistes de LTB₄ sur la perte de protéoglycanes à J20 consécutive à l'arthrite au zymosan (injection ia de zymosan dans le genou droit ($2 \text{ mg}/50 \mu\text{l}$) et de NaCl ($50 \mu\text{l}$) dans le genou gauche pour tous les lots sauf le lot témoin qui reçoit deux injections ia de NaCl. Les traitements sont administrés tous les jours par gavage aux doses suivantes : RP 66364 : 30 mg/kg/jour et RP 69698 : 10 mg/kg , 2 fois par jour. Pour comparaison, les résultats obtenus avec l'indométacine (3 mg/kg/jour) et la dexaméthasone ($0,1 \text{ mg/kg/jour}$) sont spécifiés. Les valeurs sont exprimées par les pourcentages moyens des concentrations de PG des rotules arthritiques comparées aux rotules controlatérales saines. [$*p \leq 0,05$, $**p < 0,001$, test de Student ($n=10$ dans chaque lot)]

VII.4.8 EFFETS DES ANTAGONISTES DE LTB4 SUR LE SCORE HISTOLOGIQUE DANS L'ARTHRITE AU ZYMOSAN.

Au vingtième jour, l'examen histologique des genoux arthritiques montre une importante prolifération synoviale avec une infiltration de polynucléaires et de macrophages, un œdème congestif ainsi que des érosions cartilagineuses. Le score histologique est établi par la somme des index de chacune des lésions élémentaires (hyperplasie, infiltrat synovial, pannus, érosions cartilagineuses et osseuses) cotées de 0 à 5 selon leur sévérité. Les deux antagonistes de leucotriènes n'exercent pas d'effet bénéfique sur les lésions histologiques à J20 (*figure 38*). L'efficacité de la dexaméthasone (0,1 mg/kg/jour) s'exerce sur toutes les lésions élémentaires excepté l'hyperplasie synoviale.

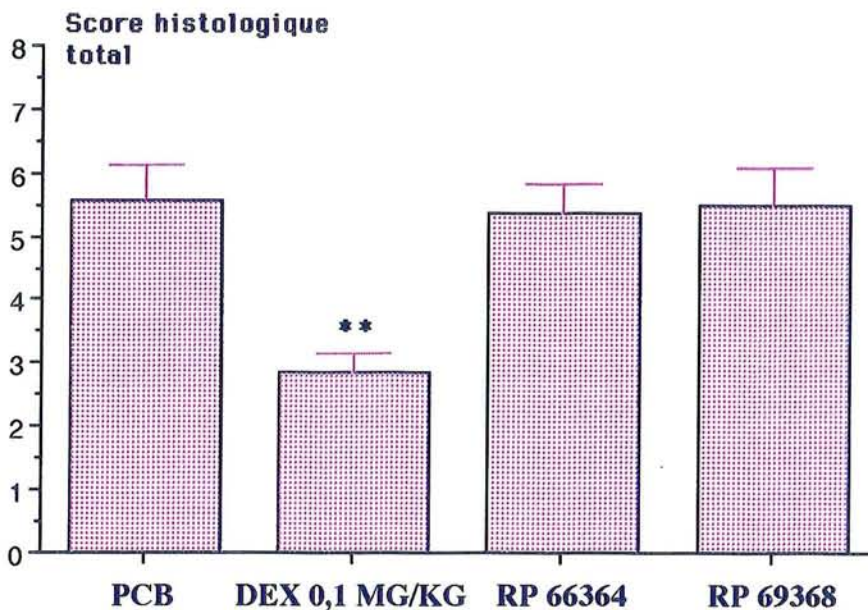


Figure 38: Effets des antagonistes de LTB4 sur le score histologique total des articulations fémoro-patellaires au vingtième jour de l'arthrite. Les traitements sont administrés tous les jours par gavage aux doses suivantes : RP 66364 : 30 mg/kg/jour et RP 69698 : 10 mg/kg, 2 fois par jour. Les rats arthritiques du lot placebo (PCB) reçoivent l'eau tweenée (1%) po. Pour comparaison, les résultats obtenus avec la dexaméthasone (0,1 mg/kg/jour) sont spécifiés. Les valeurs représentent les moyennes (\pm sem) des scores histologiques des rats des différents lots (n=10) [**p<0,01; test non paramétrique de Mann Whitney]

VII.4.8 DISCUSSION

Nos premières recherches nous ont conduit à la mise au point d'un modèle expérimental permettant l'étude des effets inflammatoires et dégénératifs survenant au cours de l'arthrite au zymosan chez le rat. L'étude de deux produits de référence possédant des profils distincts, nous a conduit à faire l'hypothèse que la plus grande efficacité de la dexaméthasone pouvait être en rapport avec une action anti-inflammatoire par inhibition de la cyclo-oxygénase et vraisemblablement par inhibition de la voie de la 5-lipoxygénase.

Ces derniers résultats nous ont conduit à étudier les produits agissant sur la voie de la 5-lipoxygénase que sont les antagonistes aux récepteurs du LTB₄. L'étude de ces produits montre le bien fondé de notre hypothèse puisque le RP66364 et le RP69698 exercent chacun des effets bénéfiques qui ne sont pas équivalents, nous conduisant ainsi à certaines hypothèses sur les mécanismes d'action de ces molécules.

Le RP66364 fait preuve d'une activité antipyrétique marquée mais il est inactif sur l'œdème et sur l'hypomobilité induits par l'injection intra-articulaire de zymosan. Le RP69698 inhibe légèrement le handicap induit par le zymosan au cours de la première semaine et de façon plus évidente à J2. Il réduit la fièvre mais de façon non significative et nous n'avons pas démontré son efficacité sur la tuméfaction articulaire.

La comparaison des deux produits évaluée grâce aux paramètres de la phase inflammatoire initiale montre qu'ils ont tous deux des effets peu marqués mais légèrement distincts. Les deux antagonistes ne semblent pas inhiber les phénomènes responsables de l'élévation de la perméabilité vasculaire ni la libération de médiateurs responsables de l'œdème. Le RP66364 exerce une activité antipyrétique de même ordre que celle observée avec l'indométacine, démontrant ainsi une activité inhibitrice vis à vis de la cyclooxygénase. L'action antipyrétique plus faible du RP69698 peut se justifier de plusieurs façons : le RP 69698 posséderait d'autres propriétés non dépendantes de la cyclooxygénase, soit en relation avec le LTB₄, soit des activités encore mal perçues vis à vis d'une ou plusieurs cytokines.

Cette variation d'action peut être mis au compte de leurs différents profils d'activité. En effet, le RP66364 est un produit mixte, à la fois inhibiteur de cyclooxygénase, bien toléré et antagoniste puissant vis à vis du LTB₄. Le RP69698 est un antagoniste puissant du récepteur au LTB₄ in vitro et dépourvu d'activité vis à vis de la cyclooxygénase. Par ailleurs, les deux produits ne sont pas équivalents vis à vis du LTB₄ puisque le RP66364 est très puissant in vitro (CI₅₀= 10 nM) mais nettement moins actif dans les tests fonctionnels (CI₅₀=150

nM). En revanche, le RP69698 est aussi actif dans les tests de binding que dans les tests fonctionnels (8 à 20 nM). Cette différence d'activité entre les deux produits se retrouve complètement *in vivo* puisque dans le test de neutropénie chez le lapin, les résultats ne sont pas équivalents (RP 66364 : DE₅₀=3 mg/kg *iv* et > 30 mg/kg *po* et RP 69698 : DE₅₀ = 0,3 mg/kg *iv* et 6,7 mg/kg *po*). Dans ces conditions, le RP69698 est au moins dix fois plus puissant *in vivo* que le RP66364.

Sur le plan du cartilage, on constate que les deux produits agissent à des degrés divers mais avec le même profil : ils sont inactifs sur la diminution brutale de l'anabolisme à J2 mais ils sont actifs sur la protection à long terme du cartilage. Le RP69698 qui possède le plus d'affinité pour les récepteurs du LTB₄ est bien le produit le plus actif vis à vis du cartilage. Ce résultat est donc bien en faveur de l'hypothèse de départ qui stipulait que la modulation de la voie de la 5-lipoxygénase puisse jouer un rôle dans la chondroprotection, vraisemblablement en inhibant les effets du LTB₄, à condition toutefois d'utiliser un produit possédant une grande affinité et qui soit un antagoniste puissant *in vivo* des effets du LTB₄. Il semble que la qualité d'un antagoniste au récepteur du LTB₄ est très importante puisqu'une étude récente a révélé qu'un autre antagoniste LTB₄, testé lors d'une monoarthrite chez le rat n'ait pas démontré son efficacité sur les différents paramètres étudiés [Seed,1994].

Les relations qui peuvent exister entre le LTB₄ et la destruction du cartilage sont sans doute liées à des modulations vis à vis de certaines cytokines. Ces interrelations sont encore mal connues et très contradictoires. Il semble toutefois que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α soient les cytokines les plus impliquées. Cependant, cette hypothèse n'est pas complètement convaincante puisque nos résultats démontrent des effets favorables préférentiellement lors des études à long terme et non pas dans les actions à court terme (anabolisme) qui sont très dépendantes de l'IL-1.

VII.5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'arthrite au zymosan chez le rat se révèle être un modèle expérimental fiable de chondropathie et de synovite qui mime certains traits de la polyarthrite rhumatoïde. Elle allie des phénomènes inflammatoires initiaux dépendant essentiellement des prostaglandines (œdème, fièvre, douleur) et des effets chondrodestructeurs liés à interleukine 1.

Dans nos conditions expérimentales chez le rat, la biotéléométrie permet une approche originale de la réaction inflammatoire caractérisée par un handicap

persistant et une réponse fébrile brève. Elle autorise également une dissociation des effets anti-inflammatoires des différentes molécules étudiées lors de l'inflammation articulaire aiguë initiale.

Ce travail de thèse a également conduit à la mise au point de techniques biochimiques capables de rendre compte de l'effet protecteur de produits sur le cartilage. La monoarthrite au zymosan est un bon modèle d'étude du métabolisme du cartilage puisqu'elle provoque des lésions du cartilage hyalin caractérisées par une diminution initiale de l'anabolisme et une déplétion marquée du contenu résiduel en protéoglycanes. Nous avons montré que l'inhibition de la synthèse des protéoglycanes induite par le zymosan est très dépendante d'un processus médié par l'interleukine-1 qui joue un rôle central dans la dégradation des molécules constitutives de la matrice cartilagineuse. En ce qui concerne la chondroprotection, nous avons démontré l'efficacité de la dexaméthasone sur les atteintes métaboliques du cartilage observées lors de l'arthrite au zymosan. A l'inverse, ces modifications s'avèrent très peu sensibles à l'indométacine.

Les antagonistes aux récepteurs du LTB₄ testés dans cette arthrite exercent également des effets chondroprotecteurs intéressants bien qu'ils fassent preuve d'activités anti-inflammatoires peu marquées. Ainsi, la mise en évidence de produits peu actifs sur les paramètres inflammatoires n'exclut pas le fait que ces produits soient actifs sur le cartilage. Cette étude confirme le bien fondé de notre hypothèse impliquant la voie de la 5-lipoxygénase dans les phénomènes conduisant à la dégradation du cartilage.

A l'avenir, nous chercherons à valider cette cible de façon plus complète en étudiant différents antagonistes du LTB₄ et en établissant des relations entre leurs activités antagonistes et leurs potentialités chondroprotectrices. Nous pourrions améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques en déterminant, par l'étude en biologie moléculaire, les effets des antagonistes LTB₄ sur la régulation des cytokines. Cela pourra se faire en étudiant les relations doses-effets produites par le RP69698, en évaluant d'autres cibles liées à la 5-lipoxygénase ou encore en complétant nos connaissances sur l'influence des corticostéroïdes sur cette voie.

D'autre part, nous pourrions améliorer l'informativité des paramètres biochimiques en étudiant les variations métaboliques des protéoglycanes dans différents sites de l'articulation comme le condyle fémoral et le plateau tibial. Il sera également utile d'évaluer par des techniques chromatographiques, les variations de la structure des protéoglycanes synthétisés dans le cartilage articulaire dans les conditions inflammatoires. Enfin, la comparaison des mécanismes menant à la dégradation du cartilage dans les pathologies de type

arthrite et arthrose, outre leurs apports physiopathologiques, contribuera à la mise au point de molécules spécifiques et à une meilleure évaluation des chondroprotecteurs.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. Andrews HJ, Bunning RA, Plumpton TA, Clark IM, Russel RG, Cawston TE. Inhibition of interleukin-1-induced collagenase production in human articular chondrocytes in vitro by recombinant human interferon-gamma. *Arthritis Rheum.*, 1990, **33**, 1733-8.
2. Änggard E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *The Lancet*, 1994, **343**, 1199-1206.
3. Arend WP, Dayer J-M. Cytokines and growth factors. in *Textbook of Rheumatology*. Kelley, Harris, Ruddy, Sledge Eds., Saunders WB. 1993, 227-47.
4. Arner EC, Pratta MA. Independant effects of interleukin-1 on proteoglycan breakdown, proteoglycan synthesis, and prostaglandin E2 release from cartilage in organ cultures. *Arthritis Rheum.*, 1989, **32**, 288-97.
5. Asch L, Asch G. Un modèle expérimental pour l'étude de l'ostéogénèse. La transplantation de l'ébauche cartilagineuse chez le rat. Dans *Actualités en physiopathologie et pharmacologie articulaires*. A. Gaucher, P Netter, J. Pourel, Régent D. Ed Masson, 1991, 420-7.
6. Au B-T, Collins PD, Williams TJ. Role of PAF in zymosan-induced IL-8 release from human neutrophils. *Agents Actions*, 1994, **41**, C185-7.
7. Aydelote MB, Kuettner KE. Differences between subpopulations of cultured bovine articular cartilage chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. *Connect. Tiss. Res.*, 1988, **18**, 205-22.
8. Bahl AK, Dale MM, Foreman JC. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the accumulation and release of interleukin-1 like activity by peritoneal macrophages from the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, 1994, **113**, 809-14.
9. Bansal MK, Ward H, Mason RM. Proteoglycan synthesis in suspension cultures of Swarm rat chondrosarcoma chondrocytes and inhibition by exogenous hyaluronate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, **246**, 602-10.
10. Barrios R, Santos GG, Figueroa J, Reyes PA. Zymosan-induced experimental hypersensitivity in rabbits. *Am. J. Pathol.*, 1980, **99**, 731-40.
11. Barrreau M, Kryvenko M, Lavergne MP, Techer A, Cavy F, Marquis O, Guillet MC, Terlain B. ω -(4,5 diphenyl-2-oxazolyl)alkanoic acid derivatives: a new family of potent LTB4 antagonists sharing CO and (or) LO properties. XIIth International Symposium on Medicinal Chemistry, Basel, Switzerland, 1992, P-180B.
12. Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhajcer OL, Chenard MP, Rio MC Chambon P. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromals cells of breast carcinomas. *Nature*, 1990, **348**, 699.
13. Benton HP, Tyler JA. Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, **154**, 421-8.
14. Berdeaux A. Nitric oxide: an ubiquitous messenger. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 1993, **7**, 401-11.
15. Bitter T, Muir H. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, 1962, **4**, 330-4.
16. Bjork J, Kleinau S, Tengblad A, Semdegard G. Elevated levels of hyaluronate and correlation with disease in experimental models of arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1989, **32**, 306-11.
17. Blackham A, Norris AA, Woods FAM. Models for evaluating the anti-inflammatory effects of inhibitors of arachidonic acid metabolism. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1985, **37**, 787-93.
18. Blasi F, Vassali J-D, Dano K. Urokinase-type plasminogene activator: proenzyme, receptor, and inhibitor. *J. Cell. Biol.*, 1987, **104**, 801.
19. Blin O, Pailhous J, Lafforgue P, Serratrice G. Quantitative analysis of walking in patients with knee osteoarthritis : a method of assessing the effectiveness of non-steroidal anti-inflammatory treatment. *Ann. Rheum. Dis.*, **45**, 990-3, 1990.

20. Blumenkrantz N, Asb -Hansen G. New method of quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, 1973, **54**, 484-9.
21. Bonney RM, Wightmann PD, Davies P, Sadowski SJ, Kuehl FA, Humes JL. Regulation of prostaglandin synthesis and of the selective release of lysosomal hydrolases by mouse peritoneal macrophages. *Biochem. J.*, 1978, **176**, 433-42.
22. Bothner H. Rheology of hyaluronate. *Acta. Otolaryngol.*, 1987, **suppl 442**, 25-30.
23. Brandt KD. A pessimistic view of serologic markers for diagnosis and management of osteoarthritis: biochemical, immunologic and clinicopathologic barriers. *J. Rheumatol.*, 1989, **16**, 39-42.
24. Bray MA, Ford-Hutchinson AW, Smith MJH. Leukotriene B₄; An inflammatory mediator in vivo. *Prostaglandins*, 1981, **22**, 213-22.
25. Brown RA, Jones KL. The synthesis and accumulation of fibronectin by human articular cartilage. *J. Rheumatol.*, 1990, **17**, 65-72.
26. Bunning RA, Russel RG, Van Damme J. Independent induction of interleukin 6 and prostaglandin E₂ by interleukin 1 in human articular chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, **166**, 1163-70.
27. Calhoun W, Chang J, Carlson RP. Effect of selected antiinflammatory agents and other drugs on zymosan, arachidonic acid, PAF, and carrageenan induced paw edema in the mouse. *Agents Actions*, 1987, **21**, 306-9.
28. Campbell IK, Novak U, Cebon J, Layton JE, Hamilton JA. Human articular cartilage and chondrocytes produce hemopoietic colony-stimulating factors in culture in response to IL-1. *J. Immunol.*, 1991, **147**, 1238-46.
29. Campbell IK, Piccoli DS, Hamilton JA. Stimulation of human chondrocyte prostaglandin E₂ production by recombinant human interleukin-1 and tumour necrosis factor. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1990, **1051**, 310-8.
30. Campbell IK, Wojta J, Nowak U, Hamilton JA. Cytokine modulation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) production by human articular cartilage and chondrocytes. Down-regulation by tumor necrosis factor α and up-regulation by transforming growth factor- β and basic fibroblast growth factor. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1994, **1226**, 277-85.
31. Carney SL. Cartilage research, biochemical, histologic, and immunohistochemical markers in cartilage, and animal models of osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 1991, **3**, 669-75
32. Carroll GJ. A study of the effects of catabolin on cyclic adenosine monophosphate biosynthesis and prostaglandin E₂ secretion in pig articular chondrocytes. *Br. J. Pharmacol.*, 1986, **25**, 359-65.
33. Carsons S, Horn VJ. Chondronectin in human synovial fluid. *Ann. Rheum. Dis.*, 1988, **47**, 797-800.
34. Carter GW, Young PR, Albert DH, Bouska J, Dyer R, Bell RL, Summers JB, Brooks DW. 5-lipoxygenase inhibitory activity of zileuton. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1991, **256**, 929-36.
35. Caterson B, Baker JR., Christner JE, Lee Y, Lentz M. Monoclonal antibodies as probes for determining the microheterogeneity of the link protein of cartilage proteoglycans. *J. Biol. Chem.*, 1985, **260**, 11348-56.
36. Chandrasekhar S, Harvey AK, Hrubey PS. Intra-articular administration of interleukin-1 causes prolonged suppression of cartilage proteoglycan synthesis in rats. *Matrix*, 1992, **11**, 1-10.
37. Chandrasekhar S, Laurie GW, Cannon FB, Martin GR, Kleinman HK. In vitro regulation of cartilage matrix assembly by a Mr 54,000 collagen-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1986, **83**, 5126-30.
38. Charri re G, Hartmann DJ, Vignon E, Ronzi re M-C, Herbage D, Ville G. Antibodies to type I, II, IX, and XI collagen in the serum of patients with rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.*, 1988, **31**, 325-32.
39. Chen F, Kerner MB, Dorfman HD, Hamerman DR. The distribution of S-100 protein in articular cartilage from osteoarthritic joints. *J. Rheumatol.*, 1990, **17**, 1676-81.

40. Cheng J. [³H] leukotriene B4 binding to the guinea-pig spleen membrane preparation: A rich tissue source for a high-affinity leukotriene B4 receptor site. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1986, **236**, 126-32.
41. Chin JE, Lin Y. Effects of recombinant human interleukin-1 β on rabbit articular chondrocytes. Stimulation of prostanoid release and inhibition of cell growth. *Arthritis Rheum.*, 1988, **31**, 1290-6.
42. Choi HU, Tang LH, Johnson TL, Pal S, Rosenberg LC, Reiner A, Poole AR. Isolation and characterization of a 35,000 molecular weight subunit fetal cartilage matrix protein. *J. Biol. Chem.*, 1983, **258**, 655-61.
43. Claesson H, Lundberg U, Malmsten C. Serum-coated zymosan stimulates the synthesis of leukotriene B4 in human polymorphonuclear leukocytes. Inhibition by cyclic AMPc. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, **99**, 1230-7.
44. Clark JM. The organisation of collagen fibrils in the superficial zones of articular cartilage. *J. Anat.*, 1990, **171**, 117-30.
45. Clark SC, Kamen R. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science*, 1987, **236**, 1229-37.
46. Cohen N, Yagaloff KA. Recent progress in the development of leukotriens B4 antagonists. *Curr. Opin. Invest. Drugs*, 1994, **3**, 13-22.
47. Cohn J. Zileuton (A-64077). A 5 lipoxygenase inhibitor. in *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Mechanisms and clinical uses*. Lewis AAJ, Furst DE Eds, Dekker M, New-York, 1994, 367-90.
48. Corey EJ, Cashman JR, Kantner SS, Wright SW. *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 1503-4.
49. Curtis BM, Widmer MB, Deroos P et al. IL-1 and its receptor are translocated to the nucleus. *J. Immunol.*, 1990, **144**, 1295-1303.
50. da Silva JAP, Colville-Nash P, Spector TD, Scott DL, Willoghby DA. Inflammation-induced cartilage degradation in female rodents. Protective role of sex hormones. *Arthritis Rheum.*, 1993, **36**, 1007-13.
51. Damas J, Bourdon V, Remacle-Volon G, Adam A. Kinins and peritoneal exudates induced by carrageenin and zymosan in rats. *Br. J. Pharmacol.*, 1990, **101**, 418-22.
52. Damas J, Lagneaux D. Dissociation between the effects of zymosan on the systemic and pulmonary vessels of the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 1991, **104**, 559-64.
53. Damas J, Remacle-Volon G. Mast cell amines and the edema induced by zymosan and carrageenans in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 1986, **121**, 367-76.
54. Daum T, Rohrbach MS. Zymosan induces selective release of arachidonic acid from rabbit alveolar macrophages via stimulation of a beta-glucan receptor. *FEBS letter*. 1992, **309**, 119-22.
55. Davies P, MacIntyre DE. Prostaglandins and inflammation. in *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. Eds Gallin JI et al., 1992, 123-38.
56. Dawson J, Rordorf-Adam C, Geiger T, Towbin H, Kunz S, Nguyen H, Zingel O, Chaplin D, Vosbeck K. Interleukin-1 (IL-1) production in a mouse tissue chamber model of inflammation I. Development and initial characterization of the model. *Agents Actions*, 1993a, **38**, 247-54.
57. Dawson J, Rordorf-Adam C, Geiger T, Towbin H, Kunz S, Nguyen H, Zingel O, Chaplin D, Vosbeck K. Interleukin-1 (IL-1) production in a mouse tissue chamber model of inflammation II Identification of (tissue) macrophages as the IL-1 producing cells and the effects of anti-inflammatory drugs. *Agents Actions*, 1993b, **38**, 255-64.
58. Dawson J, Sedgwick AD, Edwards JC, Lees P. A comparative study of the cellular, exudative and histological responses to carrageenan, dextran and zymosan in the mouse. *Int. J. Tissue React.*, 1991, **13**, 171-85.
59. Dayer J-M, de Rochemonteix B, Burrus B, Demczuk S, Dinarello CA. Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. *J. Clin. Invest.*, 1986, **77**, 645-8.

60. Dayer J-M, Ricard-Blum S, Kaufmann M-T, Herbage D. Type IX collagen is a potent inducer of PGE₂ and interleukin-1 production by human monocyte macrophages. *FEBS Lett.*, 1986, **198**, 208-22.
61. de Vries BJ, van den Berg WB, Vitters E, van de Putte LBA. Quantitation of glycosaminoglycan metabolism in anatomically intact articular cartilage of the mouse patella: in vitro and in vivo studies with ³⁵S-Sulfate ³H-glucosamine, and ³H-acetate. *Rheumatol. Int.*, 1986, **6**, 273-81.
62. Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Dowell DS, Woessner JF Jr. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J. Clin. Invest.*, 1989, **84**, 678-85.
63. Denhardt DT, Feng B, Edwards DR, Cocuzzi ET, Malyankar UM. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka EPA): structure, control of expression and biological functions. *Pharma. Ther.* 1993, **59**, 329-41.
64. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MAJ, O'Connor JV. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1. *J. Exp. Med.*, 1986, **163**, 1433-50.
65. Dinarello CA, Savage N. Interleukin 1 and its receptor. *Crit. Rev. Immunol.*, 1989, **9**, 1-20.
66. Dinarello CA. Biology of interleukin-1. *FASEB. J.*, 1988, **2**, 108-15.
67. Dinarello CA. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv. Immunol.*, 1989, **44**, 153-205.
68. Dinarello CA. The biology of interleukin-1. *Chem. Immun.*, 1992, **51**, 1-32.
69. Dingle JT, Page Thomas DP, King B. In vivo studies of articular tissue damage mediated by catabolin/interleukin 1. *Ann. Rheum. Dis.*, 1987, **46**, 527-533.
70. Dische ZA. A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. Biol. Chem.*, 1947, **167**, 189-98.
71. Dixon RAF, Diehl RE, Opas E, Rands E, Vickers PJ, Evans JF, Gillard JW, Miller DK. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature*, 1990, **343**, 282-4.
72. Dodge GR, Poole AR. Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid, and osteoarthritic articular cartilages and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin-1. *J. Clin. Invest.*, 1989, **83**, 647-61.
73. Doege K, Sasaki M, Kimura T, Yamada Y. Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 894-902.
74. Doege K, Sasaki M, Yamada Y. Rat and human cartilage proteoglycan (aggrecan) gene structure. *Biochem. Soc. Trans.*, 1990, **18**, 200-2.
75. Doherty NS, Beaver TH, Chan KY, Coutant JE, Westrich GL. The role of prostaglandins in the nociceptive response induced by intraperitoneal injection of zymosan in mice. *Br. J. Pharmacol.*, 1987, **91**, 39-47.
76. Doherty NS, Poubelle P, Borgeat P, Beaver TH, Westrich GL, Schrader NL. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E₂. *Prostaglandins*, 1985, **30**, 769-89.
77. Dower SK, Sim JE, Cerretti DP. The interleukin-1 system: Receptors, ligands and signals. *Chem. Immunol.*, 1992, **51**, 33-64.
78. Edwards JH, Wagner JC, Seal RME. Pulmonary responses to particulate materials capable of activating the alternative pathway of complement. *Clin. Allergy*, 1976, **6**, 155-64.
79. Endres S, van der Meer JWM, Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis of fever. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1987, **17**, 469-74.
80. Erdo F, Török K, Aranyi P, Szekely JI. A new assay for antiphlogistic activity; zymosan-induced mouse ear inflammation. *Agents Actions*, 1993, **39**, 137-42.

81. Erdo F, Török K, Aranyi P, Szekely JI. Zymosan induced mouse ear oedema: a new model of inflammation. *Pharmacol. Res.*, 1992, **25**, 236-7.
82. Erdo F, Török K, Szekely JI. Measurement of interleukin-1 liberation in zymosan air-pouch exudate in mice. *Agents Actions*, 1994, **41**, 93-95.
83. Eyre DR, Apon S, WU, J, Ericson LH, Walsh KA. Collagen type IX: evidence for covalent linkages to type II collagen in cartilage. *FEBS lett.*, 1987, **220**, 337-41.
84. Eyre DR, Dickson IR, van Ness KP. Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues. *Biochem. J.*, 1988, **252**, 495-500.
85. Eyre DR, WU J-J, Woods P. Cartilage specific collagens. Structural studies. in *Articular cartilage and osteoarthritis*. Kuettner K et al. Eds, Raven Press, New York, 1992, 119-31.
86. Eyre DR. The collagens of articular cartilage. *Semin. Arthritis. Rheum.*, 1991, **21**, 2-11.
87. Fantone JC, Kunkel SL, Wardb PA, Zurier RB. Suppression by prostaglandin E1 of vascular permeability induced by vasoactive inflammatory mediators. *J. Immunol.*, 1980, **125**, 2591-6.
88. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1986, **883**, 173-7.
89. Farrell AJ, Blake DR, Palmer RMJ, Moncada, S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.*, 1992, **51**, 1219-22.
90. Fawns HT, Landells JW. Histochemical studies of rheumatic conditions. Observation on fine structures of matrix of normal bone and cartilage. *Ann. Rheum. Dis.*, 1953, **12**, 105-13.
91. Fedarko NS. Isolation and purification of proteoglycans. *Experientia.*, 1993, **49**, 369-83.
92. Feng J, Price M, Cohen J, Satinoff E. Prostaglandin fever in rats: regulated change in body temperature or change in regulated body temperature. *Am. J. Physiol.*, 1989, **257**, 695-9.
93. Fernandez MP, Selmin O, Martin GR, Yamada Y, Pfäffle M. The structure of anchorin CII, a collagen binding protein isolated from chondrocyte membrane. *J. Biol. Chem.*, 1988, **261**, 5921-5
94. Ferreira Sh, Nakamura M. Pathogenesis and pharmacology of pain. in *Advances in inflammation research*. Eds G Weissmann et al, 1979, **1**, 317-29.
95. Fife RS, Brandt KD. Cartilage matrix glycoprotein is present in serum in experimental canine osteoarthritis. *J. Clin. Invest.*, 1989, **84**, 1432-9.
96. Fife RS, Brandt KD. Extracellular matrix of cartilage : Glycoprotein. in *Joint cartilage degradation. Basic and clinical aspects*. Woessner JF, Howell DS. Eds. Dekker M Eds, New-York., 1993, 139-58.
97. Fife RS, Brandt KD. Identification of a high-molecular-weight (>400,000) protein in hyaline cartilage. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1984, **802**, 506-14.
98. Fleischmajer R, Fischer LW, MacDonald ED, Jacobs L, Perlisch JS, Termine JD. Decorin interacts with fibrillar collagen of embryonic and adult human skin. *J. Struct. Biol.*, 1991, **106**, 82-90.
99. Folliard F, Terlain B. A novel method for the sampling of synovial fluid in mice. Assay of a synovial lysosomal enzyme in zymosan-induced arthritis. *Agents Actions*, 1988, **25**, 139-45.
100. Ford-Hutchinson AW. FLAP: a novel drug target for inhibiting the synthesis of leukotrienes. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1991, **12**, 68-70.
101. Forrest MJ, Jose PJ, Williams TJ. Kinetics of the generation and action of chemical mediators in zymosan-induced inflammation of the rabbit peritoneal cavity. *Br. J. Pharmacol.*, 1986, **89**, 719-30.
102. Frey J, Raby N. Lysine et collagène. *Ann. Biol. Clin.*, 1991, **49**, 36-9.

103. Gado K, Gigler G. Zymosan inflammation: A new method suitable for evaluating new antiinflammatory drugs. *Agents Actions*, 1991, **32**, 119-21.
104. Ganu VS, Goldberg RL, Blancuzzi VJ, Wilson DE, Doughty J, Melton R, O'Byrne. Elevation of synovial plasminogen activator activity after injection of interleukin-1 α into rabbit knee joint. *Agent Actions*, 1991, **34**, 226-8.
105. Gegout P, Drelon E, Jouzeau JY, Payan E, Payan JP, Chevrier D, Gillet P, Fener P, Netter P. Assay of circulating hyaluronic acid in the rat: study of diurnal variation and effect of anesthesia. *Life Sci*, 1991, **49**, 31-35.
106. Gemmel DK, Cottney J, Lewis AJ. Comparative effects of drugs on four paw œdema models in the rat. *Agents Actions*, 1979, **9**, 107-16.
107. Gold EW. The quantitative spectrophotometric estimation of total sulfated glycosaminoglycan levels. Formation of soluble alcian complexes. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1981, **673**, 408-15.
108. Goldberg RL, Kolibas LM. An improved method for determining proteoglycans synthesized by chondrocytes in culture. *Conn. Tiss. Res.*, 1990, **24**, 265-75.
109. Goldman R, Ferber E, Meller R, Zor U. A role for reactive oxygen species in zymosan and β -glucan induced protein tyrosine phosphorylation and phospholipase A2 activation in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Acta*, 1994, **1222**, 265-76.
110. Goldman R. Induction of a beta-1,3-D-glucan receptor in P388D1 cells treated with retinoic acid or 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Immunology*, 1988, **63**, 319-24.
111. Goldring MB, Birkhead J, Sandell LJ. Interleukin-1 suppresses expression of cartilage-specific type II and IX collagens and increases type I and III collagens in human chondrocytes. *J. Clin. Invest.*, 1988, **82**, 2026-37.
112. Görgen I, Hartung T, Leist M, Niehörster M, Tiegs G, Uhlig S, Weitzel F, Wendel A. Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor- α . *J. Immun.*, 1992, **149**, 918-24.
113. Gosh P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and chondroprotection. A review of evidence. *Drugs*, 1993, **46**, 834-46.
114. Green AP, Mangan FR. The effect of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs on chronic muscle inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1980, **32**, 319-322.
115. Green SP, Hamilton JA, Phillips WA. Zymosan-triggered tyrosine phosphorylation in mouse bone-marrow-derived macrophages is enhanced by respiratory burst priming agents. *Biochem. J.*, 1992, **258**, 427-32.
116. Gresele P, Arnout J, Coene MC, Deckmy H, Vermynen J. Leukotriene B4 production by stimulated whole blood: comparative studies with isolated polymorphonuclear cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, **137**, 334-42.
117. Griffiths RJ, Li SW, Wood BE, Blackham A. A comparison of the anti-inflammatory activity of selective 5-lipoxygenase inhibitors with dexamethasone and colchicine in a model of zymosan induced inflammation in the rat knee joint and peritoneal cavity. *Agents Actions*, 1991, **32**, 312-20.
118. Hamilton JA, Veis N, Bordun AM, Vairo G, Gonda TJ, Phillips WA. Activation and proliferation signals in murine macrophages: relationships among c-fos and c-myc expression, phosphoinositide hydrolysis, superoxide formation, and DNA synthesis. *J. Cell. Physiol.*, 1989, **141**, 618-26.
119. Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG, Sommer A, Eisenberg SP, Thomson RC. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature*, 1990, **343**, 336-40.
120. Hansson G, Lindgren JA, Dahlen SE, Hedqvist SE, Samuelsson B. Identification and biological activity of novel ω -oxidised metabolites of leukotriene B4 from human leukocytes. *FEBS letters*, 1981, **130**, 107-12.

121. Hardingham TE, Fosang AJ, Dudhia J. Aggrecan, the chondroitin sulfate/keratan sulfate proteoglycan from cartilage. in *Articular cartilage and osteoarthritis*. Kuettner K et al. Eds, Raven Press, New York, 1992, 5-20.
122. Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many function. *Faseb. J.*, 1992, **6**, 861-70.
123. Hardingham TE, Muir H. The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1972, **279**, 401-405.
124. Hardingham TE. The role of link-protein in the structure of cartilage proteoglycan aggregates. *Biochem. J.*, 1979, **177**, 237-47.
125. Hascall VC, Heinegard D. Aggregation of cartilage proteoglycans : the role of hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.*, 1974, **249**, 4234-41.
126. Hascall VC, Riolo RL. Characteristics of the protein-keratan sulfate core and of keratan sulfate prepared from bovine nasal cartilage proteoglycan. *J. Biol. Chem.*, 1972, **247**, 4529-38.
127. Hasslett C, Jose PJ, Giclas PC, Williams TJ, Henson PM. Cessation of neutrophil influx in C5a-induced experimental arthritis is associated with loss of chemoattractant activity from the joint space. *J. Immunol.*, 1989, **142**, 3510-7.
128. Hauselmann HJ, Oppliger L, Michel BA, Stefanovic-Racic M, Evans CH. Nitric oxide and proteoglycan synthesis by human articular chondrocytes in alginate culture. *FEBS Letters*, 1994, **352**, 361-4.
129. Heinegard D, Antonsson P, Hedbom E, Larsson T, Oldberg A, Sommarin Y, Wendel M. Noncollagenous matrix constituents of cartilage. *Pathol. Immunol. Pathol. Res.*, 1988, **7**, 27-31.
130. Heinegard D, Hascall VC. Aggregation of cartilage proteoglycans: characteristics of the proteins isolated from trypsin digests of aggregates. *J. Biol. Chem.*, 1974, **249**, 4250-6.
131. Heinegard D, Hascall VC. Characteristics of the non-aggregating proteoglycans isolated from bovine nasal cartilage. *J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, 927-34.
132. Heinegard D, Saxne T. Molecular markers of processes in cartilage in joint disease. *Br. J. Rheumatol.*, 1991, **30 suppl**, 21-4.
133. Henderson B, Pettipher ER. Arthritogenic actions of recombinant IL-1 and tumor necrosis factor alpha in the rabbit: evidence for synergistic interactions between cytokines in vivo. *Clin. Exp. Immunol.*, 1989, **75**, 306-10.
134. Hewitt AT, Varner HH, Silver MH, Dessau W, Wilkes CM, Martin GR. The isolation and partial characterization of chondronectin, an attachment factor for chondrocytes. *J. Biol. Chem.*, 1982, **257**, 2330-4.
135. Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM, Kang AH, Mainardi CL. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.*, 1985, **260**, 2493.
136. Hickery MS, Vilim V, Bayliss MT, Hardingham TE. Effect of interleukin-1 and tumour necrosis factor alpha on the turn-over of the proteoglycans in human articular cartilage. *Biochem. Soc. Trans.*, 1990, **18**, 953-54.
137. Higgs GA, Follenfant RL, Garland LG. Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: effects on acute inflammatory responses. *Br. J. Pharmacol.*, 1988, **94**, 547-51.
138. Hulkower KI, Georgescu HI, Evans CH. Protein kinase C and chondrocyte activation. *Agents Actions*, 1989, **27**, 442-4.
139. Hunziker EB. Articular cartilage structure in humans and experimental animals. in *Articular cartilage and osteoarthritis*. Kuettner K. Eds Raven Press, New-york, 1992, 183-99.
140. Imai Y, Hayashi M, Oh-Ishi S. Involvement of platelet activating factor in zymosan-induced rat pleurisy. *Lipids*, 1991, **26**, 1408-11.
141. Jafari HS, Saez-Llorens X, Paris M, Rinderknecht S, Friedland I, Ehrett S, Severien C, Olsen KD, Burns DK, Harper CF, Lark MW, Thonar EJM, McCracken GH. Dexamethasone attenuation of cytokine-mediated

- articular cartilage degradation in experimental lapine Haemophilus arthritis. *J. Infect. Dis.*, 1994, **168**, 1186-93.
142. Jansen JH, Fibbe WE, Willemze R, Kluin Nelemans JC. Interleukin-4. A regulatory protein. *Blut.*, 1990, **60**, 269-74.
143. Jones KI, Brown M, Ali SY, Brown RA. An immunohistochemical study of fibronectin in human osteoarthritis and disease free articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.*, 1987, **46**, 809-15.
144. Jouzeau JY, Gegout P, Drelon E, Chevrier D, Netter P, Gaucher A. Circulating hyaluronan is triggered by physical exercise in rats. *Arthritis Rheum.*, 1992, **35**:271.
145. Jouzeau JY, Payan E, Gillet P, Péré P, Netter P, Gaucher A. Clinical significance of circulating hyaluronan in rheumatic disease. *Arthritis Rheum.*, 1992, **35**, 1253-4.
146. Jouzeau JY. Le hyaluronate circulant est-il un marqueur de la prolifération synoviale? Arguments cliniques et études expérimentales chez le rat. 1993. Thèse de Pharmacologie de l'Université de Nancy I.
147. Kassis S, Lee JC, Hanna N. Effect of prostaglandins and cAMP levels on monocytes IL-1 production. *Agents Actions*, 1989, **27**, 274-6.
148. Kato Y, Gospodarowicz D. Stimulation by glucocorticoid of the synthesis of cartilage-matrix proteoglycans produced by rabbit costal chondrocytes in vitro; *J. Biol. Chem.*, 1985, **260**, 2364-73.
149. Keystone EC, Schorlemmer HU, Pope C, Allison AC. Zymosan-induced arthritis. A model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. *Arthritis Rheum.*, 1977, **20**, 1396-1401.
150. Klickstein LB, Shapleigh C, Goetz EJ. Lipoxygenation of arachidonic acid as a source of polymorphonuclear leukocytes chemotactic factors in synovial fluid and tissue in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *J. Clin. Invest.*, 1980, **66**, 1166-70.
151. Knott I, Dieu M, Houbion A, Remacle J, Raes M. Activation of the arachidonic cascade by interleukin-1 in human chondrocytes. *Agents Actions*, 1994, **41**, 162-3.
152. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals *Biochem. J.*, 1994, **298**, 249-58.
153. Knowles RG, Salter M, Brooks SL, Moncada S. Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung and aorta of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, **172**, 1042-8.
154. Konno S, Tsurufuji S. Analysis of the factor(s) involved in pathogenesis of zymosan-induced inflammation in rats. *Japan J. Pharmacol.*, 1985, **38**, 177-84.
155. Krane SM. Some molecular mechanisms of glucocorticoid action. *Br. J. Rheumatol.*, 1993, **32**, 3-5.
156. Kresse H, Hausser H, Schönherr E. Small proteoglycans. *Experientia.*, 1993, **49**, 403-16.
157. Labaudiniere R, Dereu N, Cavy F, Guillet M-C, Marquis O, Terlain B. ω -[(4,6-diphenyl-2-pyridyl)oxy]alkanoic acid derivatives: a new family of potent and orally active LTB₄ antagonists. *J. Med. Chem.*, 1992, **35**, 4315-24.
158. Lack CH, Rogers HJ. Action of plasmin on cartilage. *Nature*, 1958, **182**, 948.
159. Lam BK, Austen KF. Leukotrienes; Biosynthesis, release and actions. in *Inflammation: basic principles and clinical correlates*, Gallin JI et al. Eds., Raven Press, Ltd., New York, 1992, 139-47.
160. Lee A, Langer R. Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science*, 1983, **221**, 1185-7.
161. Lewandowska K, Choi HU, Rosenberg LC, Zardi L, Culp LA. Fibronectin-mediated adhesion of fibroblasts: Inhibition by dermatan sulfate proteoglycan and evidence for a cryptic glycosaminoglycan-binding domain. *J. Biol. Chem.*, 1987, **105**, 1443-54.

162. Lipiello I, Hall D, Mankin HJ. Collagen synthesis in normal and osteoarthritic human cartilage. *J. Clin. invest.*, 1977, **59**, 593-600.
163. Lipiello L, Yamamoto K, Robinson D, Mankin HJ. Involvement of prostaglandins from rheumatoid synovium in inhibition of articular cartilage metabolism. *Arthritis Rheum.*, 1978, **21**, 909-17.
164. Lotz M, Guerne PA. Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 2017-20.
165. Lotz M, Moats T, Villiger PM. Leukemia inhibitory factor is expressed in cartilage and synovium and can contribute to the pathogenesis of arthritis. *J. Clin. Invest.*, 1992, **90**, 888-96.
166. Lust G, Burton-Wurster N, Leipold H. Fibronectin as a marker for osteoarthritis. *J. Rheumatol.*, 1987, **14 suppl**, 28-9.
167. Makower AM, Wroblewski J, Pawlowski A. Effects of IGF-1, EGF, and FGF on proteoglycans synthesized by fractionated chondrocytes of rat rib growth plate. *Exp. Cell. Res.*, 1988, **179**, 498-506.
168. Malemud CJ, Moskowitz RW, Hassid A. Prostaglandin biosynthesis by lapine articular chondrocytes in cultures. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1980, **663**, 480-84.
169. Malemud CJ, Sokoloff L. The effects of prostaglandins on cultured lapine articular chondrocytes. *Prostaglandins*, 1977, **13**, 845-60.
170. March CJ, Mosley B, Larsen A. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature*, 1985, **315**, 641-7.
171. Maroudas A. Glycosaminoglycan turnover in articular cartilage. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.*, 1975, **B-275**, 293-313.
172. Martel-Pelletier J, Zafarullah M, Kodama S, Pelletier JP. In vitro effects of interleukin 1 on the synthesis of metalloproteinases, TIMP, plasminogen activators and inhibitors in human articular cartilage. *J. Rheumatol.*, 1991, **27 suppl**, 80-4.
173. Martins MA, Sila PMR, Castro Feria Neto HC, Bozza PT, Dias PMFL, Lima MCR, Cordeiro RSB, Vargaftig BB. Pharmacological modulation of PAF-induced rat pleurisy and its role in inflammation by zymosan. *Br. J. Pharmacol.*, 1989, **96**, 363-71.
174. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is anti-inflammatory and non ulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 3228-32.
175. Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J. Cell. Biochem.*, 1993, **53**, 288-295.
176. Mayne R, Brewton RG. Extracellular matrix of cartilage: Collagen. in *Joint cartilage degradation. Basic and clinical aspects*. Woessner JF, Howell DS Eds. Dekker M, New-York, 1993, 81-108.
177. Mayne R. Cartilage collagens. What is their function, and are they involved in articular disease ? *Arthritis Rheum.*, 1989, **32**, 241-6.
178. Mazières B. Les chondrocytes du cartilage de la rotule du lapin adulte. in *Osteoarthritis*, eds Peyron JG. 1985, 254.
179. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.*, 1993, **178**, 749-54.
180. McCollum R, Martel-Pelletier J, DiBattista J, Pelletier JP. Regulation of interleukin 1 receptors in human articular chondrocytes. *J. Rheumatol.*, 1991, **27**, 85-8.

181. McDevitt CA, Pahl JA, Ayad S, Miller RR, Uratsuji M, Andrish JT. Experimental osteoarthritic articular cartilage is enriched in guanidine-soluble type VI collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, **157**, 250.
182. McMillan RM, Bird TG, Crawley GC, Edwards MP, Girodeau JM, Kingston JF, Foster SJ. Methoxyalkyl thiazoles: a novel series of potent, orally active and enantioselective inhibitors of 5-lipoxygenase. *Agents Actions*, 1991, **34**, 110-2.
183. McMillan RM, Foster SJ. Leukotriene B4 and inflammatory disease. *Agents actions*, 1988, **24**, 114-9.
184. McMillan RM, Walker ERH. Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 1992, **13**, 323-30.
185. Meade EA, Smith WL, De Witt D. Differential inhibition of prostaglandin endoperoxyde synthase (cyclooxygenase) isoenzymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 6610-14.
186. Meats JE, Elford PR, Bunning RA, Russell RGG. Retinoids and synovial factors(s) stimulate the production of plasminogen activator by cultured human chondrocytes. A possible role for plasminogen activator in the resorption of cartilage in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985, **838**, 161-9.
187. Mendler M, Eich-Bender SG, Vaughan L, Winterhalter KH, Bruckner P. Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX and XI. *J. Cell. Biol. Chem.*, 1989, **108**, 191-7.
188. Miller RR, McDevitt CA. Thrombospondin is present in articular cartilage and is synthesized by articular chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, **153**, 708-14.
189. Mitrovic D, McCall E, Dray F. The in vitro production of prostanoids by culture bovine chondrocytes. *Prostaglandins*, 1982, **23**, 17-28.
190. Miyake K, Underhill CB, Lesley J, Kincade PW. Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J. Exp. Med.*, 1990, **172**, 69-75.
191. Moncada S, Higgs A. The L-Arginine- nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*, 1993, **329**, 2002-12.
192. Morales TI, Roberts AB. Transforming growth factor-beta regulates the metabolism of proteoglycan in bovine cartilage articular cultures. *J. Biol. Chem.*, 1991, **263**, 12828-31.
193. Morimoto A, Murakami N, Nakamori T, Watanabe T. Evidence for separate mechanisms of induction of biphasic fever inside and outside the blood brain barrier. *J. Physiol.*, 1987, **385**, 629-37.
194. Morris NP, Bächinger HP. Type XI collagen is a heterotrimer with the composition (1 α ,2 α ,3 α) retaining non-triple helical domains. *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 11345-50.
195. Nataf V, Tsagris L, Dumontier MF, Bonaventure J, Corvol M. Modulation of sulfated proteoglycan synthesis and collagen gene expression by chondrocytes grown in the presence of bFGF alone or combined with IGF1. *Reprod. Nutr. Dev.*, 1990, **30**, 331-42.
196. Neame PJ, Barry FP. The link proteins. *Experientia*, 1993, **49**, 393-402.
197. Neame PJ. Extracellular matrix of cartilage: Proteoglycans. in *Joint cartilage degradation. Basic and clinical aspects.* Woessner JF, Howell DS. Eds., Dekker M, New-York, 1993, 109-38.
198. Neidel J, Zeidler U. Independant effects of interleukin 1 on proteoglycan synthesis and proteoglycan breakdown of bovine articular cartilage in vitro. *Agents Actions*, 1993, **39**, 82-90.
199. Nietfeld JJ, Wilbrink B, Helle M, van Roy JL, den Otter W, Swaak AJ, Huber Bruning O. Interleukin-1 induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage. *Arthritis Rheum.*, 1990, **33**, 1695-1701.
200. Nietfeld JJ. Cytokines and proteoglycans. *Experientia.*, 1993, **49**, 456-69.

201. Niyibizi C, Eyre DR. Identification of the cartilage $\alpha 1(XI)$ chain in type V collagen from bovine bone. *FEBS Lett.*, 1989, **242**, 314-8.
202. O'Toole E, Comerford FR, Galway I. Effect of local Triamcinolone hexacetonide treatment on zymosan arthritis in rats. *Ir. J. Med. Sci.*, 1987, **156**, 228.
203. Ollivierre F, Gubler U, Towle CA, Laurencin C, Treadwell BV. Expression of IL-1 genes in human and bovine chondrocytes; a mechanism for autocrine control of cartilage matrix degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, **141**, 904-11.
204. Otterness IG, Bliven ML. Laboratory models for testing nonsteroidal antiinflammatory drugs. in *Nonsteroidal antiinflammatory drugs*. Lombardino JG. Eds. Wiley, 1985, 111-252.
205. Otterness IG, Milici AJ, Bliven ML. Some factors affecting inhibition and restoration of mobility after induction of an acute arthritis in the hamster. *Agents Actions*, 1994, **40**, 224-7.
206. Palmer RMJ, Andrews T, Foxwell NA, Moncada S. Glucocorticoids do not affect the induction of a novel calcium-dependent nitric-oxide synthase in rabbit chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, **188**, 209-15.
207. Palmosky MJ, Brandt KD. Effects of static and cyclic compressive loading on articular cartilage plugs in vitro. *Arthritis Rheum.*, 1984, **27**, 675-81.
208. Pasternack MS, Verret CR, Liu MA, Eisen HN. Serine esterase in cytotoxic lymphocytes. *Nature*, 1986, **32**, 740.
209. Paulsson M, Heinegard D. Radioimmunoassay of the 148-kilodalton cartilage protein. Distribution of the protein among bovine tissue. *Biochem. J.*, 1982, **207**, 207-13.
210. Paulsson M, Inerot S, Heinegard D. Variation in quantity and extractability of the 148-kilodalton cartilage protein with age. *Biochem. J.*, 1984, **221**, 623-30.
211. Pavloff N, Staskus PW, Kishnani NS, Hawkes SP. A new inhibitor of metalloproteinase from chicken, ChIMP3: a third member of the TIMP family. *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 17321-6.
212. Pellas TC, Colombo C, Fryer LR, Pastor G, Haston W, Raychaudhury A, Kotyuk B, Greenspan PD, Healy C, DiPasquale G. LTB₄-induced transient neutropenia in the rat: a model for evaluating efficacy and bioavailability of LTB₄ receptor antagonists. *J. Pharm. Toxicol. Med.*, 1993, **30**, 137-42.
213. Pelletier JP, DiBattista JA, Roughley P, Mc Collum R, Martel-Pelletier J. Cytokines and inflammation in cartilage degradation. *Osteoarthritis*, 1993, **19**, 545-68.
214. Pelletier JP, Martel-Pelletier, Malemud CJ. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids on cartilage metabolism in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. in *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. mechanisms and clinical use*. Lewis AJ, Furst DE Eds, Dekker M, New-York, 1994, 5-25.
215. Peracchia F, Ferrari G, Poggi A, Rotilio D. Il-1 β -induced expression of PDGF-AA isoform in rabbit articular chondrocytes is modulated by TGF- β 1. *Exp. Cell. Res.*, 1991, **193**, 208-12.
216. Perretti M, Solito E, Parente L. Evidence that endogenous interleukin-1 is involved in leucocyte migration in acute experimental inflammation in rats and mice. *Agents Actions*, 1992, **35**, 71-8.
217. Petersen M, Steadman R, Hallett B, Matthews N, Williams JD. Zymosan-induced leukotriene B₄ generation by human neutrophils is augmented by rhTNF- α but not chemotactic peptide. *Immunology*, 1990, **70**, 75-81.
218. Pettipher ER, Henderson B, Hardingham T, Ratcliffe A. Cartilage and proteoglycans depletion in acute and chronic antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1989, **32**, 601-7.
219. Pettipher ER, Higgs GA, Henderson B. Interleukin-1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1986, **83**, 8749-53.

220. Phillips WA, Hamilton JA. Phorbol ester-stimulated superoxyde production by murine bone marrow-derived macrophages requires preexposure to cytokines. *J. Immunol.*, 1989, **142**, 2445-9.
221. Plaas AHK, Barry FP, Wong-Palms S. Keratan sulfate substitution on cartilage matrix molecules. in *Articular cartilage and osteoarthritis*. Kuettner KE Eds. Raven Press, New-York, 1992, 69-79.
222. Poole AR, Flint MH, Beaumont BW. Chondrons in cartilage: Ultrastructural analysis of the pericellular microenvironments in adult human articular cartilage. *J. Orthop. Res.*, 1987, **5**, 509-22.
223. Poole AR, Ionescu M, Swan A, Dieppe PA. Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage proteoglycan aggrecan. *J. Clin. Invest.*, 1994, **94**, 25-33.
224. Poole AR. Cartilage in health and disease. in *Arthritis and allied conditions*. Mc Carty DJ. Koopman WJ. Lea and Febiger Eds. New York, 1993, 279-333.
225. Poole AR. Immunochemical markers of joint inflammation, skeletal damage and repair: Where are we now ? *Ann. Rheum. Dis.*, 1994, **53**, 3-5.
226. Poole AR. The relationship between toluidine staining and hexuronic acid content of cartilage matrix. *Histochem. J.*, 1970, **2**, 425-30.
227. Poole CA, Ayad S, Schofield JR. Chondrons from articular cartilage. 1. Immunolocalization of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine tibial chondrons. *J. Cell. Sci.*, 1988, **90**, 635-43.
228. Price LK, Choi HU, Rosenberg L, Stanley ER. The predominant form of secreted colony stimulating factor-1 is a proteoglycan. *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 2190-99.
229. Pujol JP, Loyau G. Interleukin-1 and osteoarthritis. *Life Sci.*, 1987, **41**, 1187-98.
230. Quantin B, Murphy G, Breathnach R. Pump-1 cDNA codes for a protein with characteristics similar to those of classical collagenase family members. *Biochemistry*, 1989, **28**, 5327.
231. Ralphs JR, Benjamin M, Thornett A. Cell and matrix biology of the suprapatella in the rat; A structural and immunocytochemical study of fibrocartilage in a tendon subject to compression. *Anat. Rec.*, 1991, **231**, 167-77.
232. Ralphs JR, Tyers RNS, Benjamin M. Development of functionally distinct fibrocartilages at two sites in the *quadriceps tendon of the rat : the suprapatella and the attachment to the patella*. *Anat. Embryol.*, 1992, **185**, 181-7.
233. Rao ST, Currie JL, Shaffer AF, Isakson PC. In vivo characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1994, **269**, 917-25.
234. Rediske JJ, Koehne CF, Zhang B, Lotz M. The inducible production of nitric oxide by articular cell types. *Osteoarthritis cartilage*, 1994, **2**, 199-206.
235. Reife RA, Stuart JM, HAsty KA. Pathological cartilage degradation in *Human arthritides. in joint cartilage degradation. Basic and clinical aspects*. Woessner JF, Howell DS. Eds. Dekker M New-York. 1993, 409-33.
236. Ristimäki A, Garfinkel S, Wessendorf J, Maciag T, Hla T. Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 α . *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 11769-75.
237. Roberge CJ, Grassi J, DeMedicis R, Frobert Y, Lussier A, Naccache PH, Poubelle PE. Crystal-neutrophil interactions lead to interleukin-1 synthesis. *Agents Actions*, 1991, **34**, 38-41.
238. Rola-pleszczynski M, Lemaire I. Leukotrienes augment interleukin 1 production by human monocytes. *J. Immunol.*, 1985, **135**, 3958-61.
239. Rosenberg L. Chemical basis for the histological use of Safranin O in the study of articular cartilage. *J. Bone. Joint. Surg.*, 1971, **53**, 69-82.

240. Rosenberg LC. Structure and function of dermatan sulfate proteoglycans in articular cartilage. in *Articular cartilage and osteoarthritis*. Kuettner K et al. Eds, Raven Press, New York, 1992, 45-63.
241. Rothenberg ME, Pomerantz JL, Owen WFJ, Avraham S, Soberman RJ, Austen KF, Stevens RL. Characterization of a human eosinophil proteoglycan, and augmentation of its biosynthesis and size by interleukin-3, interleukin 5, and granulocytes/macrophage colony stimulating factor. *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**, 13901-8.
242. Rothwell NJ, Hardwick AJ, Lindley I. Actions of interleukin-8 in the rat are independant of prostaglandins. *Horm. Metab. Res.*, 1990, **22**, 595-6.
243. Rothwell NJ. Eicosamoids, thermogenesis and thermoregulation. *Prostaglandins leukotienes and essential fatty acids*, 1992, **46**, 1-7.
244. Rubin AS, Roberts D. Morphometric quantitation of histopathologic changes in articular cartilage in an immunologically-induced rabbit model of rheumatoid arthritis. *Lab. Invest.*, 1987, **57**, 342-6.
245. Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell.*, 1991, **64**, 867-9.
246. Safina AF, Korolenko TA, Mynkina GI, Duskin MI, Krasnoselskaya GA. Liver and serum lysosomal enzymes activiy during zymosan-induced inflammation in mice. in *Recent progress on kinins*. Birkhäuser Verlag Bâle, 1992, 370-5.
247. Saklatvala J, Bird T. A common class of receptors for the two types of porcine interleukin-1 on articular cartilage. *Lymphokine Res.*, 1986, **5**, S99-S104.
248. Saklatvala J. Interleukin-1 and connective tissue. in *Interleukin-1, inflammation and disease*. Bomford R and Henderson B. Eds., Elsevier, Amsterdam, 1989, **16**, 143-54.
249. Saklatvala J. Tumor necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature*, 1986, **322**, 547-49.
250. Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis and biological effects. *Science*, 1987, **237**, 1171-76.
251. Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, 1983, **220**, 568-75.
252. Sato T, Ino Y, Koshiyama Y, Motoyoshi A, Oda M, Iwaki M. Inhibitory effects of a novel synthetic protease inhibitor, FUT-175, on the paw edema in rats and zymosan-induced complement activation in vitro. *Japan. J. Pharmacol.*, 1986, **42**, 587-9.
253. Sawyer RT. Intravenous zymosan-A challenge induces an alveolar inflammatory response. *Inflammation*, 1993, **17**, 273-81.
254. Saxne T, Heinegard D, Wollheim FA. Therapeutic effects on cartilage metabolism in arthritis as measured by release of proteoglycan structures into the synovial fluid. *Ann. Rheum. Dis.*, 1986, **45**, 491-7.
255. Scales WE, Kluger MJ. Effects of antipyretic drugs in circadian rhythm in body temperature of rats. *Am. J. Physiol*, 1987, **253**, 306-13.
256. Schalkwijk J, Joosten LAB, van den Berg WB, van de Putte LBA. Experimental arthrtis in C57black/6 normal and beige (Chediak-Higashi) mice: in vivo and in vitro observations on cartilage degradation. *Ann. Rheum. Dis.*, 1988, **47**, 940-6.
257. Schalkwijk J, Joosten LAB, van den Berg WB. Chondrocyte nonresponsiveness to insulin-like growth factor I in experimental arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1989, **32**, 894-900.
258. Schonherr E, Jarvelainen HT, Sandell LJ, Wight TN. Effects of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 on the synthesis of a large versican-like chondroitin sulfate proteoglycan by arterial smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 17640-47.

259. Schorlemmer HU, Bitter-Suermann D, Allison AC. Complement activation by the alternative pathway and macrophage enzyme secretion in the pathogenesis of chronic inflammation. *Immunology*, 1977, **32**, 929-40.
260. Seed MP, Kawabata K, Willoughby DA. NSAID-induced acceleration of cartilage degradation in monoarticular arthritis. in *9th International conference on Prostaglandins and related compounds*. Florence, Italy, 1994, 37.
261. Shinmei M, Naramatsu Y, Tanaka O, Inamori Y, Shinomura Y, Matsuyama S, Matsuzawa K. Increased levels of chondrocalcin (type-II collagen C-propeptide) in osteoarthritic synovial fluids. *Arthritis Rheum.*, 1989, **32**, S108.
262. Shinmei, M, Masuda K, Kikuchi T, Shimomura Y. Interleukin 1, tumor necrosis factor, and interleukin 6 as mediators of cartilage destruction. *Semin. Arthritis Rheum.*, 1989, **18**, 27-32.
263. Shinomura T, Kimata K. Proteoglycan Lb, a small dermatan sulfate proteoglycan expressed in embryonic chick epiphyseal cartilage, is structurally related to osteo-inductive factor. *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 1265-70.
264. Shipp DW, Bowness JM. Insoluble non-collagenous cartilage glycoproteins with aggregating subunits. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1975, **379**, 282-94.
265. Simkin PA. Synovial physiology. in *arthritis and allied conditions*, Mac Carty DJ. Eds., Lea & Febiger eds., Philadelphia, 1989, 207-221.
266. Simmons PM, Salmon JA, Moncada S. The release of leukotriene B4 during experimental inflammation. *Biochem. Pharmacol.*, 1983, **32**, 1353-9.
267. Simon WH, Richardson S, Herman W. Long term effects of chondrocyte death on rabbit articular cartilage 'in vivo'. *J. Bone. Joint. Surg.*, 1976, **58**, 517-26.
268. Sims JE, Giri JG, Dower SK. The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions. *Clin Immunol. Immunopathol.*, 1994, **72**, 9-14.
269. Smith CIE, Hammarström LLG, Persson UCI. Macrophage-dependance of mitogen responsiveness: macrophages exposed to zymosan enhance the response to polyanion. *Cell. Immunol.*, 1978, **41**, 134-49.
270. Smith RJ, En Chin JIA, Sam LM, Justen JM. Biologic effects of an interleukin-1 receptor antagonist protein on interleukin-1 stimulated cartilage erosion and chondrocytes responsiveness. *Arthritis Rheum.*, 1991, **34**, 78-83.
271. Smith RJ, Rohloff NA, Sam LM, Justen JM, Deibel MR, Cornette JC. Recombinant human interleukin-1 α and recombinant human interleukin-1 β stimulate cartilage matrix degradation and inhibit glycosaminoglycan synthesis. *Inflammation*, 1989, **13**, 367-82.
272. Smith RL, Allison AC, Schurman DJ. Induction of articular cartilage degradation by recombinant interleukin 1 α and 1 β . *Connect. Tiss. Res.*, 1989, **18**, 307-16.
273. Stadler J, Harbrecht BG, DiSilvio M, Curran RD, Jordan ML, Simmons RL, Billiar TR. Endogenous nitric oxide inhibits the synthesis of cyclooxygenase products and interleukin-6 by rat kupfer cells. *J. Leucoc. Biol.*, 1993, **53**, 165-72.
274. Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR, Curran RD, McIntyre LA, Georgescu HI, Simmons RL, Evans CH. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and polysaccharide. *J. Immunol.*, 1991, **147**, 3915-20.
275. 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**, 1062-69.
276. Stefanovic-Racic M, Stadler J, Evans CH. Nitric oxide and arthritis. *Arthritis. Rheum.*, 1993, **36**, 1036-44.

277. Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC, Liotta LA. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2): A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J. Biol. Chem.* 1989, **264**, 17374.
278. Stichtenoth DO, Gutzki FM, Tsikas D, Selve N, Bode-Boger SM, Boger RH, Frolich JC. Increased urinary nitrate excretion in rats with adjuvant arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 1994, **53**, 547-9.
279. Stoolman LM. Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell.*, 1989, **56**, 907-10.
280. Sullivan R, Klagsbrun M. Purification of cartilage-derived growth factor by heparin affinity chromatography. *J. Biol. Chem.*, 1985, **260**, 2399-2403.
281. Szczepanski A, Moatter T, Carley WW, Gerrisen ME. Induction of cyclooxygenase II in human synovial microvessel endothelial cell by interleukin-1. Inhibition by glucocorticoids. *Arthritis Rheum*, 1994, **37**, 495-503.
282. Tarayre JP, Delhon A, Aliaga M, Barbara M, Bruniquel F, Caillol V, Puech L, Consul N, Tisné-Versailles J. Pharmacological studies on zymosan inflammation in rats and mice. 1: zymosan-induced paw œdema in rats and mice. *Pharmacol. Res.*, 1989, **21**, 375-84.
283. Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu H, Evans C. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, **200**, 142-8.
285. Terlain B, Jouzeau J-Y, Gillet P, Lecompte T, Netter P. Cyclooxygenase inductible : du nouveau sur les relations entre anti-inflammatoires non stéroïdiens et inhibition de la synthèse des prostaglandines. *Presse Med* (sous presse).
285. Terlain B, Planche M, Gillet P, Drelon E, Gegout P, Chevrier D, Jouzeau J-Y, Netter P. Méthodes téléométriques et modèles expérimentaux ; applications en physiopathologie et en pharmacologie articulaires in *Actualités en physiopathologie et pharmacologie articulaires*. A Gaucher, P Netter, J Pourel, D Regent, D Mainard, P Gillet, Masson Ed, 131-8, 1993.
286. Tessler RH, Salmon WD. Glucocorticoids inhibition of sulfate incorporation by cartilage of normal rats. *Endocrinology*, 1975, **96**, 898-902.
287. Thomas DPP, King B, Stephens T, Dingle JT. In vivo studies of cartilage regeneration after damage induced by catabolin/interleukin-1. *Ann. Rheum. Dis.*, 1991, **50**, 75-80.
288. Tiku ML, Liesch JB, Robertsson FM. Production of hydrogen peroxyde by rabbit articular chondrocytes Enhancement by cytokines. *J. Immunol.*, 1990, **145**, 590-696.
289. Tollefsen DM, Peacock ME, Monafó WJ. Molecular size of dermatan sulfate oligosaccharides required to bind and activate heparin cofactor II. *J. Biol. Chem.*, 1986, **261**, 8854-8.
290. Trechsel U, Dew G, Murphy G, Reynolds JJ. Effects of products from macrophages, blood mononuclear cells and or retinol on collagenase secretion and collagen synthesis in chondrocytes culture. *Biochem. Biophys. Acta.* 1982, **720**, 364-70.
291. Tyler JA. Articular cartilage culture with catabolin (pig interleukin 1) synthesizes a decreased number of normal proteoglycan molecules. *Biochem. J.*, 1985, **227**, 869-78.
292. Tyler JA. Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *Biochem. J.*, 1989, **260**, 543-8.
293. van den Berg WB. Impact of NSAID and steroids on cartilage destruction in murine antigen induced arthritis. *J. Rheumatol.*, 1991, **18**, 122-3.
294. van Beuningen HM, Arntz OJ, van den Berg WB. In vivo effects of interleukin-1 on articular cartilage. Prolongation of proteoglycan metabolic disturbances in old mice. *Arthritis Rheum.*, 1991, **34**, 606-15.
295. van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg WB. Transforming growth factor-β1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophytes formation in the murine knee joint. *Lab. Invest.*, 1994, **71**, 279-90.

296. van de Loo AAJ, Arntz OJ, Otterness IG, van den Berg WB. Proteoglycan loss and subsequent replenishment in articular cartilage after a mild arthritic insult by IL-1 in mice: Impaired proteoglycan turnover in the recovery phase. *Agents Actions*, 1994, **41**, 200-8.
297. van de Loo AAJ, van den Berg WB. Effects of murine recombinant interleukin 1 on synovial joints in mice: measurement of patellar cartilage metabolism and joint inflammation. *Ann. Rheum. Dis.*, 1989, **49**, 238-45.
298. van den Berg WB, Kruijssen MWM, van de Putte LBA, van Beusekom HJ, van der Sluis-van der Pol M, Zwarts WA. Antigen-induced and zymosan-induced arthritis in mice: studies on in vivo cartilage proteoglycan synthesis and chondrocyte death. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1981, **62**, 308-16.
299. van den Berg WB, Kruijssen MWM, van de Putte LBA. The mouse patella assay. An easy method of quantitating articular cartilage chondrocyte function in vivo and in vitro. *Rheumatol. Int.*, 1982, **1**, 165-9.
300. van den Berg WB. Impact on NSAID and steroids on cartilage destruction in murine antigen induced arthritis. *J. Rheumatol.*, 1992, **18**, 122-3.
301. van den Hoff HW, van Kampen GPJ, van der Korst JK. Proteoglycan depletion of intact articular cartilage by retinoic acid is irreversible and involves loss of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 1993, **1**, 157-66.
302. van der Kraan PM, de Lange J, Vitters EL, van Beunigen HM, van Osch GJVM, van Lent P LEM, van den Berg WB. Analysis of changes in proteoglycan content in murine articular cartilage using image analysis. *Osteoarthritis Cartilage*, 1994, **2**, 207-14.
303. van der Kraan PM, Vitters PM, van Beuningen HM, van den Berg WB. Proteoglycan synthesis and osteophytes formation in 'metabolically' and 'mechanically' induced murine degenerative joint disease: an in vivo autoradiographic study. *Int. J. Exp. Path.*, 1992, **73**, 335-50.
304. van der Rest M, Bruckner P. Collagens: diversity at the molecular and supramolecular levels. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1993, **3**, 430-6.
305. van der Rest M, Mayne R. Type IX collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross-linked to type II collagen. *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**, 1615-8.
306. van Lent PLEM, van den Bersselaar L, van de Putte LBA, van den Berg WB. Immobilization aggravates cartilage damage during Antigen-induced arthritis in mice. Attachment of polymorphonuclear leucocytes to articular cartilage. *Am. J. Pathol.*, 1990, **136**, 1407-16.
307. van Osch GJVM, van der Kraan PM, van den Berg WB. Site specific inhibition of cartilage proteoglycan synthesis in the murine knee joint. Differences between 3 metabolic stimuli. *J. Rheumatol.*, 1993, **21**, 1107-12.
308. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirine-like drugs. *Nature*, 1971, **231**, 232-5.
309. Vane JR. Towards a better aspirin. *Nature*, 1994, **367**, 215-6.
310. Vaughan L, Mendler M, Huber S, Bruckner P, Winter Halter K, Irwin MH, Mayne R. D-periodic distribution of collagen type IX along cartilage fibrils. *J. Cell. Biol.*, 1988, **106**, 991-7.
311. Veis N, Hamilton JA. Colony stimulating factor-1 stimulates diacylglycerol generation in murine bone marrow-derived macrophages, but not in resident peritoneal macrophages. *J. Cell. Physiol.*, 1991, **147**, 298-305.
312. Verschure PJ, Joosten LAB, van der Kraan PM, van den Berg WB. Responsiveness of articular cartilage from normal and inflamed mouse knee joints to various growth factors. *Ann. Rheum. Dis.*, 1994, **53**, 455-60.
313. Verschure PJ, van Noorden CJF. The effects of interleukin-1 on articular cartilage destruction as observed in arthritic diseases, and its therapeutic control. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 1990, **8**, 303-313.
314. Vincenti MP, Clark IM, Brinckerhoff CE. Using inhibitors of metalloproteinases to treat arthritis: easier said than done? *Arthritis Rheum.*, 1994, **37**, 1115-26.

315. Vogel KG, Paulsson M, Heinegard D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem. J.*, 1984, **223**, 587-97.
316. von Asmuth EJU, Maessen JG, van der Linden CJ, Buurman WA. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 6 in a zymosan-induced shock model. *Scand. J. Immunol.*, 1990, **32**, 313-9.
317. von den Mark K, Mollenhauer J, Müller PK, Pfäffle M. Anchorin CII, a type-II collagen-binding glycoprotein from chondrocyte membranes. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1985, **460**, 214-23.
318. Waring PM, Carroll GJ, Kandiah DA, Buirski G, Metcalf D. Increased levels of leukemia inhibitory factor in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum.*, 1993, **36**, 911-5.
319. Weinberger A, Abramovici A, Fadila R, Levy A, Giler S, Lev A. The effect of local deep microwave hyperthermia on experimental zymosan-induced arthritis in rabbits. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, 1990, **69**, 239-44.
320. Weiss A-PC, Dorfman HD. S-100 protein in human cartilage lesions. *J. Bone. Joint. Surg.*, 1986, **68A**, 521-6.
321. Werb Z, Alexander CM. Proteinases and matrix degradation. in *Textbook of Rheumatology*. Kelley, Harris, Ruddy, Sledge Eds., Saunders WB, 1993, 248-68.
322. Westacott CI, Atkins RM, Dieppe PA, Elson CJ. Tumor necrosis factor- α receptor expression on chondrocytes isolated from human articular cartilage. *J. Rheumatol.*, 1994, **21**, 1710-5.
323. Wezeman FH, Childs GV. Ultrastructural immunohistochemical localization of anti-invasif factor (AIF) in bovine cartilage matrix. *J. Histochem. Cytochem.*, 1982, **30**, 524-31.
324. Williams TJ, Jose PJ. Mediation of increased vascular permeability after complement activation. *J. Exp. Med.*, 1981, **153**, 136-53.
325. Witsch-Prehm P, Miehke R, Kresse H. Presence of small proteoglycan fragments in normal and arthritic human cartilage. *J. Orthop. Res.*, 1992, **35**, 1042-52.
326. Woessner JF. Introduction to serial reviews: the extracellular matrix. *Faseb. J.*, 1993, **7**, 735-6.
327. Yamada KM. Cell surface interactions with extracellular materials. *Ann. Rev. Biochem.*, 1983, **52**, 761-99.
328. Yamamoto S. Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1992, **1128**, 117-31.
329. Yaron I, Meyer FA, Dayer JM, Bleiberg I, Yaron M. Some recombinant human cytokines stimulate glycosaminoglycans synthesis in human synovial fibroblast cultures and inhibit it in human articular cartilage cultures. *Arthritis Rheum.*, 1989, **32**, 173-80.
330. Zurier RB, Quagliata F. Effect of prostaglandin E1 on adjuvant arthritis. *Nature*, 1971, **234**, 304-5.

BIBLIOGRAPHIE

PHARMACOLOGY LETTERS

Accelerated Communication

**ASSAY OF CIRCULATING HYALURONIC ACID IN THE RAT:
STUDY OF DIURNAL VARIATION AND EFFECT OF ANESTHESIA**

P. Gegout*, E. Drelon*, J.Y. Jouzeau*, E. Payan*,
J.P. Payan**, D. Chevrier*, P. Gillet*, P. Fener* and P. Netter*

*Laboratoire de Pharmacologie, URA CNRS 1288, Faculté de Médecine
and **Service de Toxicocinétique et Métabolisme du Produit
Chimique, INRS, 54 505 Vandoeuvre Les Nancy, France

(Submitted May 8, 1991; accepted May 28, 1991;
received in final form June 25, 1991)

Abstract. Serum hyaluronic acid (HA) may provide a good marker for the severity of joint disease in the rat since a positive correlation was observed in experimental models of arthritis. However, little is known about its physiological variation in rats. In the present work, we do not find any circadian rhythm of HA in healthy Sprague-Dawley rats in contrast to that observed in humans, whose serum levels vary during daytime. Furthermore, the influence of blood sampling conditions on HA concentrations was evaluated in conscious animals and by using different anesthetics. The greater reproducibility for the assay of HA is observed with the intracardiac puncture under ether inhalation. Blood sample collection in the absence of anesthesia leads to a significant increase in serum levels of HA, which could be attributed partly to enhanced joint movements generated by psychological stress.

Introduction

Hyaluronic acid (HA) is widely proposed in rheumatology, as a marker for synovial inflammation, since serum levels of HA are elevated in inflammatory rheumatic diseases with destructive polysynovitis (1). Significant correlations were observed between circulating levels and tender or swollen joint indices (2) and with joint score index recorded according to Kaarela's method (3). A relationship between the increase in serum HA concentrations during normal morning activities and the duration of morning stiffness or the Ritchie articular index was also reported (4). More recently, Poole *et al.* showed a direct correlation of hyaluronate levels with the number of tender joints and joints with effusions (5). Similar results have been reported in the rat in certain experimental models (arthritis induced by Freund's complete adjuvant (6), by type II native collagen (6) or by *Lactobacillus casei* cell walls (7)) in which there is a good correlation between circulating levels of HA and the severity of joint inflammation.

Corresponding Author: Pr P Netter, URA CNRS 1288,
"Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires",
Faculté de Médecine, BP 184, 54505 Vandœuvre Les Nancy, France

0024-3205/91 \$3.00 + .00

Copyright (c) 1991 Pergamon Press plc

However, serum HA levels in the rat may be dependent on non-inflammatory stimuli such as physical activity as observed in man (4,8,9). In fact, a diurnal variation has been described in healthy human subjects as well as during rheumatoid arthritis (RA). In rodents, it is not known whether a 24 hour cycle of HA exists, although a circadian rhythm of motor activity has been observed in naive animals and during experimental arthritis (10). The aim of the present study was to investigate the existence of circadian rhythm in healthy rats, and to assess the influence of anesthesia on circulating HA levels.

Materials and methods

Animals: Sprague-Dawley female rats, 10-12 weeks of age, weighing 200 to 230 g (Iffa credo, l'Arbresle, France), were kept in a room with a 12h/12h day-night light cycle, and were given unlimited access to water and a standard diet, according to current standards concerning the confinement of laboratory animals.

Assay of HA: rat sera were assayed with the "HA test 50" radiometric assay commercialized by Pharmacia. This method involves competitive assay using the high affinity of hyaluronic acid for a protein of bovine cartilage (HABP: Hyaluronan Binding Protein), and allows a dosage in a range of 10 to 500 $\mu\text{g/l}$ with a maximum linearity between 10 and 200 $\mu\text{g/l}$ (11).

Study of diurnal rhythm: 13 rats in whom an intra-arterial catheter had been installed were maintained in individual metabolic cages without limitation for movement. These experimental conditions allowed us to investigate the kinetics of circulating HA levels in the absence of anesthesia and any handling of the animals. The catheter was installed under general anesthesia using a technique adapted from Bonnet et al (12). Each rat was placed in the decubitus position, and the neck and dorsal areas shaved. The left carotid artery was isolated and two binding wires were used to ligate it. On the cephalic side, the first ligature was tightened in order to prevent any reflux of blood. The catheter (crinotube n°1, Fandre, France) previously heparinized with a 10% solution in saline was inserted to a length of 3 cm after a V-shaped incision had been made in the artery. It was held in place by the second ligature at the cardiac side. The opposite end of the catheter was subcutaneously tunneled up to the interscapular area and came out of the body. This free extremity of the crinotube was long enough to allow blood sample collection without disturbing the animals. After a 24 hour postoperative delay, blood samples (0.3 ml) were collected every 4 hours for one daytime from 6 pm (6 pm, 10 pm, 2 am, 6 am, 10 am, 2 pm, 6 pm).

Effect of anesthesia: 40 rats were placed in plastic cages in groups of 5. They were randomly assigned to 3 groups and successively underwent intracardiac blood sampling at one week intervals (Day 0, Day 7, and Day 14). Blood sample collection was carried out randomly according to 3 modalities of sampling:

- conscious rat (group of unanesthetized rats)
- anesthesia induced by inhalation of ether (ether group)
- anesthesia induced by *im* injection of ketamine + acepromazine (ketamine group)

Samples	Day 0	Day 7	Day 14
n = 15	ether	ketamine	no anesthesia
n = 12	ketamine	no anesthesia	ether
n = 13	no anesthesia	ether	ketamine

Statistical analysis: Values are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Comparison between the different groups was performed by a two way anova test followed by a Scheffe *F* test. The variations of HA serum levels over a period of 24 hours were studied using Student's *t* test.

Results and discussion

Existence of a diurnal cycle. Diurnal serum levels of HA do not vary significantly (Table 1) in healthy Sprague-Dawley female rats. This lack of variation in circulating HA was observed in all rats, even if there was sometimes a difference in baseline levels (limits of mean values for daytime: $18.03 \pm 1.01 \mu\text{g/l}$ for rat n° 13 and $59.56 \pm 9.32 \mu\text{g/l}$ for rat n° 1).

Table 1: Diurnal variation in serum levels of HA (data are expressed as mean \pm SD in $\mu\text{g/l}$, n=13 rats)

Time	6 pm.	10 pm.	2 am.	6 am.	10 am.	2 pm.	6 pm.
[HA]	33.9 ± 14.3	35.4 ± 15.1	36.4 ± 21.4	34.0 ± 16.6	35.1 ± 16.7	43.0 ± 13.3	41.4 ± 15.1

These experimental results do not confirm the diurnal variation observed in healthy humans (8), where daytime levels (peak at 9 am) are slightly higher than night-time levels (trough at 4 am). Similarly, a significant increase in serum levels of HA has been described after the subject resumes his physical activity (getting up, washing up, etc...) (4,9). Since the morning rise in HA levels appears to be closely related to functional activity in humans, the authors suggest that this might correspond to drainage of lymph from the joint space which is more pronounced during physical activity. The elevation in circulating levels of HA following an exercise test (4) tends to support this hypothesis. In addition, in patients with rheumatoid arthritis (RA), a similar process is observed during morning stiffness (4,8,9). However, the amplitude of the variation is higher in the course of RA, since there is increased synovial production within the inflamed joints. The moderate physical activity of a catheterized rat, which is maintained alone and in a confined area (metabolic cage), might be the source of the discrepancy in results.

Effect of anesthesia. Although the practical modalities of blood sampling are always described in the literature, the animal's condition (conscious or anesthetized) is rarely specified. The retro-orbital pathway is mainly used in experimental pharmacology but remains traumatic and may be a source of psychological stress. This leads us to choose the method of intracardiac blood sample collection, which is quicker, easier to perform and avoids contamination of blood with hyaluronate derived from body tissues or fluids (7).

Table 2 : Effect of anesthesia on circulating concentrations of hyaluronic acid. (Data are expressed as mean \pm SD in $\mu\text{g/l}$).

Sample	day 0	day 7	day 14
n = 15	ether 106.2 \pm 31.3	ketamine 100.0 \pm 34.6	no anesthesia 134.5 \pm 69.2
n = 12	ketamine 105.1 \pm 77.9	no anesthesia 163.9 \pm 90.6	ether 92.1 \pm 45.5
n = 13	no anesthesia 205.0 \pm 91.8	ether 99.6 \pm 57.4	ketamine 86.1 \pm 83.1

Serum levels of HA were significantly lower in ether and ketamine groups than in conscious rats ($p=0.0001$). This effect was observed on Day 0 and Day 7 while HA levels were equivalent in all three groups at day 14. When animals were sampled in the absence of anesthesia, we observed that HA levels gradually decreased depending on the day of blood collection [200.0 \pm 91.8 $\mu\text{g/l}$ at Day 0; 169.3 \pm 90.5 $\mu\text{g/l}$ at Day 7; 134.5 \pm 69.2 $\mu\text{g/l}$ at Day 14]. This "day-related effect" was not found again for any of the two methods for induction of anesthesia: inhalation of ether or systemic injection (*im*) of neuroleptic and ketamine (Table 2).

In addition, circulating HA levels were not significantly different ($p=0.793$) according to the protocol used: 99.8 \pm 46.1 $\mu\text{g/l}$ ($n = 40$) for the ether-treated group and 97.0 \pm 65.8 $\mu\text{g/l}$ ($n = 40$) for ketamine-treated rats. This suggests that the duration of anesthesia (1 to 2 minutes with ether versus 20 to 30 minutes with the mixture of neuroleptic and ketamine) does not alter the turnover of circulating HA. However, a larger scattering of the values is observed in the ketamine treated group (CV = 67.8% versus CV = 46.2% for ether group)

Nevertheless, values observed under standard conditions for confinement of laboratory animals (5 rats per cage) were higher than those obtained with the catheterized rats. Many factors must be taken into account: living in groups, transporting and handling which induce hyperactivity (10), and stress generated by blood sampling. Indeed, each catheterized rat was kept in isolation, in a limited amount of space and blood was obtained *in situ*, with no handling or trauma.

It is possible that emotionality may contribute to the increase of circulating HA, as previously demonstrated for glycosaminoglycans (13). Indeed, fright induced by transfer to the laboratory testing room and by handling might account for the higher HA levels observed in uncatheterized rats (conscious and anesthetized rats, cf Tables 1 & 2).

However, the contribution of joint mobilization might not be underestimated although it is difficult to assess. Rats living in groups have more pronounced physical activity closely related to their social behavior, even if all samples (no anesthesia, ether, ketamine) were collected during daytime resting of the rats (2 pm). Furthermore, psychological stress (transfer, handling, blood puncture) may lead to struggling thus increasing joint outflow

through the lymphatics. This might be illustrated by the extreme levels found in conscious rats in comparison with anesthetized ones. In addition, serum HA levels lessened with the number of blood samples of conscious rats (day-related effect). This may reflect a reduced frequency of movement which could be related to the decrease in stress as a result of frequent handling.

In conclusion, our results demonstrate that there is no diurnal cycle for serum levels of hyaluronic acid in healthy Sprague-Dawley rats. Blood sampling under anesthesia allows one to partially avoid the uncheckable movements generated by emotionality and results in measurements which are reproducible over time.

Anesthesia by inhalation of ether may be convenient for prospective studies of serum HA levels during experimental arthritis. In fact, this method seems more reproducible than dissociative anesthesia, since ketamine sleeping time is significantly affected by the arthritic process through the inhibition of some drug metabolizing enzymes (cytochrome P-450).

References

1. A. ENGSTRÖM-LAURENT, R. HÄLLGREN, Ann. Rheum. Dis. 44 83-88 (1985).
2. K. HERSLEV-PETERSEN, K.D. BENTSEN, A. ENGSTRÖM-LAURENT, P. JUNKER, P. HALBERG, I. LORENZEN, Ann. Rheum. Dis. 47 116-126 (1988).
3. Y.T. KONTTINEN, H. SAARI, V.E.A. HONKANEN, K. SZOCSIK, H. MUSSALO-RAUHAMAA, R. TULENSALO, C. FRIMAN, Clin. Chim. Acta 193 39-48 (1990).
4. A. ENGSTRÖM-LAURENT, R. HÄLLGREN, Arthritis Rheum. 30 1333-1338 (1987). +9
5. A.R. POOLE, J. WITTER, N. ROBERTS, F. PICCOLO, R. BRANDT, J. PAQUIN, M. BARON, Arthritis Rheum. 33 790-799 (1990).
6. J. BJÖRK, S. KLEINAU, A. TENGBLAD, G. SMEDEGÅRD, Arthritis Rheum. 32 306-311 (1989).
7. R.L. GOLDBERG, A.S. RUBIN, J. Rheumatol. 16 92-96 (1989).
8. P. CHASSAGNE, X. LE LOET, B. DELPECH, H. LEVESQUE, J.F. MENARD, C. MAINGONAT, P. DESHAYES, Rev. Rhum. 56 775-779 (1989).
9. U. LINDQVIST, A. ENGSTRÖM-LAURENT, U. LAURENT, A. NYBERG, U. BJÖRKLUND, H. ERIKSSON, R. PETTERSSON, A. TENGBLAD, Scand. J.Clin. Lab. Invest. 48 765-770 (1988).
10. M. CASTELL, A.D. NOGUERA, T. CAMBRAS, M. RIBOT, C. CASTELLOTE, J. QUERALT, Pain, 33 379-383 (1988).
11. R. BRANDT, E. HEDLHOF, I. ASMAN, A. BUCHT, A. TENGBLAD, Acta. Otolaryngol. suppl. 442 31-35 (1987).
12. P. BONNET, J.P. FABRY, D. GRADISKI, Sci. Tech. Anim. Lab. 3 177-182 (1978).
13. P.N. SHARAEV, V.G. IVANOV, L.I. KUTYAVIN, Vop. Med. Khim. SSSR, 35 20-23 (1989).



Abstract publié dans Arthritis and Rheumatism, 1992, 35, Supplément 9, S 352

Abstracts of scientific presentations,
56th Annual scientific meeting of the American College of Rheumatology
11 - 15 Octobre 1992, Atlanta

B 150

SERUM HYALURONAN (HA) IS TRIGGERED BY PHYSICAL ACTIVITY IN RATS. Jean-Yves Jouzeau, Pascale Gegout, Eric Drelon, Denis Chevrier, Pierre Gillet, Patrick Netter and Alain Gaucher. URA CNRS 1288, 54505 Nancy, France

Circulating HA in human exhibits a circadian rhythm which is closely related to physical activity, due to an increased HA removal from the joints through the lymphatics. We studied the influence of joint movements on serum HA levels through i) struggling during blood collection in healthy rats ii) swimming few minutes in healthy and collagen-sensitized animals. In the first experiment, 3 groups of 13 rats successively received light ether or dissociative (ketamine) anesthesia or none at one week intervals (days 0.7.14). Table 1 shows a significantly higher level of serum HA ($m \pm SD$, *: $p < 0.05$) in conscious animals while both anesthetics leads to reproducible measurement over time.

Table 1	Day 0	Day 7	Day 14
ether	106 \pm 31 μ g/l	100 \pm 57 μ g/l	92 \pm 45 μ g/l
ketamine	105 \pm 78 μ g/l	100 \pm 35 μ g/l	86 \pm 83 μ g/l
none	250 \pm 92 μ g/l*	164 \pm 91 μ g/l*	135 \pm 69 μ g/l

In the second experiment, blood samples were drawn under light ether anesthesia, 4 hours before and just after a swimming of 6 minutes in temperate water (34 \pm 1°C). Table 2 shows a significant increase in serum levels of HA (*: $p < 0.05$) during exercise, either in healthy (n=13) or collagen-sensitized arthritic (n=9) and non-arthritic (n=12) rats (day 35 post-sensitization). This increase is not closely related to the severity of arthritis.

Table 2	Resting	After swimming
healthy	111 \pm 45 μ g/l	176 \pm 69 μ g/l*
CII-sensitized non arthritic	107 \pm 73 μ g/l	192 \pm 155 μ g/l*
CII-sensitized arthritic	167 \pm 139 μ g/l	292 \pm 149 μ g/l*

These results demonstrate that circulating HA is clearly triggered by physical activity in rats. Its clinical relevance in experimental arthritis should be restricted to standardized blood collection, such as puncture in the resting phase and under anesthesia.

Nom, Prénom : Pascale G E G O U T

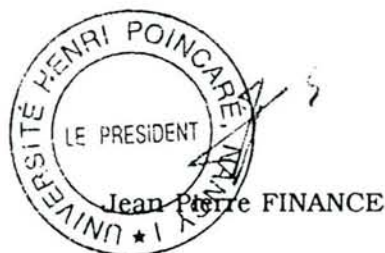
Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie et Santé

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 30 JAN. 1995 n°66

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1



RESUME

L'injection intra-articulaire de zymosan dans l'articulation fémoro-patellaire du rat induit une synovite persistante qui mime certains traits de la polyarthrite rhumatoïde. La phase inflammatoire précoce de l'arthrite évaluée par mesure biotéléométrique est caractérisée par un handicap persistant et une réponse fébrile brève. L'inflammation articulaire provoque des lésions du cartilage hyalin définies par une baisse initiale de l'anabolisme du cartilage et une déplétion marquée du contenu résiduel en protéoglycanes après 20 jours.

L'arthrite induite par le zymosan allie des processus précoces dépendants des prostaglandines et des cytokines (œdème, fièvre, douleur) avec des effets délétères sur le cartilage liés à l'IL-1. Si l'on excepte son efficacité sur la réponse fébrile, l'arthrite au zymosan est peu sensible aux anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques comme l'indométacine. A l'inverse, la dexaméthasone fait preuve de propriétés antipyrétiques et antiœdémateuses, elle restaure l'hypomobilité et exerce des effets bénéfiques sur le cartilage.

Les antagonistes aux récepteurs du leucotriène B₄, bien qu'ils soient inactifs sur la diminution de l'anabolisme initiale, exercent des effets chondroprotecteurs car ils normalisent le contenu en protéoglycanes du cartilage au terme de l'arthrite. Les antagonistes aux récepteurs du LTB₄ exercent des activités anti-inflammatoires peu marquées et à des degrés différents sur les paramètres étudiés.

MOTS-CLES

Cartilage articulaire - Arthrite induite au zymosan - Antagonistes au récepteur de leucotriène B₄ - Télémétrie - Interleukine-1 - Chondroprotection.