



HAL
open science

Intérêt de la vectorisation et/ou de l'induction des protéines de stress dans les modèles expérimentaux de pathologies ostéoarticulaires : Validation de l'électroporation biphasique

Nadège Gaborit

► **To cite this version:**

Nadège Gaborit. Intérêt de la vectorisation et/ou de l'induction des protéines de stress dans les modèles expérimentaux de pathologies ostéoarticulaires : Validation de l'électroporation biphasique. Sciences pharmaceutiques. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT : 2008NAN10127 . tel-01777270

HAL Id: tel-01777270

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777270>

Submitted on 24 Apr 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>

Ecole Doctorale « Biologie Santé Environnement »

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE NANCY UNIVERSITE – UNIVERSITE HENRI POINCARÉ

Mention : Pharmacologie

par

Nadège GABORIT

**Intérêt de la vectorisation et/ou de l'induction des
protéines de stress dans les modèles expérimentaux
de pathologies ostéoarticulaires.
Validation de l'électroporation biphasique**

Soutenue le 18 Avril 2008 devant le jury composé de :

Membres du Jury :

FREYRIA Anne-Marie, CR1 CNRS
JESSEL Nadia, CR1 (Inserm HDR)
STOLTZ Jean-François, PU-PH (HDR)

Directeur de thèse :

GILLET Pierre, PU-PH (HDR)

Membre invité :

GROSSIN Laurent, CR2 CNRS

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Docteur Laurent GROSSIN et Monsieur le Professeur Pierre GILLET de m'avoir donné la possibilité d'effectuer mon DEA et ma thèse au sein de leur équipe. Je les remercie pour leur encadrement, leurs conseils et leur soutien pendant toutes ces années.

Je remercie Monsieur le Professeur Patrick NETTER de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir fait bénéficier de cet environnement scientifique propice à l'exécution de mes travaux.

Je remercie nos collaborateurs Monsieur le Docteur Dominique DUMAS et Monsieur le Docteur Lluís MIR pour nous avoir fourni le matériel, les techniques, et les conseils nécessaires à l'aboutissement de ce travail.

Je tiens à remercier Madame le Docteur Nadia JESSEL, Madame le Docteur Anne-Marie FREYRIA et Monsieur le Professeur Jean-François STOLTZ de me faire l'honneur de juger mon travail.

Je remercie Madame le Docteur Christel HENRIONNET, Monsieur Joseph PAQUET et Monsieur le Docteur Ahmed LAROUI pour leur soutien scientifique et amical, leur gentillesse, et leur disponibilité.

Merci à Madame Stéphanie ETIENNE, Madame Emilie VELOT et Mademoiselle Clémence MATTHIEU pour leur participation active à ces expérimentations.

Je remercie Monsieur Michel THIERY pour les soins prodigués aux animaux, pour son soutien et sa bonne humeur quotidienne.

Je remercie Messieurs Vincent MORMONT et Jean-Christophe GOEBEL d'avoir réparé x fois mon ordinateur portable en sauvant mes données.

Je tiens à remercier les collègues de l'IUT Nancy-Brabois de l'option ABB, qui m'ont soutenu tout au long de ma thèse en particulier Nadine PAVLOV et Marie LESEINE (un grand merci !!!).

Je remercie également au CIES de m'avoir fait bénéficier d'une formation parallèle de moniteur et de m'avoir permis de rencontrer de nombreux moniteurs (vive les formations en résidentielle ! Merci Mr GREGOIRE, Merci Lolo et Framboise). Merci à Carine ASENSIO qui m'a donné l'opportunité d'effectuer ce monitoring durant ma thèse.

Je remercie les secrétaires, Mesdames Nadia BEZAI et Hélène TORTERAT, pour leur efficacité et leur bonne humeur, et pour m'avoir facilité de nombreuses démarches.

« Merci ! » à toutes les personnes du laboratoire qui m'ont apporté leur soutien scientifique et/ou humain, pour la transmission de leur savoir, leur disponibilité, leur gentillesse et/ou leur compréhension.

Merci à Steph, Drine, Dam, Clem, Adeline, Hélène, Elvire et Océane pour leur soutien. Merci au petit monde de l'impro Nancéenne en particulier à Alice, Hélène, Noémie et Noizette. Merci à JC pour la motivation venue de très loin.

Enfin, je remercie toute ma famille : mes parents, Marion, Lydie, Vincent, Louis-Marie, Mayumi et les loulous (Paul et Eloïse) pour leur soutien inconditionnel depuis toujours. MERCI à Angel (du fond du cœur, pour tout ce que tu as pu et continu de m'apporter). Un grand merci à vous pour m'avoir soutenu envers et contre tout, m'aidant ainsi à mener à bien ce travail.

Je dédie cette thèse à Paul, Eloïse et à ma future nièce qui sera le véritable événement de 2008...

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC	« Avidin-Biotin-Complex »
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
AS	Anti Sens
BEt	Bromure d'Ethidium
BMP	« Bone Morphogenetic Protein »
BT	Bleu de Toluidine
CMV	Cyto MegaloVirus
COX	Cyclo-Oxygénase
DAB	DiAminoBenzidine
DIG	Digoxygénine
DMF	DiMéthylFormamide
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DNase	DésoxyriboNucléase
dNTP	désoxyNucléotides TriPhosphates
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EP	Electroporation
EYFP	« Enhanced Yellow Fluorescent Protein »
FLIM	« Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy »
GAG	GlycosAminoGlycanes
GAPDH	GlycerAldéhyde-3-Phosphate DéHydrogénase
GFP	« Green Fluorescent Protein »
GRP	« Glucose Regulated Protein »
HES	Hématoxyline Eosine Safran
HSF	« Heat Shock Factor »
Hsp	« Heat shock protein »
HV	« Hight Voltage »
HVJ	« Hemagglutinating Virus of Japan » ou virus de Sendai
IL	InterLeukine
i-NOS	« inductible Nitric Oxyde Synthase »
LCA	Ligament Croisé Antérieur
LPS	LipoPolySaccharide
LV	« Low Voltage »
MIA	Mono-Iodo-Acétate
MTT	3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5 diphényltétrazolium
<i>M.tb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NO	« Nitric Oxyde »
PBS	Solution saline de phosphate
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne

PFA	Para FormAldéhyde
PG	ProtéoGlycane
RDO	Rapide Décalcifiant Osseux
RNase	RiboNucléase
RP29	« Ribosomal Protein » 29
RS	Rouge Sirius
RT	Transcription inverse
S	Sens
SDS	Sodium DodécylSulfate
SEM	Ecart Standard à la Moyenne
SVF	Sérum de Veau Foetal
TBE	Tampon Tris Borate EDTA
TGF	« Transforming Growth Factor »
TIMP	« Tissue Inhibitor of Metalloproteinases »
TNF	« Tumor Necrosis Factor »
vEGF	« vascular Endothelium Grown Factor »

SOMMAIRE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	1
I. L'articulation	2
A. Généralités	2
B. Le cartilage articulaire	3
1. Structure et fonction	3
2. Le chondrocyte	4
3. La matrice extracellulaire.....	5
4. Homéostasie du cartilage articulaire.....	9
C. La membrane synoviale	9
1. Structure et fonction	9
2. Les synoviocytes	10
3. Le liquide synovial	12
II. Les principales pathologies articulaires.....	13
A. L'arthrose.....	13
1. Physiopathologie de l'arthrose	13
2. Modèles expérimentaux d'arthrose	15
a. Modèle par section du ligament croisé antérieur	16
b. Modèle par injection de mono-iodoacétate	17
B. L'arthrite	17
1. Généralité.....	17
2. L'arthrite rhumatoïde.....	17
3. Modèles expérimentaux d'arthrite.....	19
a. Les différents modèles	19
b. Le modèle par injection de parois de Mycobactérie.....	19
III. Thérapie génique et articulation.....	20
A. Pourquoi utiliser la thérapie génique ?	20
B. Intérêt d'une thérapie génique locale.....	20
C. Les différentes méthodes de transfert de gènes.....	21
D. Electroporation	23
1. Généralité.....	23
a. Les débuts.....	23
b. Electroperméabilisation et électrophorèse	23
c. Les tissus ciblés.....	24
d. Paramètres	24
i. Les générateurs	24
ii. Les impulsions électriques	24
iii. Les électrodes	25
IV. Les protéines de stress.....	26
A. Généralités	26
B. Hsp70	28
C. Hsp27	29
D. Inhibition du protéasome et induction d'Hsp.....	30
1. Le protéasome	30
2. Les inhibiteurs du protéasome.....	32
3. MG132 : un inhibiteur réversible du proteasome.....	33
4. MG132 et induction d'Hsp	34

MATERIEL ET METHODE35

I. Expérimentation animale	36
A. Animaux	36
B. Traitement des animaux	36
1. Préparation des animaux avant traitement	36
2. Modèles expérimentaux.....	36
a. Modèle expérimental d'arthrose : au MIA	36
b. Modèle expérimental de mono-arthrite : aux parois de Mycobactéries	36
c. Modèle expérimental d'arthrose par section du ligament croisé antérieur.....	37
3. Au MG132 : inhibiteur réversible du protéasome	37
4. Mode de transfection	38
a. Injection simple	38
b. Electroporation biphasique.....	38
c. Polyplexes : in vivo jetPEI™	39
C. Sacrifice.....	40
II. Histologie.....	41
A. Préparation des échantillons	41
B. Les différentes colorations utilisées	41
1. Hématoxyline – Eosine - Safran	41
2. Bleu de toluidine.....	41
3. Rouge Sirius	41
C. Immunohistologie	42
D. Hybridation <i>in situ</i>	43
1. Marquage de la sonde à la digoxigénine	43
2. Vérification du marquage de la sonde	43
a. Par retard sur gel	43
b. Par immunodétection via un Anticorp anti-DIG.....	43
3. Protocole d'hybridation <i>in situ</i> sur coupes	44
III. Fluorescence.....	45
A. Microscopie confocale	45
B. Imagerie de durée de vie de fluorescence	45
IV. Culture cellulaire	46
A. Culture de chondrocytes et synoviocytes de rat	46
1. Primoculture de chondrocytes.....	46
2. Primoculture de synoviocytes	46
3. Entretien des cellules	46
B. Transfection transitoire par Poly-Ethylène-Imine	47
C. Traitements.....	47
1. A l'IL-1 β	47
2. Au MG132 : inhibiteur réversible du protéasome	48
D. Test de cytotoxicité	48
E. Immunocytochimie	48
F. Hybridation <i>in situ</i> sur cellules.....	50
V. Biologie moléculaire.....	51
A. Développement du vecteur pcDNA-EYFP	51
1. Technique de clonage	51
2. Maxipréparation de plasmide.....	53
B. Extraction des ARN totaux	54
1. A partir de cellules en monocouche.....	54
2. A partir de cartilage rotulien	54
3. A partir de membranes synoviales.....	55
4. Vérification de la qualité des ARN totaux	55

a. Dosage spectrophotométrique	55
b. Migration sur gel d'agarose	55
C. Transcription inverse	55
1. Avec la reverse-transcriptase M-MLV	55
2. Avec la transcriptase inverse iScript™	56
D. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	56
1. PCR semi-quantitative	56
2. PCR quantitative en temps réel	57
a. Principe	57
b. Protocole expérimental	59
c. Courbe de fusion	59
d. Analyse des résultats	60
VI. Biochimie	61
A. Mesure de la biosynthèse des protéoglycanes	61
B. Extraction protéique à partir de cellules en monocouche	61
C. Dosage des protéines par la méthode de BCA	62
D. Western-blot	62
VII. Analyse statistique	63

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1 : Mise au point des outils d'analyse	65
I. Développement des vecteurs pcDNA.3.1-Hsp70-GFP et pcDNA.3.1-Hsp27-GFP	65
A. Objectifs	65
B. Construction des vecteurs pcDNA3.1-Hsp70-GFP et pcDNA3.1-Hsp27-GFP	65
C. Vérification de l'efficacité de transfection	66
1. Mise en évidence de l'expression des ARNm Hsp70 et Hsp27 par RT-qPCR	66
2. Mise en évidence de l'expression des protéines Hsp70 et Hsp27 par immunocytochimie	67
3. Mise en évidence par hybridation <i>in situ</i> de la présence du plasmide pcDNA-GFP-Hsp70 dans les chondrocytes transfectés	68
II. Développement du vecteur pcDNA-EYFP	70
A. Construction du vecteur pcDNA-EYFP	70
B. Vérification de l'efficacité de transfection	72
1. par immunocytologie	72
2. par microscopie de fluorescence	72
CHAPITRE 2 : Electrotransfert <i>in vivo</i> chez le rat	74
I. Evaluation de l'application d'impulsions électriques par le Cliniporator	74
A. Applications des impulsions sur le muscle squelettique de rat	75
1. Evaluation des effets délétères des impulsions HV et LV sur le muscle squelettique	76
B. Induction de l'expression de protéines de stress (HSP)	76
II. Applications des impulsions sur cartilage articulaire d'animaux sains	81
A. Aspect général	81
B. Histologie classique	82
C. Synthèse de protéoglycanes	83
D. Dissémination du plasmide dans la membrane synoviale	85
E. Hybridation <i>in situ</i> (localisation)	87
1. Vérification du marquage de la sonde	87
a. Par la technique de retard sur gel	87
b. Par immunodétection	88
2. Localisation du plasmide pcDNA-EYFP par hybridation <i>in situ</i>	89
III. Applications des impulsions sur cartilage articulaire d'animaux pathologiques	90
A. Modèle par injection de paroi de Mycobactéries :	90

1. Aspect général.....	91
2. Histologie Classique.....	91
3. Anabolisme.....	93
4. Biologie moléculaire.....	93
5. Conclusion.....	97
B. Modèle au Mono-Iodo-Acetate :	97
1. Aspect général.....	98
2. Histologie classique.....	98
3. Anabolisme.....	100
C. Conclusion.....	100
IV. Discussion.....	101
CHAPITRE 3 : MG132 et cartilage articulaire.....	104
I. Test des effets du MG132 <i>in vitro</i>	104
A. Evaluation de la cytotoxicité du MG132 <i>in vitro</i>	104
1. Cas du MG132 dilué dans du DMSO 1%o.....	105
a. Dans les chondrocytes.....	105
b. Dans les synoviocytes.....	106
2. Cas du MG132 dilué dans de l'éthanol 1%o dans les synoviocytes.....	107
B. Induction des protéines Hsp70 et HSP27 par le MG132.....	108
1. Objectifs.....	108
2. Mise en évidence de l'expression des protéines Hsp70 et Hsp27.....	108
a. Par western-blot.....	108
b. Par immunocytochimie.....	110
3. Mise en évidence de l'expression des ARNm d'Hsp70 par RT-PCR.....	110
4. Traitement des synoviocytes.....	111
5. Traitement des chondrocytes.....	113
C. Effet du MG132 <i>in vitro</i> en pré-traitement sur des cellules stimulées à l'IL-1 β	115
1. Choix de la durée d'exposition à l'IL-1.....	115
2. Mise en évidence.....	115
a. Cas du MG132 dilué dans du DMSO 1%oo.....	116
b. Cas du MG132 dilué dans de l'éthanol 1%o.....	117
II. Intérêt du MG132 <i>in vivo</i> , sur un modèle d'arthrose expérimentale par section des ligaments croisés antérieurs.....	118
A. Caractérisation du modèle.....	118
.....	119
B. Effet de l'Induction d'Hsps par le MG132.....	119
1. Objectifs.....	119
2. Induction des protéines de stress (Hsp70 & Hsp27) par le MG132.....	120
3. Optimisation de l'induction d'Hsp70 par le MG132.....	120
a. Vérification de l'innocuité d'une injection intra-articulaire de MG132 par semaine pendant 1 mois.....	120
b. Vérification de l'efficacité d'induction d'Hsp70 par le MG132.....	121
C. Evaluation histologique du potentiel protecteur du MG132 sur le modèle de section du LCA ...	123
III. Discussion.....	126

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES...129

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. L'articulation

A. Généralités

Les articulations auxquelles nous nous sommes intéressées sont les diarthroses, qui sont des articulations mobiles par opposition aux articulations dites immobiles telles que les sutures crâniennes (synarthroses), ou articulations peu mobiles telles que la symphyse pubienne (amphiarthroses). Ces articulations sont celles retrouvées le plus fréquemment dans l'organisme. Elles sont constituées : de segments osseux présentant des surfaces articulaires, elles-mêmes recouvertes de cartilages articulaires, d'une capsule articulaire qui est une enveloppe fibreuse et élastique entourant l'articulation et permettant de maintenir en contact ses différents constituants, d'une membrane synoviale qui tapisse la paroi interne de cette capsule et sécrète le liquide synovial, de ligaments qui sont des tissus conjonctifs élastiques très résistants et joignent les segments osseux entre eux, de bourses séreuses qui sont fixées aux os à proximité des articulations et facilitent le glissement des structures et sont remplies de liquide synovial, et, de tendons qui sont des tissus fibreux reliant les muscles aux os. Enfin, dans certains cas, les ménisques qui sont de petites structures fibro-cartilagineuses, sont présents entre les deux surfaces articulaires pour assurer un meilleur contact et favoriser leur glissement [Chevalier et Richette, 2005]. La *figure 1* représente un exemple de diarthrose : l'articulation du genou.

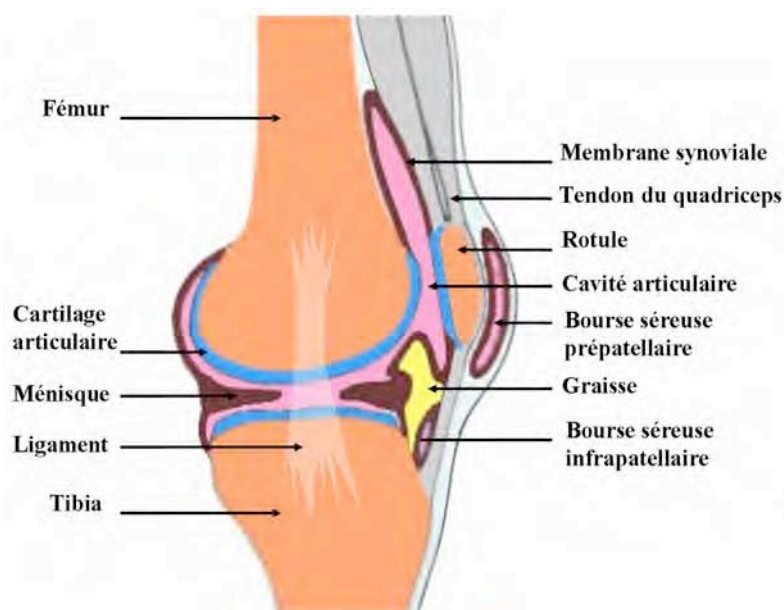


Figure 1 : Schéma de l'articulation du genou, vue latérale

B. Le cartilage articulaire

1. Structure et fonction

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif recouvrant les surfaces de frottement des articulations, il est très souple et présente une forte capacité de déformabilité. C'est un cartilage hyalin qui a pour fonction de faciliter les mouvements articulaires et de limiter les pressions exercées dans les zones portantes ou lors de chocs. Ce tissu est constitué d'un seul type de cellules : les chondrocytes, d'une matrice extracellulaire très dense, et d'eau ; il n'est ni innervé, ni vascularisé. L'apport nutritionnel de ce tissu se fait *via* le liquide synovial dans lequel il baigne, ou, en ce qui concerne les couches inférieures du cartilage, *via* l'os sous-chondral.

Ce tissu est organisé en plusieurs couches qui diffèrent de par la morphologie des chondrocytes qu'elles renferment, ainsi que par la structure et le contenu de la matrice extracellulaire (*figure 2*).

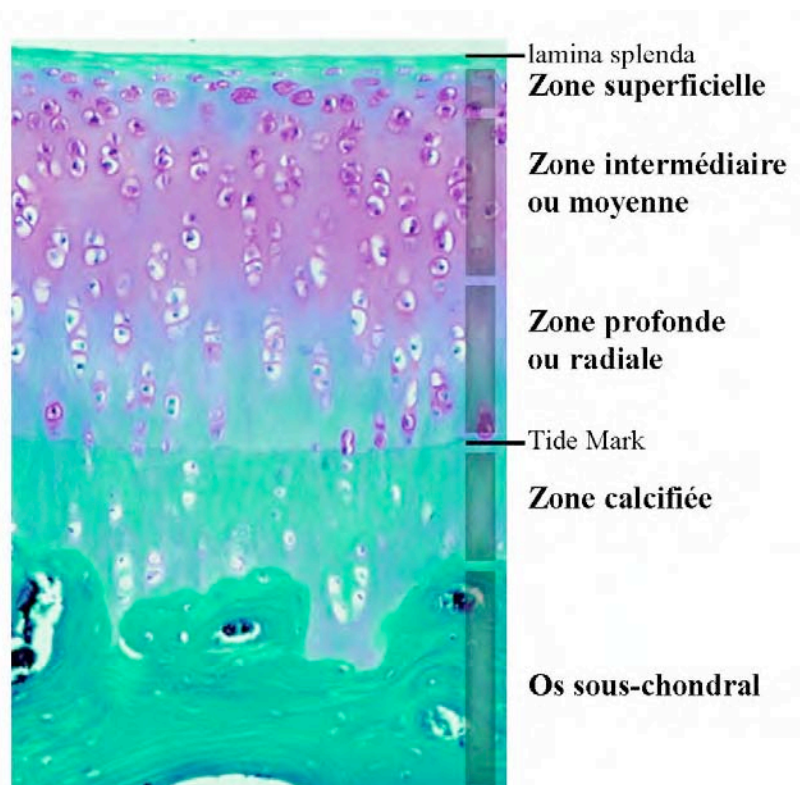


Figure 2 : Les différentes couches du cartilage articulaire

Tout d'abord, une zone acellulaire nommée *lamina splend*a recouvre la couche superficielle, permettant l'accrochage de macromolécules provenant du liquide synovial, qui vont protéger la surface du cartilage. La couche superficielle comprend des chondrocytes ayant l'aspect de fibroblastes, la matrice extracellulaire y est principalement constituée de fibronectine, de fibres de collagènes disposées parallèlement à la surface du cartilage - ce qui lui permet de résister à de fortes tensions - et de quelques protéoglycanes. De gros chondrocytes sphériques composent la couche intermédiaire. Celle-ci comprend un réseau non organisé de fibres de collagènes, et un contenu en protéoglycanes plus dense. La couche profonde qui présente une structure très riche en protéoglycanes, où les fibres de collagènes sont disposées perpendiculairement à la surface, est constituée de petites colonnes de chondrocytes. Une ligne de démarcation basophile, véritable barrière empêchant l'angiogenèse de l'os sous-chondral vers le cartilage, sépare la couche profonde de la couche inférieure, dite calcifiée du fait de sa concentration élevée en calcium. Cette dernière est une région très pauvre en protéoglycanes qui comprend des fibres de collagènes arrangées perpendiculairement à la surface du cartilage, et ancrées au niveau de l'os sous-chondral. La couche calcifiée est composée de chondrocytes arrondis, contenus dans de petites cavités non calcifiées [Huber *et coll.*, 2000].

2. Le chondrocyte

Les chondrocytes sont des cellules mésenchymateuses, très différenciées et hautement spécialisées. Ils représentent 1 à 10 % du volume total du cartilage, selon l'âge de l'individu et le type d'articulation. La densité et l'apparence des cellules varient selon la zone où ils se trouvent. Elles se divisent très peu dans un cartilage sain, et n'ont aucune mobilité.

La plupart du temps, les chondrocytes ont un aspect sphérique, de 30 à 40 µm de diamètre. Ils possèdent un noyau central assez développé, des mitochondries et des vacuoles lysosomiales. Ces cellules vivent principalement en anaérobie (le cartilage étant un tissu qui fonctionne en hypoxie), mais cette particularité varie selon la zone du cartilage. En effet, en surface, les chondrocytes peuvent fonctionner partiellement en aérobie par diffusion du dioxygène présent dans le liquide synovial.

La principale fonction des chondrocytes est de fabriquer les constituants de la matrice extracellulaire, et de maintenir l'homéostasie du cartilage. Ainsi, ils produisent et organisent très minutieusement la structure du cartilage en fibres de collagènes, protéoglycanes, et molécules non collagéniques. Leur activité métabolique diffère selon les zones du cartilage et

selon les stimuli mécaniques, électriques et physicochimiques transmis par la matrice extracellulaire [Muir, 1995].

3. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est une sorte de gel renforcé par des fibres. Elle est composée de 70 à 80 % d'eau, et de 20 à 30 % de macromolécules, ainsi que de petites protéines, de gaz, d'électrolytes dissous et de métabolites. Elle peut être divisée en trois zones, la matrice péricellulaire, la matrice territoriale et la matrice interterritoriale, du plus proche au plus éloigné du chondrocyte.

En effet, chaque chondrocyte est entouré par une matrice péricellulaire, qui assure la protection hydrodynamique du chondrocyte. La cellule entourée de ce microenvironnement se nomme le chondron. Cette zone, d'un pH acide facilitant l'activité enzymatique péricellulaire, est très riche en protéoglycanes sulfatés, acide hyaluronique, biglycanes, collagènes de type VI, et molécules non collagéniques telles que l'anchorine ou la fibronectine.

Les matrices, territoriale et interterritoriale, de pH physiologique, sont constituées principalement de collagènes et de protéoglycanes (*figure 3*). La matrice extracellulaire territoriale retrouvée principalement dans les couches, superficielle, intermédiaire et profonde du cartilage, est constituée de fibres de collagènes de large diamètre et de forte concentration de protéoglycanes riches en chondroïtine sulfate. La matrice interterritoriale contient des protéoglycanes particulièrement riches en kératane sulfate, et des collagènes, majoritairement retrouvés sous forme de fibres de gros diamètre [Huber *et coll.*, 2000].

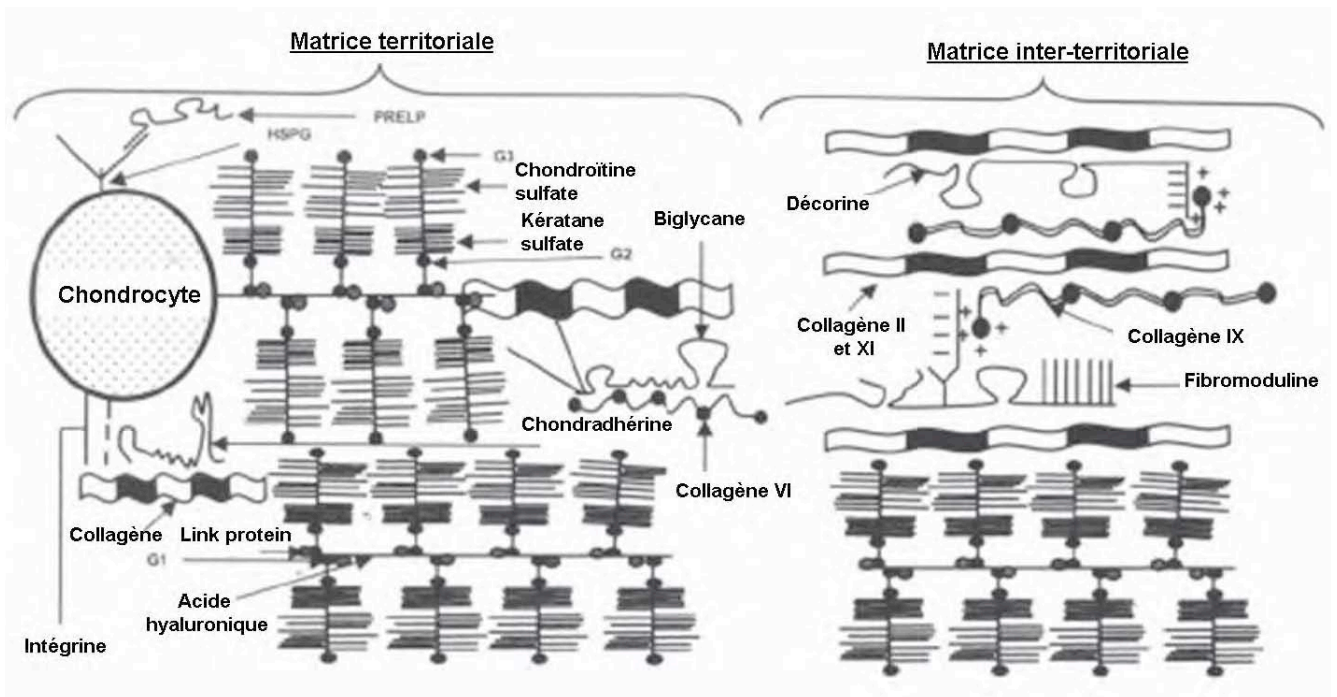


Figure 3 : Principaux composants de la matrice cartilagineuse extracellulaire
Composition des matrices, territoriale (proche des chondrocytes) et interterritoriale (plus distante des cellules). [Kiani *et coll.*, 2002]

Les collagènes :

Les fibres de collagènes sont composées de trois chaînes α polypeptidiques formant une triple hélice. Elles sont secrétées par la cellule sous forme de procollagènes. Chacune de ces trois chaînes est formée de plusieurs domaines collagéniques (répétition d'un triplet d'acides aminés : Glycine - X - Y, X et Y étant un tiers du temps proline et hydroxyproline) et non collagéniques. Il en existe différents types qui se distinguent par leur structure interne, leur aspect fibrillaire ou non fibrillaire, leur diamètre et leur orientation.

Le collagène de type II est à la base de l'architecture du cartilage, il lui confère notamment ces propriétés de résistance à la compression. Etant caractéristique du cartilage, il représente un marqueur de chondrocyte normal, et témoigne de son caractère différencié en culture cellulaire. Il existe deux catégories de collagènes de type II, la forme II-A, exprimée par le chondrocyte en cours de développement, et la forme II-B, exprimée par les chondrocytes du cartilage adulte. Cependant, le collagène de type II n'est pas spécifique du cartilage, car il est également retrouvé dans d'autres tissus. Bien qu'il représente à lui seul 80 à 90 % des collagènes totaux, d'autres types sont également présents. C'est le cas du collagène de type VI qui serait impliqué dans l'adhésion du chondrocyte à la matrice extracellulaire. Le collagène de type IX représente quand à lui 1 % des collagènes. Il est lié de façon covalente aux fibres de collagène de type II,

et favoriserait les interactions fibrilles-fibrilles ou fibrilles-protéoglycanes. Le collagène de type X est également retrouvé. C'est le seul collagène totalement spécifique du cartilage articulaire. Il est présent autour des chondrocytes hypertrophiques et dans la zone calcifiée du cartilage articulaire. Il serait impliqué dans le processus de minéralisation. Enfin, le collagène de type XI représente 2 à 3 % des collagènes totaux, et est souvent retrouvé près du collagène de type II. Il a été démontré que les collagènes de type II et XI étaient réticulés dans le cartilage et qu'avec le collagène de type IX ils formaient des fibrilles hétérotypiques chez le rat. De plus, le collagène de type XI apparaît, chez le bovin, au cœur des fibres de collagène de type II et le collagène de type IX à leur surface [Petit *et coll.*, 1993]. Les **figures 4 et 4 bis** représentent l'hétérofibrille formée par les collagènes de type II, IX et XI.

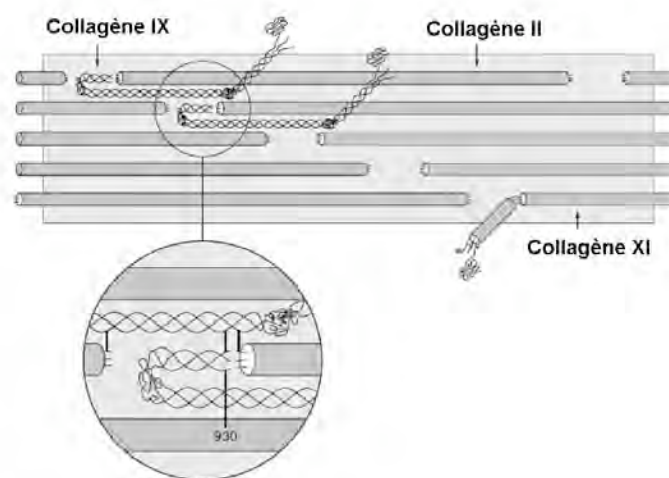


Figure 4 : Hétérofibrille des collagènes II, IX et XI,

Modèle moléculaire d'interaction entre les fibres de collagènes de type II, et les collagènes de type IX et XI. [Eyre *et coll.*, 2001]

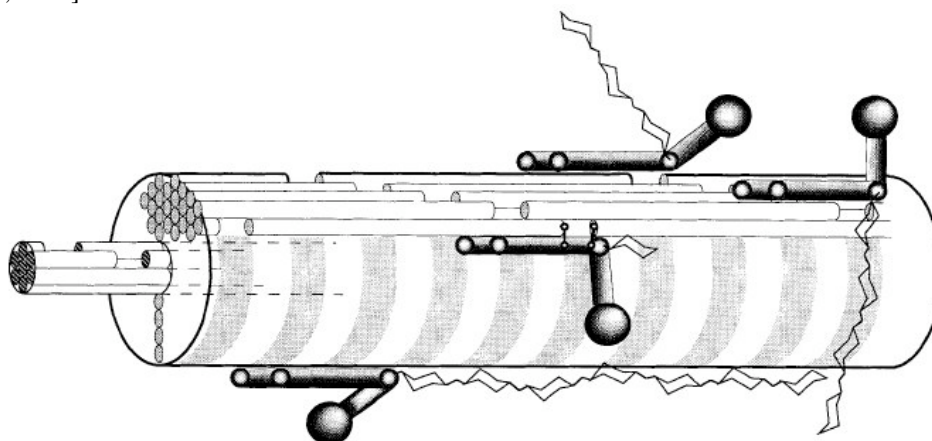


Figure 4 bis : Représentation schématisque de l'organisation dans les fibrilles du cartilage

Une protéine core de 4 molécules de collagènes XI (●) est entouré de molécules de collagènes II (⊙). Les collagènes de type IX sont attachés à la surface de la fibrille de manière antiparallèle. Les régions triple hélices des collagènes sont désignées par des cylindres avec une largeur très exagérée. Les domaines non-hélicoïdaux des collagènes de type IX sont représentés par des sphères ombrées. Le domaine N-terminal, non-hélicoïdal (NC4) correspond aux plus grosses sphères. Les ↓ désignent les liaisons dérivées de l'hydroxylysine entre les collagènes de type IX et de type II. Les chaînes chondroïtine-sulfates (⌘) de longueur variable sont attachées au second domaine non-hélicoïdal de l'extrémité N-terminale (NC3). [Bruckner et Van Der Rest, 1994]

Les protéoglycanes :

Les protéoglycanes sont des molécules constituées de chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) reliées à une protéine axiale appelée : protéine core. Les GAG sont composées de répétitions de disaccharides (un sucre aminé et un acide hexuronique) qui forment de longues chaînes polysaccharidiques chargées positivement. Ces disaccharides, qui ont la propriété de capter les ions Ca^{2+} et Na^+ , sont à l'origine de la capacité des protéoglycanes à attirer les molécules d'eau, car ces disaccharides comprennent au moins une charge négative sur leur groupement carboxyle ou sulfate. Cette propriété permet aux protéoglycanes de créer une pression osmotique et d'assurer l'hydratation du cartilage, entraînant ainsi la tension des fibres de collagènes, à l'origine des capacités fibroélastiques du cartilage articulaire.

Il existe deux types de protéoglycanes dans le cartilage articulaire : les protéoglycanes de masse molaire élevée (en particulier : l'agrécane) qui représentent 90 % des protéoglycanes totaux, et les protéoglycanes de faible masse molaire.

Les agrécanes sont constituées d'une protéine core de 237 à 248 kDa, sur laquelle sont fixées des chaînes de chondroïtine sulfate et de kératane sulfate. Cette protéine se lie à l'acide hyaluronique de façon non covalente par sa région N-terminale. Une petite glycoprotéine (« link protein ») stabilise cette liaison en se fixant simultanément à l'acide hyaluronique et à la protéine core. Cependant, la composition des agrécanes dépend également de l'âge et de la zone du cartilage. Les fibres de collagènes interagissent avec les régions riches en kératane sulfate de la plupart des agrécanes. L'acide hyaluronique qui lie les molécules d'agrécanes, est également relié aux fibres de collagènes. Il est synthétisé par les chondrocytes et est tout particulièrement abondant dans la zone intermédiaire du cartilage.

La matrice extracellulaire comprend également des protéoglycanes de forte masse molaire, non agrégés, qui pourraient provenir de la dégradation d'agrécanes.

Les petits protéoglycanes, tels que les biglycanes, la décorine, et la fibromoduline, représentent environ 3 % des protéoglycanes totaux. Ils sont liés aux macromolécules et favorisent leur stabilisation [Chevalier et Richette, 2005].

Protéines non collagéniques :

Elles semblent intervenir, pour la plupart, dans le maintien et la stabilisation de la structure de la matrice extracellulaire. Par exemple : l'anchorine CII intervient dans l'ancrage du réseau collagénique au chondrocyte, et, la tenascine et la fibronectine interagissent, elles aussi, avec les chondrocytes et la matrice. Leurs fonctions sont mal connues, mais, elles pourraient jouer un rôle lors de pathologies articulaires, telles que l'arthrite rhumatoïde ou l'arthrose.

4. Homéostasie du cartilage articulaire

L'homéostasie du cartilage représente l'équilibre entre la biosynthèse et la dégradation des constituants matriciels. Elle est retrouvée dans des conditions physiologiques normales. Les chondrocytes et les synoviocytes vont être stimulés par des cytokines (interleukines, interférons, TNF et facteurs de croissance) anti-inflammatoires et pro-inflammatoires, mais également par des stress mécaniques ou électriques, des contacts intercellulaires, ou des contacts cellule-matrice, grâce à différents récepteurs à la surface des cellules [Huber *et coll.*, 2000]. Ces stimuli vont entraîner l'activation ou l'inactivation de l'expression de plusieurs gènes codant pour les différents acteurs du maintien de l'homéostasie du cartilage, les macromolécules de la matrice, les protéases matricielles, mais également les cytokines, elles-mêmes.

Il existe quatre principales catégories d'enzymes protéolytiques : aspartique, cystéine, sérine et métalloprotéases (MMPs). Les MMPs sont une famille d'endoprotéinases qui dégradent tous les composants matriciels. Elles comprennent au moins trois collagénases MMP-1, MMP-8 et MMP-13 qui détruisent les fibres de collagènes. Ces MMPs sont hautement régulées, notamment par des inhibiteurs de métalloprotéases, les TIMPs. Parmi les métalloprotéases, il existe également des agrécanases telle que ADAMTS-1, ADAMTS-2 et ADAMTS-5 qui font partie des ADAMTS ; sous famille des ADAM (désintégrines et métalloprotéases) avec un motif thrombospondine [Nagase et Kashiwagi, 2002].

Dans certaines pathologies ostéoarticulaires, telles que l'arthrose ou l'arthrite, des cytokines pro-inflammatoires vont perturber l'homéostasie du cartilage et la faire évoluer vers une dégradation des macromolécules de la matrice extracellulaire. Dans ce cas, les protéoglycanes, en particulier l'agrécane, vont être rapidement détériorés suite au stimulus inflammatoire, mais ils peuvent rapidement être remplacés, si ce stimulus s'arrête. Les collagènes vont être plus résistants à la dégradation, mais également plus difficiles à remplacer [Rowan, 2001].

C. La membrane synoviale

1. Structure et fonction

La synoviale est un tissu conjonctif différencié, organisé en deux couches : la couche sous-intimale (subintima), qui se trouve en contact avec la capsule articulaire, et la couche intimale (intima) en contact avec la cavité articulaire.

La subintima est une partie fibreuse, riche en cellules, beaucoup plus vascularisée que l'intima. Elle comprend des fibroblastes, des macrophages, des mastocytes, des adipocytes et des fibres de collagènes. Elle contient aussi de très nombreux capillaires dans la partie la plus superficielle, des artérioles et des vaisseaux lymphatiques.

L'intima est composée d'une assise de cellules ne dépassant pas trois cellules d'épaisseur, dans des conditions physiologiques normales. Les cellules de l'intima sont appelées synoviocytes. La **figure 5** représente une membrane synoviale issue d'un genou de rat.

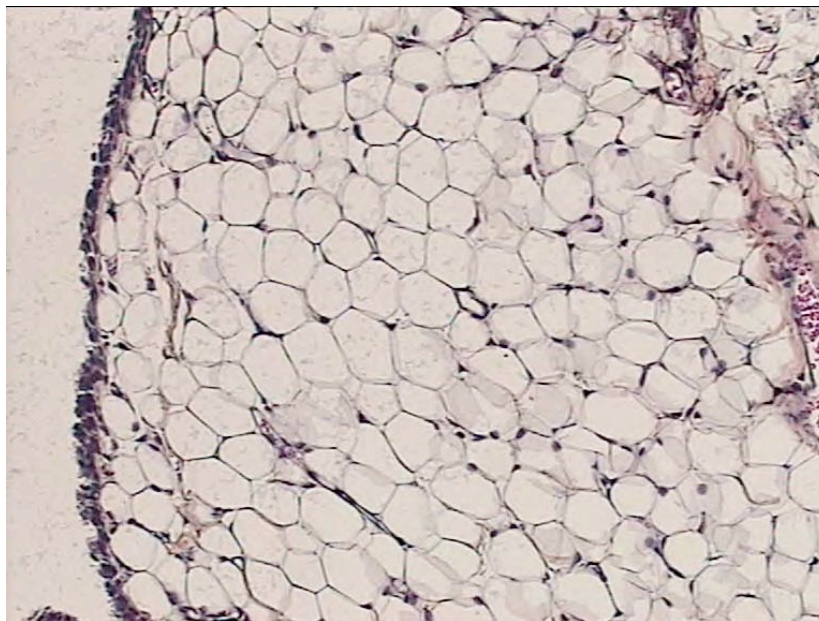


Figure 5 : Photo d'une membrane synoviale observée en microscopie optique, coloration à l'hématoxyline (grossissement x160), les synoviocytes de type A et B se trouvent principalement sur la surface de l'intima à gauche de la photographie.

La synoviale a plusieurs fonctions. Tout d'abord, elle assure la trophicité de l'articulation. En effet, elle participe à ses propriétés mécaniques et à sa stabilité. Ensuite, elle constitue une barrière de filtration et d'échanges, en particulier de par sa participation active à la formation du liquide synovial. Enfin, elle joue un rôle de défense contre les agressions extérieures et peut être considérée comme un organe immunitaire [Edwards, 1994].

2. Les synoviocytes

Les synoviocytes sont principalement de deux types : le type A, représentant les cellules macrophagiques, non fixées, dérivant de cellules souches sanguines mononuclées, et le type B, constitué des cellules fibroblastiques. Ces deux types cellulaires sont représentés dans la **figure 6**. Un troisième type de cellules intimaux, intermédiaire entre les types A et B,

a cependant été décrit. Il est constitué de cellules dendritiques et représente moins de 1 % des cellules intimes [Fitzgerald et Bresnihan, 1995].

Les synoviocytes de type A sont généralement ronds et situés à la surface de l'intima. La surface de ces cellules est couverte de microvillosités et de microplis qui sont des structures caractéristiques des macrophages. Elles ont une structure riche en lysosomes, de larges vacuoles et des vésicules pinocytaires situées principalement à proximité de la cavité articulaire. Elles possèdent un appareil de Golgi très développé mais un petit réticulum endoplasmique granuleux. Dans des conditions physiologiques normales, les cellules de type A, peuvent absorber et dégrader les constituants extracellulaires, les débris cellulaires, les microorganismes et les antigènes dans le liquide synoviale ou dans la matrice de l'intima grâce à leurs systèmes vésiculaire et lysosomiale très développés. Elles expriment également les molécules du système majeur d'histocompatibilité de classe II et jouent un rôle prépondérant dans la présentation de l'antigène et les phases primaires de la réponse immunitaire.

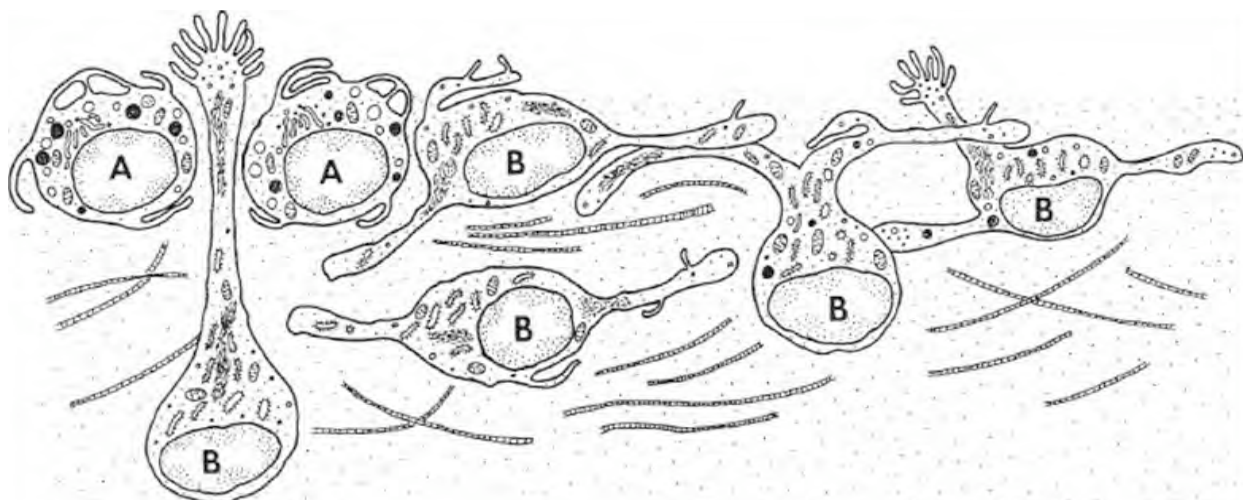


Figure 6 : Schéma représentant les deux types de synoviocytes et leurs localisations possibles dans l'intima
les synoviocytes de type A (macrophagiques) et les synoviocytes de type B (fibroblastiques)
[Iwanaga *et coll.*, 2000]

Les synoviocytes de type B sont des cellules possédant un noyau relativement gros. Elles ont un réticulum endoplasmique particulièrement développé, ce qui témoigne de l'importance de leur fonction de biosynthèse protéique. Contrairement aux cellules de type A, elles présentent peu de vacuoles et de vésicules, et possèdent un appareil de Golgi nettement moins développé. Les synoviocytes de type B présentent à la surface de leur membrane plasmique de petites alvéoles. De plus, elles développent des microfilaments et filaments de manière longitudinale, au niveau de leur cytoplasme. Les cellules de type B sécrètent des

collagènes et de la fibronectine, de l'acide hyaluronique et d'autres GAG dans l'espace interstitiel de l'intima et dans la cavité articulaire, et sont donc impliquées directement et indirectement dans le contrôle de la composition protéique du liquide synovial [Iwanaga *et coll.*, 2000].

3. Le liquide synovial

Le liquide synovial a pour fonctions de lubrifier l'articulation et d'absorber les chocs. Il représente également une source de nutrition sous forme de glucose pour le cartilage articulaire. C'est un dialysat de plasma sanguin qui doit ses propriétés viscoélastiques à la présence d'acide hyaluronique parmi ces constituants. Sa composition dépend de la bonne santé de l'articulation. Dans des conditions physiologiques normales, le liquide synovial comprend de l'acide hyaluronique, des protéines, principalement de l'albumine et de la γ -globuline, et de très faibles quantités de protéines de haut poids moléculaire, tels que le fibrinogène, les IgM, les inhibiteurs de métalloprotéases, et l' α 2-macroglobuline. Il est constitué, par ailleurs, de cytokines, de collagènes, d'enzymes, de protéoglycanes et de fibronectine en faibles concentrations, d'électrolytes (Na^+ et Cl^-), de petites molécules comme l'urée et le glucose, et contient des lipides en très faibles quantités. Les constituants cellulaires du liquide synovial sont les leucocytes : lymphocytes, monocytes, clasmocytes, synoviocytes de type A, et cellules polynucléaires.

Dans des conditions physiopathologiques, le liquide synovial présente des modifications de sa composition avec une diminution du poids moléculaire et de la concentration en acide hyaluronique (ce qui entraîne une baisse de sa viscosité et de son élasticité), une augmentation de son contenu en protéines et en lipides avec notamment une hausse de la quantité de cholestérol estérifié, et une apparition de triglycérides. Une augmentation de ses constituants cellulaires est également retrouvée.

Le liquide synovial se révèle être un bon outil de diagnostic des pathologies ostéo-articulaires. C'est pourquoi il peut être prélevé au cours d'analyses cliniques, en cas de suspicion d'atteinte de l'articulation. Plusieurs paramètres seront alors évalués : sa couleur, sa limpidité, sa viscosité, et sa cytologie. [Fam *et coll.*, 2007]

II. Les principales pathologies articulaires

Le cartilage articulaire n'est pas à l'abri des détériorations et des maladies. Ainsi, des facteurs chimiques ou mécaniques vont accélérer le processus de dégénération du cartilage. Il existe différentes pathologies susceptibles d'affecter les surfaces articulaires. Les principales sont l'arthrose et l'arthrite rhumatoïde.

A. L'arthrose

1. Physiopathologie de l'arthrose

L'arthrose est une maladie articulaire dégénérative d'évolution chronique. C'est une pathologie touchant particulièrement les genoux, les hanches, les épaules, les doigts, les pieds ou encore le rachis. Lorsque plus de deux articulations sont touchées, l'arthrose est dite généralisée. Plusieurs facteurs augmentent le risque d'atteinte arthrosique : des facteurs systémiques (l'âge, le sexe, l'appartenance ethnique, la génétique, l'état hormonal, la densité osseuse, et les facteurs métaboliques et nutritionnels), mais également des facteurs biomécaniques locaux (l'obésité, une déformation ou une altération de l'articulation, une faiblesse musculaire, l'activité physique répétée de certains métiers ou certains sports augmentant les risques d'atteintes articulaires).

Le symptôme le plus évident de l'arthrose, est la douleur survenant lorsque l'articulation est en mouvement. Les patients présentent souvent une raideur matinale. Ces douleurs peuvent être accompagnées de contractures et spasmes musculaires, de blocages articulaires, ou de craquements au niveau de l'articulation. A un stade avancé, la douleur empêche le malade de dormir, et limite sa mobilité pendant la journée. L'arthrose est parfois associée à une inflammation plus ou moins aiguë, ce qui a pour effet de provoquer le renflement de l'articulation. La *figure 7* représente les dommages subis par l'articulation au cours de l'arthrose.

L'arthrose est caractérisée par une perte de cartilage, associées à des modifications de l'extrémité osseuse, scléroses, ostéophytes. La perte de cartilage dans l'arthrose peut commencer par une lésion focale et s'étendre progressivement à la totalité de l'articulation, engendrant des lésions au niveau des surfaces articulaires, et entraînant la dégénération progressive du cartilage. Cette dégénération est associée à une perte de la teneur en protéoglycanes et le clivage des fibres de collagène de type II. L'homéostasie du cartilage va être rompue et la dégradation des produits matriciels deviendra supérieure à leur biosynthèse.

La première cause de ce phénomène est l'augmentation des protéases matricielles, notamment des MMP-3, MMP-13, MMP-14 et des agrécanases ADAMTS-1, ADAMTS-4 et ADAMTS-5, associée à une diminution des inhibiteurs de MMPs, les TIMPS. Plus tard le pH de la cavité articulaire diminue, permettant aux cathepsines de participer à la dégradation du cartilage. D'autres acteurs tels que les cytokines, IL-1 et TNF- α vont être impliqués dans cette dégradation. Les cytokines pro-inflammatoires, alors surexprimées, vont entraîner une augmentation d'oxyde nitrique, et favoriser l'apoptose des chondrocytes, tout comme la prostaglandine PGE2 ou les leucotriènes. L'inflammation survient plus ou moins tôt lors de l'arthrose, ces conditions inflammatoires augmenteraient les concentrations de MMP dans le liquide synovial et accéléreraient les dommages articulaires [Sarzi-Puttini *et coll.*, 2005].

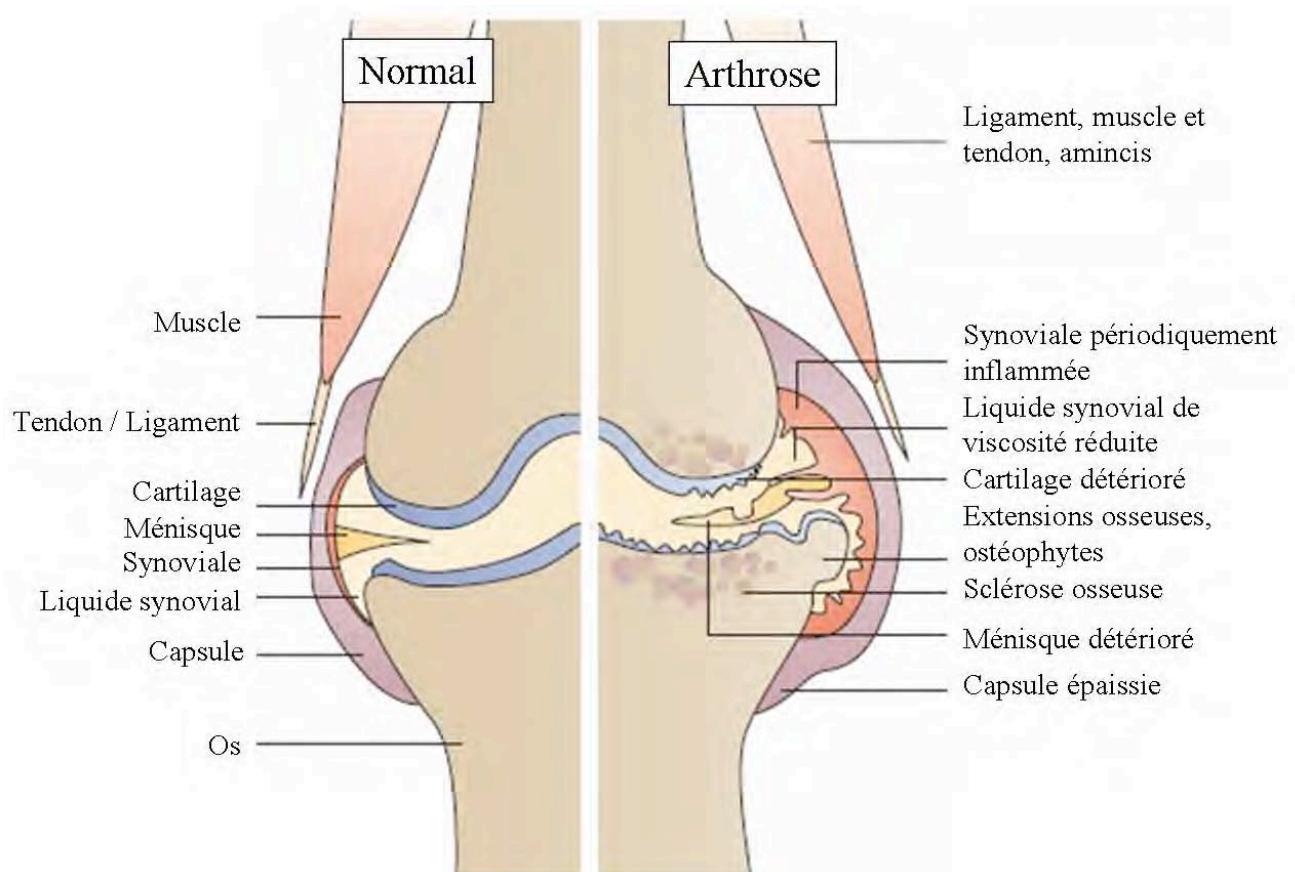


Figure 7 : Comparaison des structures articulaires saines et arthrosiques.

[Wieland *et coll.*, 2005]

2. Modèles expérimentaux d'arthrose

Afin d'effectuer des recherches à but thérapeutique sur les maladies telles que l'arthrose, différents modèles expérimentaux ont été mis en place en utilisant, autant que possible, les mécanismes physiopathologiques censés intervenir dans l'arthrose. Les critères préférentiels servant à choisir un modèle animal sont reportés dans le *tableau 1*.

Tableau 1 : Modèle expérimentaux d'arthrose, critères de choix d'un modèle, d'après Prizker, 1994

• Homogénéité ou hétérogénéité génétique
• Connaissance et homogénéité de l'historique de la nutrition et de l'activité physique
• Espérance de vie de l'animal, période de la maladie
• Fréquence de la maladie
• Disponibilité d'une population servant de témoin
• Caractéristiques anatomiques et physiologiques <ul style="list-style-type: none"> ➤ Quantitative <ul style="list-style-type: none"> - Quantité de tissu articulaire suffisante pour les études - Accessibilité du liquide synovial ➤ Qualitative <ul style="list-style-type: none"> - Ressemblance avec les tissus humains - Articulations portantes <i>versus</i> non portantes
• Disponibilité des techniques expérimentales pour ce modèle
• Approvisionnement en animaux, standardisation
• Facilité de manipulation
• Accessibilité du modèle pour les manipulations expérimentales <ul style="list-style-type: none"> ➤ Médicaments ➤ Interventions physiques
• Recherches préalables effectuées sur ce modèle (effets secondaires connus)
• Coût

De nombreux modèles ont été mis en place, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'arthrose induite, par opposition à l'arthrose spontanée retrouvée chez des animaux tels que certaines races de chiens (Labrador, Beagle, Shepherd), le singe [Chateauvert et *coll.*, 1990], la souris [Stoop et *coll.*, 1999] ou encore le cochon d'Inde [Kapadia et *coll.*, 2000].

L'arthrose peut être induite de plusieurs manières :

- L'arthrose biomécanique qui comprend les modèles d'instabilité articulaire (par section du ligament croisé antérieur, ou ménisectomie, qui sont les plus fréquemment employés dans l'industrie pharmaceutique), les modèles de déplacement de charge (par compression, immobilisation), et les modèles de surcharges articulaires.

- L'arthrose structurale monoarticulaire peut-être induite par attaque de la matrice extracellulaire de façon physique (traumatismes chirurgicaux, chaleur, laser), chimique (acides, dénaturant protéique tel que le formaldéhyde, solution ionique) ou enzymatique (papaïne, trypsine, hyaluronidase, collagénase) ; mais également par attaque des cellules articulaires induites de manière physique (congélation, électrolyse, radiations ionisantes), chimique (acide osmique, mono-iodoacétate, colchicine, antibiotiques polyènes, vitamine A), hormonales (hormones de croissance, cortisone), cytokiniques (IL-1, TNF, TGF- β 2) ou *via* d'autres médiateurs de l'inflammation (papaïne, zymosan, carragénine, cristaux, fragments tissulaires ou bactéries) [Pritzker *et coll.*, 1994] [Jouzeau *et coll.*, 2000].

Nous nous sommes intéressés, en particulier, à deux modèles expérimentaux d'arthrose, celui par section du ligament croisé antérieur [Galois *et coll.*, 2004], et celui induit par injection de mono-iodoacétate (MIA) [Guimgamp *et coll.*, 1997], en effet ces deux modèles sont des modèles d'arthrose monoarticulaire, peu coûteux, relativement facile à effectuer (bien que le premier nécessite des connaissances chirurgicales basiques). De plus, ils permettent de s'affranchir de plusieurs paramètres : les inconvénients d'autres modèles, tels que ceux nécessitant une inflammation pour initier l'arthrose expérimentale, le temps nécessaire au développement de modèles d'arthroses spontanées, ou encore, les inconvénients inhérents aux possibles prédispositions génétiques de ces derniers modèles.

Il est important de noter qu'il sera préférable d'utiliser le modèle de section du ligament croisé antérieur si l'on veut observer l'influence d'un traitement sur la chondroprotection, car si le modèle au MIA induit une nécrose cellulaire, le modèle de section engendre le phénomène d'apoptose qui représente mieux le processus de mort cellulaire décrit au cours de l'arthrose.

a. Modèle par section du ligament croisé antérieur

Ce procédé permet d'induire une arthrose d'une manière chirurgicale. En effet, les travaux de Williams et son équipe ont montré les effets de cet acte chirurgical qui consiste en une section du ligament croisé antérieur sous anesthésie, au niveau du genou du rat [Williams *et coll.*, 1982]. Les travaux de Gallois et son équipe ont montré que les genoux des rats ayant

subi ce type d'intervention présentait après 28 jours, une déplétion de protéoglycanes, une hypocellularité de l'ensemble du cartilage, une altération de la structure du cartilage pouvant aller jusqu'à une mise à nu de l'os sous chondral, des remaniement osseux, et des lésions dégénératives qui apparaissent, à la fois, au niveau des plateaux et des condyles [Galois, et coll., 2004].

b. Modèle par injection de mono-iodoacétate

Une injection intra-articulaire de MIA dans le genou perturbe le métabolisme chondrocytaire, en inhibant certaines enzymes de la glycolyse. Ceci entraîne une diminution de la quantité d'ATP présente dans la cellule et provoque un déséquilibre fonctionnel du chondrocyte. L'utilisation du MIA pour induire une arthrose a été découverte en premier, chez le poulet, par Kalbhen [Kalbhen et Blum, 1977]. Il a ensuite été vérifié que cette induction rapide était également possible dans de nombreuses espèces (cochons de Guinée, rats, souris, cheval). Selon la dose injectée, il est possible de reproduire facilement des lésions s'apparentant aux lésions arthrosiques [Guinguamp et coll., 1997].

B. L'arthrite

1. Généralité

L'arthrite est une pathologie inflammatoire qui selon le nombre d'articulations touchées, est nommée monoarthrite (une seule articulation), oligoarthrite (deux ou trois), ou polyarthrite (au moins quatre). Selon l'origine de la pathologie, plusieurs types d'arthrites peuvent être distingués. Cette origine est de nature infectieuse (une bactérie ou plus rarement un virus), de nature métabolique (dépôts microcristallins de calcium, d'urate monosodique ou de fer), ou encore, de nature immunologique comme c'est le cas de l'arthrite rhumatoïde.

2. L'arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde est une pathologie au cours de laquelle les réponses immunitaires et inflammatoires sont étroitement liées et engendrent la destruction du cartilage et de l'os. Cette maladie affecte 0,5 à 1 % de la population adulte des pays industrialisés, et réduit de manière conséquente la qualité de vie des personnes affectées, sachant que les femmes sont deux à trois fois plus touchées que les hommes. Cette maladie peut commencer à tout âge, avec cependant, une augmentation du nombre de cas entre 40 et 60 ans.

L'arthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire systémique et chronique qui cible la synoviale et qui est souvent accompagnée de manifestations extra-articulaires. En effet, la

membrane synoviale va devenir hyperplasique et va, peu à peu, être envahie par des cellules inflammatoires chroniques, comme le représente la **figure 8**. L'arthrite rhumatoïde est une pathologie multifactorielle. Cependant, il semble évident que l'interaction entre des antigènes endogènes et exogènes inconnus *via* des cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T, CD4+ est impliquée dans l'induction de la réponse immunitaire. Cette induction est suivie par le recrutement et l'activation des monocytes et des macrophages, et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (en particulier IL-1 et TNF- α) dans le liquide synovial. Ces cytokines vont entraîner la production de collagénases et de métalloprotéases par les synoviocytes de type B et par les chondrocytes, provoquant une dégradation du cartilage et une érosion de l'os. D'autres facteurs, tels que la dérégulation des lymphocyte B qui produisent le facteur rhumatoïde et d'autres anticorps, la formation d'autres complexes immuns et la sécrétion d'autres médiateurs de l'inflammation, vont également contribuer à ce processus [Goldblatt et Isenberg, 2005].

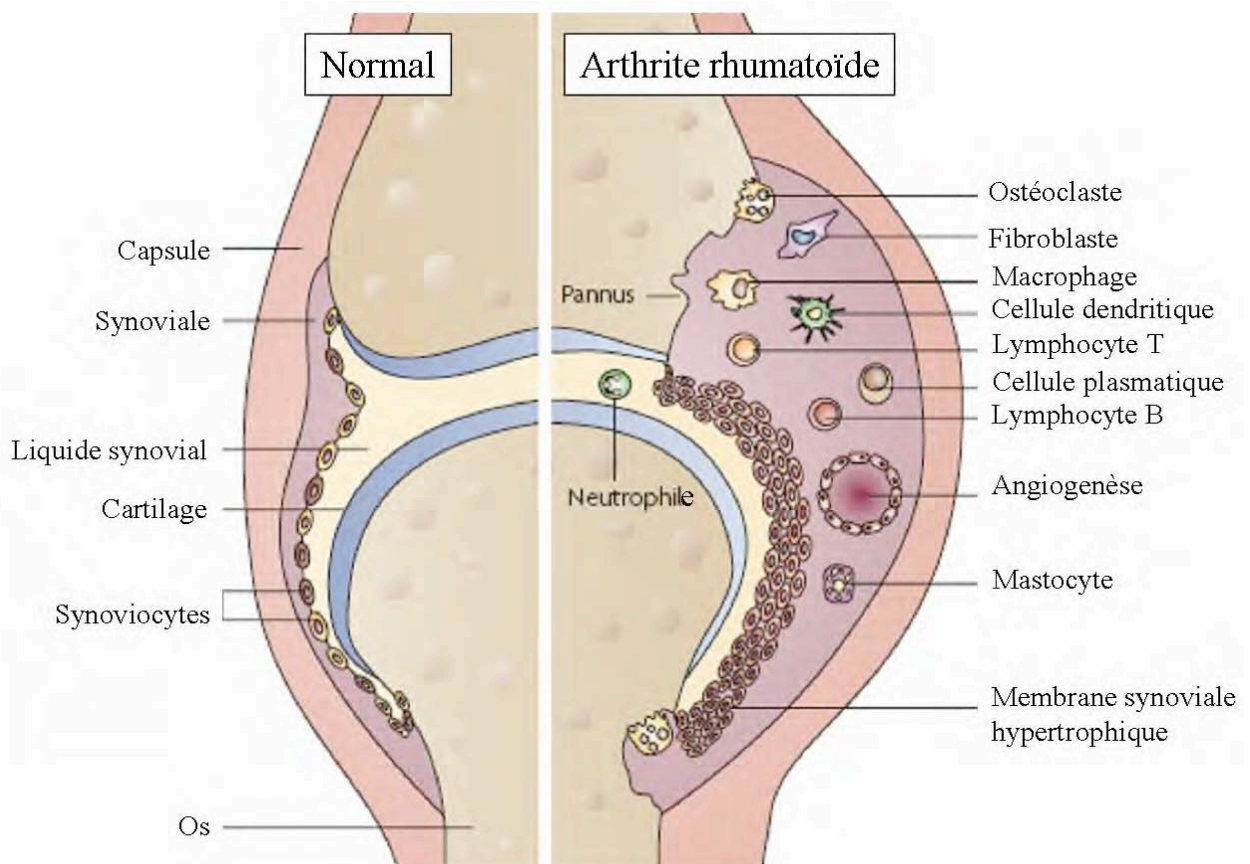


Figure 8 : Représentation d'une articulation saine et d'une articulation affectée par l'arthrite rhumatoïde
Structures articulaires et cellules inflammatoires infiltrées dans la membrane synoviale [Strand *et coll.*, 2007]

3. Modèles expérimentaux d'arthrite

a. Les différents modèles

Comme pour l'arthrose, de nombreux modèles expérimentaux d'arthrite ont été élaborés pour aider les chercheurs à comprendre les différents mécanismes mis en jeu au cours de cette pathologie. Le premier modèle d'arthrite à avoir été décrit est le modèle d'arthrite à adjuvant qui permet d'induire une arthrite par simple injection de l'adjuvant de Freund qui contient des *Mycobacterium tuberculosis* [Pearson, 1956]. Peu à peu, de nombreux modèles d'adjuvant incomplet ont été mis en place, comme l'arthrite induite à l'avridine [Chang et coll., 1980], à l'adjuvant de Freund incomplet et au pristane [Bedwell et coll., 1987]. Un second modèle est l'arthrite induite par un antigène, qui consiste à pratiquer une injection d'antigène protéique dans l'articulation du genou de l'animal préalablement immunisé avec le même antigène [Dumonde et coll., 1962], [Brackertz et coll., 1977]. Une arthrite chronique peut également être obtenue par simple injection de parois de streptocoque soniquées. Un modèle d'arthrite induite au collagène par immunisation au collagène de type II existe également [Trentham et coll., 1977]. L'équipe de Carlson a mis au point un modèle d'arthrite par immunisation des rats avec des protéines oligomériques de la matrice cartilagineuse (COMPs) [Carlsen et coll., 1998]. Enfin, il existe des modèles d'arthrite spontanée, par exemple chez la souris transgénique surexprimant le gène codant TNF- α [Keffer et coll., 1991] [Williams, 1998].

b. Le modèle par injection de parois de Mycobactérie

Une injection intra-articulaire de parois de Mycobactérie (*Mycobacterium tuberculosis*) dans le genou d'un rat, induit une réaction inflammatoire avec une prolifération de la membrane synoviale qui devient invasive, accompagnée d'une perte significative du contenu en GAG, d'une diminution de la masse osseuse au niveau de la rotule et d'un gonflement de l'articulation [Seed et coll., 1991]. Ces différentes conséquences font de cette manipulation, un modèle expérimental facile à obtenir, mimant une arthrite monoarticulaire. Bien que l'origine de l'arthrite induite dans ce modèle soit différente de celle d'une arthrite rhumatoïde, le choix de ce modèle s'avère justifié car nos expériences visent à montrer l'intérêt curatif d'un traitement sur une articulation arthritique, et non à traiter l'origine de l'affection à son commencement.

III. Thérapie génique et articulation

A. Pourquoi utiliser la thérapie génique ?

De nombreux traitements sont aujourd'hui disponibles pour améliorer les conditions de vie des patients atteints par l'arthrose ou par l'arthrite rhumatoïde. Les principaux traitements sont les analgésiques, les AINS (anti-inflammatoires non stéroïdiens), les corticostéroïdes, qui sont indispensables pour calmer les épisodes douloureux et inflammatoires en phase aiguë de la maladie, les DMARD (*disease modifying anti-rheumatic drugs*), et les injections de protéines d'intérêt : BRM (*biologic response modifier*) tels que les anti-TNF ou les antagonistes du récepteur à l'IL-1. Les DMARDs et les BRM s'avèrent relativement efficaces mais les premiers engendrent une baisse des défenses immunitaires et les seconds sont particulièrement coûteux, réservant ce type de traitement à un faible pourcentage de patients. Ce coût pourrait être notablement réduit et ainsi favoriser l'accès au traitement, en injectant dans le tissu lésé, non plus les protéines d'intérêt, mais la séquence codante et le système vectoriel adéquat pour exprimer la protéine à volonté. Il est donc nécessaire de s'orienter vers des techniques de thérapie génique pour soigner ou du moins amoindrir les effets des pathologies ostéoarticulaires [Gouze *et coll.* 2007].

B. Intérêt d'une thérapie génique locale

Dans le cas de pathologies ostéoarticulaires, l'utilisation de la thérapie génique soulève quelques interrogations concernant l'innocuité de la méthode, les choix du transgène, de la cible, et du moyen de vectorisation. En effet, le ciblage du tissu cartilagineux comporte plusieurs difficultés. Tout d'abord, il ne peut en aucun cas être transfecté *via* une administration systémique, car le cartilage articulaire n'est pas vascularisé, et malgré la possibilité offerte par différentes techniques de vectorisation, comportant un ligand tissu-spécifique, une telle approche s'avérerait peu efficace. Ensuite, étant donné la composante inflammatoire commune à de nombreuses pathologies articulaires, il est important que la technique de transfert de gène n'engendre pas une augmentation de ce phénomène. De plus, il est nécessaire que la technique de transfection utilisée limite la dissémination du transgène vers les tissus avoisinant tels que la membrane synoviale. Enfin, la méthode de transfert de gène utilisée doit tenir compte de la matrice extracellulaire particulièrement dense, du cartilage

articulaire. Pour ces raisons, une thérapie génique locale semble plus appropriée, elle peut être effectuée grâce à divers types de vectorisations virales ou non virales.

C. Les différentes méthodes de transfert de gènes

Les vecteurs viraux sont des virus dont la fonction de réplication a été supprimée et dont une partie du génome a été remplacée par les gènes d'intérêt thérapeutique. Les vecteurs les plus couramment utilisés sont les rétrovirus, les adénovirus, les « adeno-associated-virus » (AAV), le virus de l'herpès (« herpex simplex virus » : HSV), le papilloma virus, les lentivirus. Ces vecteurs viraux ont l'avantage de présenter une efficacité de transfection relativement élevée. Cependant, ils recèlent également plusieurs désavantages (*tableau 2*), notamment les pouvoirs inflammatoire et immunogène, des adénovirus et des HSV, semblent difficilement compatibles avec des essais thérapeutiques sur les pathologies ostéoarticulaires. Les rétrovirus, dont la transduction est limitée aux cellules en division, s'avèrent être de piètres candidats pour un ciblage des chondrocytes qui se divisent très peu. Les lentivirus et les AAV semblent les plus adaptés, mais leur fabrication est très complexe. De plus, la capacité d'intégration du transgène dans le cas des lentivirus, peut être un désavantage en engendrant des mutations qui entraînent la mort des cellules ciblées [Gouze *et coll.* 2007].

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des principales méthodes de vectorisation (en particulier les vecteurs viraux), extrait de la publication de Gouze *et coll.*, 2007

Vecteurs	Intégration	Avantages	Inconvénients
Non viral	Non	Facile à produire et peu coûteux Taille du transgène illimitée Transfection indépendante du cycle cellulaire	Faible efficacité de transfection <i>in vivo</i>
Adénovirus	Non	Facile à produire Transduction indépendante du cycle cellulaire	Immunogène et inflammatoire Nécessite la présence membranaire du récepteur des adénovirus et des coxsackievirus (CAR)
Gutless adénovirus	Non	Théoriquement peu immunogène Transduction indépendante du cycle cellulaire Taille du transgène (< 37 kb)	Très difficile à produire
Herpes simplex virus	Non	Transduction indépendante du cycle cellulaire Taille du transgène (< 35 kb)	Inflammatoire et cytotoxique
Rétrovirus	Oui	Intégration du transgène Longue durée d'expression du transgène	Transduction limitée aux cellules en division Insertion mutagène possible Efficacité complexe <i>in vivo</i>
Lentivirus	Oui	Intégration du transgène Transduction indépendante du cycle cellulaire Longue durée d'expression du transgène	Insertion mutagène possible Difficile à produire
AAV	Possible	Associé à aucune maladie chez l'homme Nombreux sérotypes disponibles Longue durée d'expression possible	Taille du transgène limitée (< 4 kb) Difficile à produire

Tableau 3 : Propriétés des principales méthodes de vectorisations non virales

	principe	administration	cible	découverte	expression du transgène
ADN nu	transfert direct	locale	peau, foie, muscle, tumeurs, certaines cellules immunitaires	Wolff et coll., 1990	très faible mais augmentée par ajout de rayonnements, agents myoxiques ...
	électroporation	locale	muscle, foie, peau, tumeurs	Coster 1965	10 à 1000 fois plus important que sans électroporation
systèmes lipidiques	gene gun	locale	peau	sur cellules animales en 1992 par Klein et autres	faible
	liposomes neutres et anioniques	systémique, peut être rendue tissu-spécifique par l'ajout d'un ligand cible-spécifique		Fraley et coll., 1980	faible
	liposomes cationiques = lipoplexes	intraumorale, orale, intrapéritonéale, intraveineuse	coeur, foie, orvveau, rein et surtout les poumons	Felgner et coll., 1987	supérieure à celle des liposomes neutres et anioniques
	lipopolyplexes cationiques	intraorale ou systémique	neurones, métastases pulmonaires	Gao et Huang, 1996	2 à 28 fois supérieure aux lipoplexes
polymères	lipopolyplexes anioniques	systémique, peut être rendue tissu-spécifique par l'ajout d'un ligand cible-spécifique	neurones, poumons, foie...	Lee et Huang, 1996	dépend du ligand, de la sensibilité de la composition lipidique au pH
	émulsions et micelles cationiques	systémique	tumeurs	Liu et coll., 1996	
	polyplexes	systémique, intraorale, intramusculaire, locale		Wu et coll., 1988	1 à 100 fois supérieure à l'injection simple d'ADN nu
nano(micro)particules	ADN est contenu dans les nanosphères via des interactions ioniques et une occlusion physique (avec possibilité de co-encapsulation avec d'autres molécules d'intérêt)	intra-trachéale, intragastrique ou intramusculaire		Leong, 1999	significativement plus faible que les polyplexes ou lipoplexes

Il existe différents systèmes non viraux, les systèmes basés sur l'injection d'ADN nu, les systèmes lipidiques et les systèmes basés sur la formation de complexe ADN-polymère. Les vecteurs non viraux, bien que présentant dans l'ensemble une efficacité de transfection plus faible que les vecteurs viraux, présentent l'avantage d'être non immunogènes et permettent la vectorisation de transgènes de grande taille. Le **tableau 3** montrent les différentes propriétés de ces vecteurs non viraux [Li et Ma, 2001].

D. Electroporation

L'électroporation est une technique permettant de perméabiliser les cellules par le biais d'impulsions électriques qui engendrent la formation de pores membranaires réversibles. Ces pores vont permettre l'entrée dans la cellule de macromolécules chargées qui resteraient normalement à l'extérieur des cellules, mais également d'ADN plasmidique.

1. Généralité

a. Les débuts

Les premiers travaux d'électroporation *in vitro* sur cellules eukaryotes ont été réalisés en 1982 par Neumann [Neumann et coll. 1982] [Wong et Neumann, 1982] afin de favoriser la pénétration d'ADN dans les cellules cibles. Des expériences *in vitro* ont été réalisées dès 1988 par Orłowski et coll., afin de favoriser la pénétration d'un agent anticancéreux : la bléomycine, dans les cellules électroperméabilisées. Enfin, les premières expériences de transfert d'ADN *in vivo*, ont été effectuées par l'équipe de Titomirov et coll. en 1991, dans la peau.

b. Electroperméabilisation et électrophorèse

En 1991, les travaux de Klenchin et coll., ont montré l'importance de la composante électrophorétique, lors de l'électroporation *in vitro*. En effet, à la suite d'une injection d'ADN au sein de la culture cellulaire, une première impulsion électrique de courte durée et de haut voltage va permettre l'électroperméabilisation des membranes cellulaires, et les impulsions suivantes de faible voltage, vont faire migrer les molécules d'ADN à l'intérieur des cellules à la manière d'une électrophorèse.

En 1999, l'équipe de Mir et coll., ont pu également montrer l'importance de cette composante électrophorétique *in vivo*. Elle permet, en effet, d'augmenter l'efficacité de transfection dans le tissu cible (dans ce cas, le muscle squelettique).

c. Les tissus ciblés

Depuis, cette technique d'électroporabilité membranaire a été employée *in vivo* sur de nombreux tissus : le foie, les testicules, la vessie, le muscle strié squelettique, le cerveau, le cœur, l'estomac, les reins, la moelle épinière, le tissu synovial [Ohashi et coll. 2002], la cornée, la rétine, le tendon, la rate, le poumon, le tissu adipeux [Andre et Mir, 2004] témoignant de son efficacité et de son utilisation croissante.

d. Paramètres

Pour chaque nouveau tissu ciblé, il est nécessaire de réajuster les différents paramètres afin d'optimiser l'efficacité de l'électroporation. Ils comprennent principalement, le genre de générateurs d'impulsions employés, le modèle d'électrodes, ainsi que le type, le nombre, la durée, la fréquence et l'intensité des impulsions émises.

i. Les générateurs

Il existe différents types de générateurs d'impulsions électriques, les plus répandus étant les générateurs à voltage constant, les générateurs à courant constant, et les générateurs à décroissance exponentielle. Les premiers ne tiennent pas compte de la perte de résistance des milieux traversés au fur et à mesure de l'électroporabilité, la quantité de courant effectivement reçue par les cellules va donc augmenter au cours du temps. L'utilisation des générateurs à courant constant permet quand à elle d'éviter une telle augmentation, afin de s'affranchir d'effets délétères éventuels, telle qu'une perméabilisation membranaire irréversible. Enfin, les générateurs à décroissance exponentielle délivrent un courant électrique qui décroît au cours du temps de manière exponentielle à partir de la valeur demandée.

ii. Les impulsions électriques

La forme des impulsions électriques peuvent être de deux types, comme le représente la **figure 9** : les ondes carrées (unipolaires ou bipolaires), et les ondes exponentielles. Les ondes carrées sont généralement préférées pour les approches *in vivo*, car le voltage et la durée des impulsions électriques peuvent être choisis indépendamment de la résistance électrique du milieu (tissu). Au contraire, les ondes exponentielles sont souvent utilisées *in vitro* avec une constante de temps qui dépend de la résistance au milieu d'incubation [Bloquel et coll., 2004].

Le nombre, la durée, la fréquence et l'intensité des impulsions électriques doivent être minutieusement choisis en fonction du type de tissu ou du type cellulaire ciblé. En effet, des impulsions trop longues, ou trop fréquentes risquent de conduire à une irréversibilité du phénomène de perméabilisation membranaire, entraînant la mort cellulaire. Des impulsions de

haut voltage seront donc forcément de très court durée, et destinées essentiellement à l'électroperméabilisation, les impulsions de faibles voltages, pourront être plus nombreuses et plus longues, et permettront d'assurer la phase de migration du transgène à l'intérieur du tissu.

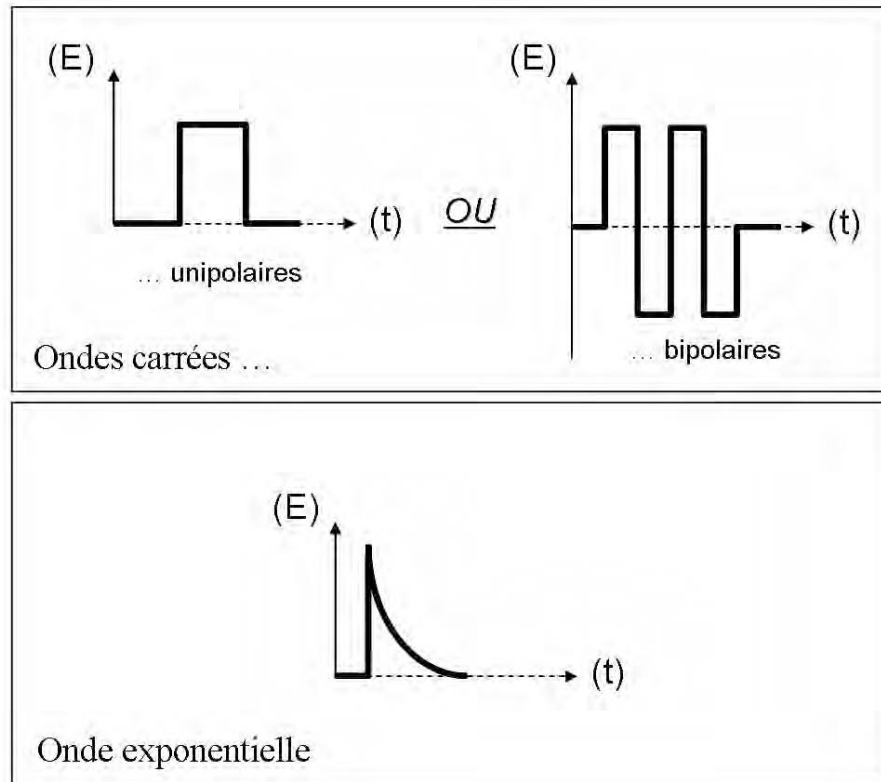


Figure 9 : Représentations des différents types d'ondes électriques utilisées en électroporation,
E : intensité du courant électrique, t : temps.

iii. Les électrodes

Suivant la structure et l'accessibilité du tissu, différents types d'électrodes pourront être utilisées. Dans le cadre d'un ciblage du cartilage rotulien, par exemple, des électrodes plates semblent les mieux adaptées, pour l'instant, car l'ergonomie de cette structure articulaire suppose le développement de nouvelles formes d'électrodes plus adéquates.

IV. Les protéines de stress

A. Généralités

Les protéines de choc thermique ou « Heat Shock Protein » (Hsp) sont des molécules ubiquitaires qui possèdent un haut degré d'homologie entre elles. La grande conservation des gènes codant pour ces protéines dans l'évolution suggère qu'elles exercent une fonction essentielle pour la survie de l'organisme. La fonction commune des Hsp est celle de chaperon moléculaire. En effet, elles interagissent avec les protéines immatures, anormales, ou endommagées, empêchant ainsi leur accumulation et permettant la correcte conformation des peptides ou leur destruction, en les dirigeant vers le protéasome.








Les Hsp appartiennent à la super-famille des protéines de stress dont la caractéristique principale est leur surexpression au cours d'un stress cellulaire. La nature de celui-ci (choc thermique, endotoxines, toxiques) est peu importante, étant donné que la plupart des stress cellulaires provoquent une accumulation de protéines endommagées par inhibition de leur dégradation *via* le protéasome et une destruction des Hsp elles-mêmes, ces deux phénomènes combinés nécessitent alors une production accrue d'Hsp.

Les Hsp ont été regroupées en six familles principales en fonction de leur masse moléculaire (en KDa) chez les mammifères : Hsp110, 90, 70, 60, 47, 30-25. Nous remarquerons qu'une même protéine peut parfois être désignée de plusieurs façons en fonction des espèces. Les propriétés des différentes familles d'Hsp sont répertoriées dans le **tableau 4**.

La synthèse d'Hsp est induite par l'activation et la translocation dans le noyau d'un facteur de transcription, appelé facteur de choc thermique ou « heat shock factor » : HSF. Ce facteur va se fixer sur une séquence spécifique du promoteur du gène codant pour une Hsp. Cette séquence est nommée HSE pour « heat shock element », elle se trouve sous forme de répétitions multiples au sein du promoteur. L'interaction d'HSF et HSE va provoquer la transcription du gène codant pour Hsp.

Nous nous intéresserons en particulier aux familles d'Hsp70 et d'Hsp27.

Tableau 4 : Principales caractéristiques des différentes familles de protéines de choc thermique
[Wirth et coll., 2002]

Protéine	Représentation schématique (Hsp+polypeptides)	Localisation cellulaire	Particularités-Fonctions
Hsp110		noyau (partie fibrillaire du nucléole) cytoplasme	<ul style="list-style-type: none"> constitutive et <u>inductible</u> associée à l'ARN → rôle dans la production de ribosomes et dans la thermotolérance
Hsp90		cytoplasme (noyau)	<ul style="list-style-type: none"> <u>constitutive</u> et inductible associée à de nombreuses protéines: récepteurs stéroïdes, kinases, actine-tubuline, facteurs de transcription. → rôle dans la transduction de signaux du cycle cellulaire, chaperon moléculaire
Hsp70		cytoplasme noyau (lors de stress)	<ul style="list-style-type: none"> constitutive et <u>inductible</u> associée aux protéines durant leur formation et leur translocation intracellulaire associée aux protéines dénaturées lors de stress → rôle de chaperon moléculaire et dans la thermotolérance
Hsp60	  profil haut	mitochondrie	<ul style="list-style-type: none"> <u>constitutive</u> et inductible associée à l'Hsp10 facilite le repliement et l'assemblage des protéines enzymatiques mitochondriales antigènes important des bactéries → rôle de chaperon moléculaire
Hsp47		réticulum endoplasmique	<ul style="list-style-type: none"> <u>constitutive</u> associée au procollagène et collagène → rôle de chaperon spécialisé pour le collagène
Hsp27		cytoplasme noyau (lors de stress)	<ul style="list-style-type: none"> constitutive et inductible niveau de phosphorylation variable homologie avec l'α-crystalline association à l'actine expression liée au statut hormonal d'un tissu → rôle dans la thermotolérance, dans le développement, chaperon moléculaire

B. Hsp70

La structure commune des Hsp70 est constituée de deux domaines : une extrémité N-terminale très conservée de 45 kDa possédant une activité ATPasique, et une extrémité C-terminale moins conservée de 25 kDa qui lie les peptides.

Cette famille Hsp70 est constituée de plusieurs membres de tailles similaires (70 kDa), les uns exprimés de manière constitutive, et les autres inductibles.

Les principaux membres de la famille Hsp70 sont les suivants :

- Hsp70, également appelée Hsp70.1 et Hsp70.3, est une protéine inductible qui dans des conditions physiologiques normales est présente de manière constitutive dans le cytosol à un taux basal, bien que ce niveau basal diffère selon l'âge et le tissu. En effet, il semblerait que les tissus en contact direct avec l'extérieur (donc directement soumis à divers stress) tels que la peau, les poumons ou encore le tube digestif, présentent des niveaux d'expression basale plus élevés [Tanguay et *coll.*, 1993]. Ces protéines sont codées par deux gènes *hsp70.1* et *hsp70.3* localisés dans le complexe majeur d'histocompatibilité, et, si semblables, que leurs produits ne sont pas distinguables [Gunther et Walter, 1994]. De nombreux stress de nature biologique, chimique ou physique, produisent une induction d'Hsp70, c'est pourquoi elle est considérée comme un marqueur de stress et de toxicité [Rajdev et Sharp, 2000]. En cas de stress, les protéines Hsp70 sont dirigées vers le noyau, avant d'être surexprimées dans le cytosol [Wirth et *coll.*, 2002].

- Hsp70.2, codée par le gène *hsp70.2* qui a la particularité de ne s'exprimer que dans les spermocytes.

- Hsc70, l'homologue constitutif d'Hsp70, est majoritairement exprimée dans des conditions physiologiques normales, bien que très faiblement induite au cours d'un stress. Elle se localise dans le cytosol et dans le noyau.

- Grp78 « glucose-regulated protein », est une protéine localisée dans le réticulum endoplasmique induite par des inhibiteurs des conditions de glycosylation.

- Hsp70 mitochondriale, située dans les mitochondries [Yamashita et *coll.*, 2004]

La famille des protéines Hsp70 intervient dans une large gamme de processus incluant le repliement et l'assemblage des protéines naissantes, endommagées ou agrégées, la translocation membranaire des protéines sécrétées, et le contrôle des protéines régulatrices. Elles sont également impliquées dans des processus de maintien de l'équilibre cellulaire, en intervenant dans les voies de transduction du signal et en jouant un rôle de contrôle qualité en

assurant la reconnaissance de la structure des protéines et en réparant les éventuels déformations. Toutes ces fonctions attribués aux Hsp70 s'avèrent être basées sur leur capacité à interagir avec les protéines qui présentent des segments peptidiques hydrophobes de manière ATP-dépendante [Mayer et Bukau, 2005].

La variété des fonctions des Hsp70 est dû à plusieurs particularités. D'une part, il s'agit d'une vaste famille de protéines qui, bien que présentant une très grande homologie entre elles et d'un organisme à l'autre [Hunt et Morimoto, 1985], ont évolué au cours du temps, leur permettant de se spécialiser. D'autre part, les Hsp70 s'associent avec d'autres systèmes chaperons ou avec différentes co-chaperones qui leur octroient une fonction cellulaire spécifique. C'est le cas des protéines JDP « J-domain protein » [Kelley, 1998], des protéines Bag [Takayama et Reed, 2001], Hip [Höhfeld et *coll.*, 1995], Hop [Odunuga, et *coll.*, 2003], CHIP « Hsc70-interacting protein » [Jiang et *coll.*, 2003]. *La revue de Mayer et Bukau de 2004, présente rapidement ces interactions.*

C. Hsp27

Les protéines de choc thermique de faible poids moléculaire forment une famille très abondante et diversifiée. Le nombre de représentants de cette famille varie beaucoup d'un organisme à l'autre (d'un seul exemplaire chez la plupart des mammifères et chez les oiseaux, à de multiples membres chez la drosophile par exemple), et leur degré d'homologie est nettement plus faible que dans les autres familles d'Hsp [Ehrnsperger et *coll.*, 1997]. Chez l'homme, une dizaine de petites Hsps a été identifiée [Kappe et *coll.*, 2003]. Malgré, leur faible homologie, ces Hsp sont caractérisées par une séquence conservée d'environ 80 à 100 acides aminés, formant le « α -crystallin domain ».

Dans des conditions physiologiques normales, les Hsp27 (de 27 kDa), sont retrouvées de manière constitutive dans le cytosol à proximité de l'appareil de Golgi sous forme d'aggrégats de 400 kDa. Après un choc thermique, elles forment des complexes oligomériques encore plus volumineux, allant jusqu'à des tailles de 800 à 2000 kDa et sont re-localisées dans le noyau [Mehlen et *coll.*, 1997]. Elles jouent leur rôle de chaperon moléculaire, sans intervention d'ATP, sous forme d'aggrégats, en se liant de manière très efficace aux protéines anormales, étant donné que chaque sous unité de ces complexes oligomériques, peut se lier à un peptide [Ehrnsperger et *coll.*, 1997].

Comme de nombreuses Hsp, Hsp27 est induite à la suite d'un stress cellulaire et sa surexpression semble correspondre avec l'augmentation de la survie cellulaire dans des

cellules exposées à un choc cytotoxique [Chretien et Landry, 1988]. Hsp27 est présente dans des types cellulaires variés et intervient dans différents processus, telle que la survie cellulaire, en interférant avec des composants clefs des voies de signalisation du processus apoptotique, notamment, le complexe d'activation des caspases. Hsp27 joue également un rôle dans la dégradation, *via* le protéasome, des protéines régulatrices de l'apoptose [Arrigo, 2000], [Bruey et *coll.*, 2000]. De plus, elles permettent la résistance à certaines substances anticancéreuses [Ciocca et *coll.*, 1993].

D. Inhibition du protéasome et induction d'Hsp

1. Le protéasome

La dégradation des protéines est un processus important dans la régulation de nombreux mécanismes cellulaires, comme la progression dans le cycle cellulaire, l'oncogenèse, le développement, la croissance et l'atrophie des tissus mais également l'élimination de protéines anormales.

Le protéasome est un complexe multiprotéiniques présent à la fois dans le cytoplasme et le noyau des cellules eucaryotes. Le protéasome est constitué de quatre anneaux cylindriques, chaque anneau étant lui-même constitué de sept sous-unités (*figure 10*). A l'intérieur de ce cylindre, il existe une cavité, formée de trois chambres contiguës, où sont localisées les différentes activités catalytiques. C'est une protéase multi-catalytique, qui est caractérisée par trois activités distinctes : activité « chymotrypsin-like » (Tyrosine ou Phénylalanine en position P1), une activité « tryptic-like » (Arginine ou Lysine en position P1), une activité hydrolytique « postglutamyl » (glutamate ou résidus acides). Le protéasome 26S est la forme active. Il est constitué d'un complexe catalytique 20S flanqué, de part et d'autre, d'une sous-unité régulatrice 19S.

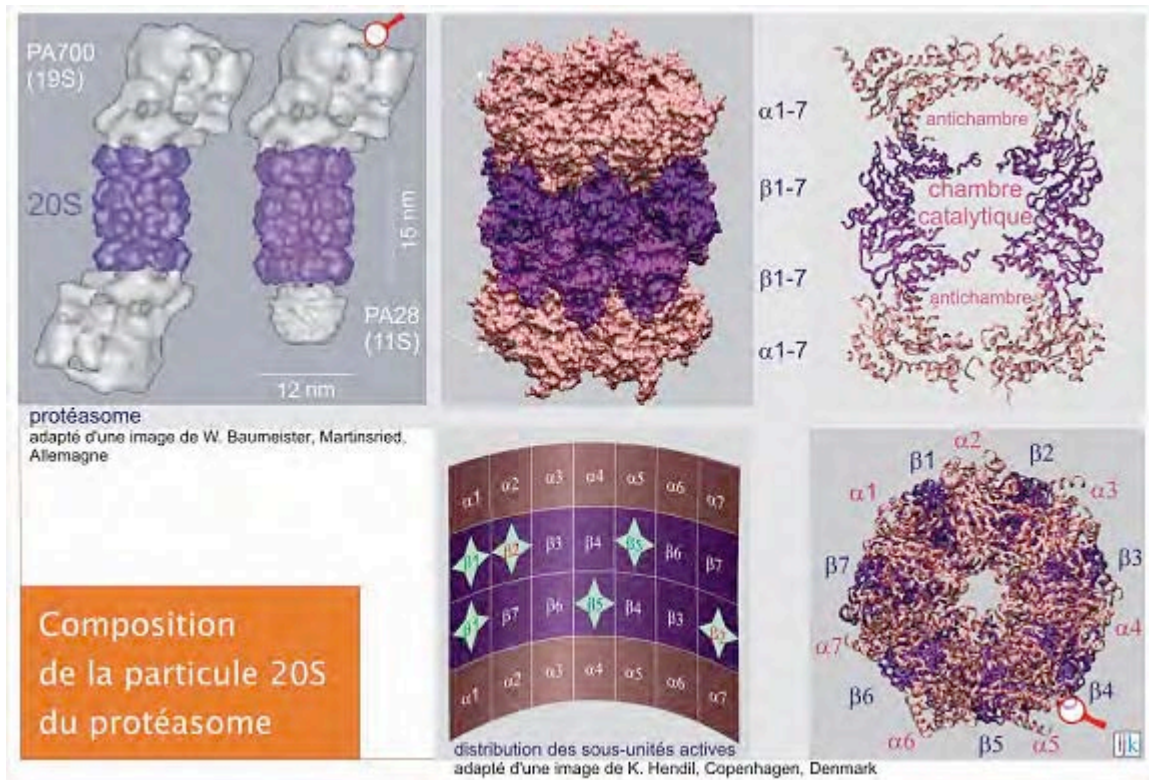
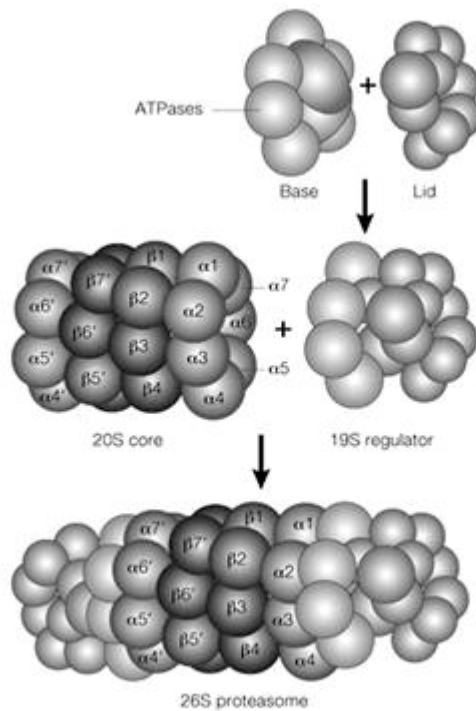


Figure10 : Structure de la particule 20S du protéasome



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 10 bis : Représentation du protéasome 26S

Le protéasome 26S dégrade les protéines qui ont été poly-ubiquitinilées selon un procédé appelé ubiquitination (*figure 11*). Les protéines ubiquitinilées sont reconnues par les sous-unités régulatrices 19S qui ôtent la chaîne d'ubiquitine pour la recycler et dénature la protéine condamnée. La protéine dénaturée est alors introduite à l'intérieur de la cavité du protéasome 26S et réduite en petits polypeptides de trois à vingt-deux résidus. L'activité protéolytique du protéasome est entièrement localisée dans les anneaux de la sous-unité β centrale qui contient au total six sites actifs. Cependant le mécanisme est similaire à celui des protéases serine. Une caractéristique du protéasome provient du fait qu'il utilise la thréonine comme résidu catalytique [Adams, 2002].

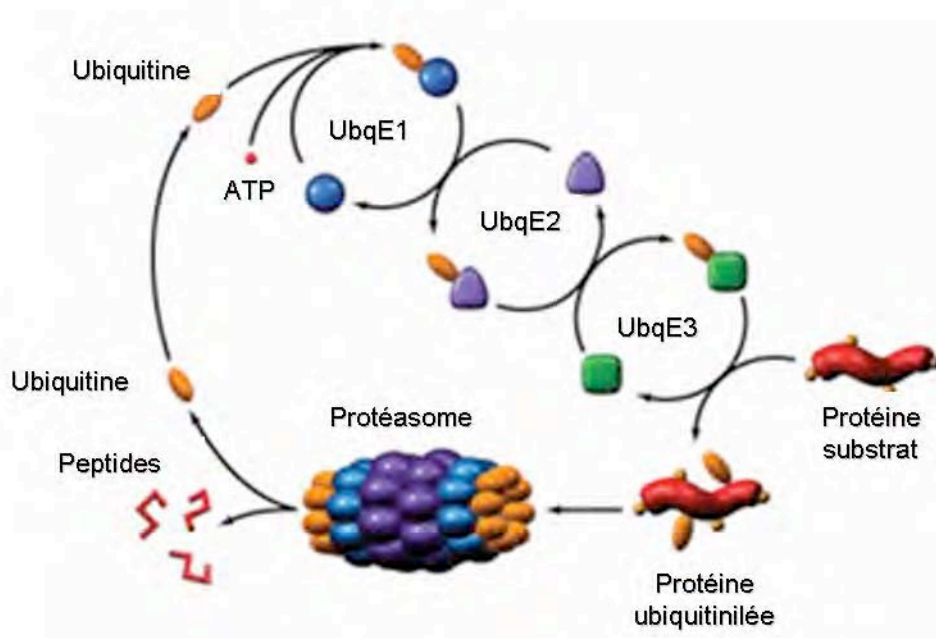


Figure 11 : Processus d'ubiquitination, visant à tagger une protéine destinée à la dégradation en la dirigeant vers le protéasome. Ce procédé est réalisé avec l'aide de trois autres types d'enzymes (notées E1,E2 et E3) : L'enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1), active l'ubiquitine en présence d'ATP en formant une liaison thiolester entre un résidu cystéine de son site catalytique et l'ubiquitine, puis transfère l'ubiquitine activée sur l'une des E2s.L'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2), modifie une fois de plus l'ubiquitine en formant une liaison thiolester et est capable d'attacher l'ubiquitine à la protéine cible en générale avec l'aide d'une E3.L'ubiquitine ligase (E3), joue un rôle dans la reconnaissance entre l'ubiquitine et les différentes protéines cibles. Schéma extrait du site <http://www.emdbiosciences.com>

2. Les inhibiteurs du protéasome

L'intérêt porté aux fonctions du protéasome dans les processus cellulaires normaux et dans les cas de pathologies humaines, a ouvert la voie au développement d'inhibiteurs du protéasome [Voorhees et Orłowski, 2006]. La première classe de composant, dont la fonction d'inhibition du protéasome a été prouvée, est celle des peptides aldéhydes [Wilk et Orłowski,

1983]. Ce sont des inhibiteurs réversibles de protéases à sérine et cystéine qui se lient à la thréonine du site actif N-terminal des sous unités du protéasome ayant une activité protéolytique. Ensuite, l'équipe d'Adams a remplacé le pharmacophore des peptides aldéhydes par un groupement fonctionnel d'acide boronique, générant ainsi une série d'inhibiteurs à peptides d'acide boronique [Adams *et coll.*, 1998]. L'un des représentants de ces inhibiteurs est le Bortezomid qui est un acide boronique dipeptidyl qui inhibe l'activité « chymotrypsin-like » du protéasome, de manière réversible. Il existe également d'autres inhibiteurs du protéasome, tel que la lactacystine, isolée à partir du *Streptomyces lactacystinaeus*, qui est un inhibiteur irréversible étant donné qu'il modifie de manière covalente la thréonine nucléophile N-terminal de la sous-unité β du protéasome [Fenteany *et coll.*, 1995]. Enfin, l'équipe de Hanada a isolé l'epoxomicine, un peptide epoxyketone inhibant le protéasome de manière irréversible en bloquant son activité « chymotrypsin-like » [Meng *et coll.*, 1999].

3. MG132 : un inhibiteur réversible du proteasome

Le MG132 fait partie de la classe des peptides aldéhydes. C'est un tripeptidyl aldéhyde : carbobenzoxyl-leucinyll-leucinyll-leucinal ($C_{26}H_{41}N_3O_5$). Il se lie au site actif du protéasome 20S et l'inhibe *via* la formation réversible d'adduits hemiacetal entre le groupement aldéhyde du MG132 et le groupe hydroxyle de la thréonine catalytique N-terminale. Sa formule est représentée dans la *figure 12*.

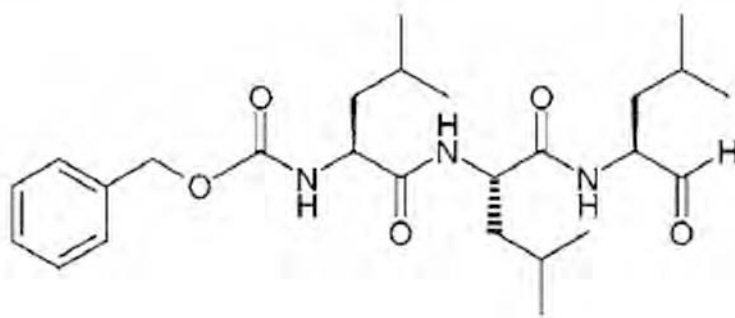


Figure 12 : Formule du MG132, inhibiteur réversible du protéasome de la classe des peptides aldéhydes tripeptidyl aldéhyde : carbobenzoxyl-leucinyll-leucinyll-leucinal ($C_{26}H_{41}N_3O_5$)

4. MG132 et induction d'Hsp

Il a été montré que le MG132 provoquait une hyperphosphorylation et une augmentation de l'activité de liaison à l'ADN d'HSF-1, et, une induction de l'expression des gènes *hsp27* et *hsp70* [Kim *et coll.*, 1999]. Ainsi, le MG132, d'une part en induisant un stress cellulaire provenant de l'inhibition du protéasome qui engendre une accumulation de protéines anormales, et d'autre part en favorisant la liaison d'HSF-1 sur les HSE des promoteurs des gènes *hsp27* et *hsp70*, va entraîner une augmentation de l'expression de ces deux gènes.

MATERIELS ET METHODES

I. Expérimentation animale

A. Animaux

Toutes les études ont été réalisées chez les rats (Wistar, Charles River, Saint-Germain sur l'Arbresle, France) mâles (150 à 175 g). Ils sont installés dans une animalerie thermorégulée ($24\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$), dont l'air est renouvelé, et dans laquelle des cycles diurnes (6 heures à 18 heures) et nocturnes (18 heures à 6 heures) alternent régulièrement. Les rats sont placés par trois à cinq dans des cages en plastique, avec accès à une nourriture standardisée et de l'eau *ad libitum*. Les expérimentations débutent après une période d'acclimatation des animaux d'une durée de deux à sept jours.

B. Traitement des animaux

1. Préparation des animaux avant traitement

Les animaux devant subir une électroporation, sont rasés au niveau de l'articulation du genou avec de la crème dépilatoire, la veille du traitement.

Avant injection intra-articulaire ou électroporation, les animaux sont anesthésiés à l'isofluorane (AErrane™ – Baxter S.A., Branquart, Belgique).

2. Modèles expérimentaux

a. Modèle expérimental d'arthrose : par injection intra-articulaire de Mono-Iodo-Acétate

Deux doses de MIA (0,03 et 0,3 mg, Merck-Clevenot, Nogent-sur-Marne, France), solubilisées dans 50 µl de sérum physiologique stérile, sont injectées par voie intra-articulaire bilatérale dans le genou, sous anesthésie.

b. Modèle expérimental de mono-arthrite : par injection intra-articulaire de parois de Mycobactéries

Une quantité de 400 µg de parois de *Mycobacterium tuberculosis* (Difco Laboratories, Detroit, USA), mises en suspension dans 50 µl de sérum physiologique stérile, est injectée par voie intra-articulaire unilatérale dans le genou sous anesthésie. Cette dose a été retenue car elle est optimale (dose réponse) puisqu'elle permet d'induire à la fois un handicap, une réaction fébrile et des lésions ostéochondrales [Gilroy *et coll.*, 1998].

c. Modèle expérimental d'arthrose par section du ligament croisé antérieur chez le rat

Après anesthésie des rats, une incision parapatellaire médiale de deux centimètres est réalisée permettant l'accès à l'articulation du genou droit. Une luxation patellaire est pratiquée sur le genou en extension afin d'atteindre le ligament croisé antérieur (LCA) (**figure 13**). Sur le genou fléchi, le LCA est repéré visuellement et il est sectionné à l'aide d'une lame de scalpel (lame de 15). Après la section, un contrôle est effectué par une recherche du tiroir antérieur, signant la rupture complète du LCA. Un lavage articulaire abondant au sérum physiologique est réalisé pour évacuer toute trace sanguine. La rotule est repositionnée sur le genou en extension, puis la fermeture de l'articulation est réalisée en deux plans, d'abord le muscle à points séparés avec du fil vicryl 3/0 résorbable (Ethicon vicryl, Johnson & Johnson intl, Belgique) puis la peau à points séparés avec du fil nylon 3/0 (Peters Filapeau, surgical sutures and medical supplies, France). Chez les rats témoins, le genou droit est opéré, sans induire de lésion ligamentaire (arthrotomie). Il s'agit d'une modification de la procédure décrite par Williams [1982].

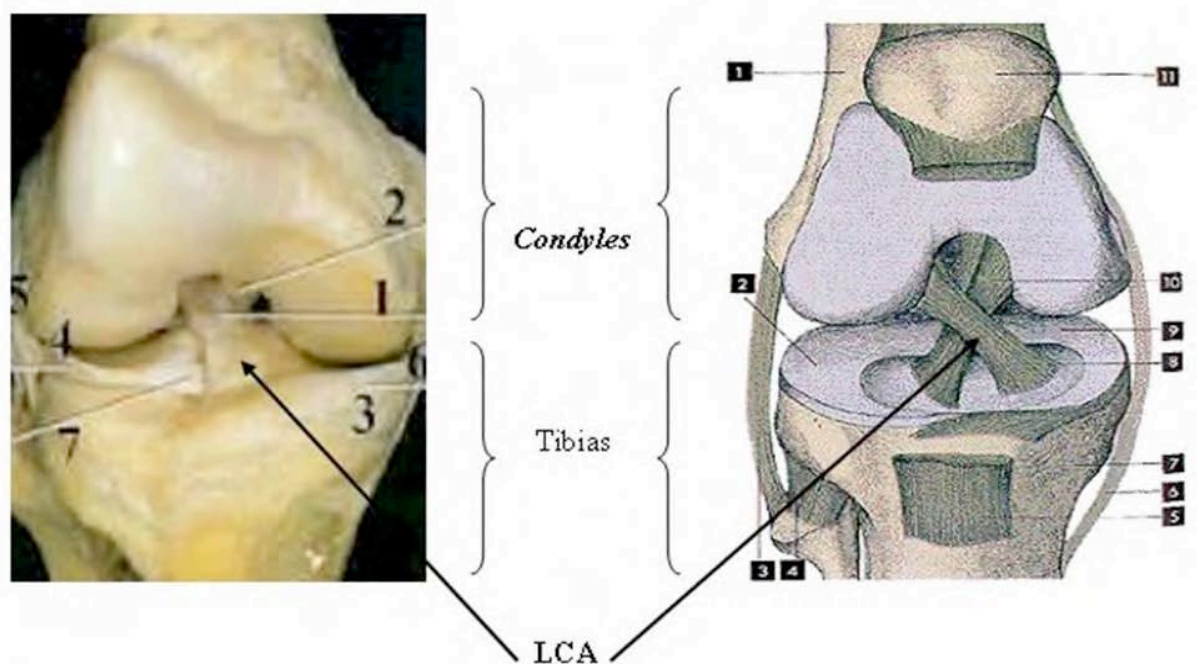


Figure 13 : Vue anatomique d'un genou humain. Partie supérieure : Condyle ; Partie inférieure : Tibia
(www.lpgp.u-psud.fr/maillie/privé/QUESTCEKETA/Lexique/LettreG/genou.html)

3. Au MG132 : inhibiteur réversible du protéasome

Le traitement au MG132 (Z-Leu-Leu-leucinal) / (Calbiochem, VWR, Strasbourg, France) s'effectue en pratiquant une injection intra-articulaire de MG132 (1,5 ou 15 μ M (0,1 % (v/v) DMSO)) dilué dans une solution de NaCl 0,9 %, dans des genoux de rats sains, ou des

genoux pathologiques (afin d'apprécier les effets préventifs ou curatifs, potentiels, de cette molécule).

4. Mode de transfection

Afin de véhiculer l'ADN plasmidique au sein de l'articulation, différentes techniques non virales de transfert de gènes ont été utilisées. Concernant les transfusions effectuées sur les animaux des modèles expérimentaux cités précédemment, elles sont entreprises sur les articulations pathologiques en vue d'un traitement curatif.

a. Injection simple

Une quantité de 30 µg d'ADN plasmidique reconstitué dans 50 µl de NaCl 0,9 % est injectée dans le genou du rat sous anesthésie.

b. Electroporation biphasique

Immédiatement après avoir subit une injection de 30 µg d'ADN plasmidique reconstitué dans 50 µl de NaCl 0,9 % (vingt-cinq à trente secondes), les chocs électriques sont appliqués à l'aide de deux électrodes plates, placées de chaque côté du genou, dont la taille est adaptée à la patte du rat (**figure 14**). Le contact électrique est assuré par un gel conducteur qui est appliqué sur la patte. Les impulsions électriques sont générées par un électroporateur (Cliniporator, IGEA, Carpi, Modena, Italie), qui permet de dissocier les phases de perméabilisation et de migration. Différentes conditions d'électroporation ont été choisies : un premier pulse de haut voltage (jusque 770 V/cm) de courte durée assurant la perméabilisation, suivi de plusieurs pulses de bas voltage (jusque 80 V/cm) permettant la migration de l'ADN plasmidique chargé négativement dans le tissu, selon le principe de l'électrophorèse. Nous avons fait varier l'intensité de voltage du premier pulse ainsi que le nombre des seconds pulses. La force du choc électrique (en V/cm) correspond au voltage par rapport à la distance séparant les deux électrodes.

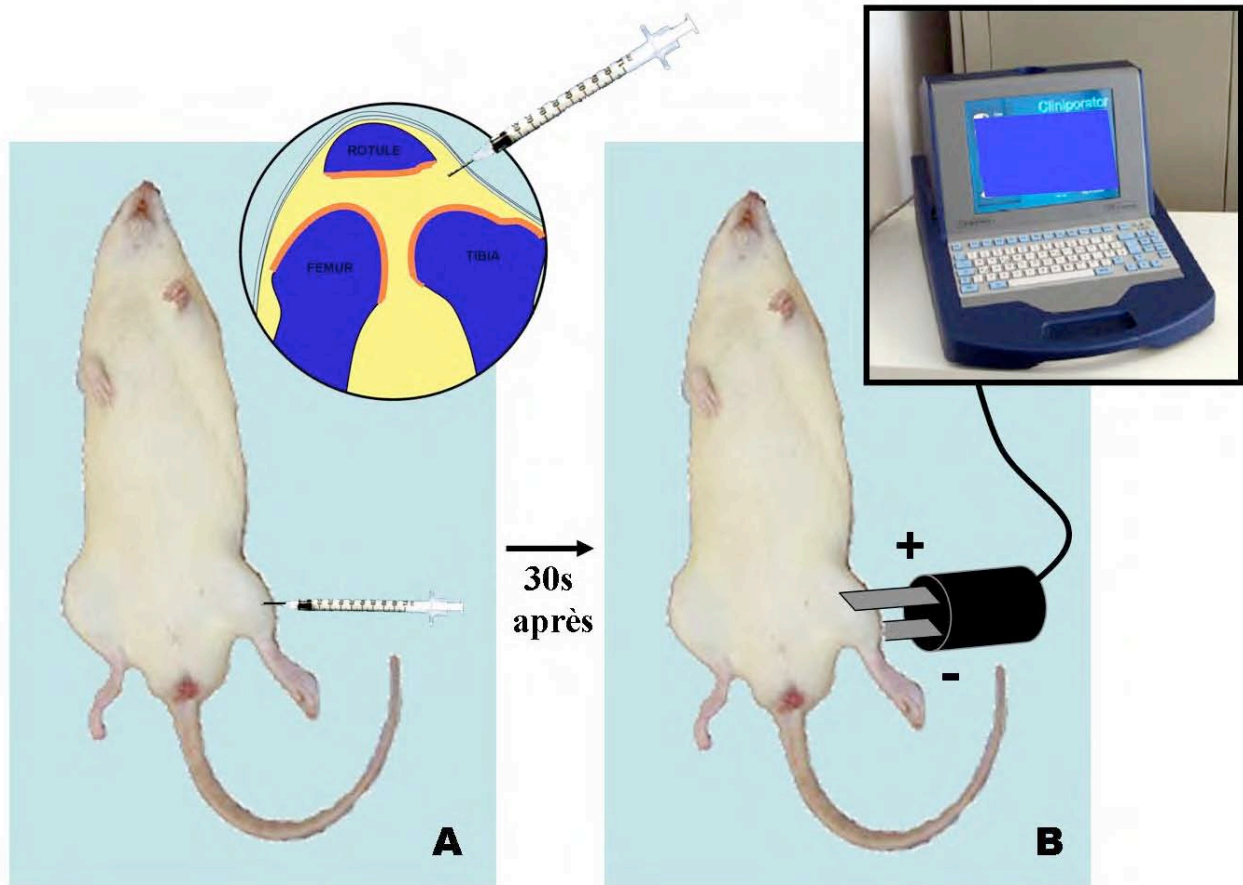


Figure 14 : Injection de plasmide et électroporation biphasique

Après une injection intra-articulaire d'ADN plasmidique (A) reconstitué dans une solution de sérum physiologique, les chocs électriques sont appliqués à l'aide de deux électrodes, placées de chaque côté du genou, au niveau de la rotule du rat (B). L'ADN étant chargé négativement, nous plaçons l'anode au dessus de la rotule, pour faire migrer les molécules plasmidiques vers le cartilage articulaire.

Ces deux opérations, espacées de 25 à 30 secondes, sont effectuées sur le rat anesthésié à l'isofluorane.

c. Polyplexes : *in vivo* jetPEI™

Nous avons utilisé comme agent de transfection, *in vivo* jetPEI™ (Qbiogene, Illkirch, France), constitué de molécules linéaires de polyéthylénimine (PEI). Ces molécules portent une densité de charges cationiques élevée permettant un transfert de gènes efficace. La **figure 15** illustre le mécanisme de transfection des cellules eucaryotes par le PEI. Ainsi, le PEI et l'ADN forment des micro-précipités résultant de l'interaction des charges, qui vont pouvoir être endocytés par les cellules. L'ADN plasmidique est dilué dans une solution de glucose à 5 % à raison de 25 µg dans 25 µl, le mélange est homogénéisé avant d'être promptement vortexé après ajout de 25 µl de solution de PEI (150 mM) diluée à 12 % dans une solution de glucose à 5 % . Le mélange obtenu est incubé pendant quinze minutes à température ambiante avant d'être injecté à l'animal au niveau de l'articulation du genou.

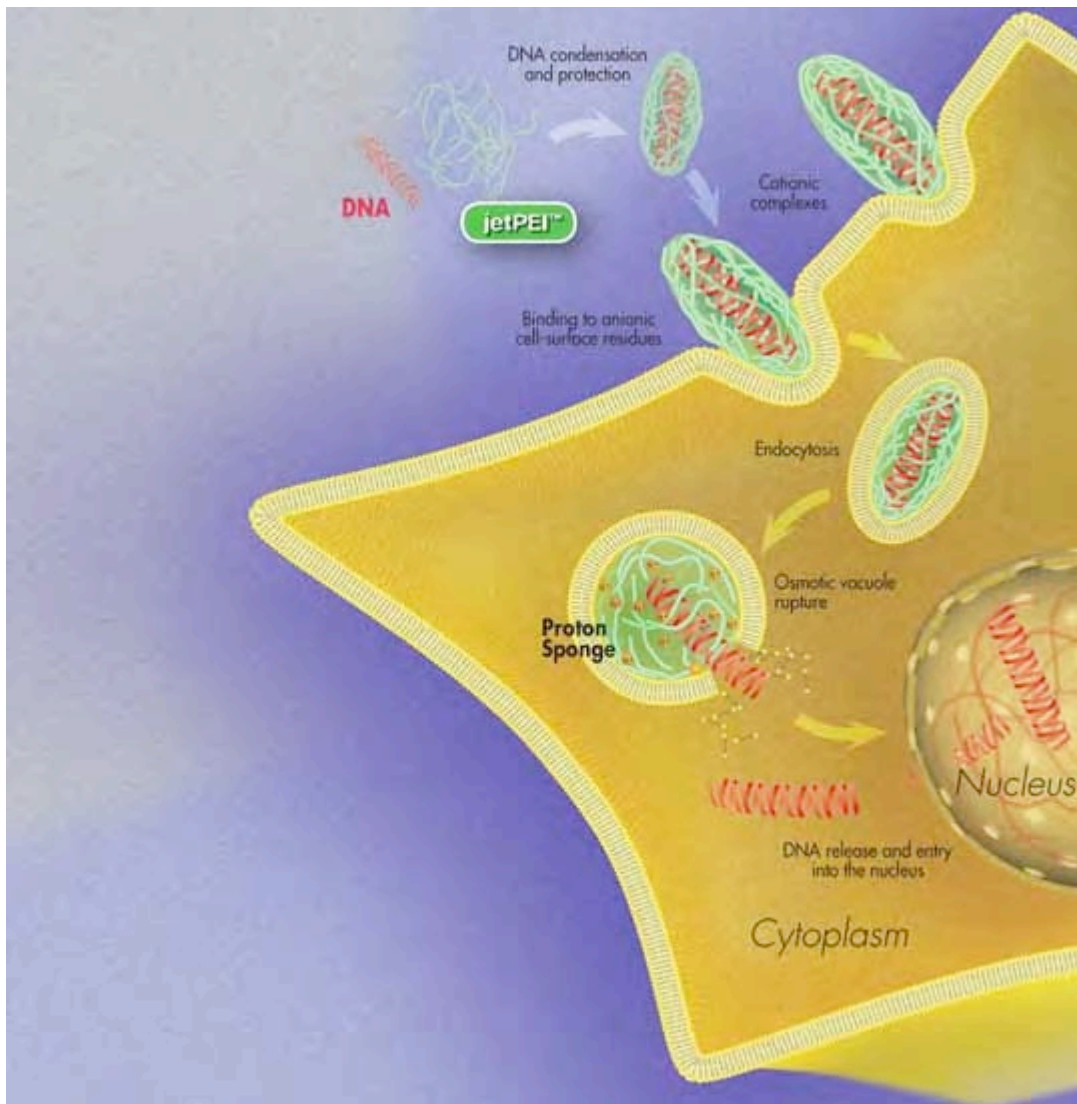


Figure 15 : Mécanisme de transfert de gènes dans des cellules eucaryotes à l'aide du système jetPEI™
 [polyplus transfection / <http://www.polyplus-transfection.com>]

C. Sacrifice

Après anesthésie par injection intra-péritonéale d'un mélange d'hydrochlorure de kétamine (37,6 mg/kg) / (Imalgene 500, Merial, Saint-Priest, France) et d'acépromazine (1,25 mg/kg) / (Vetranquil, Ceva Santé Animale, Libourne, France), les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale, puis disséqués.

II. Histologie

A. Préparation des échantillons

L'articulation du genou est prélevée, puis les tissus sont fixés dans du paraformaldéhyde 4 % (v/v) (Sigma, Saint-Quentin Fallavier) dans du PBS (pH 7,4), pendant huit heures, décalcifiés (Rapide Décalcifiant Osseux, Eurobio) et déshydratés dans des bains d'alcool de concentrations croissantes. Les prélèvements sont ensuite inclus dans la paraffine, et des coupes histologiques parallèles à la surface du cartilage de 5 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome (LEICA RM 2135).

B. Les différentes colorations utilisées

Après déparaffinage et réhydratation, les coupes sont colorées de trois façons différentes.

1. Hématoxyline – Eosine - Safran

L'HES est une coloration standard, qui permet de visualiser les cellules ainsi que les constituants matriciels. L'hématoxyline (0,5 %, cinq minutes) colore les noyaux en bleu foncé, l'éosine (1 %, cinq minutes) se fixe sur les éléments acidophiles et leur confère une coloration rose (cytoplasme, fibres nerveuses, fibres élastiques et musculaires) et le safran (1%, cinq minutes) se lie aux collagènes et à certaines protéines, telles que la chondrine (coloration jaune). Les lames sont ensuite déshydratées et montées avec une résine synthétique (Vogel, Bayer diagnostic, France).

2. Bleu de toluidine

Le bleu de toluidine est une coloration métachromatique permettant la mise en évidence de glycosaminoglycanes carboxylés, sulfatés ou phosphatés. La coloration au bleu de toluidine nécessite une incubation de cinq minutes, dans une solution à 1 %. Les lames sont plongées dans l'acétone, dans l'alcool absolu, puis déshydratées. Le montage des lames est réalisé avec une résine synthétique (Vogel).

3. Rouge Sirius

Le rouge Sirius est un colorant anionique du collagène. La réaction se produit entre les groupements sulfoniques du colorant et les groupements basiques présents sur les molécules de collagène [Constantine, 1968]. La coloration au rouge Sirius est réalisée avec une solution

saturée en acide chlorhydrique 0,01 N pendant deux minutes, puis avec une solution d'alcool à 95°, et enfin, un bain d'alcool absolu pendant deux minutes. Les lames sont ensuite déshydratées et montées avec une résine synthétique (Vogel). Les sections colorées au rouge Sirius sont dans un premier temps observées en lumière classique, puis en lumière polarisée en disposant les lames à 45° sous un microscope équipé de deux filtres spécifiques. La lumière polarisée permet de visualiser l'architecture du réseau collagénique.

C. Immunohistologie

Après déparaffinage et réhydratation, les coupes sont lavées avec du PBS 1X, puis soumises à une digestion enzymatique par la chondroïtinase ABC (cassure des liaisons des chondroïtines sulfates des protéoglycanes) pendant une heure trente minutes, à 37 °C. Après trois lavages au PBS, les cellules des tissus sont perméabilisées par une solution de Triton (Sigma) 3 % (v/v), dans du PBS, pendant trente minutes, à température ambiante. L'activité peroxydase endogène est ensuite inhibée par une incubation dans une solution préparée, extemporanément, de peroxyde d'hydrogène 3 % (v/v) (Carlo Erba, Val de Reuil, France) dans de l'eau distillée pendant trente minutes. Après lavage au PBS, les coupes sont perméabilisées par une solution de Triton 0,3 % (v/v dans du PBS) pendant trente minutes, à température ambiante. Après un autre lavage au PBS, les coupes sont mises en contact avec une solution bloquante (sérum IgG de chèvre) pendant une heure (Kit Vectastain, Vectorlab, AbCys, France), permettant la saturation de tous les sites aspécifiques. Enfin, elles sont incubées avec le premier anticorps toute la nuit à 4 °C (anticorps polyclonaux de lapin anti-Hsp70 et Hsp27 : Stressgen, Tebu, Le Perray en Yvelines, France et anticorps polyclonal de lapin anti-GFP et variants - dont EYFP – Clontech, Saint Germain en Laye, France). Les anticorps sont dilués au 1/500°. Une amplification du signal est obtenue en utilisant un anticorps de chèvre anti-lapin, couplé à la biotine, contenu dans le kit (trente minutes à température ambiante). Après une série de trois lavages, au PBS puis à l'eau, la révélation débute : un système de détection biotine-streptavidine couplé à peroxydase est utilisé selon les recommandations du fournisseur (Vectorlab). La coloration est obtenue avec du 3,3'-diaminobenzidine (DAB / Vectolab) contenant du peroxyde d'hydrogène. Après deux lavages à l'eau, les coupes sont placées dans trois bains successifs d'alcool absolu, puis de toluène, avant d'être montées entre lames et lamelles à l'aide d'une résine synthétique (Eukitt, CML, Nemours, France).

D. Hybridation *in situ*

1. Marquage de la sonde à la digoxigénine

La sonde positive, marquée à la digoxigénine est une sonde spécifique du promoteur du CMV présent sur tous les plasmides construits à partir du pcDNA.3.1. La préparation de cette sonde, ainsi que de la sonde négative non marquée, s'effectue à l'aide du « PCR DIG probe Synthesis Kit » (Roche, Meylan, France). Ceci consiste à amplifier la séquence du promoteur du CMV par PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques de cette séquence (*tableau 5*) en incorporant des dNTP marqués ou non à la digoxigénine.

2. Vérification du marquage de la sonde

a. Par retard sur gel

Les produits de PCR de sonde marquée et non marquée à la digoxigénine sont déposés sur gel d'agarose à 1 %. Un retard de migration pour la sonde positive, par rapport à la sonde négative, témoigne d'une correcte incorporation de la digoxigénine dans la sonde marquée.

b. Par immunodétection via un Anticorp anti-DIG

Pour vérifier que la sonde est suffisamment marquée à la digoxigénine, nous avons effectué une détection de la digoxigénine par un anticorp anti-DIG sur membrane de nylon. La sonde est diluée dans du tampon TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) aux $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{10^e}$, $\frac{1}{20^e}$ et $\frac{1}{100^e}$. Les solutions de sonde sont dénaturées pendant cinq minutes à 95 °C avant d'être remises immédiatement dans la glace. Les dépôts de chaque dilution de sonde sont effectués sur une membrane de nylon, Hybon N+ (Amersham France, les Ulis), à raison d'1 μ l par dépôt. La membrane est ensuite séchée à l'air libre et cuite dans un four à 80 °C pendant deux heures. Une fois cuite, la membrane est humidifiée avec du tampon TN pH 7,5 (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) puis les sites aspécifiques sont bloqués par incubation de la membrane, pendant trente minutes, dans du tampon TNB à pH 7,5 (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 % d'agent bloquant). La membrane est alors lavée brièvement dans du tampon TN puis incubée pendant trente minutes avec l'anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline (Anti-Digoxygenin-AP, Roche), dilué à 150 mU/ml dans du tampon TN. Suite à deux lavages de quinze minutes dans du tampon TN et un bref passage dans une solution de TN, à pH 9,5, supplémentée avec 50 mM de MgCl₂, la révélation de l'anticorps est effectuée par incubation de la membrane dans une solution de NBT-BCIP (Amresco, Interchim, Montluçon, France) pendant cinq minutes. Enfin, la réaction est stoppée par lavage à l'eau distillée, puis la membrane est séchée afin d'analyser les différents spots.

3. Protocole d'hybridation *in situ* sur coupes

Après déparaffinage et réhydratation, les coupes sont lavées avec du PBS 1X, puis soumises à une réaction enzymatique par la protéinase K (100 µg/ml) pendant quinze minutes à 37 °C. Après trois lavages au PBS, les cellules des tissus sont perméabilisées par une solution de Triton 3% (v/v) dans du PBS, pendant quinze minutes, à température ambiante. Les coupes sont alors fixées avec une solution de formaldéhyde 0,4 % (v/v), pendant cinq minutes, à 4 °C. Les lames sont rincées par de l'eau distillée puis le mélange, contenant la sonde marquée ou non à la digoxigénine (50 µl), est distribué sur les coupes [10 µl de solution 50X de Denhart (Sigma) ; 50 µl de Dextran sulfate 50 % (p/v) (Sigma) ; 10 µl d'ADN de sperme de saumon soniqué (10 mg/µl) (Sigma) ; 200 µl de SSC 10X (Sigma) ; 500 ng de sonde dans 50 µl de tampon Tris-EDTA préalablement chauffée à 95 °C pendant cinq minutes ; et enfin un volume de formamide déionisé (Sigma)]. L'ensemble est soigneusement recouvert d'une lamelle afin d'éviter l'évaporation, et le séchage des cellules, puis chauffé durant six minutes à 95 °C dans un four à hybridation puis immédiatement placé dans la glace pendant une minute. L'hybridation se réalise toute la nuit en chambre humide à 42 °C. Après deux lavages de cinq minutes dans du SSC 2X à température ambiante, puis dix minutes dans du SSC 0,1X à 42°C, l'activité peroxydase endogène est inhibée par une incubation de trente minutes dans une solution préparée, extemporanément, de peroxyde d'hydrogène 3 % (v/v) dans de l'eau. Après trois lavages dans un tampon TNT (0,1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0,15 M NaCl, 0,05 % Tween 20), les sites non spécifiques sont bloqués par un tampon TNB (0,1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0,15 M NaCl, 0,5 % agent bloquant, Life Science, Marnes La Coquette, France) pendant trente minutes, à température ambiante, puis l'anticorps anti-digoxigénine couplé à la peroxydase (Roche), préparé selon les recommandations du fournisseur (1/50 dans du tampon TNB) est incubé avec les coupes, une heure, à température ambiante. Les lames sont ensuite lavées dix minutes dans du tampon TNT, deux fois de suite. Une réaction d'amplification du signal (Tyramide Signal Amplification TSATM, Life Science) est réalisée. Elle permet l'augmentation significative de l'intensité des signaux aussi bien chromogéniques que fluorescents. Ce système utilise la peroxydase pour catalyser la fixation de dinitrophénol (DNP) marqué. La réaction est rapide (moins de dix minutes à température ambiante) et elle résulte en la fixation de nombreux DNP marqués immédiatement adjacents à l'enzyme immobilisée. Après lavages dans du TNT, les coupes sont incubées trente minutes avec un anticorps anti-DNP couplé à la peroxydase (Life science). Après une dernière série de lavages, la peroxydase est révélée par la DAB (Sigma). Une contre-coloration est réalisée dans du vert de méthyle 1 % (p/v) pendant

une minute. Après plusieurs lavages dans de l'eau, les lames sont trempées dans trois bains successifs d'alcool absolu, puis de toluène (environ trois minutes par bain). Les lames sont ensuite montées avec lamelles à l'aide d'une résine synthétique (Eukit).

III. Fluorescence

A. Microscopie confocale

Les images confocales et les spectres d'émission ont été réalisés à l'aide d'un microscope confocale à balayage laser SP2, dépourvu de filtre (Leica microsystemes, France), équipé de lasers argon (raies 457 nm, 476 nm, 488 nm, 514 nm) et Hélium-Néon (543 nm et 633 nm) et d'un objectif à immersion huile corrigé x 63 (HCX PL APO CS 63.0 x 1.32, code 506180 Leica). Le signal d'émission de fluorescence est recueilli de manière optimisée, pour chaque canal, après décomposition de la lumière de fluorescence sur un prisme (AOBS - Acoustical Optical Beam Splitter), et sélection d'une bande passante spécifique (GFP et eGFP: 482-544 nm ; EYFP : 511-573 nm).

Zoom : 2,34. Ouverture du diaphragme : Airy 1 (61 μm). Résolution latérale : 200 nm. Résolution spatiale : 225 nm. Format : 512 x 512. 8 bits. Vitesse de balayage : 400 Hz.

B. Imagerie de durée de vie de fluorescence

Les mesures de déclin de fluorescence (durée de vie des états excités précurseurs de la fluorescence) sont réalisées selon la méthode de comptage monophotonique corrélée en temps. Un oscillateur Titane-saphir délivre un pulse laser d'une durée d'impulsion de 120 femtosecondes à une fréquence de 76 MHz. Pour l'imagerie des durées de vie, un module SPC-730 Becker & Hickl (Allemagne) interfacé au microscope confocal a été mis en œuvre.

IV. Culture cellulaire

A. Culture de chondrocytes et synoviocytes de rat

1. Primoculture de chondrocytes

Les chondrocytes sont préparés à partir de cartilage articulaire de rats sains. Le cartilage est prélevé au niveau de l'épiphyse des têtes fémorales. Il est lavé trois fois avec une solution de NaCl 0,9 % (B.Braun, Boulogne, France) supplémenté en pénicilline et en streptomycine (10 mg/ml) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) puis soumis à une digestion par une solution de pronase (2 mg/ml) (Sigma) dans du NaCl 0,9 % durant deux heures à 37 °C sous 5 % de CO₂. Après trois rinçages par du NaCl 0,9 %, le cartilage est soumis à une deuxième digestion par une solution de collagénase B (1,5 mg/ml) (Roche) pendant une nuit à 37 °C sous 5 % de CO₂. La collagénase permet la libération des chondrocytes. Elle est reconstituée dans du milieu de culture DMEM/F12 (Invitrogen) supplémenté à 1 % en pénicilline et en streptomycine. Les solutions sont filtrées sur filtre de 0,22 µm de diamètre afin de les stériliser. Cette suspension est ensuite prélevée et centrifugée à 250 g pendant huit minutes. Le culot est récupéré et mis en culture dans des flasques de 75 cm² contenant du milieu complet (DMEM/F12 supplémenté par 2 mM de L-glutamine (Invitrogen), 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL streptomycine) contenant 10 % de SVF (sérum de veau fœtal) décomplémenté.

2. Primoculture de synoviocytes

Les synoviocytes sont préparés à partir de membranes synoviales de genoux de rats sains. Les membranes synoviales sont incubées dans une solution de collagénase/dispase (0,1 U/mL et 0,8 U/mL, Roche) pendant toute une nuit. Les suspensions sont ensuite prélevées et centrifugées à 250 g pendant huit minutes. Le culot cellulaire est récupéré et mis en culture dans des flasques de 75 cm² avec du milieu complet à 10 % de SVF. Les cultures sont maintenues dans un incubateur à 37 °C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

3. Entretien des cellules

Les cellules se multiplient et sont transférées dans de nouveaux flacons une fois à confluence. Nous avons utilisé des chondrocytes en 1^{er} passage et des synoviocytes en 3^{ème} passage pour limiter la dédifférenciation de ces cellules. Pour chaque passage, les cellules à confluence sont lavées avec du PBS (Invitrogen) et récupérées suite à l'action d'un volume de

trypsine (Invitrogen) pendant cinq minutes à 37 °C et une neutralisation par du milieu complet. La solution de cellules est centrifugée, puis le culot cellulaire est repris par du milieu complet. Un comptage sur cellule de Malassez est réalisé afin de répartir les cellules dans les flasques ou dans des plaques de culture.

B. Transfection transitoire par Poly-Ethylène-Imine

Nous avons utilisé comme agent de transfection de l'Exgen 500 (Euromedex, Mundolsheim, France), constitué de molécules linéaires de polyéthylémine (PEI). Pour une transfection optimale, les cellules en culture sont traitées à 60 % de confluence. La quantité de plasmides ainsi que le volume d'Exgen 500 sont propre à chaque plaque de culture utilisée : 1 µg de plasmide / $2,5 \cdot 10^5$ cellules (équivalent à un puit) pour les plaques de six puits ; 0,5 µg de plasmide / $7 \cdot 10^4$ cellules (équivalent à un puit) pour les plaques de vingt-quatre puits ; d'autre part 6 % (v/v) d'Exgen 500 dans du NaCl 0,9 % par puit, dans les deux cas. Il faut que l'Exgen 500 soit versé délicatement sur la solution de plasmide, et que ce mélange de transfection soit homogénéisé immédiatement dans un vortex pendant quinze secondes. Ensuite, il est incubé pendant dix minutes à température ambiante, puis, mis en contact avec les cellules. Il est très important de bien homogénéiser le mélange immédiatement après mise en contact de l'ADN avec l'Exgen 500 de façon à ne pas obtenir de complexes trop volumineux, éventuellement toxiques pour les cellules, car difficilement endocytés. Quatre volumes de milieu de culture complet sont ajoutés sur les cellules. L'ensemble est placé à 37 °C sous 5 % de CO₂ pendant deux heures. Le mélange est ensuite éliminé et les chondrocytes ou synoviocytes sont replacés dans du milieu de culture complet.

C. Traitements

1. A l'IL-1β

Les cellules sont mises en contact avec une solution à 10 ng/µl l'IL-1β (Sigma) dans du DMEM/F12 complet à 1 % de SVF pendant huit heures. Les cellules sont ensuite rincées deux fois au PBS et conservées par congélation à -80 °C, en attendant d'être utilisées pour les extractions des ARN totaux et ou bien grattées en vue d'une extraction protéique.

2. Au MG132 : inhibiteur réversible du protéasome

L'exposition au MG132 (Z-Leu-Leu-leucinal) / (Calbiochem, VWR, Strasbourg, France) se pratique sur les cellules à confluence. Pour ce faire, les cellules sont traitées avec du MG132 (1,5 μ M en solution de milieu de culture à 0,1 % (v/v) DMSO ou d'EtOH) pendant quatre heures puis elles sont replacées dans du milieu de culture complet contenant 1 % de SVF. Les cellules témoins sont traitées avec du milieu de culture complet contenant 0,1 % de DMSO ou d'EtOH.

D. Test de cytotoxicité

La technique que nous avons utilisé pour les études de cytotoxicité du MG132 est le test MTT, nommée également bleu de thiazole ou 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5 diphényltétrazolium. Le MTT solubilisé est de couleur jaune, une fois en contact avec des cellules vivantes, les déshydrogénases mitochondriales le réduisent en cristaux de formazan, bleus, par clivage du noyau tétrazolium. Ces cristaux sont alors solubilisés avec une solution de SDS- DMF et la coloration est mesurée par spectroscopie à une longueur d'onde de 580 nm [Denisot et *coll.*, 1986]. Si un produit administré aux cellules est toxique, leur activité mitochondriale chute et la réduction de MTT en cristaux de formazan ne se fait plus.

Les cellules, cultivées dans des plaques de 96 puits, subissent un traitement au MG132. Après vingt-quatre heures, le milieu de culture est remplacé par 100 μ l de milieu neuf, et 50 μ l de MTT (2,5 mg/ ml, solubilisé dans du PBS). Les plaques de cultures sont placées à l'incubateur pendant quatre heures, à 37 °C, temps au bout duquel, 100 μ l de SDS-DMF sont rajoutés (80 g de sodium dodécylsulfate, 200 ml diméthylformamide, 200 ml d'eau distillée, pH 7,4). La lecture au spectrophotomètre, s'effectue après une incubation de vingt-quatre heures à 37 °C.

E. Immunocytochimie

Cette technique permet de procéder à l'immunodétection de la protéine recherchée, en suivant différentes étapes présentées dans la *figure 16*.

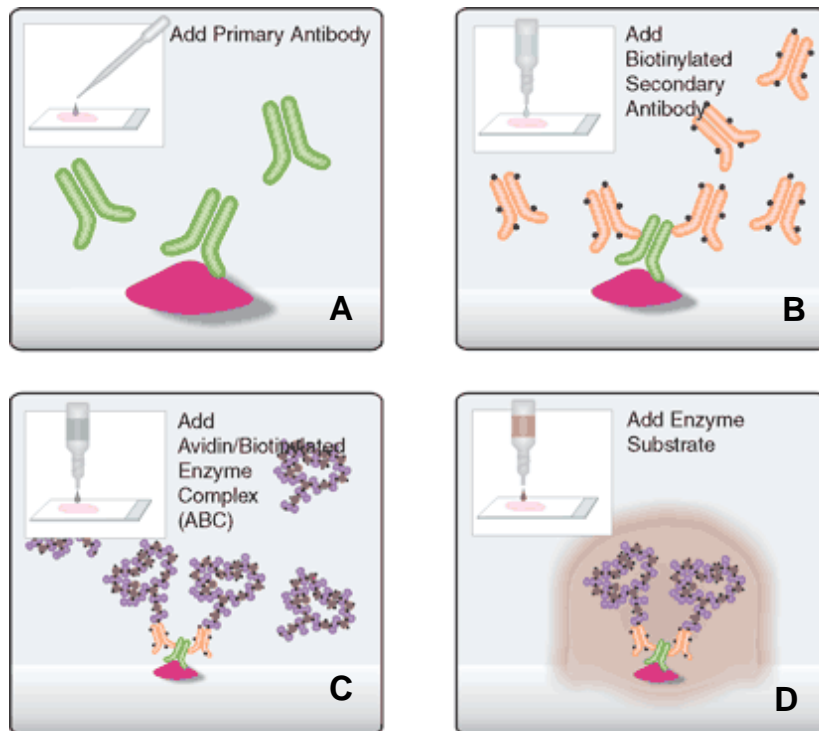


Figure 16 : Principe de l'immunocytochimie.

1 : L'anticorps primaire de lapin se fixe sur les protéines d'intérêt recherchées.

2 : L'anticorps secondaire biotinylé anti-lapin, est ajouté et se fixe sur le premier anticorps.

3 : Le complexe ABC, constitué de streptavidine-biotine couplée à la peroxydase de Raifort est ajouté et se fixe sur le site biotinylé de l'anticorps secondaire.

4 : L'ajout de la DAB sous l'action de la peroxydase émet une coloration brune.

[Vector Laboratories / <http://www.vectorlabs.com/infopage.asp?dpID=4&locID=609308>].

Les cellules sont cultivées dans des plaques de vingt-quatre puits sur des lamelles. Après transfection, les cellules sont lavées par une solution de PBS (Eurobio, Courtaboeuf, France), puis fixées à température ambiante pendant quinze minutes dans une solution de paraformaldéhyde 4 % (Sigma) préparée extemporanément (p/v dans du PBS, pH 7.4). Après lavage au PBS, les cellules sont perméabilisées par une solution de Triton (Sigma) 0,3 % (v/v dans du PBS) pendant trente minutes à température ambiante. L'activité peroxydase endogène est ensuite inhibée par une incubation dans une solution préparée extemporanément de peroxyde d'hydrogène 3 % (v/v) (Carlo Erba) dans de l'eau pendant trente minutes. Après un autre lavage au PBS, les cellules sont mises en contact avec une solution bloquante (sérum IgG de chèvre) pendant une heure (Kit Vectastain), permettant la saturation de tous les sites aspécifiques. Enfin, elles sont incubées avec le premier anticorps toute la nuit à 4 °C (anticorps polyclonaux de lapin anti-Hsp70 et Hsp27 : Stressgen, et anticorps polyclonal de lapin anti-GFP et variants - dont EYFP – Clontech). Une amplification du signal est obtenue en utilisant un anticorps de chèvre anti-lapin couplé à la biotine, contenu dans le kit (trente minutes à température ambiante). Après une série de trois lavages au PBS puis à l'eau, la révélation

début : un système de détection biotine-streptavidine couplé à peroxydase est utilisé selon les recommandations du fournisseur (Vectorlabs).

La coloration est obtenue avec du 3,3'-diaminobenzidine (DAB / Vectolabs) contenant du peroxyde d'hydrogène. Après deux lavages dans de l'eau, les lamelles sont retirées de la plaque et placées dans trois bains successifs d'alcool absolu, puis trempées dans du toluène. Les lamelles sont ensuite montées sur lames à l'aide d'une résine synthétique (Eukitt).

F. Hybridation *in situ* sur cellules

Les cellules sont cultivées dans des plaques de vingt-quatre puits avec lamelles. Les cellules sont lavées au PBS, puis fixées à température ambiante pendant quinze minutes dans une solution de paraformaldéhyde 4 % (Sigma) préparée extemporanément (p/v) dans du PBS, pH 7,4. Après lavage avec du PBS, les cellules sont perméabilisées par une solution de Triton (Sigma) 0,3 % (v/v) dans du PBS pendant vingt minutes à température ambiante. Après rinçage, les lamelles sont récupérées et placées sur des lames d'histologie. Le mélange contenant la sonde spécifique du promoteur du CMV, marquée ou non à la digoxigénine (50 µl) est alors distribué sur les cellules [10 µl de solution 50X de Denhart (Sigma) ; 50 µl de Dextran sulfate 50 % (p/v) (Sigma) ; 10 µl d'ADN de sperme de saumon soniqué (10 mg/µl) (Sigma) ; 200 µl de SSC 10X (Sigma) ; 500 ng de sonde dans 50 µl de tampon Tris-EDTA préalablement chauffée à 95 °C pendant 5 minutes ; et enfin un volume de formamide (Sigma)]. L'ensemble est soigneusement recouvert d'une lamelle afin d'éviter l'évaporation, et le séchage des cellules, puis chauffé durant six minutes à 95 °C dans un four à hybridation puis immédiatement placé dans la glace une minute. L'hybridation se réalise toute la nuit en chambre humide à 42 °C.

Les lamelles sont alors récupérées et remises dans les plaques de vingt-quatre puits. Après deux lavages de cinq minutes dans du SSC 2X à température ambiante, puis une incubation de dix minutes dans du SSC 0.1X, à 42°C, les sites non spécifiques sont bloqués par un tampon TNB (0,1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0,5 % agent bloquant, life science) pendant quinze minutes, à température ambiante. L'anticorps anti-digoxigénine (Roche) couplé à la phosphatase alcaline (1/500 dans du tampon TNB) est incubé avec les cellules durant une heure, à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées deux fois dans du tampon TNT (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl) pendant dix minutes. L'activité de la phosphatase

endogène est inhibée avec du lévamisole (1 mM / Sigma) pendant cinq minutes. La coloration est révélée avec du NBT/BCIP (Amresco) contenant du lévamisole (à l'obscurité, à 37 °C).

Les lamelles sont ensuite contre-colorées avec de l'éosine, pendant quinze secondes. Après plusieurs rinçages, elles sont récupérées et montées sur lames de façon aqueuse (Aquatex, Merck, Darmstadt, Allemagne).

V. *Biologie moléculaire*

A. Développement du vecteur pcDNA-EYFP

1. **Technique de clonage**

Les vecteurs pEYFP (Clontech), et pcDNA3.1. (Invitrogen) sont digérés par EcoR I et BamH I (Invitrogen) à raison de 1 µl d'enzyme (10 U/µl) pour 1 µl de plasmide (1 à 1,5 µg/µl), selon les recommandations du fournisseur. Les sites de restriction de ces deux vecteurs sont présentés dans la *figure 17*.

Les produits de digestion sont ensuite déposés sur gel d'agarose, et les différents fragments isolés par l'électrophorèse. Les séquences codantes de l'EYFP ainsi que le vecteur pcDNA3.1. linéarisé sont alors récupérés à l'aide du kit d'extraction (QIAquick Gel Extraction Kit / Qiagen, Courtaboeuf, France).

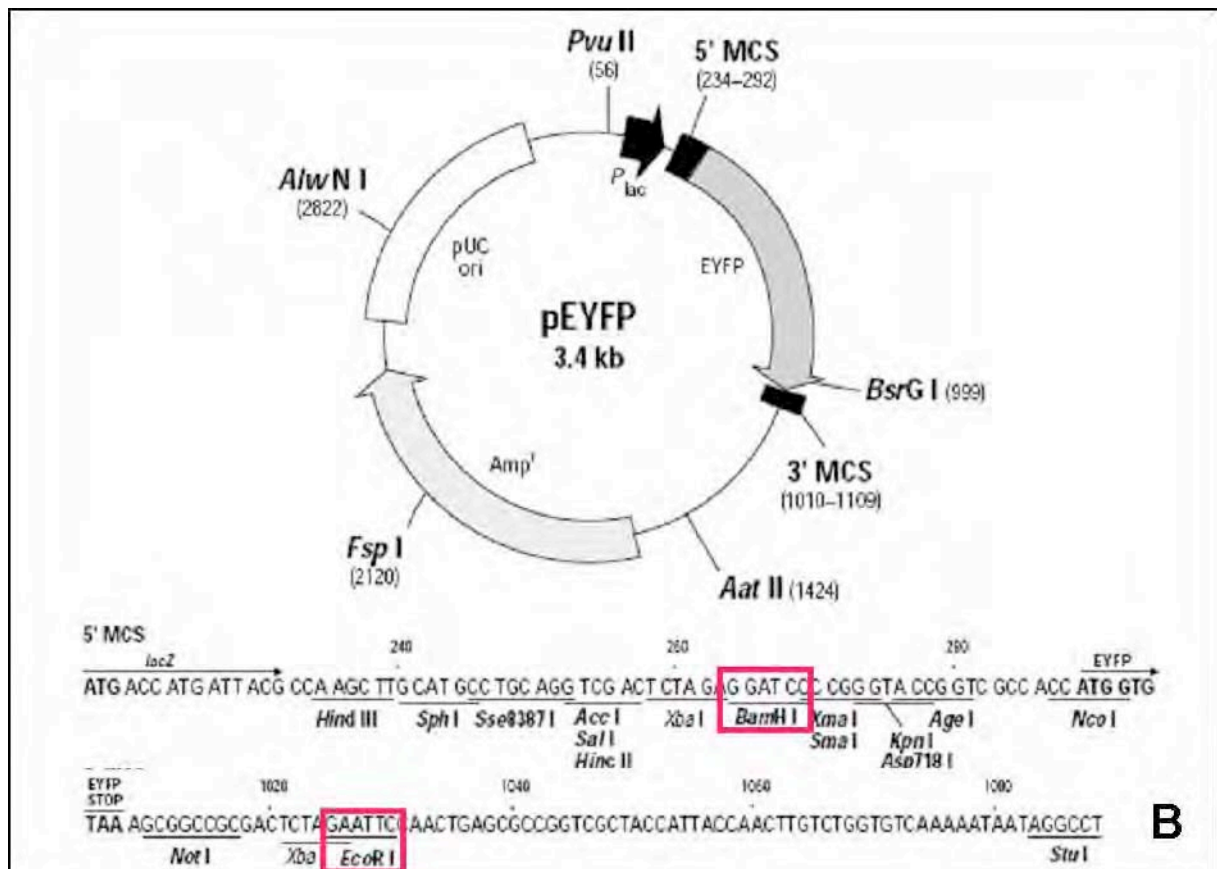
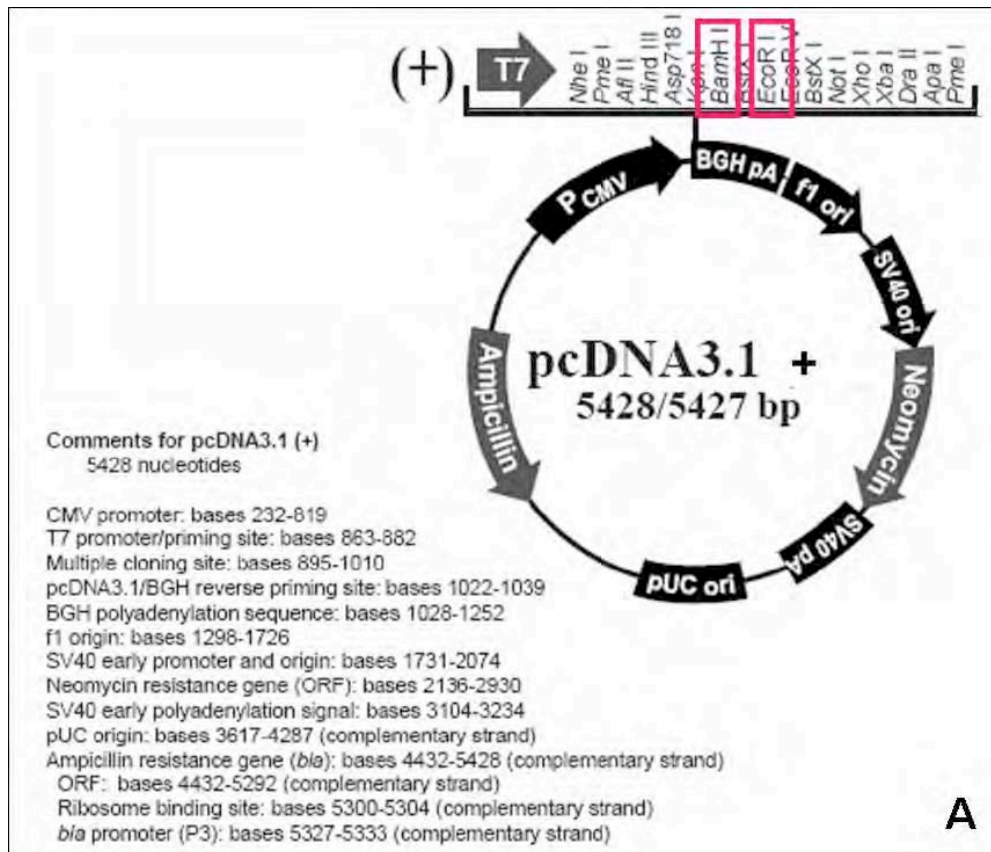


Figure 17 : Digestion des plasmides pcDNA3.1 (A) et pEYFP (B) par EcoR I et BamH I

Une ligation est effectuée par la T4 DNA ligase (Promega), entre l'insert et le vecteur, afin d'obtenir un nouveau vecteur recombinant le pcDNA3.1/EYFP, par incubation du mélange durant une heure, à température ambiante. La transformation de bactéries compétentes (50 µl) (GTS, Turbocells® Chemically Competent *E.coli*, Ozyme, St Quentin, France) s'effectue immédiatement après la ligation avec 2 µl de produit de ligation. L'ensemble est placé dans la glace pendant trente minutes, puis un choc thermique est réalisé à 42 °C pendant trente secondes. L'ensemble est replacé dans la glace pendant deux minutes. Le milieu SOC (950 µl, 2 g Bacto®-Tryptone, 0,5 g Bacto®-Yeast Extract, NaCl 1M, Mg²⁺ 2M, Glucose 2 M) est ajouté au tube contenant les bactéries et le produit de ligation. L'ensemble est placé à 37 °C pendant deux heures, sous agitation. Des boîtes de Pétri contenant du LB agar (10 g Bacto®-Tryptone, 5 g Bacto®-Yeast Extract, 5 g NaCl, 15 g Agar, pH 7) et de l'ampicilline (100 µg/ml) sontensemencées avec 100 µl de ce mélange et placées dans un incubateur à 37 °C, pendant une nuit. Les boîtes de gélose contenant les colonies sont stockées à 4 °C jusqu'à leur utilisation. Le plasmide est alors isolé et purifié par minipréparation (Plasmid Mini kit, Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. L'absorbance à 260 nm ainsi que le rapport des absorbances à 260/280 nm sont mesurés. La concentration en plasmide (µg/ml) est donnée par la formule suivante [Sambrook, 1989] :

$$[\text{ADN}] = A_{260} \times (1 / D) \times 50 \text{ } \mu\text{g/ml, où } D = \text{Dilution de l'échantillon}$$

2. Maxipréparation de plasmide

Cette technique nous a permis de produire en grande quantité les plasmides désirés. Les bactéries transformées avec le plasmide d'intérêt sont mises à développer stérilement dans 500 ml de milieu LB Broth liquide supplémenté par de l'ampicilline (100 µg/ml). Les erlenmeyers sont placés à 37 °C, durant une nuit, sous agitation. La maxipréparation de plasmide se réalise à l'aide du kit PhoenIX Maxiprep (Qbiogene). Une première centrifugation à 4000 g pendant sept minutes est d'abord réalisée afin de récupérer les bactéries en culot sec. Le culot est repris dans 16,5 ml de solution de « resuspension » contenant 50 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM d'EDTA et 100 µg/ml de RNase A. Puis 16,5 ml de tampon de lyse (200 mM NaOH, 1% (p/v) SDS) sont ajoutés. Après agitation, par retournements successifs, pendant une minute, le tout est mis à incuber quatre minutes, à température ambiante, puis une centrifugation à 8000 g, pendant quinze minutes est effectuée. Le surnageant est récupéré et il est passé sur une colonne échangeuse d'ions selon les recommandations du fournisseur. Après l'ajout d'une solution de lavage (60 ml) puis d'une solution d'élution (15 ml), l'ADN plasmidique est précipité par de l'isopropanol (10,5 ml). Une centrifugation à 8000 g, pendant trente minutes, à 20 °C est

ensuite réalisée. Le culot d'ADN est récupéré, lavé par de l'éthanol à 70 % (1 ml), séché et repris dans 200 µl d'eau exempte de nucléase.

B. Extraction des ARN totaux

1. A partir de cellules en monocouche

Après décongélation des cellules à température ambiante, l'extraction des ARN s'effectue grâce au kit RNeasy (Qiagen). Les cellules sont incubées durant dix minutes dans 350 µL de tampon RLT additionné de β-mercaptoéthanol à 10 µl/ml (Sigma). Cette étape permet de lyser les membranes cellulaires et de libérer le contenu des cellules en acides nucléiques. Un volume d'éthanol à 70 % est alors ajouté et le mélange est déversé dans la colonne d'extraction d'ARN. Les ARN totaux retenus sur la membrane de silice sont alors lavés à l'aide de différents tampons fournis dans le kit, deux fois au RW1 et une fois avec du RPE. L'élution est alors réalisée avec 50 µL d'eau exempte de nucléase.

La membrane de silice qui compose les colonnes du kit RNeasy permet de séparer assez spécifiquement les ARN totaux de l'ADN plasmidique et génomique, mais afin de s'affranchir d'une quelconque contamination d'ADN, les ARN issus de cellules transfectées sont traités à la DNase (RNase free DNase Set, Qiagen). Nous avons donc effectué une étape supplémentaire pendant l'extraction d'ARN après le passage du mélange contenant les acides nucléiques et l'éthanol sur colonne. Après un premier lavage au RW1, les ARN totaux contenus sur la membrane ont été mis en présence de 35 µl de tampon RDD contenant la DNase à 1 U/µl pendant dix minutes, puis la membrane est, à nouveau, lavée avec du RW1 avant d'être traitée selon le protocole exposé préalablement.

2. A partir de cartilage rotulien

Le cartilage est obtenu à partir de rotules de rat congelées à -80 °C. Le cartilage, pelé stérilement, est placé dans un microtube de 1,5 ml, lui-même baigné partiellement dans de l'azote liquide, afin d'être broyé à l'aide d'un piston préalablement autoclavé. Le broyat est mis en suspension dans une solution de RLT supplémentée de β-mercaptoéthanol. Après dix minutes d'incubation le mélange est déposé sur colonne Qiasreder (Qiagen) afin d'ôter les débris tissulaires. Après centrifugation, la solution purifiée est supplémentée avec 600 µl d'éthanol 70°, et passée sur colonne RNeasy, la suite de l'extraction s'effectue de la même manière que pour l'extraction d'ARN à partir de cellules en culture.

3. A partir de membranes synoviales

Les membranes synoviales de rat sont conservées congelées à -80 °C. La membrane est broyée à l'aide d'un piston préalablement autoclavé. Le broyat est mis en suspension dans une solution de RLT supplémentée de β-mercaptoéthanol. Après dix minutes d'incubation, le mélange est déposé sur colonne Qiasreder (Qiagen) afin d'ôter les débris tissulaires. Après centrifugation, la solution purifiée est supplémentée avec 600 µl d'éthanol 70°, et passée sur colonne RNeasy, la suite de l'extraction s'effectue de la même manière que pour l'extraction d'ARN à partir de cellules en culture.

4. Vérification de la qualité des ARN totaux

a. Dosage spectrophotométrique

Ce dosage permettra d'effectuer l'étape de transcription inverse à partir de la même quantité d'ARN totaux dans tous les échantillons. La quantité d'ARN est mesurée par spectrophotométrie à 260 nm. La concentration en ARN est donnée par la formule suivante :

$$[\text{ARN}] = A_{260} \times 1/D \times 40 \text{ } \mu\text{g/ml, où } D = \text{facteur de dilution de l'échantillon.}$$

Parallèlement, le rapport A260/A280 doit être compris entre 1,8 et 2, pour témoigner de la pureté de nos extraits d'ARN vis-à-vis des protéines.

b. Migration sur gel d'agarose

Afin de vérifier que les ARN récupérés ne sont pas dégradés, on effectue une migration sur gel d'agarose 1 %. Les dépôts sont composés de 2 µl d'extraits d'ARN additionnés de 5 µl de bleu de charge. Un agent intercalant des acides nucléiques, le BEt (Bromure d'Ethidium, Eurobio) est ajouté au gel d'agarose. Il permet de révéler les bandes sous UV. Les extraits d'ARN dégradés donnent sur gel une traînée diffuse, alors que s'ils ne le sont pas, nous pouvons observer deux bandes distinctes qui correspondent aux ARN majoritaires, 18 S et 28 S.

C. Transcription inverse

1. Avec la reverse-transcriptase M-MLV

Cette réaction permet d'obtenir un ADN simple brin complémentaire (ADNc) à l'aide d'une amorce poly-dT et d'une enzyme, la transcriptase inverse MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus / Invitrogen). Cette enzyme présente une activité ADN polymérase ARN

dépendante ainsi qu'une activité exoribonucléasique hybride dépendante permettant la dégradation des ARN contenus dans les hybrides ADN-ARN.

L'ADNc est obtenu à partir d'une quantité d'ARN, entre 500 ng et 1 µg (la quantité d'ARN est différente selon les manipulations, elle dépend de l'extraction d'ARN réalisée auparavant), en utilisant des amorces se fixant sur la partie poly-Adénylée des ARN messagers (ARNm). Suite au dosage des ARN, il faut réaliser différentes dilutions afin que nos échantillons aient tous la même concentration. Le mélange réactionnel contient 11 µl de solution d'ARN et 9 µL de tampon réactionnel. Ce tampon est composé de 4 µl de tampon de RT, de 2 µl de DTT, de 1 µl de dNTP, 1 µl d'oligoDT, 1 µl de transcriptase inverse. La réaction de transcription inverse se déroule pendant une heure à 37 °C. Les ARN restants sont dénaturés par la chaleur (durant cinq minutes à 95 °C).

2. Avec la transcriptase inverse iScript™

Cette enzyme est obtenue par une modification de la transcriptase inverse dérivée du M-MLV qui lui confère une plus grande sensibilité. Ainsi, son utilisation s'avérera nécessaire pour transcrire des échantillons d'ARNm tels ceux issus du cartilage rotulien de rat. En effet, les ARN totaux extraits sont très faiblement concentrés. Ces ARN sont mis au contact de 4 µl de solution 5X iScript Reaction Mix, et de 1 µl d'enzyme (iScript Reverse transcriptase), les réactifs proviennent du « iScript cDNA Synthesis Kit » (Bio-rad, Marnes-la-coquette, France). Le volume final étant de 20 µl nous avons choisi, de travailler systématiquement avec 15 µl d'ARN totaux. De ce fait, les études de PCR qui suivront, devront impérativement comprendre l'étude de l'expression d'un gène de ménage afin de normaliser les résultats. La réaction de transcription inverse comprend deux étapes d'incubation, 5 minutes à 25 °C suivies de 30 minutes à 42 °C. Enfin, les ARN restants sont dénaturés par la chaleur durant 5 minutes à 85 °C. Les échantillons d'ADNc seront conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

D. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

1. PCR semi-quantitative

Les ADNc codant pour les différentes protéines d'intérêt sont amplifiés par PCR. Les amorces ont été conçues selon des séquences référencées sur le site « pubmed » (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) ou bien sur la séquence du plasmide dont est extrait le gène, à l'aide du programme Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). De plus, nous avons vérifié à l'aide du programme NCBI-

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) et de la banque de séquences GenBank que les amorces ainsi conçues étaient spécifiques. Les conditions de PCR, pour chacun de ces marqueurs, ont été préalablement optimisées. Les conditions de température d'hybridation des amorces et le nombre de cycles réalisés sont mentionnés dans le **tableau 5**.

Tableau 5 : Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification des ADNc correspondant aux gènes recherchés.

Gènes (Rat)	Amorces sens	Amorces AS	Taille amplificat	Tm théorique	Tm observé
RP29	5'-aagatgggtcaccagcagctctactg-3'	5'- agacgcggaagagcgagaa -3'	73 pb	81°C	81 - 82°C
TNF α	5'-atgggctcctctcattcag-3'	5'- actccagctgctcctctgct -3'	104 pb	82°C	81°C
EYFP	5'-aggagcgcaccatcttcttc-3'	5'-cggccatgatatagagcttg-3'	183 pb	85°C	84°C
vEGF	5'-cacatctgcaagtacgttcgtta-3'	5'-cagagcggagaagcatttgg-3'	120 pb	79°C	80°C
COX-2	5'- tacaagcagtggaaggcc -3'	5'-cagtattgaggagaacagatggg-3'	304 pb	83 - 84°C	81°C
iNOS	5'- aatgcggaaggtcatggc- 3'	5'-cgacttctgtctcagtagcaaa -3'	67 pb	78°C	78 - 79°C
Hsp70	5'-atgcgctcagctcctacgcctt - 3'	5'-gctgatcttgccttgagaccctc- 3'	70 pb	79°C	82°C
Hsp27	5'- gagtggctcagtggtcagc- 3'	5'-tcaggagcgaagtgggtgac - 3'	209 pb	90 °C	84°C
HSF-1	5'-catccttcgagagagcgaac - 3'	5'- caggtgtccaggtggagt- 3'	184 pb	86°C	85°C
HSF-2	5'- atggagcccaagaagaat- 3'	5'- gatactggctggagggatca - 3'	225 pb	77°C	77°C
IL-1 β	5'- cttcccagacatgctagg -3'	5'- caaaggctcccctggagac -3'	64 pb	79°C	79-80°C
CMV	5'-ggcggagttgttacgacatt-3'	5'-gccagatatacgcttgaca-3'	546 pb	-	-

Les échantillons sont d'abord chauffés à 95 °C, pendant 15 minutes, pour activer la *Taq* polymérase (HotStar*Taq*[®] polymerase, Qiagen). Les cycles d'amplification (dénaturation, fixation des amorces et synthèse) sont alors réalisés (45 secondes à 95 °C ; 45 secondes à la température de fixation des amorces ; 1 minute à 72 °C). L'étape d'élongation finale est réalisée 10 minutes à 72 °C.

Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % (w/v) dans un tampon TBE coloré par du bromure d'éthidium (0,5 μ g/ml). Les tailles des différents fragments sont rapportées sur le **tableau 5**.

2. PCR quantitative en temps réel

a. Principe

Cette technique va nous permettre de suivre en temps réel l'amplification d'un fragment d'ADN donné, grâce au kit QuantiTech SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) et un appareillage particulier le LightCycler (Roche Applied Science). Le principe général est celui d'une PCR classique. Ainsi, grâce à l'utilisation d'une matrice d'ADN, d'amorces spécifiques, et du mélange réactionnel fourni dans le kit – ce dernier comprenant, la *Taq* polymérase, les dNTP, et un tampon de PCR adéquat (Tris HCl, KCl, (NH₄)₂ SO₄, 5 mM MgCl₂, pH 8,7) - un fragment d'ADN déterminé va être amplifié par réaction de

polymérisation en chaîne. La différence essentielle provient de la présence dans la solution réactionnelle d'un intercalant de l'ADN nommé le SYBR Green. Ce fluorophore a la capacité d'émettre une fluorescence très vive lorsqu'il est intercalé dans de l'ADN double brin, fonction disparaissant dès qu'il se retrouve sous sa forme libre (*figure 18*). La réaction s'effectue dans des capillaires en verre de 1,5 mm de diamètre et de 3 cm de hauteur. Ceci favorise les échanges thermiques entre le mélange réactionnel et l'appareil, diminuant ainsi les durées des différentes étapes de la PCR, et donc le temps nécessaire à l'exécution du programme. Pendant toute la durée du processus, un microspectrofluorimètre couplé au LightCycler va nous permettre de mesurer la fluorescence émise par le SYBR Green. Ainsi il est possible de suivre l'évolution en temps réel de la quantité d'amplifiats en effectuant des relevés de fluorescence à la fin de chaque étape d'élongation. Cette évolution peut-être représentée par une sigmoïde. En effet, la fluorescence émise ne sera détectée qu'à partir d'un seuil nécessitant plusieurs cycles d'amplification avant d'augmenter exponentiellement jusqu'à un second seuil, le SYBR Green se trouvant alors en quantité limitante. Ce n'est donc que durant la phase exponentielle que la quantité d'amplicons obtenus sera directement proportionnelle à la fluorescence émise.

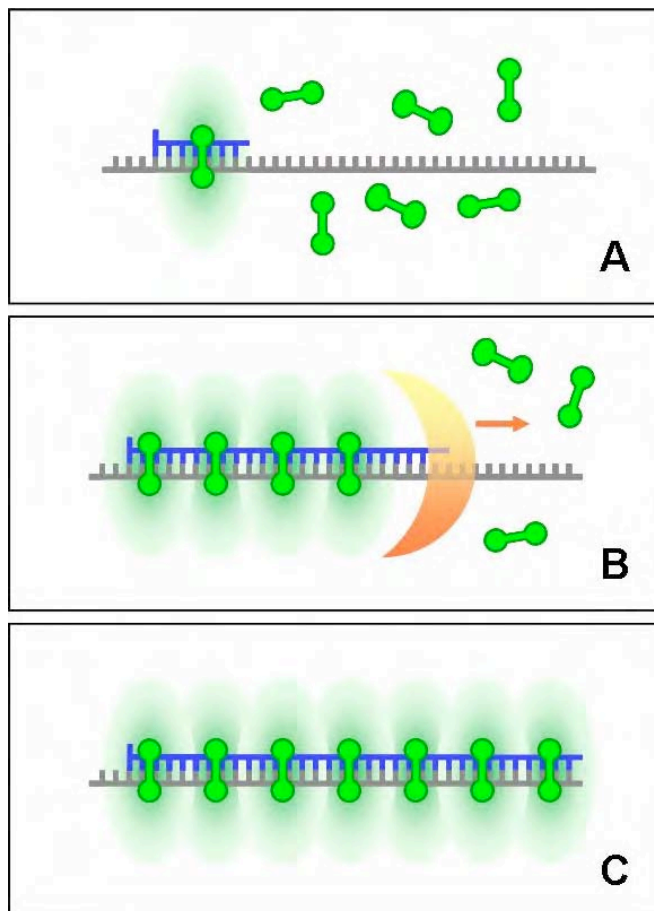


Figure 18 : PCRq par incorporation de SYBR Green

Le SYBR Green est une molécule qui fluoresce uniquement lorsqu'elle est intercalée au sein de l'ADN double brin à la longueur d'onde d'excitation. Ainsi au cours des différents cycles d'amplification, aucune fluorescence n'est décelable pendant les étapes de dénaturation, l'ADN se trouvant sous forme simple brin. Le SYBR Green commence à s'intercaler dès la formation d'ADN double brin, donc lors de la phase d'hybridation (A) et cette incorporation se poursuit tout au long de l'élongation (B). La quantité maximale de SYBR Green intercalé est donc retrouvée à la fin de chaque élongation (C). C'est pourquoi le relevé de fluorescence s'effectue pour chaque cycle de PCR à la fin de la phase d'élongation.

b. Protocole expérimental

Chaque extrait d'ADNc obtenu après la transcription inverse est dilué au quart dans de l'eau ultra pure (exempte de DNase).

Le mélange réactionnel contient 2 µl d'extrait d'ADNc, 10 µl de « SYBR Green PCR Master Mix », 1 µl d'amorce sens, 1 µl d'amorce antisens et 6 µl d'eau ultra pure. Les amorces sont choisies spécifiquement suivant le gène que l'on veut amplifier (**Tableau 5**). Il existe une étape initiale d'activation de l'enzyme et de dénaturation de quinze minutes à 95 °C. Ensuite, le Lightcycler réalise quarante cycles composé de dix secondes à 95 °C pour la dénaturation de l'ADNc, vingt secondes à la température d'hybridation des amorces ($T^{\circ}\text{hyb.}$) et quinze secondes à 72 °C, température à laquelle se réalise l'élongation.

c. Courbe de fusion

Chaque produit d'ADN double brin synthétisé possède une température de fusion (T_m) spécifique, définie comme étant la température à partir de laquelle 50 % de l'ADN est sous forme double brin et 50 % sous forme simple brin. La vérification de cette T_m nous permet de vérifier la spécificité de l'amplification lors de la PCR, en effet, un pic correspond à un gène amplifié (**figure 19**, exemple du TNF α).

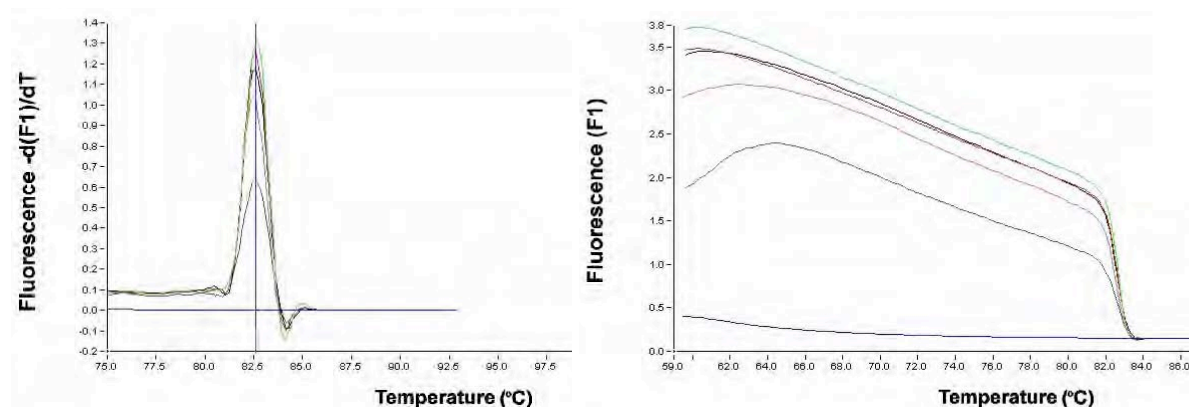


Figure 19 : Vérification de la spécificité de l'amplification par PCRq par la détermination du T_m du produit de PCR amplifié du TNF alpha. La présence d'un seul pic traduit l'unicité du fragment amplifié et la comparaison du T_m observé et du T_m théorique confirme l'identité du fragment amplifié. (valeur de T_m théorique : <http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>).

Ainsi, après le dernier cycle de PCR, la température est rapidement élevée à 95 °C pour dénaturer l'ADN double brin, puis elle est abaissée à la température d'hybridation, provoquant ainsi la reformation d'ADN double brin. La température est ensuite élevée lentement à 95 °C et la fluorescence émise par le SYBRGreen est relevée tout les 0,1 °C. Lorsque 50 % de l'ADN double brin sont dissociés, la fluorescence chute brutalement, c'est à cette température que

correspond la température de fusion du produit synthétisé. La température de fusion est obtenue en traçant la dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température : elle correspond au maximum de la courbe

d. Analyse des résultats

Afin de pouvoir comparer les échantillons entre eux, nous commençons systématiquement par effectuer une PCRq d'une séquence d'un gène de ménage (codant, dans notre cas, pour la protéine ribosomale RP29) dont le taux d'expression ne varie pas selon les stimuli ou traitements affligés aux cellules (*in vivo* ou *in vitro*). Cette étude permettra d'affecter un facteur de correction aux résultats obtenus pour l'analyse de l'expression des gènes d'intérêts.

Enfin pour évaluer les concentrations du fragment d'ADN considéré, dans chaque échantillon à tester, nous réalisons une gamme d'étalonnage à partir de la séquence d'ADN cible préalablement amplifiée par PCRq, purifiée et diluée à différentes concentrations (en général de 10^{-3} à 10^{-6} ng/ μ l). La qualité de la gamme est vérifiée par régression linéaire (*figure 20*).

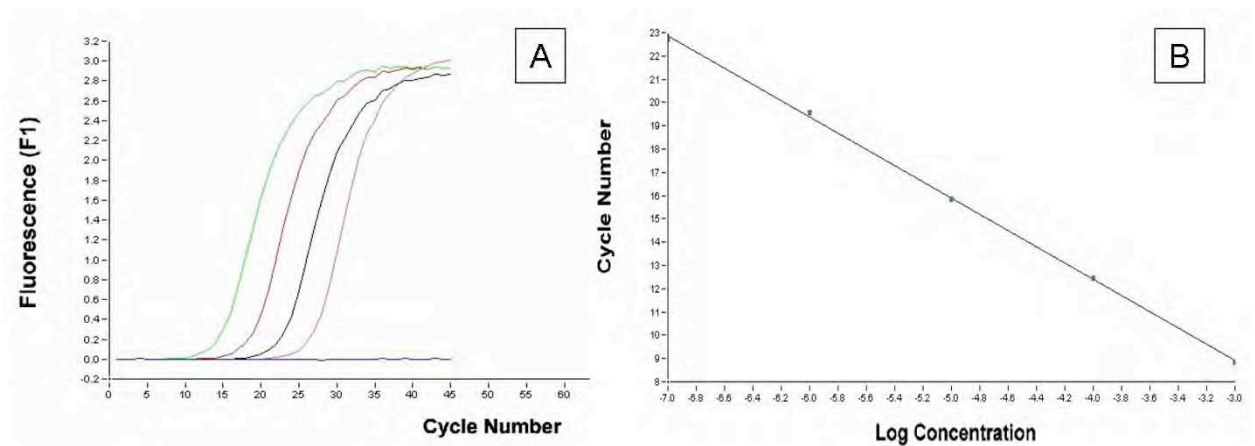


Figure 20 : Gamme étalon obtenue par dilutions successives (ng/ml) du produit de PCR amplifié du TNF alpha, après purification de celui-ci. L'efficacité de l'enzyme est vérifiée pour des concentrations en produit de PCR allant de 10^{-3} à 10^{-7} ng/ml. La droite ainsi obtenue permet d'affecter une concentration à chaque échantillon analysé. La figure A montre l'évolution de l'amplification par PCRq en temps réel de la gamme étalon du TNF α , et la figure B correspond à la régression linéaire obtenue à partir de A.

VI. Biochimie

A. Mesure de la biosynthèse des protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des constituants majeurs du cartilage hyalin. L'aggrécane, présent en quantité équimolaire avec les petits PGs, biglycane, décorine et fibromoduline, est constitué de 150 chaînes de GAG sulfatés environ, qui représentent près de 90 % de sa masse moléculaire. L'incorporation de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ dans le cartilage patellaire constitue ainsi un reflet de la synthèse des PGs.

Nous avons adapté, chez le rat, une méthode développée par Van den Berg [1982] [Gégout, 1994 ; Guingamp, 1997 ; Grossin, 2003] pour apprécier la synthèse des PGs dans le cartilage patellaire. Elle consiste à mettre en culture les explants dans un milieu (RPMI 1640 HEPES- HCO_3 , Invitrogen ; trois heures, 37 °C, 5 % CO_2) supplémenté en L-glutamine (2 mM), en antibiotiques et en $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (0,7 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$; Dupont-Nemours, France). Plusieurs lavages (sérum physiologique) permettent d'éliminer le $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ non incorporé. Les rotules sont ensuite décalcifiées (acide formique 5 % (v/v)) et une biopsie centropatellaire est réalisée (2 mm de diamètre, Stiefel). Les échantillons sont solubilisés (Soluène-350, Packard, Rungis, France ; 0,5 ml) et la quantité de ^{35}S incorporé est déterminée par un compteur de radioactivité après l'ajout d'un liquide scintillant (Hionic-Fluor, Packard ; 4,5 ml).

Nous réalisons des biopsies centropatellaire de la rotule car c'est dans le centre des rotules au niveau de la zone portante que nous allons pouvoir évaluer si nous avons un effet délétère de tel ou tel traitement sur l'anabolisme des chondrocytes (en observant une baisse de la biosynthèse des protéoglycanes). Dans la périphérie de la rotule au contraire de tels effets délétères se traduiront plutôt par une augmentation de la synthèse de protéoglycanes (due à la progression des ostéophytes notamment).

B. Extraction protéique à partir de cellules en monocouche

La récupération des cellules cultivées est effectuée, après deux lavages au PBS, en grattant le fond des plaques six puits, en présence de 150 μl de tampon de lyse (Tris 10 mM, triton 1 %, pH 7,4) complémenté avec de l'antiprotéase (Complete Mini - Roche). Les lysats cellulaires sont alors repris dans des eppendorfs, avant de subir trois cycles de congélation – décongélation, entrecoupés d'agitations énergiques au vortex.

Ces passages successifs dans de l'azote liquide, puis, dans le bain marie à 37 °C, durant une minute, vont permettre de casser les membranes cellulaires et nucléaires pour obtenir un maximum de protéines. Les solutions protéiques obtenus seront alors congeler en azote liquide puis conserver à -80 °C jusqu'à leur dosage.

C. Dosage des protéines par la méthode de BCA

Le réactif, fourni par Interbiotech – Interchim (Montluçon, France) est constitué d'acide bicinchonique (BCA) et d'ions cuivriques en milieu alcalin. Les ions cuivreux générés par réduction par les protéines forment avec le BCA un complexe intensément coloré.

Les mélanges protéiques sont décongelés doucement durant la préparation de la solution de travail, contenant 50 volumes de réactif A (sodium carbonate, sodium bicarbonate, BCA, sodium tartrate en NaOH 0,1 M) pour un volume de réactif B (CuSO₄, 5H₂O 4 %). Une gamme étalon est effectuée à partir d'une solution de BSA à 1 mg/ml (Sigma) diluée dans le tampon de lyse utilisé pour l'extraction protéique. Les échantillons protéiques sont alors homogénéisés vigoureusement et centrifugés pendant cinq minutes à 13000 g afin de ne pas prélever les débris cellulaires. Le dosage s'effectue en plaque 96 puits, ou 10 µl d'échantillon protéique ou de solution étalon sont mélangés à 200 µl de solution de travail. La microplaque est alors couverte et incubée à 37 °C pendant trente minutes à une heure. La lecture d'absorbance s'effectue à 560 nm. Le tracé de la droite d'étalonnage, de l'absorbance en fonction de la quantité de protéines, nous permet ainsi d'évaluer la concentration protéiques de nos échantillons.

D. Western-blot

Les échantillons protéiques sont supplémentés avec du tampon de dépôt 5X - SDS 10 % (p/v), DTT 10 mM, glycérol 20 % (v/v), Tris base 200 mM (pH 6,8), bleu de bromophénol 0,05 % (p/v) – porté à 1X, puis chauffés pendant cinq minutes à 95 °C, avant d'être brièvement centrifugés et déposés sur gel SDS-polyacrylamide à 10 % (p/v). L'électrophorèse est alors réalisée selon la méthode de Laemmli, 1970. Les protéines ainsi séparées sont transférées sur une membrane PVDF (Millipore / Immobilon-P ; taille des pores 0,45 µm) grâce à un système de transfert « semi-sec ». La membrane est alors saturée par une solution de blocage contenant du TBS-Tween 0,1 % supplémenté par 5 % de lait en poudre (p/v) afin d'éviter les liaisons

non-spécifiques, pendant une nuit à 4 °C. La membrane est alors incubée avec le l'anticorps primaire de lapin (anticorps polyclonaux de lapin anti-Hsp70 et Hsp27 : Stressgen), pendant une heure minimum, puis après trois lavages de cinq minutes dans une solution de TBS-T, elle est incubée une heure avec l'anticorps secondaire IgG anti-lapin couplé à HRP (Cell Signaling Technology), puis lavée trois fois comme précédemment. Les différents anticorps sont dilués dans du tampon de blocage et les différentes étapes sont réalisées à température ambiante, sous agitation modérée.

La détection des protéines d'intérêt s'effectue par chemiluminescence, à l'aide du réactif LumiGLO (Cell Signaling Technology) et de peroxide, qui dilués dans de l'eau distillé forme la solution de révélation. Cette solution est mise en contact avec la membrane pendant deux minutes.

Après avoir été égouttée, la membrane est placée au contact d'un film (Kodak-Biomax MR film) durant une à dix minutes pour révéler la luminescence. Le film est alors placé dans une solution de révélateur, rincé à l'eau, et fixé, avant d'être séché à l'air libre.

VII. Analyse statistique

Les résultats sont analysés à l'aide des logiciels Statview[®] et Graph Pad Prism 4. Les différents tests utilisés sont précisés en même temps que les résultats obtenus. Le risque des tests effectués est de $\alpha = 0,05$ lorsqu'il n'est pas précisé. Les histogrammes présentent les résultats sous forme de moyennes + ou - l'écart-type (SD) ou bien, + ou - l'écart standard à la moyenne (s.e.m. ou e.s.m.).

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1 : MISE AU POINT DES OUTILS D'ANALYSE

1. Développement des vecteurs pcDNA.3.1-Hsp70-GFP et pcDNA.3.1-Hsp27-GFP

A. Objectifs

La surexpression des protéines Hsp70 et Hsp27, dans les chondrocytes de rat, est obtenue par transfert de gène non viral, à l'aide d'un vecteur d'expression eucaryotique contenant la séquence ADN complémentaire pour cette protéine. La première partie de cette étude s'est intéressée à la construction des vecteurs d'expression contenant les séquences Hsp70 et Hsp27, puis à l'optimisation du transfert de gène (quantité d'ADN, d'agent de transfection, temps de mise en contact avec les cellules, temps nécessaire à une expression maximale).

Afin de surexprimer les protéines de choc thermique Hsp70 et Hsp27 nous aurions pu avoir recours aux vecteurs pcDNA-Hsp70 et pcDNA-Hsp27 développés au cours de travaux antérieurs. Pourtant, nous avons choisi de développer de nouveaux plasmides, pcDNA-Hsp70-GFP et pcDNA-Hsp27-GFP pour produire des protéines de choc thermique, fusionnées avec la « green fluorescent protein », GFP. Cette fusion nous a permis d'apprécier l'efficacité de transfection et la localisation de ces protéines par microscopie de fluorescence.

En effet, la GFP, protéine fluorescente extraite de la méduse *Aequorea victoria*, à la capacité d'émettre une fluorescence maximale à une longueur d'onde de 509 nm quand celle-ci est excitée à 488 nm.

B. Construction des vecteurs pcDNA3.1-Hsp70-GFP et pcDNA3.1-Hsp27-GFP

Les séquences codantes d'Hsp70 et d'Hsp27 de rat sont amplifiées par RT-PCR à partir d'ARN issus de chondrocytes de rat chauffés au préalable à 42 °C pendant trente minutes. L'amorce utilisée en 5' (5'-AGCGACATGGCCAAGAAAACAGCG -3', 5'-AAGACCATGACCGAGGTGGAAG-3') s'hybride au niveau du codon initiateur ATG, tandis que l'amorce utilisée en 3' (5'-

CCAGAAAAGCCTCCAATCCACCTCC-3', 5'-TGGAGCCAAGTGGGAAG-3') présente une mutation au niveau du codon stop de l'ADNc. Cette mutation permet l'expression de la protéine (Hsp70 ou Hsp27) en fusion avec la GFP dont la séquence est présente dans le plasmide.

Le fragment de PCR a été extrait, purifié et inséré dans le plasmide pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Des cellules compétentes (*E.coli* TOP 10, Invitrogen) ont ensuite été transformées par le plasmide recombinant selon les recommandations du fournisseur. Il a été isolé et purifié par mini-préparation puis digéré par réaction enzymatique afin de déterminer le sens d'insertion du gène.

Le plasmide a finalement été amplifié en utilisant un kit de maxi préparation (Qiagen/Filter, Endofree Plasmid Maxi kit - Qiagen).

C. Vérification de l'efficacité de transfection

Des études préliminaires ont été réalisées afin de déterminer la quantité de plasmides ainsi que le volume d'Exgen 500 (molécules de polyéthylénimine (PEI)) nécessaires pour obtenir un transfert maximal et une toxicité minimale pour les cellules.

Pour chaque plaque de culture, le volume de PEI et la quantité d'ADN ont été déterminés par rapport au nombre de cellules par puits. Toutes les transfections, quel que soit le diamètre des puits, ont été réalisées à 70 % de confluence des cellules. Le temps de mise en contact avec les chondrocytes a été optimisé à deux heures.

1. Mise en évidence de l'expression des ARNm Hsp70 et Hsp27 par RT-PCRq

La *figure 21* représente les taux d'expression en ARNm d'Hsp70 et Hsp27 après transfections des chondrocytes par (i) pcDNA-GFP-Hsp70 seul, (ii) pcDNA-GFP-Hsp27 seul, ou (iii) pcDNA-GFP-Hsp70 et pcDNA-GFP-Hsp27. Les surexpressions obtenues suite à la transfection ou la double transfection sont comparables qu'il s'agisse d'Hsp70 ou d'Hsp27.

Les vecteurs pcDNA-GFP-Hsp70 et/ou pcDNA-GFP-Hsp27 sont donc fonctionnels quand ils sont transfectés dans des chondrocytes de rat, comme le montre l'augmentation du taux d'expression des ARNm codant pour Hsp70 et/ou Hsp27 suite à ces transfections.

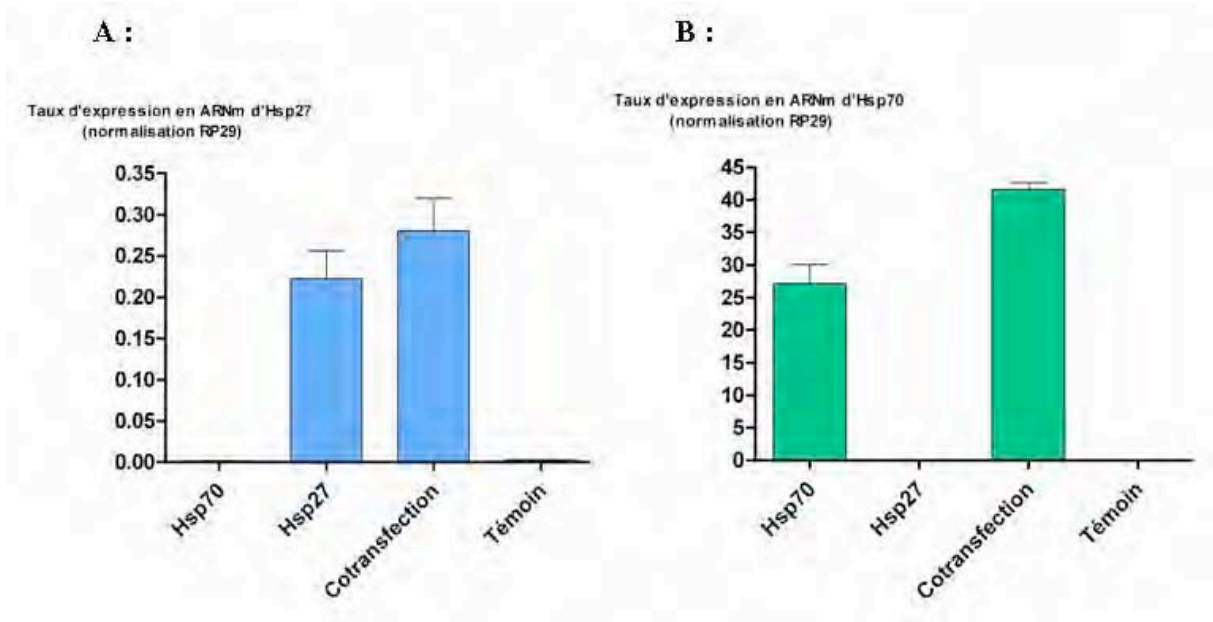


Figure 21 : Taux d'expression en ARNm d'Hsp27 et d'Hsp70 suite à la simple transfection ou la double transfection par les vecteurs pcDNA-GFP-Hsp27 et/ou pcDNA-GFP-Hsp70 sur des chondrocytes de rat.

Les chondrocytes sont utilisés au premier passage, ils sont transfectés pendant deux heures. Les cellules témoins ne sont pas transfectées. Les ARN totaux sont extraits des cellules à différents temps après le début du traitement, puis les ARNm subissent une rétro-transcription avant d'être quantifiés par PCR en temps réel. Deux types de témoins sont utilisés, les témoins n'ayant subi aucun traitement, et ceux mis en présence de 0,1% de DMSO. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires de synthèse d'ARNm codant pour les différentes protéines d'intérêt (**A** : Hsp27, **B** : Hsp70) rapportée à celle des ARNm codant pour RP29. Les histogrammes représentent la moyenne et l'écart type de chaque groupe (n=3, * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; ANOVA et test a posteriori).

2. Mise en évidence de l'expression des protéines Hsp70 et Hsp27 par immunocytochimie

Les études d'immunocytochimie ont été réalisées vingt-quatre et quarante-huit heures après le transfert du plasmide contenant ou non la séquence du gène Hsp70, en utilisant un anticorps spécifique de la protéine Hsp70. Les résultats sont montrés sur la *figure 22* et sont exprimés en pourcentage de cellules positives par rapport au nombre de cellules totales dénombrées par champ de microscope.

Nous avons ainsi obtenu un pourcentage de cellules positives par rapport au nombre de cellules totales pour chacun des deux temps (24 et 48 heures) (marquage noir cytoplasmique traduisant la présence d'Hsp70), à savoir 25 % de cellules positives après 24 heures et 19 % après 48 heures.

Ces résultats sont corrélés à ceux obtenus en western blot, c'est à dire un maximum d'expression de la protéine recombinante Hsp70, 24 heures après le transfert.

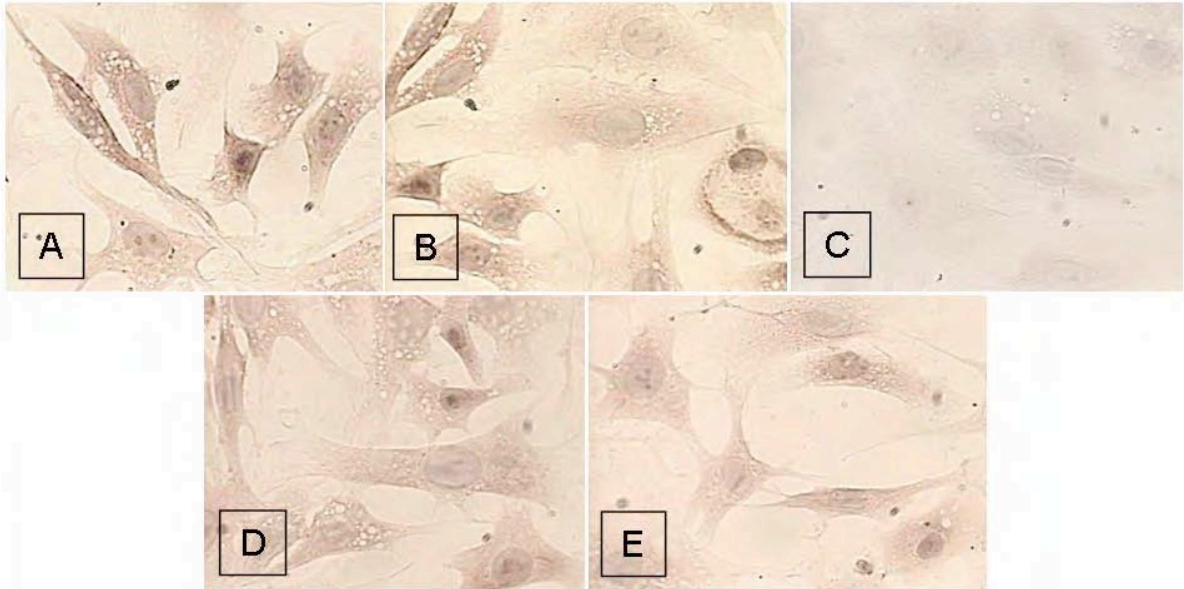


Figure 22 : Analyse par immunocytochimie de l'expression des protéines recombinantes Hsp70/GFP et Hsp27/GFP à 24 heures (objectif x10 x40). Les figures **A** et **B** représentent les cellules transfectées au pcDNA-GFP-Hsp70, les figures **D** et **E** représentent les cellules transfectées au pcDNA-GFP-Hsp27. La figure **C** représente des cellules témoins non transfectées. **A**, **B** et **C** sont des cellules mises en présence de l'anticorps anti-Hsp70. **D** et **E** sont des cellules mises en présence de l'anticorps anti Hsp27. Le témoin « cellules non transfectées mises en présence de l'anticorps anti-Hsp27 » n'est pas montré mais à la même allure que la figure **C**.

3. Mise en évidence par hybridation *in situ* de la présence du plasmide pcDNA-GFP-Hsp70 dans les chondrocytes transfectés

Nous avons corrélé l'expression de la protéine Hsp70 dans les chondrocytes avec la présence du plasmide par une technique d'hybridation *in situ* à l'aide d'une sonde complémentaire du promoteur du CMV marquée à la digoxigénine. Comme le montre la **figure 23**, la localisation du plasmide reste périnucléaire (non intégratif). Il n'y a donc pas d'intégration du gène Hsp70 au génome de la cellule. De la même façon que pour les études d'immunocytochimie, nous avons établi un pourcentage de cellules positives (marquage noir traduisant la présence du plasmide) par rapport au nombre de cellules totales et nous obtenons 22 % de cellules positives 48 heures après le transfert, ce qui correspond quasiment au pourcentage de cellules exprimant la protéine Hsp70.

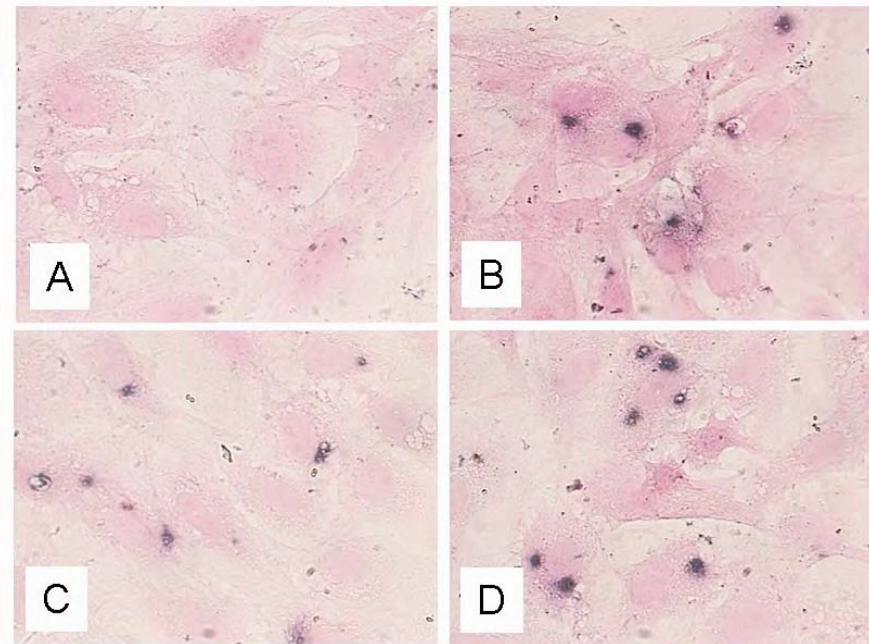


Figure 23 : Détection du plasmide dans les chondrocytes de rat en culture (pcDNA-GFP-Hsp70) (objectif x10 x40). Quarante-huit heures après la transfection, les chondrocytes ont été fixés et une réaction d'hybridation *in situ* a été réalisée à l'aide d'une sonde complémentaire du promoteur du CMV marquée à la digoxigénine. Après incubation avec un anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline, la coloration a été révélée avec du NBT/BCIP. Une contre-coloration des cellules a été effectuée avec de l'éosine (n = 3 expériences indépendantes).

II. Développement du vecteur pcDNA-EYFP

Nous avons souhaité développer un nouveau vecteur rapporteur nous permettant de suivre de part sa localisation et son expression, l'innocuité de notre technique d'électroporation biphasique. En effet, dans les études préalables effectuées au sein de l'équipe, le plasmide utilisé était le pcDNA-GFP. L'inconvénient de ce vecteur provenait de la faible fluorescence émise par la Green Fluorescent Protein, celle-ci étant difficilement dissociable de l'autofluorescence naturelle du cartilage. Nous avons donc construit un vecteur recombinant, nous donnant la possibilité d'exprimer une autre protéine fluorescente, la EYFP : « enhanced Yellow Fluorescent Protein ». Cette protéine est un variant de la GFP, comprenant quatre substitutions d'acides aminés. Elle émet une fluorescence bien plus vive que la GFP, et est donc plus facilement identifiable et localisable. Sa longueur d'onde d'émission est de 530 nm.

A. Construction du vecteur pcDNA-EYFP

Afin de vérifier la correcte insertion de la séquence codant le gène EYFP (*figure 24*) au sein du vecteur pcDNA.3.1, nous avons effectué une analyse restrictive du plasmide pcDNA-EYFP recombiné.

```
>eyfp, 720 bases, 1DFF633B  
  
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGTGGTGCCCATCCTGGT  
CGAGCTGGACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGG  
GCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTTCATCTGCACC  
ACCGGCAAGCTGCCCGTGGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTTCGGCTA  
CGGCCTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACT  
TCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTC  
TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGG  
CGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGG  
ACGGCAACATCCTGGGGCACAAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAAC  
GTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAA  
GATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACC  
AGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCCCCACAACCAC  
TACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGA  
TCACATGGTCTGTGGAGTTCTGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCA  
TGGACGAGCTGTACAAGTAA
```

Figure 24 : Séquence codante de l'EYFP

Le vecteur a été digéré par l'enzyme de restriction Pst I, il présente trois fragments, de 4273 pb, 1356 pb et 541 pb (*figure 25*).

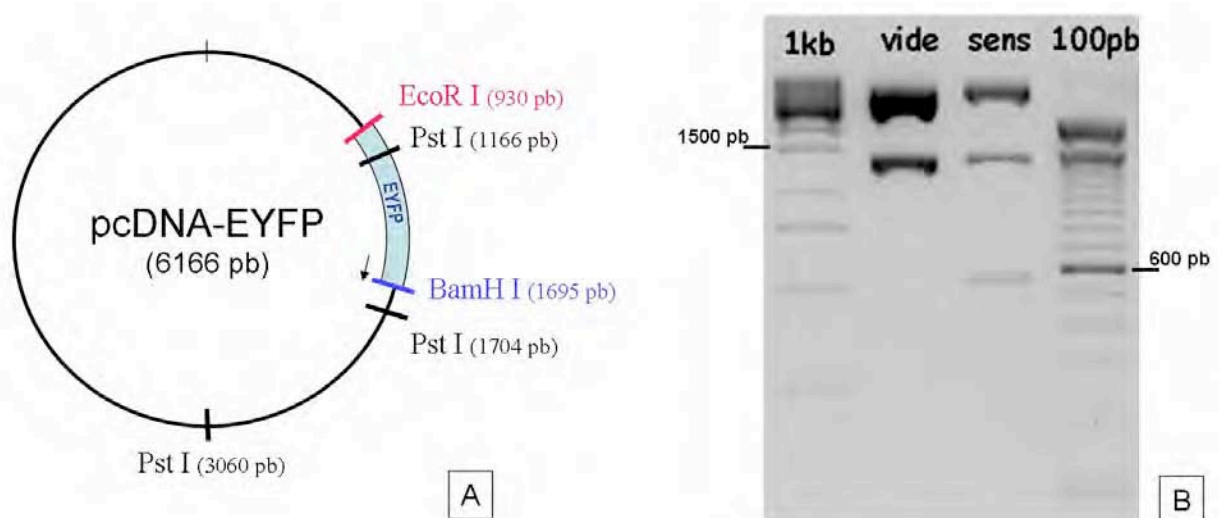


Figure 25 : Analyse restrictive du vecteur pcDNA-EYFP. Vérification de la correcte insertion de la séquence codant EYFP dans le vecteur pcDNA.3.1 par digestion enzymatique du vecteur (par Pst I). La carte de restriction (A) représente les sites de digestion de Pst I ainsi que les deux sites de restriction EcoR I et BamH I ayant servi à l'insertion de la séquence codant pour l'EYFP. La photo du gel d'agarose après électrophorèse (B) représente le cas du plasmide pcDNA.3.1 seul (**vide**) et celui du pcDNA-EYFP (**sens**) après digestion par Pst I. Les deux marqueurs de tailles de **1kb** et **100 pb** nous permettent de vérifier la taille des fragments attendus (4269 pb, 1356 pb et 541 pb pour le pDNA-EYFP ; 4050 pb et 1356 pb pour pcDNA.3.1.).

Ce vecteur a également été séquencé par Génome Express (Zone Astec, Grenoble, France), les séquences sont présentées dans la **figure 26**. Nous avons utilisé le logiciel DIALIGN 2.2.1 pour aligner les séquences obtenues avec celle attendue, et nous avons constaté une homologie totale de la partie codant pour l'EYFP.

```

>PCDNAEYFP_T7PROM_1      1141      0      1141      ABI
NNCCGTGTMNNNCCGGCTGTTACTAGCTGGACCGAGCTCGGATCCCCGGG
TACCGGTGCGCCACCATTGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTG
GTGCCATCCTGGTGCAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAAGTTTCAG
CGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGA
AGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGGCCACCCCTCGTG
ACCACCTTCGGCTACGGCCTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCCACAT
GAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGG
AGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAAGACCCGCGCGAG
GTGAAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCAT
CGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAAGCTGGAGTACAACCT
ACAACAGCCACAACGTCTATATCATGCGCCGACAAAGCAGAAAGAACGGCATC
AAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCT
CGCCGACCACTACCAGCAGAAACACCCCAATCGGGCAGCGGCCCGTGTGTC
TGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAAGTCCGCCCTGAGCAAAAGACCCC
AACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGTGGAGTTCGTGACCCGCCCGCGG
GATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGGCCGGACTCTA
GAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCC
CGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCCAT
CTGTTGTTTGGCCCTCCCGCTGCCTTCTTGAACCTGGAAGTGCACCTCC
CACTGTCCCTTCTATAAAATGAGGAAATGCATCCGATTTGCTGAGTANG
TGTCACTTATCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAAGCAGGGGGAAG
ATTGGAAAGAAATCCAGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGCTTCT
GAGCGGAAGAAACCCTGGGGCTTAGGGGGAAACCCACCC

```

```

>PCDNAEYFP_BGHREV_21127 0 1127 ABI :
Sens inverse-complémentaire de la séquence (1 - 1127)
AAACATTATCATTAGCCGACTCCCCTGACGTTACTGTATTTCTCACTAACATCTCCCTGAA
GAAATAATAATNGNTTAGGCTACTAATCATGAGGTCATAGTATNATGTGNNACAAAATN
MNNNTCTTTTCNCAAAATTCGCANTAGNAANNTACACNGGAGGTATANAAAAGGCTAACC
GNTTGATATTTGTAAGATTCCCCATTTCCNTACGGGNNTAAGGAAATCTATTTACCTCTT
TTAAGAAGATCCAAATGTTCTTGCTTTTNGCCTTAAAGCTGTTCCCGAGTTTGAATTC
TGATTTCCAAATTTTCCCCCTATTAGCCAGCGACGAGAGNCTGTCACAGGTGATGATTC
ATCCTTGTCGATCGGGTCGGAGACTTAAACGGCCCCAAGTTCATATTTTCCGGCGAGGGC
GAGGGCGATGCCTCCTTCGGCAAACTGGCTCAGAAAGGTCATCTGCACCACCGGCAAGCTG
ACCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACTTCGGTTACGGCCTGCAGTGTCTGGCCCGC
TACCCCGACCCATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGNTACGTC
CAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG
TTCGAGGGGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGAC
GGCAACATCCTGGGGCACAAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACCGTCTATATCATG
GCCGACAAGCAGAAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGAC
GGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGGGCCCCGCTG
CTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAAGACCCCAACGAG
AAAGCGGATCACAATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGGCATG
GACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGGCCGACTCTAGAATTTCTGCAGATATCCAGCACAGGG
CGCCCGCTCGAGTCAGAGGGCCCTAACCCGGNNNNNAAAAAACAANN

```

Figure 26 : Séquençage du plasmide pcDNA-EYFP à partir du promoteur T7 et de BGH, afin de vérifier la séquence codante de l'EYFP une fois insérée dans le pcDNA3.1.

B. Vérification de l'efficacité de transfection

1. par immunocytologie

Nous avons transfecté des chondrocytes avec le plasmide pcDNA-EYFP et évalué l'efficacité de transfection par immunocytologie à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'EYFP. Nous avons constaté qu'il y avait effectivement reconnaissance de la protéine dans les cellules transfectées, comme le montre la *figure 27*. Le plasmide semble être fonctionnel et permettre la production de protéines EYFP.

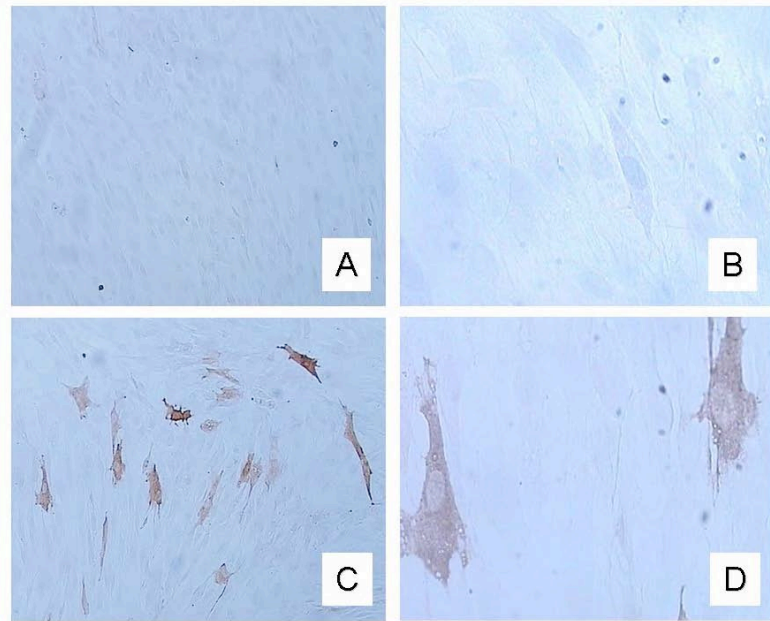


Figure 27 : Cellules transfectées par le pcDNA-EYFP, et immunodétection de la protéine EYFP. Les figures A et B représentent des cellules non transfectées, les figures C et D sont les cellules transfectées. Les figures B et D sont des grossissements x4 des images A et C (Objectifs x10 x10 et x10 x40 respectivement).

2. par microscopie de fluorescence

Chaque protéine fluorescente possède un spectre d'émission spécifique, avec une forme et un pic d'émission caractéristique : 509 nm pour la GFP, 530 nm pour l'EYFP (Living Colors™ User Manual, Clontech, <http://www.clontech.com>), l'autofluorescence des cellules présente, quand à lui, un spectre d'émission de forme aplatie, avec un pic à 540 nm. Dans un premier temps, une approche spectrale nous a permis de distinguer la fluorescence émise par la GFP et l'EYFP de l'autofluorescence des cellules (*figure 28*).

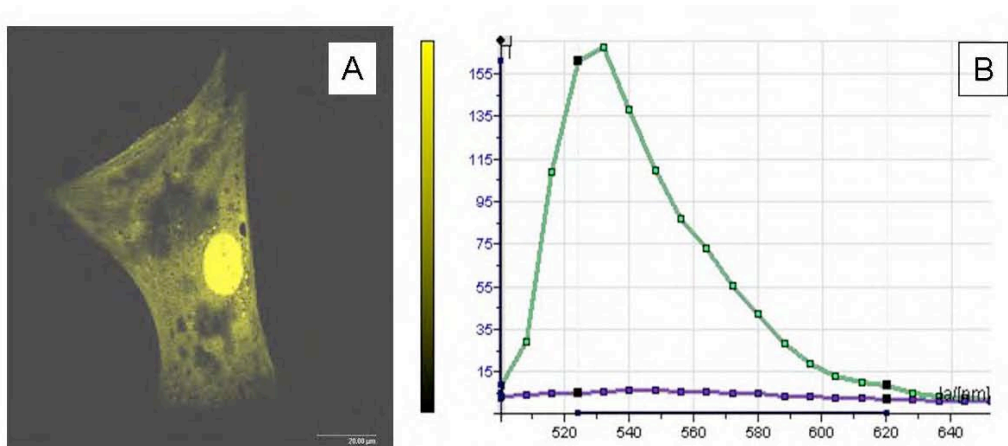


Figure 28 : Chondrocytes transfectés avec le pcDNA-EYFP (A), et analyse spectrale (B). L'analyse spectrale montre en vert le profil de l'EYFP et en violet le profil de l'autofluorescence naturelle des chondrocytes.

Etant donné que les variants GFP présentent des absorptions dans le proche infrarouge (GFP vers 880 nm, et EYFP vers 920 nm), il est possible d'exciter ces molécules spécifiquement tout en s'affranchissant de l'autofluorescence (*figure 29*). En effet, à ces longueurs d'onde d'excitation, les cellules n'émettent pas d'autofluorescence, toute la fluorescence observée après excitation en mode biphoton est donc due essentiellement à l'EYFP (ou GFP selon le cas).

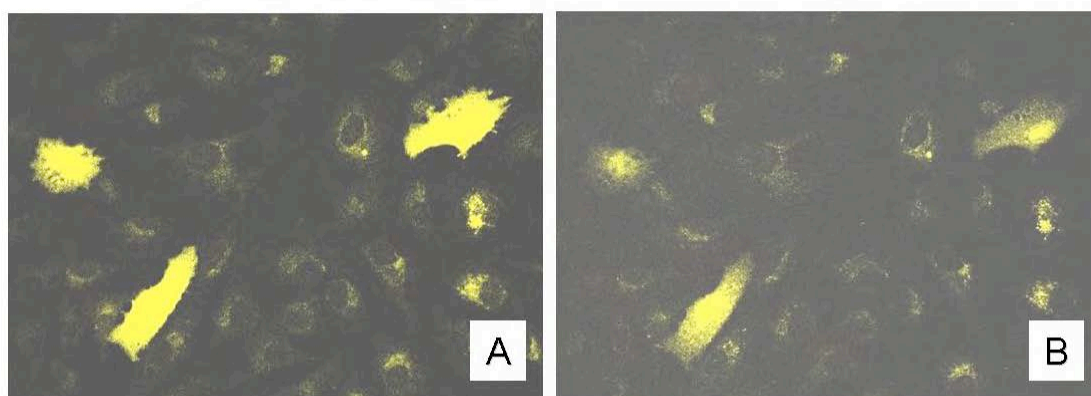


Figure 29 : Comparaison de la visualisation de la fluorescence de l'EYFP en mode monophoton à 488 nm (A) ou biphoton à 920 nm (B).

Enfin, l'imagerie de durée de vie de fluorescence (FLIM) nous a permis d'effectuer un seuillage afin de discriminer les cellules présentant une expression de variants GFP, et de leur affecter un code couleur, en fonction de la durée de vie de fluorescence. Pour la GFP, nous avons observé une demi vie de $2,43 \pm 0,12$ ns et pour l'EYFP une demi-vie de fluorescence de $3,69 \pm 0,08$ ns. Les résultats de durée de vie de fluorescence obtenus pour la GFP et l'EYFP sont conformes à ceux trouvés dans la littérature [Pepperkok, 1999].

CHAPITRE 2 : ELECTROTRANSFERT IN VIVO CHEZ LE RAT

L'un des objectifs de cette thèse est d'étudier la possibilité d'utiliser l'électrotransfert *in vivo* dans le traitement des pathologies ostéoarticulaires. Pour cela nous devons nous assurer que les observations qui seront faites ne seront pas dues à des artefacts liés à un autre paramètre. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Lluís Mir (IGR) avec qui nous avons étudiés l'influence de certains paramètres.

Nous nous sommes intéressés, dans le cadre d'études préliminaires, aux éventuels dommages induits par l'électrotransfert biphasique (en comparaison avec les résultats précédemment obtenus avec l'appareil d'électroporation Jouan). L'application *in vivo* de l'électrotransfert est relativement récente [Titomirov *et coll.* 1991] et l'utilisation de la combinaison d'une impulsion de courte durée et de haut voltage (HV) suivie d'une impulsion de longue durée et de faible voltage (LV) est encore plus récente *in vivo* [Bureau *et coll.*, 2000]. L'utilisation au sein du laboratoire d'un nouveau type de générateur (le Cliniporator), développé dans le cadre d'un projet européen mené par l'IGR (QLK3-1999-00484), et capable de délivrer ce type de combinaisons d'impulsions, nous a donc conduit dans un premier temps à valider ce générateur sur différents tissus (muscles et cartilage articulaire). En effet, l'utilisation des impulsions électriques pour véhiculer un transgène dans le cartilage articulaire rotulien a déjà été démontré [Grossin *et coll.*, 2003], et, son efficacité a été prouvée dans le traitement préventif d'un modèle d'arthrose chez le rat [Grossin *et coll.*, 2006]. Ces études avaient été réalisées en utilisant un appareil d'électroporation développant des ondes carrées, qui avaient pour fonction d'assurer aussi bien la perméabilisation que la migration des acides nucléiques. La détermination des paramètres électriques optimaux, conduisant à une haute efficacité de transfection et à des lésions tissulaires associées minimales, a ainsi été effectuée dans le cadre de la dernière phase du projet européen Cliniporator.

I. Evaluation de l'application d'impulsions électriques par le Cliniporator

Afin d'être sûr de ne pas avoir d'artefacts dus aux lésions tissulaires ou au stress cellulaire, nous avons réalisé une étude des lésions histologiques et de l'expression d'une protéine de stress (Hsp70) pouvant résulter de l'électrotransfert. Cette étude de l'innocuité de l'électrotransfert de gènes dans le muscle est également intéressante dans le cadre de futures applications cliniques.

A. Applications des impulsions sur le muscle squelettique de rat

La première partie de ce travail a été de démontrer la possibilité d'utiliser les impulsions de type HV et LV pour véhiculer un plasmide codant pour une protéine fluorescente (GFP) dans différents tissus. Une première série d'expérience a été réalisée afin de montrer l'expression de notre protéine traceur dans le muscle (tibialis cranialis de rat), en utilisant des conditions basiques (non optimisées). Les images obtenues sont présentées sur les *figures 30 et 31*, où la fluorescence est observée à l'aide d'une loupe binoculaire à fluorescence.

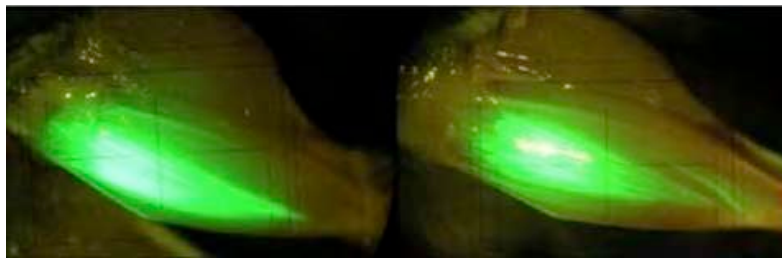


Figure 30 : Exemples de muscles (tibialis cranialis de rat) exprimant la GFP, observés à la loupe binoculaire à fluorescence deux jours après l'électrotransfert (1 HV 800 V/cm 100 μ s, 1 seconde délai, 1 LV 400 ms 80 V/cm ; 20 μ l de plasmide pEGFPN1 à 0,5 μ g/ μ l dans du PBS). Chacun des exemples représente un rat différent.

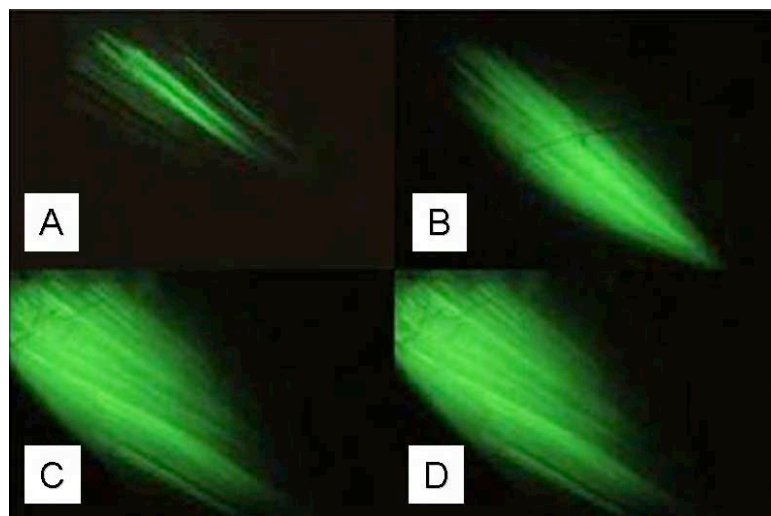


Figure 31 : Fluorescence émise par la GFP, 48h après injection seule ou électrotransfert de pcDNA-GFP dans le muscle de rat sain.

A : Injection seule,

B : Cliniporator 1 HV + 8 LV : 1 HV de 800 V/cm pendant 100 μ s, 0 s délai, et 8 LV de 80 V/cm pendant 50 ms,
C : Cliniporator 1 HV + 1 LV: 1 HV de 800 V/cm pendant 100 μ s, 0 s délai, et 1 LV 80 V/cm pendant 400 ms,
D : Jouan (ondes carrées) : 8 pulses 250 V/cm 20 ms 1 Hz.

1. Evaluation des effets délétères des impulsions HV et LV sur le muscle squelettique

L'évaluation de lésions histologiques potentielles, induites par les impulsions électriques du générateur, a été faite dans le muscle squelettique de souris soit par (A) injection seule ou (B) injection suivie d'une combinaison d'un HV et d'un LV scindé en huit impulsions ou (C) injection suivie d'une combinaison d'un HV et d'un LV (unique, mais de même durée totale que les huit LVs précédents) optimaux ou (D) injection suivie d'impulsions optimales délivrées avec le générateur Jouan (générateur de trains d'impulsions carrées longues répétées).

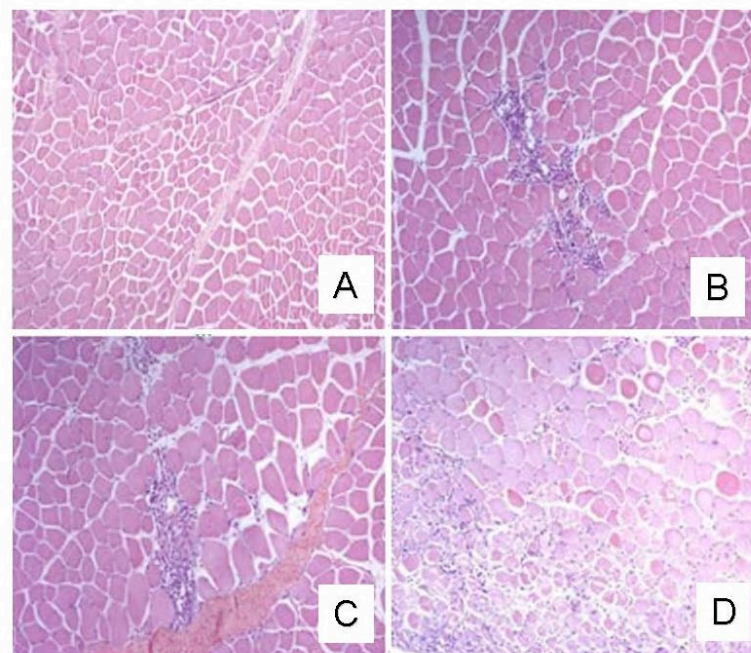


Figure 32 : Analyse histologique (HES) du muscle après application d'impulsions électriques.

A : Muscle d'un animal témoin

B : Muscle d'un animal ayant reçu 1 injection unique suivie 1HV 800V/cm 100 μ s, 0sec délai, 8LV 80V/cm 50ms

C : Muscle d'un animal ayant reçu 1 injection seule suivie 1HV 800V/cm 100 μ s, 0s délai, 1LV 80V/cm 400ms

D 8 pulses 225V/cm 20ms 1Hz (générateur Jouan)

Comme le présente *la figure 32*, il n'y a pas de différences entre les groupes (B) et (C), seule une légère infiltration de cellules immunitaires est observable. A l'inverse, avec les impulsions de type carrées longues répétées (D), des zones d'intenses altérations

morphologiques sont observables.

B. Induction de l'expression de protéines de stress (HSP)

L'induction de l'expression de HSPs est un indicateur de stress cellulaire. En effet, les HSPs sont un ensemble de protéines conservées au sein des organismes procaryotes et eucaryotes, dont l'expression est induite par divers types de stress cellulaires ou durant le développement embryonnaire. De fait, le stress cellulaire peut être induit par une variété de stimuli comme l'augmentation de la température, l'éthanol, des agents mitogènes, des cytokines, l'hypoxie ou une infection virale, mais également par l'exposition à des métaux lourds, aux UV, au manque de glucose, en cas d'apport d'antibiotiques...

Les HSPs jouent aussi un rôle protecteur dans les cellules en tant que molécules chaperonnes, en facilitant le repliement, le transport intracellulaire, l'assemblage et le désassemblage d'autres protéines.

Les HSP protègent aussi les cellules des dégradations dues aux radicaux libres, à la fois *in vivo* et *in vitro* et protègent aussi les cellules de la nécrose ou de l'apoptose.

De plus, Andrew *et coll.* [Andrews *et coll.*, 1997] ont rapporté que les méthodes classiquement utilisées pour les transfections transitoires induisaient une réponse au stress cellulaire et ils ont démontré que l'électroporation induisait l'expression d'Hsp72 dans des cellules HUT 78. Ils supposent que les impulsions électriques de fort voltage, utilisées pour l'électroporation entraînent des lésions membranaires et des altérations de la structure des protéines (dénaturation), qui sont connues pour induire la réponse au stress.

A l'inverse, Pazmany *et coll.* [Pazmany *et coll.*, 1995] ont rapporté que l'exposition de cellules à une impulsion électrique unique (250-1250 V/cm) provoque l'activation rapide et persistante de la capacité de fixation à l'ADN d'un certain nombre de facteurs de transcription, incluant AP-1, SP1, AP-2, NF- κ B, fos et jun. Mais ils ont démontré que l'exposition des cellules à leurs impulsions électriques n'entraîne pas l'induction de la protéine Hsp70.

C'est pourquoi, nous avons étudié le niveau d'expression de l'ARNm du gène de Hsp70 dans le cadre d'impulsions électriques délivrées *in vivo* sur des muscles de rats avec deux types de générateurs. Le premier générateur est un électroporateur PS-15 Jouan (GHT 1281, Jouan, St Herblain, France) dont les impulsions sont visualisées et contrôlées par un oscilloscope (VC 6025, Hitachi, Tokyo, Japon), le second générateur est le Cliniporator qui délivre des combinaisons d'impulsions électriques de haut voltage (HV) et de bas voltage (LV).

Dans un premier temps, nous avons mesuré l'expression de l'ARN messenger de Hsp70 en fonction du générateur utilisé et de la concentration en ADN. En effet, certains groupes ont rapporté un possible effet toxique de l'ADN sur les cellules [Heller *et coll.*, 1996 ; Matsumoto, *et coll.*, 2001]. Nous avons donc injecté des muscles tibialis cranialis de rat avec 20 µl d'une solution contenant soit uniquement du PBS soit du PBS avec 0,5 µg/µl ou 2,5 µg/µl de plasmide. Les muscles injectés ont ensuite été électroporés soit avec le générateur Jouan (250 V/cm, huit pulses, 20 ms), soit avec le Cliniporator (une HV de 800 V/cm pendant 100 µs suivie d'une LV de 80V/cm pendant 400 ms). Le niveau d'expression d'Hsp70 a ensuite été mesuré à 24 et 48 heures. Le niveau d'ARN messenger pour Hsp70 a été déterminé dans des extraits de muscle par transcription reverse suivie d'une amplification par PCR. Les résultats sont présentés dans la **figure 33** sous forme de rapport Hsp70 sur RP29 en unité arbitraire.

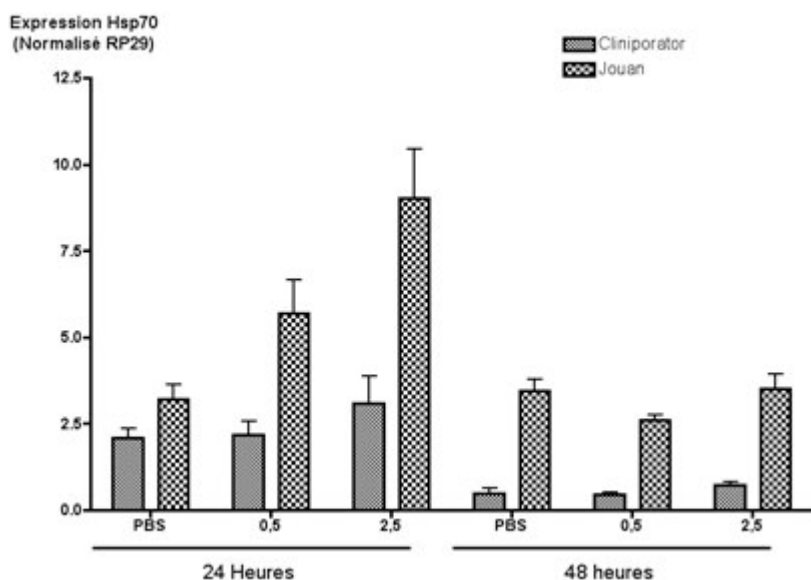


Figure 33 : Expression de Hsp70 dans le muscle 24 et 48 heures après électrotransfert, en fonction de la concentration en ADN et du générateur utilisé (Cliniporator : 1 HV 100 µs 800 V/cm, 1 s délai, 1 LV 400 ms 80 V/cm ; Jouan : 8 x 20 ms 230 V/cm 1 Hz).

Nous avons pu constater qu'aux concentrations utilisées, il n'y a pas d'effet de la concentration en ADN sur le stress induit par les impulsions électriques. A 48 heures, les impulsions du Jouan génèrent significativement ($p < 0,001$, test de rang Mann-Whitney) plus de stress que celles utilisées pour le Cliniporator. En se basant sur ces résultats, nous avons approfondis l'étude de l'effet des impulsions électriques sur l'expression de Hsp70, en n'injectant que du PBS puisqu'il n'y a pas d'effet de l'ADN, quel que soit le générateur utilisé

et la concentration.

Nous avons donc ensuite mesuré les niveaux d'expression d'ARNm pour Hsp70 dans les fibres musculaires, à différents temps, après divers types de traitement : injection seule, HV seul, combinaison de HV et LV, et train d'impulsions carrées longues répétées délivrées avec le Jouan. Les résultats sont présentés dans les *figures 34 et 35*.

Concernant les différents types d'impulsions, nous avons constaté (*figure 35*) que le HV seul entraîne une légère augmentation de l'expression de Hsp70, 6 heures après l'impulsion alors que l'utilisation de huit impulsions entraîne une forte augmentation de l'expression de Hsp70 dès 30 minutes.

Les résultats concernant la combinaison HV+LV (*figure 34*) montrent clairement un accroissement de l'expression de Hsp70 plus important que le HV seul (*figure 35*). Cependant cette augmentation est réduite par rapport à l'induction générée par les impulsions du générateur Jouan à partir de 6 heures suivant les impulsions. Le LV utilisé après le HV induit plus ou moins d'expression selon qu'il est scindé en plusieurs impulsions ou non. Lorsqu'il est composé d'une seule impulsion de 400 ms, il provoque un accroissement maximal de l'expression d'Hsp70 à 24 heures alors que ce n'est plus le cas avec le LV scindé en huit impulsions de 50 ms chacune. Ce résultat est en accord avec une autre analyse théorique réalisée l'IGR [Davalos *et coll.*, 2003] qui montre que la température lors de l'impulsion unique de 400 ms peut atteindre plus de 50°C pendant une seconde, alors qu'avec les huit impulsions de 50 ms (même durée totale de 400 ms), la température n'atteint pas les 50°C grâce à la dissipation thermique se produisant durant l'intervalle entre les pulses.

Nous pouvons donc conclure que les lésions et le stress, induits par la combinaison d'impulsions HV + LV, sont moindres comparés au cas des impulsions classiques carrées longues répétées. De plus, elles demeurent suffisamment basses et transitoires pour ne pas interférer dans l'étude de l'électrotransfert.

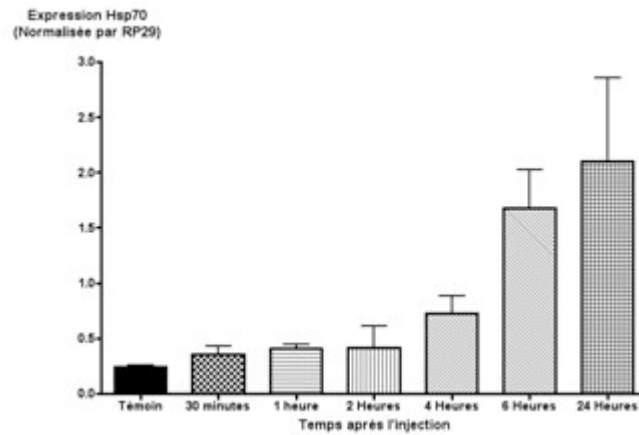


Figure 34 : Expression d'Hsp70 dans le muscle, après injection d'ADN plasmidique et application des impulsions électriques (HV-LV). Les animaux subissent une injection intramusculaire de plasmide suivie d'une électroporation avec 1 HV et 1 LV. Les animaux sont sacrifiés entre 30 minutes et 24 heures après l'électrotransfert. Les tissus musculaires ciblés sont prélevés et les ARN totaux sont extraits. Nous effectuons alors une RT-PCRq pour mesurer l'expression des ARNm codant pour Hsp70 à chaque temps. Le lot témoin ne subit qu'une injection de sérum physiologique.

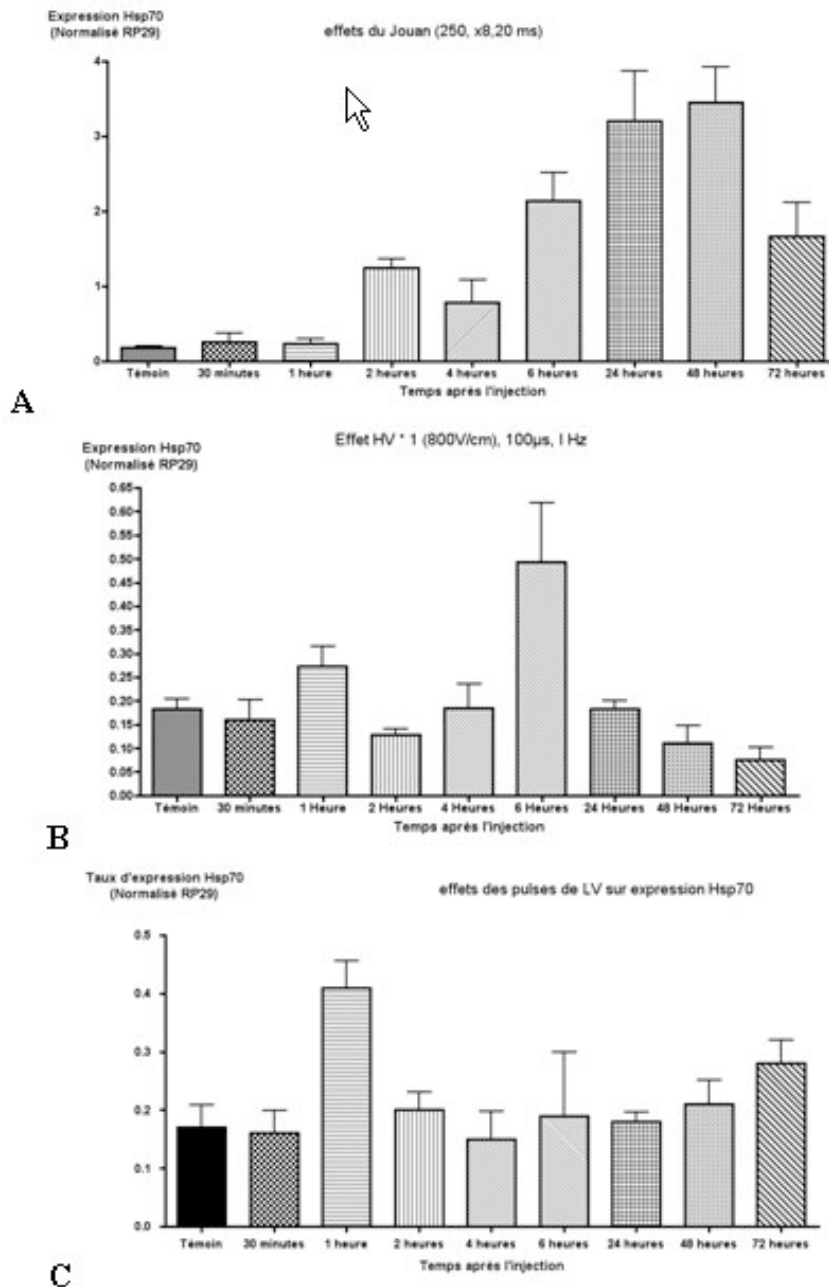


Figure 35 : Analyse de l'expression d'Hsp70 après application des différents types d'impulsions électriques dans le muscle. Les animaux subissent une électroporation suivant différentes conditions. **A** : générateur Jouan, ondes carrées, 8 pulses de 250 V/cm pendant 20 ms, **B** : Cliniporator, 1 HV de 800 V/cm pendant 100 μs, **C** : Cliniporator, 8 LV de 80 V/cm pendant 50 ms. Les animaux sont sacrifiés entre 30 minutes et 24 heures après l'électrotransfert. Les tissus musculaires ciblés sont prélevés et les ARN totaux sont extraits. Nous effectuons alors une RT-PCRq pour mesurer l'expression des ARNm codant pour Hsp70 à chaque temps. Le lot témoin ne subit aucun traitement.

II. Applications des impulsions sur cartilage articulaire d'animaux sains

Afin de vérifier l'innocuité de la technique d'électroporation biphasique sur les tissus articulaires, diverses conditions d'électroporation ont été testées sur des rats sains (**tableau 6**). Les facteurs de diversité étant d'une part l'intensité de la première impulsion de haut voltage qui assurent la perméabilisation cellulaire et d'autre part le nombre d'impulsions qui permettent la migration de la biomolécule d'intérêt (ici, le plasmide rapporteur : pcDNA-EYFP). Chaque lot correspond à une condition et est composé de trois rats électroporés des deux côtés. De plus, les analyses ont été effectuées à différent temps, 48 heures, 7 jours et 14 jours suivant l'électroporation biphasique.

Tableau 6 : Conditions d'électroporation

Conditions	<i>Pulse de perméabilisation</i>	Durée du pulse de perméabilisation	Pulse de migration	<i>Nb de pulses de migration</i>	Durée des pulses de migration	Pause entre les pulses de migration
1	770 V/cm	100 μ s	80 V/cm	4	50 ms	200 ms
2	770 V/cm	100 μ s	80 V/cm	20	50 ms	200 ms
3	640 V/cm	100 μ s	80 V/cm	4	50 ms	200 ms
4	640 V/cm	100 μ s	80 V/cm	20	50 ms	200 ms
5	500 V/cm	100 μ s	80 V/cm	4	50 ms	200 ms
6	500 V/cm	100 μ s	80 V/cm	20	50 ms	200 ms

A. Aspect général

Les rats ont été pesés, avant et après l'électroporation, et aucune variation n'a été constatée dans la courbe de poids, qu'il s'agisse de l'étude à 48 heures ou de celle à 7 jours. De plus, lors du prélèvement des tissus sur les animaux sacrifiés (n = 6 rotules par groupe), aucune anomalie n'a été relevée sur les différentes structures du genou (ni érythème, ni œdème, ni inflammation marquée).

B. Histologie classique

L'étude histologique a été effectuée sur des rats ayant subi une injection intra-articulaire de plasmide pcDNA-EYFP suivie d'une électroporation et sacrifiés 48 h après. Les différents lots correspondent à diverses conditions d'électroporation (**tableau 6**), mais également à deux lots témoins, l'un composé de témoins absolus, l'autre composé de rats ayant subi uniquement une injection de plasmide sans électroporation. Les rotules et les membranes synoviales prélevées sont sectionnées en coupes de 5 μm et colorées suivant divers procédés. Aucune différence significative n'a été observée entre les différents lots.

La coloration à l'hématoxyline – éosine – safran (HES) des rotules n'a montré aucune dégradation du cartilage ou remaniement osseux, ni de perte de la viabilité cellulaire. La coloration au bleu de toluidine (BT) révèle de par l'intensité de la coloration au niveau du cartilage, une teneur normale en protéoglycanes. La coloration au rouge Sirius (RS) démontre une concentration en collagènes tout à fait normale, et l'observation en lumière polarisée reflète une organisation correcte des fibres collagéniques. Et cela, quel que soient les conditions d'électroporation utilisées et le temps précédent le sacrifice (à savoir : 48 heures, 7 jours et 14 jours).

Nous avons sélectionné parmi les résultats ceux correspondant aux pulses électriques de perméabilisation de plus haut voltage et susceptibles d'être les plus délétères (770 V/cm), ils sont présentés dans la **figure 36**. Les exemples représentatifs des résultats pour chacune des conditions d'électroporation, chaque temps, et chaque coloration sont reportés en **annexes 1 à 12**.

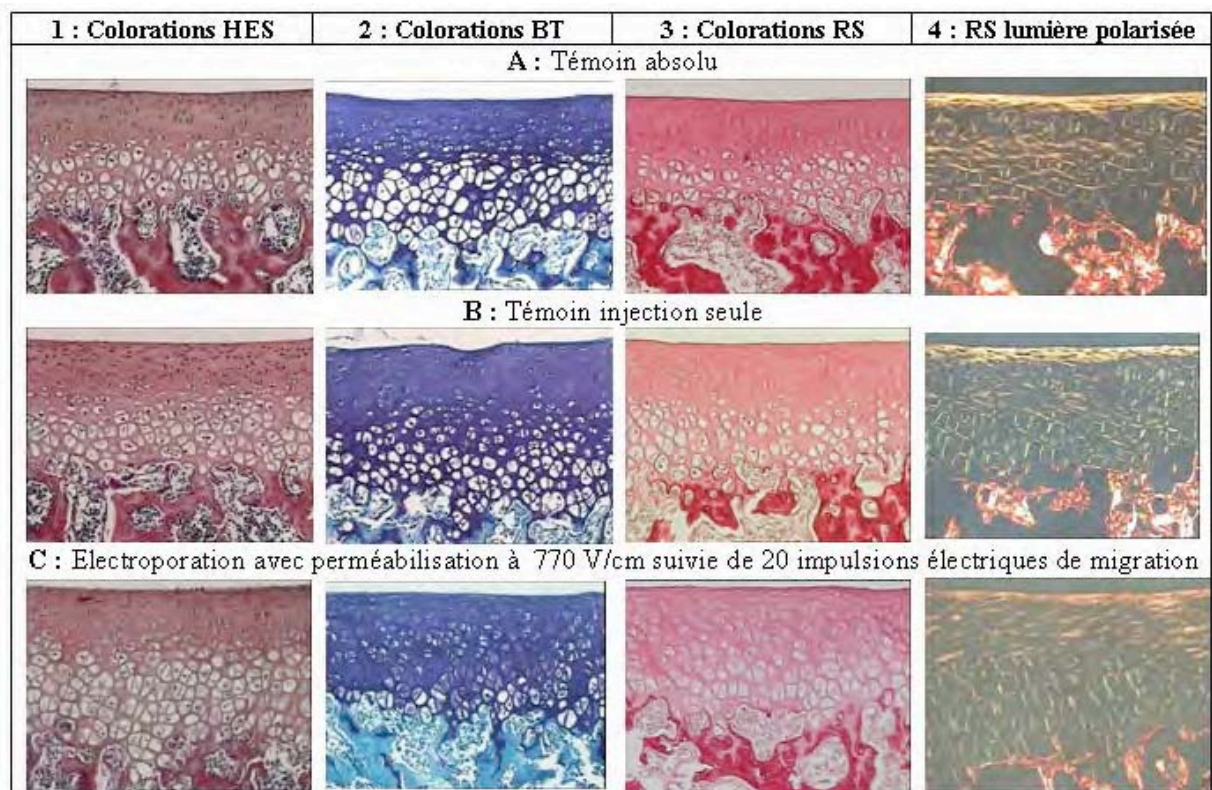


Figure 36 : Résultats de l'étude histologique des rotules (Objectifs x10 x10) : Vérification à 48 heures de l'innocuité de l'électroporation biphasique sur l'architecture du cartilage

Coupes de rotules ayant subi différentes colorations : **1** : Hématoxyline, éosine, safran ; **2** : Bleu de Toluidine ; **3** : Rouge Sirius ; **4** : Rouge Sirius observé en lumière polarisée

Ces rotules ont été prélevées chez trois lots de rats ayant subis différents traitements :

A : Les animaux ne subissent pas d'injection de plasmide rapporteur et ne sont pas électroporés.

B : Les animaux subissent uniquement une injection de plasmide rapporteur (ils ne sont pas électroporés).

C : Les animaux subissent une injection de plasmide rapporteur suivi d'une électroporation : une première impulsion électrique de 770 V/cm d'une durée de 100 μ s, va permettre la perméabilisation, elle sera suivie de 20 impulsions de 80 V/cm de 50 ms assurant la migration.

L'étude histologique classique démontre l'absence d'effet délétère des impulsions électriques, sur le cartilage, d'un point de vue microscopique, indépendamment de l'intensité du pulse de perméabilisation et du nombre de pulses de migration.

C. Synthèse de protéoglycanes

Pour chaque lot de rats, six rotules sont isolées et des échantillons correspondant au centre et à la périphérie de ce tissu sont prélevés, pour analyser l'anabolisme, par incorporation de S^{35} , 48 heures et 7 jours après électroporation. Les résultats pour le centre des rotules sont représentés dans la **figure 37**. Les résultats pour la périphérie des rotules ne sont pas présentés.

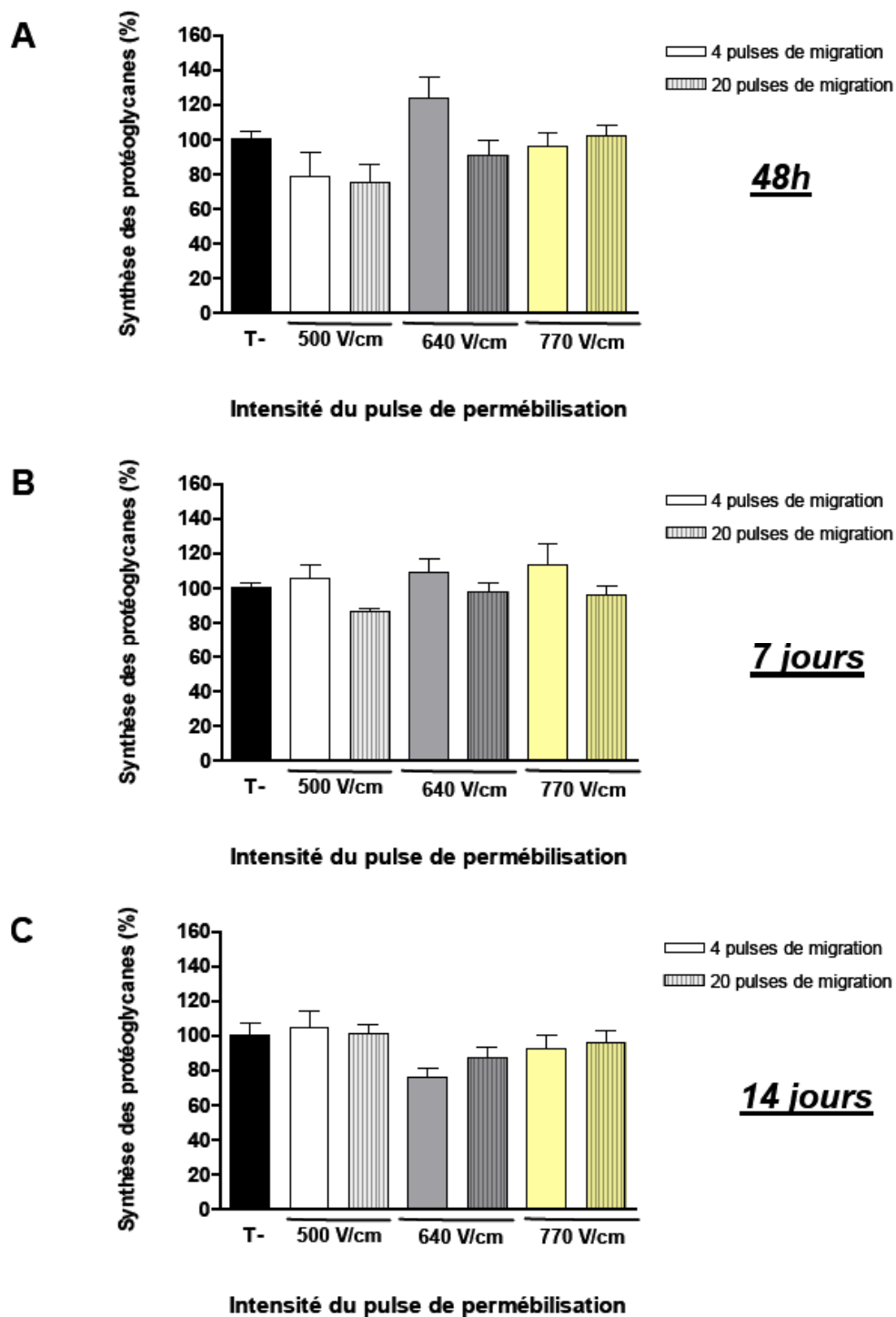


Figure 37 : Résultats de l'incorporation de ^{35}S dans le centre des rotules de rats sains exposés à différentes conditions d'électroporation biphasique.

Plusieurs impulsions électriques sont appliquées au niveau des rotules de rats sains. Un premier pulse de 500 V/cm, 640 V/cm ou 770 V/cm d'une durée de 100 μs , va permettre la perméabilisation. Ce pulse sera suivi de 4 ou 20 pulses de 80 V/cm de 50 ms assurant la migration. Les animaux sont électroporés et les rotules sont prélevées 48 heures (A), 7 jours (B) ou 14 jours (C) après. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'incorporation de ^{35}S dans le centre des rotules, la moyenne des résultats d'anabolisme des témoins non électroporés étant considérée comme une biosynthèse des protéoglycanes de 100 %. Les histogrammes représentent la moyenne et l'écart standard à la moyenne de chaque groupe (n=6 rotules).

Au bout de 48 heures, une augmentation significative de la synthèse des protéoglycanes est observée, en périphérie des rotules, pour un premier pulse de perméabilisation de 500 V/cm (Statview[®] – ANOVA et tests *a posteriori* pour échantillons non appariés – risque $\alpha = 0,05$). Par contre, il n’y a aucune variation significative de cette synthèse dans le centre des rotules.

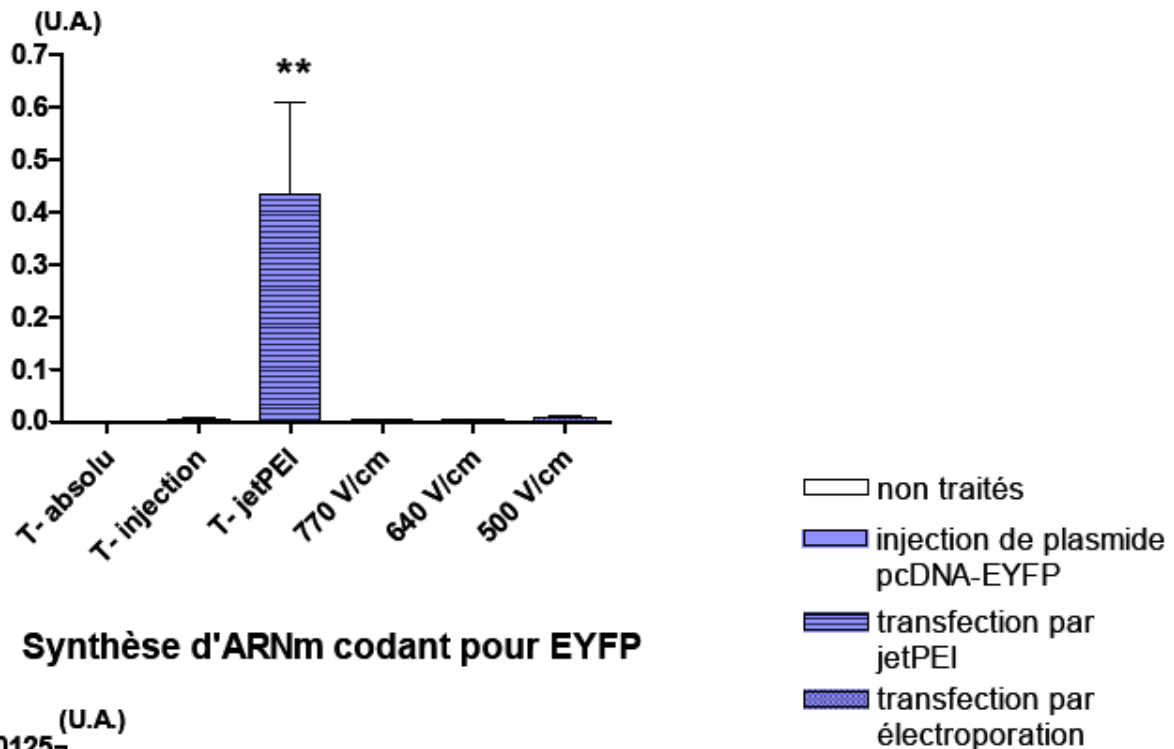
La mesure d’anabolisme, 7 jours après l’électroporation, montre une diminution significative de la synthèse des protéoglycanes, dans le centre des rotules, pour un premier pulse de perméabilisation à 500 V/cm suivi de 20 pulses de migration (Statview[®] – ANOVA et tests *a posteriori* pour échantillons non appariés – risque $\alpha = 0,05$). Dans la périphérie des rotules, aucune variation significative n’est apparue à 7 jours.

L’étude de l’anabolisme révèle une légère diminution de la synthèse de protéoglycanes dans le cas d’un pulse de perméabilisation à 500 V/cm, ce qui suggère une légère chondrotoxicité de ce type de pulse.

D. Dissémination du plasmide dans la membrane synoviale

Nous avons voulu déterminer le degré de dissémination du plasmide rapporteur dans la membrane synoviale suite à l’injection du plasmide et à l’électroporation. Pour ce, nous avons comparés les différentes conditions d’électroporation entre elles et par rapport à une injection simple de plasmide, ou bien par rapport à une injection de plasmides complexés avec des lipoplexes (système JetPEI). Les trois conditions d’électroporation font varier l’intensité du pulse de perméabilisation (770, 640 et 500 V/cm). Les animaux sont transfectés (par électroporation, système JetPEI ou simple injection de plasmide), exceptés les animaux témoins absolus, et les membranes synoviales sont prélevées au bout de 48 heures. Les ARN totaux sont alors extraits et les ARNm subissent une RT-PCR en temps réel afin d’être quantifiés. Les résultats sont reportés dans la **figure 38**.

Synthèse d'ARNm codant pour EYFP



Synthèse d'ARNm codant pour EYFP

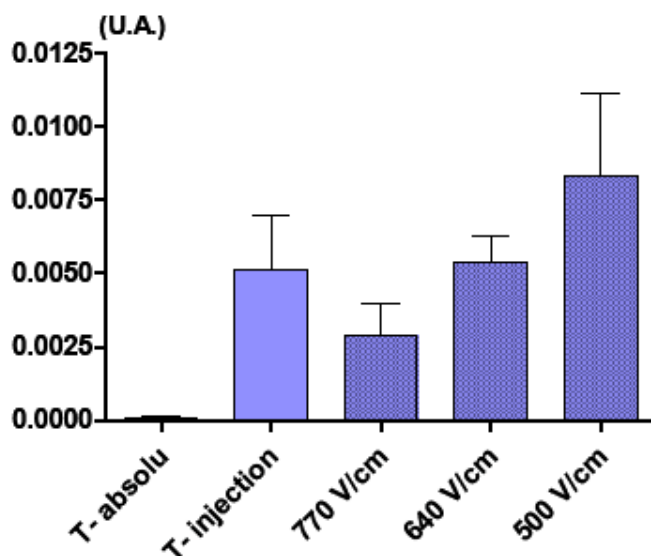


Figure 38 : Résultats par RT-PCR quantitative de la synthèse des ARNm codant pour EYFP dans les membranes synoviales de rats transfectés localement avec le plasmide pcDNA-EYFP.

Les animaux sains subissent une injection bilatérale intra-articulaire de plasmide pcDNA-EYFP suivie d'une électroporation biphasique. Trois conditions d'électroporation sont évaluées faisant varier l'intensité du pulse de perméabilisation (de 770, 640 ou 500 V/cm). Le prélèvement des membranes synoviales est effectué 48 heures après. Les ARN totaux sont ensuite extraits, puis les ARNm subissent une rétro-transcription avant d'être quantifiés par PCR en temps réel. Les témoins injections sont des animaux ayant subi uniquement l'injection de plasmide. Les témoins jetPEI sont des animaux ayant subi une injection de plasmides complexés avec des lipoplexes. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (U.A.) de synthèse d'ARNm codant pour EYFP rapportée à celle des ARNm codant pour RP29. Les histogrammes représentent la moyenne et l'écart standard à la moyenne de chaque groupe (n=4 membranes synoviales par groupe, **: $p < 0,01$).

Nous avons constaté que la dissémination du plasmide dans la membrane synoviale est significativement beaucoup plus importante dans le cas de la transfection *via* le système JetPEI. Concernant les animaux électroporés, bien que ne présentant pas de variations dans la dissémination du plasmide dans la membrane synoviale, nous avons constaté une tendance à l'augmentation en fonction de l'intensité du pulse de perméabilisation. La plus faible intensité provoquant la plus importante dissémination.

Ces données nous laissent supposer qu'un ciblage préférentiel du cartilage implique l'utilisation de pulse de perméabilisation de haut voltage.

E. Hybridation *in situ* (localisation)

Nous avons souhaité mettre en évidence la localisation différentielle du plasmide rapporteur en fonction des conditions d'électrotransfert utilisées. Pour ce, nous avons effectué une hybridation *in situ* permettant de reconnaître grâce à une sonde marquée à la digoxygénine le promoteur CMV du plasmide pcDNA-EYFP. Cette étude a été réalisée sur des coupes de cartilage articulaire de rats préalablement électroporés suite à une injection intra-articulaire de plasmide rapporteur.

1. Vérification du marquage de la sonde

a. Par la technique de retard sur gel

La sonde anti-CMV marquée à la digoxygénine est obtenue en suivant les instructions du fournisseur. Brièvement, nous avons effectués une PCR grâce à des amorces spécifiques de la région à reconnaître par la sonde, tout en insérant dans les produits PCR des dNTP couplés à la digoxygénine. A la différence de la sonde marquée (S+), la sonde non marquée (S-), est obtenue en effectuant la même opération avec des dNTP classiques (non couplés à la digoxygénine).

Afin de vérifier que la sonde est correctement marquée à la digoxygénine, nous avons déposé les sondes S+ et S- sur un gel d'agarose à 2 % et fait migrer ces deux produits de PCR par électrophorèse. La photographie sous UV de ce gel est présentée dans la **figure 39**. La taille du fragment PCR attendue est de 546 pb, cependant, en présence de digoxygénine la migration est ralentie car la taille totale du fragment est augmentée. Ainsi, nous trouvons une taille de 546 pb pour la sonde S-, et une taille légèrement supérieure à 600 pb pour la sonde S+. Nous en concluons que la sonde S+ est effectivement marquée par la digoxygénine.

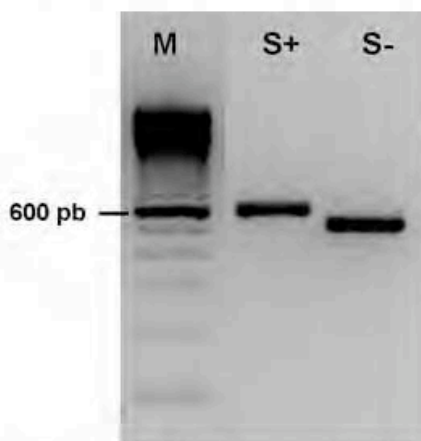


Figure 39 : Evaluation du marquage des sondes par électrophorèse en gel d'agarose. Sur ce gel d'agarose, nous avons pu constater que les produits de PCR de la sonde marquée à la digoxygénine (S+) sont plus volumineux que le produit PCR de la sonde non marquée (S-). M représente le marqueur de taille de 100 pB.

b. Par immunodétection

Les résultats de la détection de la digoxygénine sur la sonde marquée par un anticorps anti-DIG sont présentés dans la **figure 40**. Nous avons constaté que le marquage était effectivement spécifique de la sonde marquée (S+) étant donné que l'anticorps anti-DIG ne se fixe pas du tout sur la sonde non marquée (S-). De plus, nous avons pu observer une immunofixation sur la sonde S+, jusqu'à une quantité de 0,1 pg, ce qui témoigne d'une bonne sensibilité de notre sonde marquée. La sonde marquée pourra être utilisée efficacement pour nos expériences d'hybridation *in situ*.

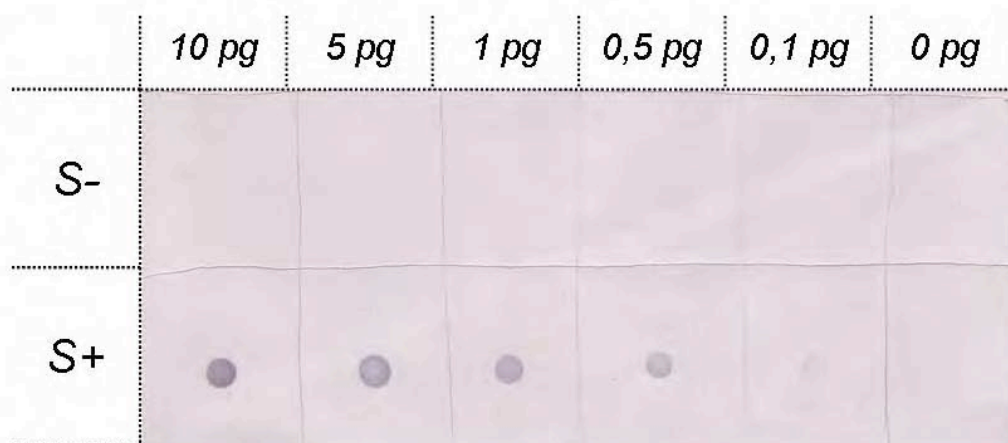


Figure 40 : Immunodétection du marquage à la digoxygénine des sondes marquée (S+) et non marquée (S-) utilisées pour l'hybridation *in situ*. Les sondes sont diluées pour obtenir différentes quantités allant de 10 pg à 0 pg de sonde, afin de tester non seulement la spécificité du marquage mais également la sensibilité de la sonde marquée à l'anticorps anti-digoxygénine utilisé.

2. Localisation du plasmide pcDNA-EYFP par hybridation *in situ*

Nous avons testé trois conditions différentes d'électroporation, faisant varier les impulsions de migration (huit impulsions de 80 ou de 60 V/cm ou quatre impulsions de 80 V/cm). En effet, nous avons voulu évaluer si la différenciation de ce paramètre permettait une localisation variable du plasmide dans le tissu ciblé. Les résultats sont présentés dans la **figure 41**. Nous avons pu vérifier la présence du plasmide dans le cartilage articulaire rotulien dans chaque cas d'électrotransfert. Cependant, la localisation du plasmide ne semble pas être particulièrement modifiée dans les conditions testées. Les variations apportées aux conditions d'électroporation ne sont donc pas suffisantes pour engendrer des différences dans la localisation du plasmide après l'électrotransfert.

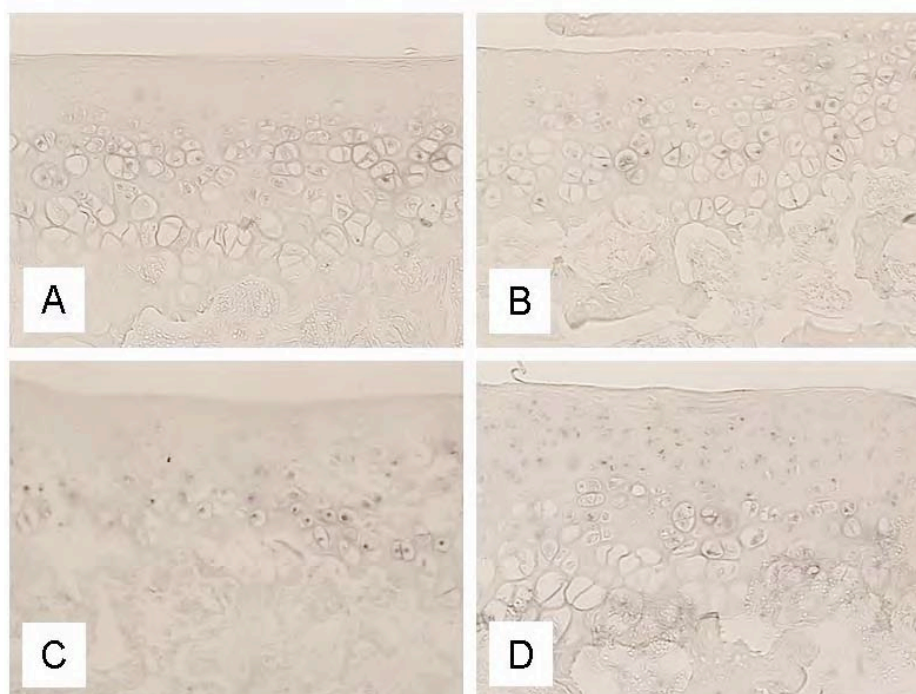


Figure 41 : Détection par hybridation *in situ* (digoxigénine) de la localisation du plasmide dans le cartilage articulaire rotulien de rats sains (objectifs x10 x10). Les rats ont été anesthésiés puis rasés avant de subir une injection intra-articulaire avec le plasmide pcDNA3.1-GFP (30 μ g). Quarante-huit heures après l'électrotransfert, les rats ont été sacrifiés et les rotules ont été prélevées, fixées, décalcifiées et incluses en paraffine. Des coupes de 5 mm ont été réalisées pour effectuer les réactions d'hybridation *in situ* afin de détecter le promoteur du CMV présent au niveau du plasmide. Le pourcentage de cellules positives a été déterminé en comptant le nombre de cellules totales et le nombre de cellules positives dans trois champs différents (objectifs x10 x40) dans chaque couche du cartilage (superficielle, moyenne et profonde) (n = 6 rotules).

Conditions d'électroporation utilisées :

A : Témoin non injecté, non électroporé

B : Electroporation avec 1 HV de 800 V/cm et 8 LV de 80 V/cm

C : Electroporation avec 1 HV de 800 V/cm et 4 LV de 80 V/cm

D : Electroporation avec 1 HV de 800 V/cm et 8 LV de 60 V/cm



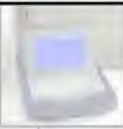
III. Applications des impulsions sur cartilage articulaire d'animaux pathologiques

L'utilisation potentielle de l'électroporation biphasique pour véhiculer un transgène thérapeutique au sein de la cavité articulaire pour influencer positivement sur certaines pathologies articulaires telles l'arthrite ou l'arthrose, nécessite la vérification de l'innocuité de cette technique dans des modèles expérimentaux d'arthropathies (le modèle par injection intra-articulaire de parois de mycobactéries et le modèle par injection intra-articulaire de MIA). Nous avons voulu mettre en évidence, que l'électroporation biphasique n'accentuait pas les dommages des tissus déjà lésés. Pour ce, nous avons étudié plusieurs paramètres, tout d'abord l'aspect général du cartilage articulaire *via* des colorations histologiques, mais également la capacité de biosynthèse du cartilage et enfin les conséquences de l'électroporation sur les médiateurs de l'inflammation (uniquement dans le cas du modèle inflammatoire).

A. Modèle par injection de paroi de Mycobactéries :

L'étude de l'innocuité de l'électroporation biphasique sur le modèle expérimental par injection intra-articulaire unilatéral de paroi de Mycobactéries a été effectuée sur quatre groupes de six animaux (**tableau 7**) : la moitié des animaux est traitée par injection de parois de Mycobactéries, l'autre moitié n'est pas traitée, enfin pour chacun de ces deux cas, la moitié subit une électroporation deux jours après le traitement au parois de Mycobactéries (ou l'absence de traitement). Les animaux sont sacrifiés cinq jours après le premier traitement.

Tableau 7 : Groupes de rats dans l'expérience d'électroporation sur le modèle expérimental d'arthrite

 GROUPES	 Injection de parois de Mycobactéries	 Electroporation <i>2 jours plus tard</i>
Témoins absolus	NON	NON
Electroporés	NON	OUI
Traités	OUI	NON
Traités + Electroporés	OUI	OUI

1. Aspect général

Les animaux inclus dans cette étude sont pesés à intervalles réguliers. Nous avons pu constater que les animaux non traités aux parois de Mycobactéries présentaient un gain de poids similaire tandis que les animaux traités n'avaient pris aucun poids pendant la période d'étude. Cependant, aucune différence n'a été observée entre les lots électroporés et non électroporés.

2. Histologie Classique

L'étude histologique a été réalisée sur des prélèvements de genoux de rats de chaque groupe. Les résultats sont présentés dans la *figure 42*.

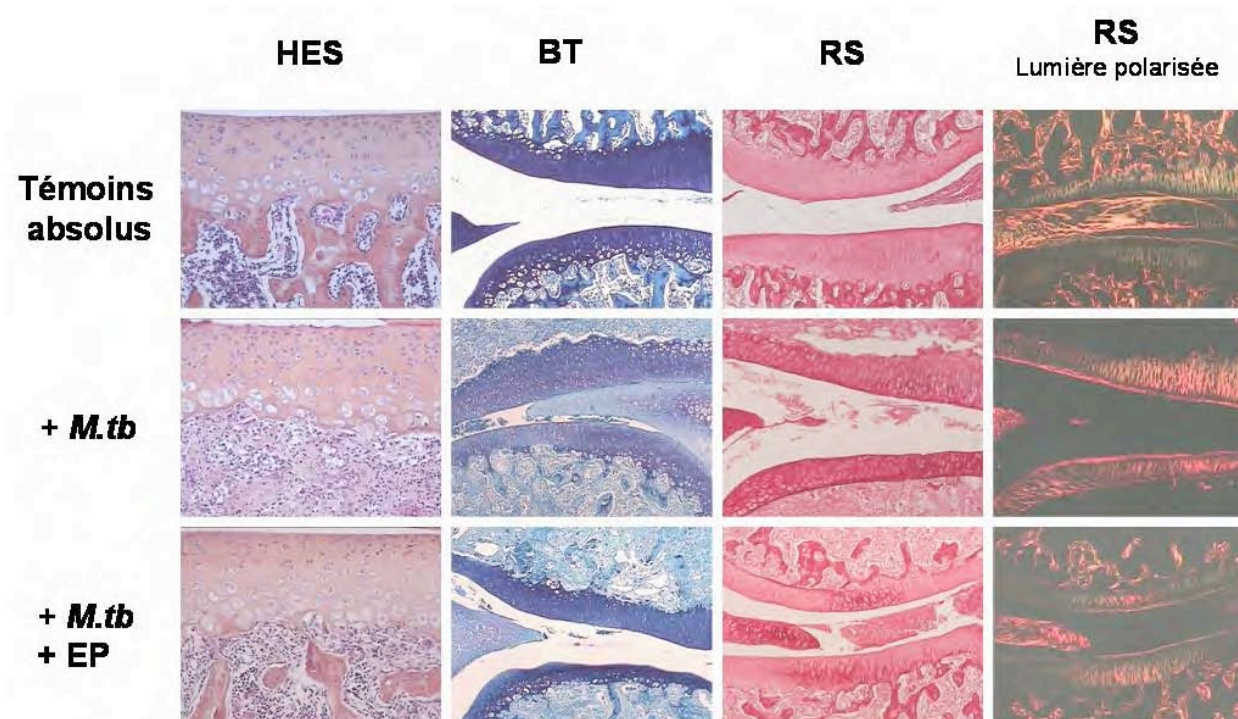


Figure 42 : Vérification de l'innocuité de l'électroporation biphasique sur la structure du cartilage articulaire (de plateaux tibiaux et de condyles fémoraux) issu d'un modèle expérimental de mono-arthrite par injection intra-articulaire mono-latérale de parois de Mycobactéries (Objectifs x10 x10).

Les animaux sont traités aux parois de Mycobactéries (+ M.tb.) puis électroporés (+EP) deux jours après. Le prélèvement des genoux est effectué cinq jours après le traitement aux parois de Mycobactéries. Les genoux sont fixés, déshydratés et inclus en paraffine avant d'être coupés. Après réhydratation les coupes sont colorées de diverses manières.

HES : Hématoxyline, Eosine et Safran, permettant d'apprécier la structure générale du cartilage

BT : Bleu de Toluidine, qui fait apparaître la teneur en protéoglycanes du cartilage

RS : Rouge Sirius, présentant la teneur en collagènes du cartilage, et la disposition du réseau collagénique (par observation en lumière polarisée).

La membrane synoviale des animaux des différents groupes témoins ne présente pas de modification structurale significative (*figure 43*). En revanche, les membranes synoviales des animaux injectés avec des parois de mycobactéries (+/- électroporation) sont hyperplasiques,

avec formation de plusieurs couches de synoviocytes, une infiltration cellulaire (lymphocytes B, lymphocytes T, monocytes) et une néovascularisation importante.

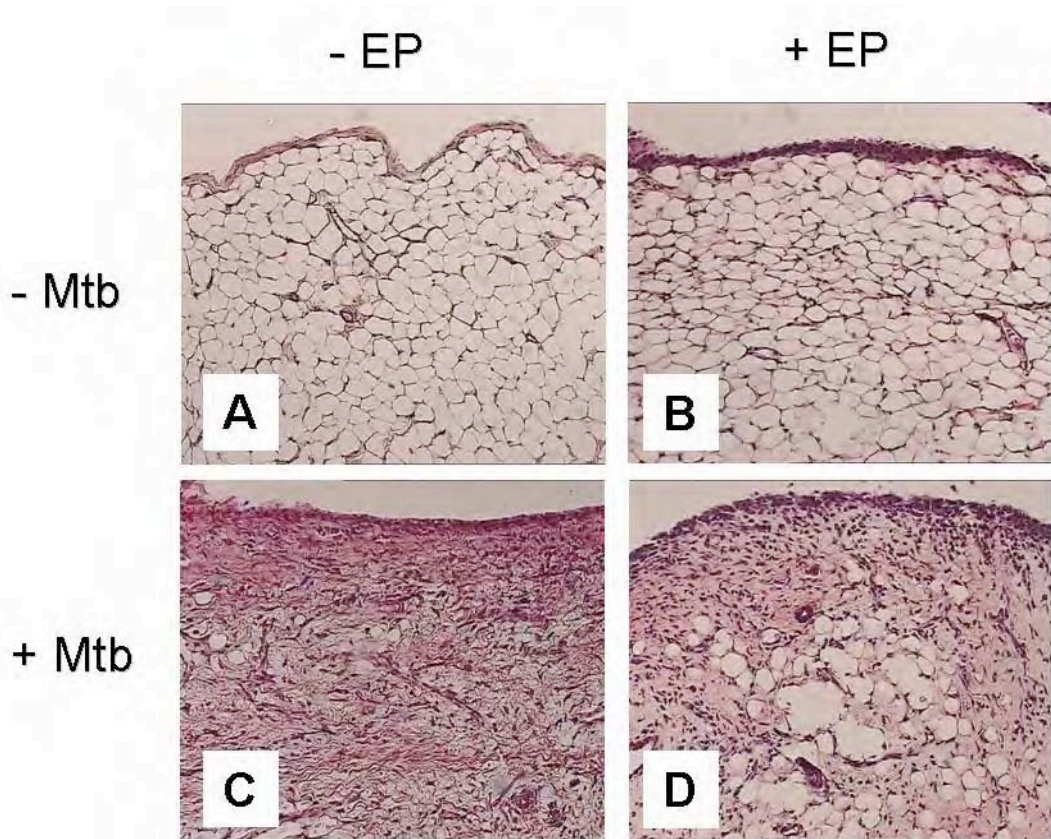


Figure 43 : Vérification de l'innocuité de l'électroporation biphasique sur la structure de la membrane synoviale issue d'un modèle expérimental d'arthrite par injection intra-articulaire unilatérale de parois de Mycobactéries (Objectifs x10 x10).

Les animaux sont traités aux parois de Mycobactéries (+Mtb) puis électroporés (+EP) deux jours après. Le prélèvement des tissus est effectué cinq jours après le traitement aux parois de Mycobactéries. Les membranes synoviales sont fixées, déshydratées et incluses en paraffine avant d'être coupées. Après réhydratation, les coupes sont colorées à l'HES : Hématoxyline, Eosine et Safran.

A : Rats témoins absolus ; B : Rats témoins ayant reçu la série d'impulsions électriques ; C : Rats exposés aux parois de Mycobactéries ; D : Rats exposés aux parois de Mycobactéries puis soumis aux impulsions électriques, 48 heures après l'injection.

Les colorations HES (*figure 42*), bleu de toluidine et rouge Sirius ne laissent pas apparaître de modifications importantes de la structure de cartilage mais quelques éléments traduisant une situation pathologique sont observables : apparition de clusters de chondrocytes, réorganisation de l'os sous-chondral. Toutefois, ces modifications ne sont détectées que chez les animaux ayant reçus des parois de mycobactéries et pas chez les animaux des groupes témoins. De plus, l'application des impulsions électriques n'a pas amplifié les légères modifications structurales observées après cinq jours.

3. Anabolisme

Pour chaque lot de rats, les rotules sont isolées et les échantillons correspondants au centre et à la périphérie du tissu sont prélevés, pour analyser la fonction de biosynthèse des protéoglycanes. Les résultats sont reportés dans la **figure 44**. Aucune différence significative de la fonction d'anabolisme n'a été relevée dans le centre des rotules entre les animaux électroporés et non électroporés, qu'il s'agisse du groupe préalablement traité ou non traité aux parois de Mycobactéries. Globalement, nous avons pu constater une diminution de la biosynthèse des protéoglycanes chez les animaux traités aux parois de Mycobactéries par rapport aux non traités.

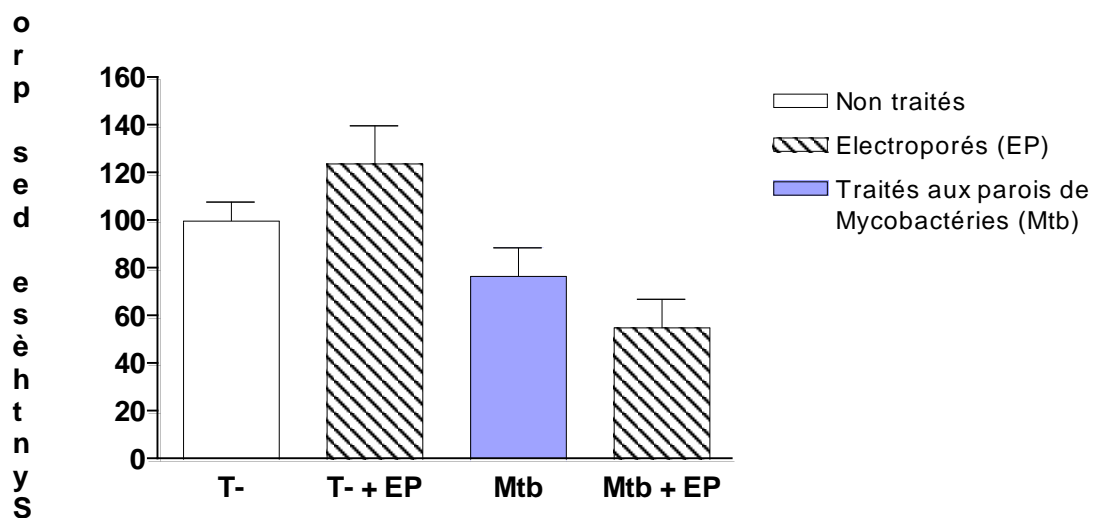


Figure 44 : Résultats de l'incorporation de ³⁵S dans le centre des rotules de rats issus d'un modèle expérimental de mono-arthrite avec ou sans électroporation biphasique.

Le modèle expérimental est établi par injection intra-articulaire mono-latérale de parois de Mycobactéries au niveau des rotules de rats sains. Les animaux sont traités aux parois de Mycobactéries puis électroporés deux jours après. Le prélèvement des rotules et l'incorporation de ³⁵S sont effectués cinq jours après le traitement aux parois de Mycobactéries.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'incorporation de ³⁵S dans le centre des rotules, la moyenne des résultats d'anabolisme des témoins non traités étant considérée comme une biosynthèse des protéoglycanes de 100%. Les histogrammes représentent la moyenne et l'écart standard à la moyenne de chaque groupe (n=6 rotules par groupe).

4. Biologie moléculaire

Nous avons voulu évaluer l'incidence de l'électroporation biphasique sur le taux de transcription des gènes codant pour les marqueurs de l'inflammation (IL-1 β , COX-2, iNOS, vEGF et TNF α).

Dans un premier temps, nous avons comparé les taux de transcription des ces différents marqueurs à partir d'ARNm issu des membranes synoviales d'animaux traités, ou non, aux parois de Mycobactéries, à plusieurs temps : 24, 48 et 72 heures après traitement (ou absence de traitement). Nous nous sommes en particulier intéressés au temps 48 heures – temps auquel

les animaux traités sont électroporés au cours de l'expérience suivante. Les résultats sont présentés dans la *figure 45*.

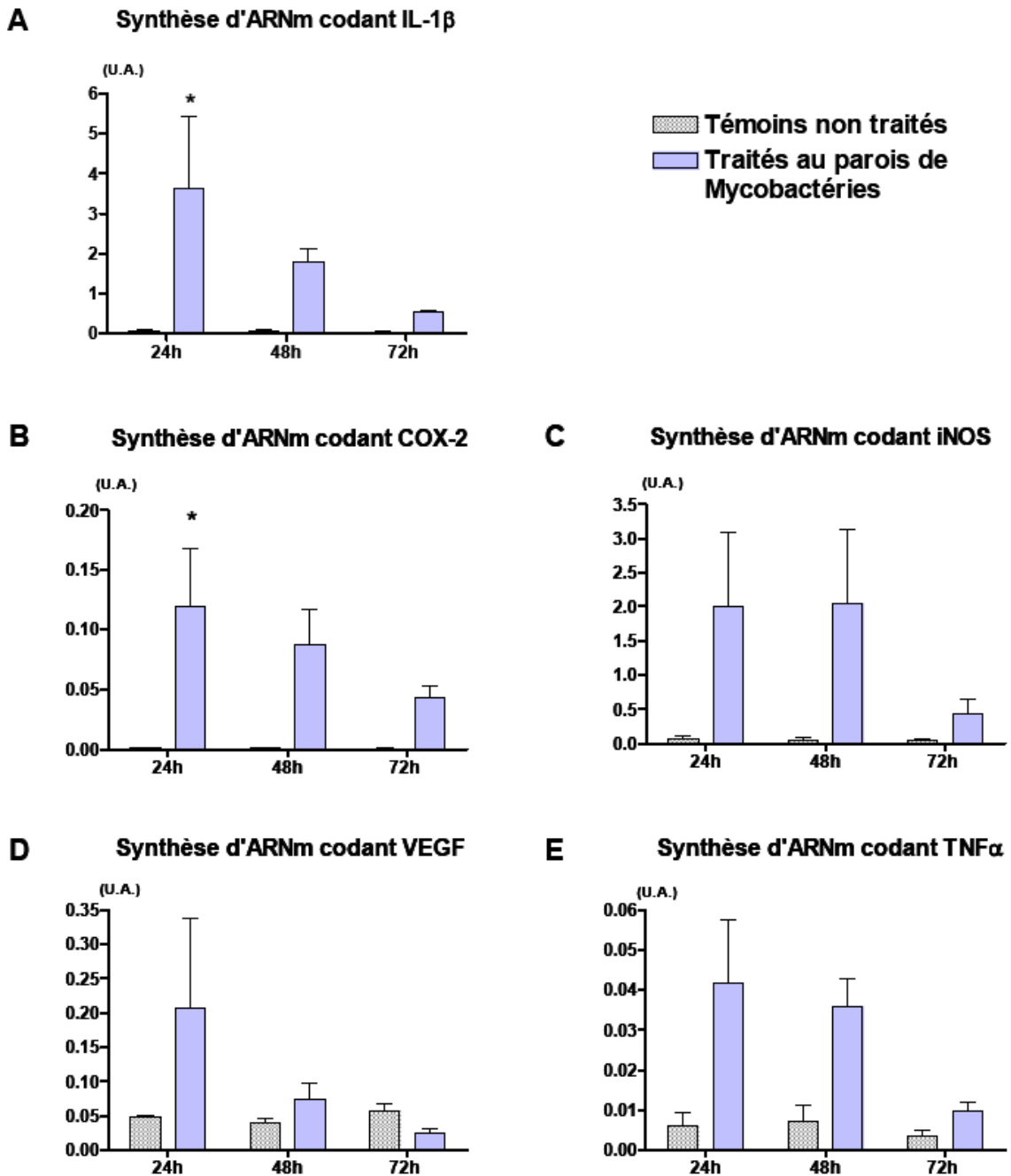


Figure 45 : Résultats par RT-PCR quantitative de la synthèse des ARNm de différents marqueurs de l'inflammation dans la membrane synoviale de rats issus du modèle expérimental de mono-arthrite, 24, 48 et 72 heures après traitement.

Le modèle expérimental est établi par injection intra-articulaire mono-latérale de parois de Mycobactéries au niveau des rotules de rats sains. Le prélèvement des membranes synoviales est effectué 24, 48 ou 72 heures après le traitement aux parois de Mycobactéries. Les ARN totaux sont ensuite extraits, puis les ARNm subissent une rétro-transcription avant d'être quantifiés par PCR en temps réel. Les graphiques représentent respectivement les résultats obtenus pour la synthèse d'ARNm codant, **A** : IL-1 β , **B** : COX-2, **C** : iNOS, **D** : VEGF, **E** : TNF α . Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (U.A.) de synthèse d'ARNm codant pour la protéine d'intérêt rapportée à celle des ARNm codant pour RP29. Les histogrammes représentent la moyenne et l'écart standard à la moyenne de chaque groupe (n=4 membranes synoviales par groupe, * : p < 0,05).

Nous pouvons constater que les taux d'ARNm codant pour IL-1 β , COX-2 et iNOS sont particulièrement plus importants dans le cas des animaux traités par injection de parois de Mycobactéries. Au contraire, les taux d'ARN codant pour vEGF et TNF α des animaux traités sont plus proches de ceux retrouvés chez les animaux témoins. Nous pouvons donc supposer que si il existe une différence due à l'électroporation sur les taux de transcription des gènes codant pour les marqueurs de l'inflammation, celle-ci sera plus facilement perceptible en étudiant les ARNm codant pour IL-1 β , COX2 et iNOS.

Cependant, nous avons effectué la même analyse en s'intéressant aux mêmes marqueurs inflammatoires lors d'une seconde expérience présentant quatre groupes de rats : traités ou non aux parois de Mycobactéries et électroporés (ou non) deux jours plus tard. Les prélèvements de membranes synoviales sont effectués cinq jours après le premier traitement, les ARN totaux en sont extraits et les taux de transcription des ARNm codant pour les marqueurs de l'inflammation sont évalués par RT-PCR quantitative en temps réel. Les résultats sont présentés dans la *figure 46*.

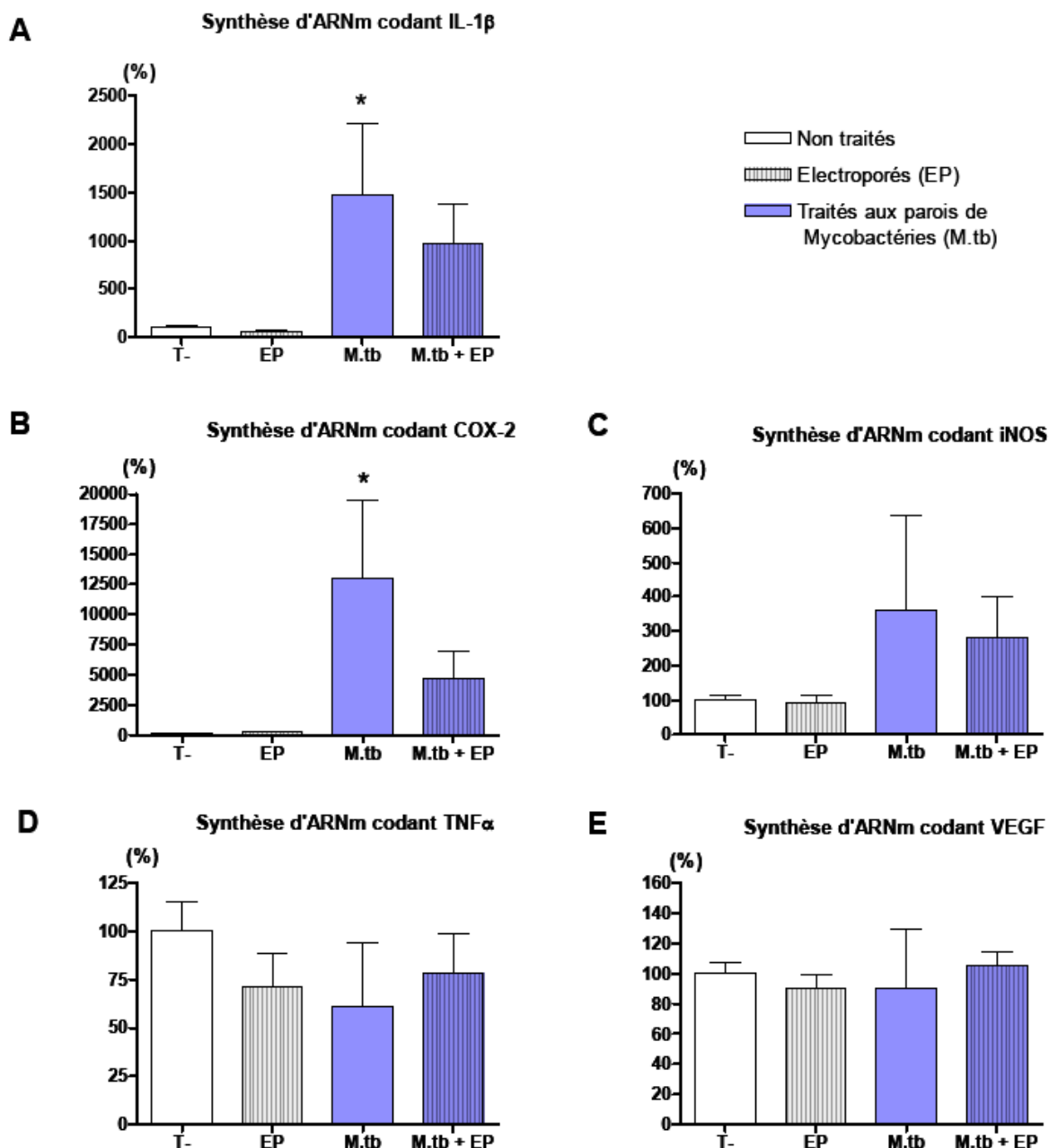


Figure 46 : Résultats par RT-PCR quantitative de la synthèse des ARNm de différents marqueurs de l'inflammation dans la membrane synoviale de rats issus du modèle expérimental de mono-arthrite avec ou sans électroporation biphasique.

Le modèle expérimental est établi par injection intra-articulaire mono-latérale de parois de Mycobactéries au niveau des rotules de rats sains. Les animaux sont traités aux parois de Mycobactéries puis électroporés deux jours après. Le prélèvement des membranes synoviales est effectué cinq jours après le traitement aux parois de Mycobactéries. Les ARN totaux sont ensuite extraits, puis les ARNm subissent une rétro-transcription avant d'être quantifiés par PCR en temps réel. Les graphiques représentent respectivement les résultats obtenus pour la synthèse d'ARNm codant, **A** : IL-1 β , **B** : COX-2, **C** : iNOS, **D** : TNF α , **E** : VEGF. Les résultats sont exprimés en pourcentage de synthèse d'ARNm codant pour la protéine d'intérêt rapportée à celle des ARNm codant pour RP29. La moyenne des résultats des témoins non traités étant considérée comme une synthèse d'ARNm de 100%. Les histogrammes représentent la moyenne et l'écart standard à la moyenne de chaque groupe (n=4 membranes synoviales par groupe, * : p < 0,05).

Nous avons pu constater une augmentation significative du taux de transcription des gènes codant pour l'IL-1 β et COX-2 quand les rats étaient traités aux parois de Mycobactéries. Cependant, nous n'avons observé aucune différence significative quelque soit les marqueurs de l'inflammation étudiés entre les rats électroporés et non électroporés. Une tendance à la baisse du taux de transcription des gènes codant pour IL-1 β et COX-2 est toutefois relevée pour les animaux électroporés par rapport aux rats non électroporés, au sein du groupe traité aux parois de Mycobactéries.




5. Conclusion

Ces différentes études convergent dans le sens de l'innocuité de l'électroporation biphasique sur une articulation pathologique mimant une arthrite. En effet, les impulsions électriques n'engendrent pas de déstructurations supplémentaires du cartilage, ni une diminution de sa fonction d'anabolisme, ni une augmentation du taux d'expression des marqueurs de l'inflammation.

B. Modèle au Mono-Iodo-Acetate :

L'étude de l'innocuité de l'électroporation biphasique sur le modèle expérimental par injection intra-articulaire bilatéral de MIA a été effectuée sur quatre groupes de trois animaux (*tableau 8*) : la moitié des animaux est traitée par injection de MIA, l'autre moitié n'est pas traitée, enfin pour chacun de ces deux cas, la moitié subit une électroporation deux jours après le traitement au MIA (ou l'absence de traitement). Les animaux sont sacrifiés quatorze jours après le premier traitement.

Tableau 8 : Groupes de rats dans l'expérience d'électroporation sur le modèle expérimental d'arthrose

 GROUPES	 Injection de MonoIodo Acétate (MIA)	 Electroporation <i>2 jours plus tard</i>
Témoins absolus	NON	NON
Electroporés	NON	OUI
Traités	OUI	NON
Traités + Electroporés	OUI	OUI

1. Aspect général

Les animaux inclus dans cette étude sont pesés à intervalles réguliers. Nous n'avons constaté aucune variation de prise de poids entre les différents lots.

2. Histologie classique

L'étude histologique a été réalisée sur les prélèvements de rotules et de membranes synoviales de rats de chaque groupe.

Les membranes synoviales des animaux des différents groupes ne présentent pas de modifications structurales significatives, à l'exception d'un petit épaissement pour les animaux traités au MIA (*Figure 47*). L'application d'impulsions électriques ne semble pas entraîner d'altérations (prolifération, fibrose) chez les animaux sains et chez les animaux traités par le MIA.

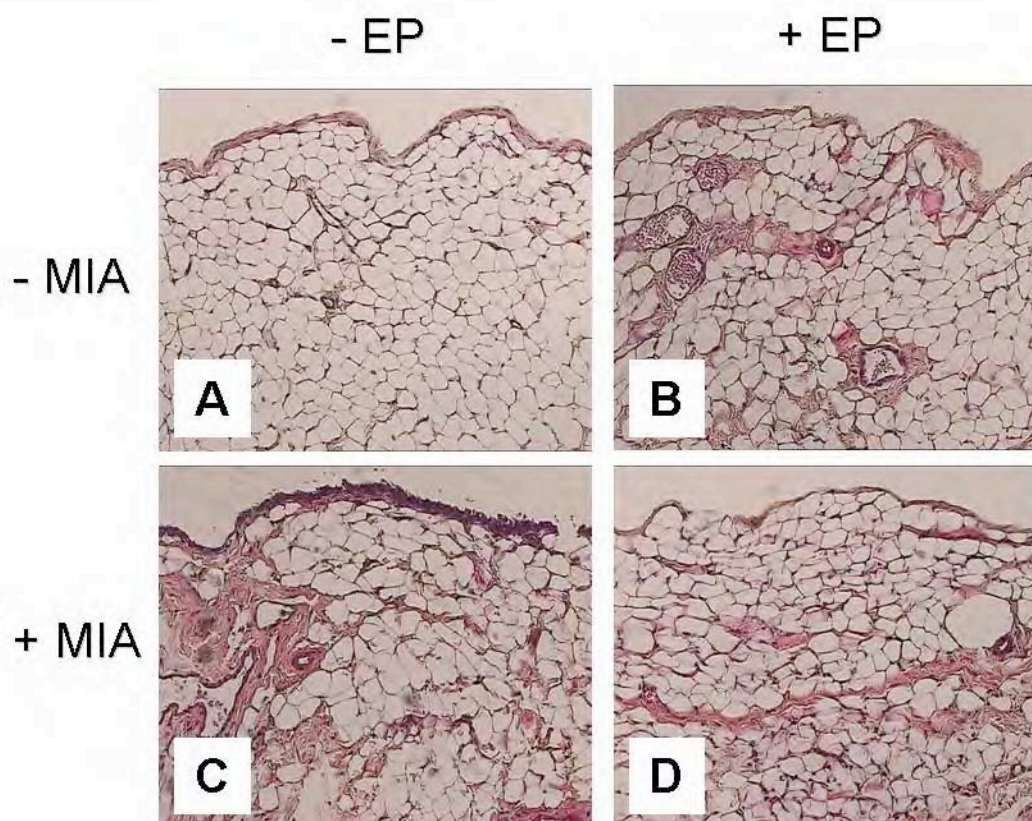


Figure 47 : Vérification de l'innocuité de l'électroporation biphasique sur la structure de la membrane synoviale issue d'un modèle expérimental d'arthrose par injection intra-articulaire bilatérale de Mono-Iodo-Acétate (Objectifs x10 x10).

Les animaux sont traités au Mono-Iodo-Acétate (+MIA) puis électroporés (+EP) deux jours après. Le prélèvement des tissus est effectué 14 jours après le traitement au MIA. Les membranes synoviales sont fixées, déshydratées et incluses en paraffine avant d'être coupées. Après réhydratation, les coupes sont colorées à l'HES : Hématoxyline, Eosine et Safran.

A : Rats témoins absolus ; B : Rats témoins ayant reçu la série d'impulsions électriques ; C : Rats exposés au MIA ; D : Rats exposés au MIA puis soumis aux impulsions électriques, 48 heures après l'injection.

Le cartilage des rats est analysé par une série de colorations qui permettent d'apprécier d'éventuelles modifications (appréciation qualitative) de la structure du tissu articulaire, les résultats sont présentés sur la **figure 48**. Aucune différence n'est constatée entre les animaux témoins et les animaux électroporés, quelque soit la coloration utilisée (HES, Bleu de toluidine, Rouge sirius). Les animaux traités par une injection de MIA présente une réduction de l'épaisseur du cartilage et de la cellularité (HES), une diminution du contenu en protéoglycanes (Bleu de toluidine) ainsi qu'une désorganisation du réseau collagénique (Rouge sirius). L'application d'impulsions électriques n'aggrave pas la sévérité des lésions observées uniquement avec les injections de MIA et ceci quelque soit la dose injectée. Il faut noter également une diminution de la formation des clusters suite aux pulses chez les animaux injectés au MIA.

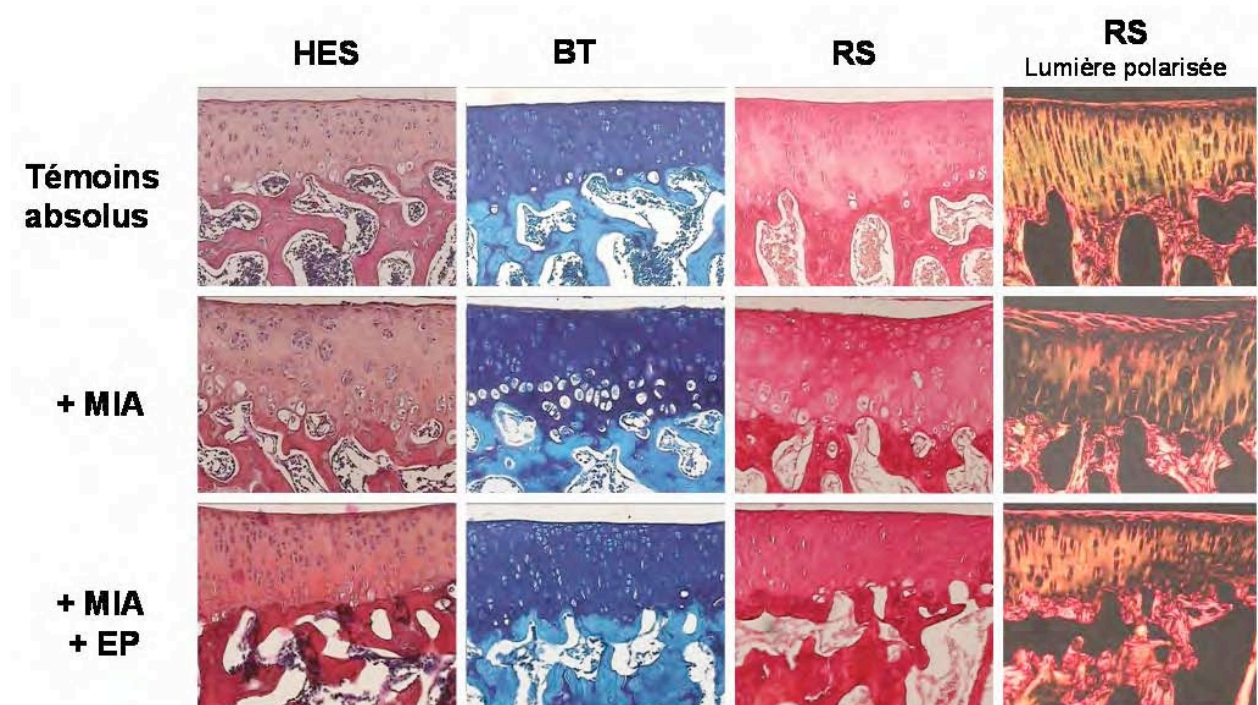


Figure 48 : Vérification de l'innocuité de l'électroporation biphasique sur la structure du cartilage rotulien issu d'un modèle expérimental d'arthrose par injection intra-articulaire bilatérale de Mono-Iodo-Acétate (Objectifs x10 x10).

Les animaux sont traités au Mono-Iodo-Acétate (+MIA) puis électroporés (+EP) deux jours après. Le prélèvement des rotules est effectué 14 jours après le traitement au MIA. Les rotules sont fixées, déshydratées et incluses en paraffine avant d'être coupées. Après réhydratation, les coupes sont colorées de diverses manières.

HES : Hématoxyline, Eosine et Safran, permettant d'apprécier la structure générale du cartilage

BT : Bleu de Toluidine, qui fait apparaître la teneur en protéoglycanes du cartilage

RS : Rouge Sirius, présentant la teneur en collagènes du cartilage, et la disposition du réseau collagénique (par observation en lumière polarisée).

3. Anabolisme

Pour chaque lot de rats, les rotules sont isolées et les échantillons correspondant au centre (*figure 49*) et à la périphérie (données non montrées) du tissu sont prélevés pour analyser la fonction de biosynthèse des protéoglycanes.

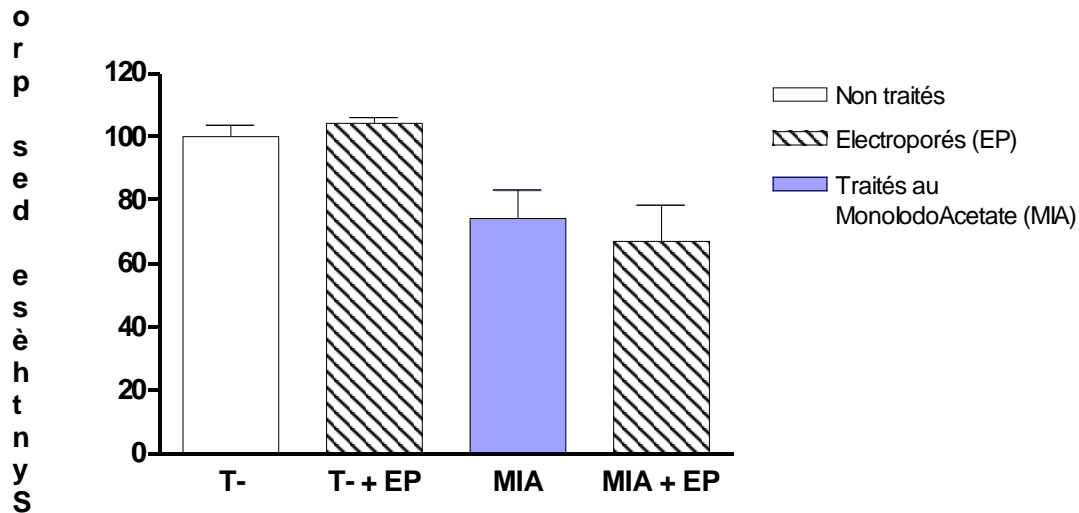


Figure 49 : Résultats de l'incorporation de ³⁵S dans le centre des rotules de rats issus d'un modèle expérimental d'arthrose avec ou sans électroporation biphasique.

Le modèle expérimental est établi par injection par injection intra-articulaire bilatérale de Mono-Iodo-Acetate. Les animaux sont traités au MIA puis électroporés deux jours après. Le prélèvement des rotules et l'incorporation de ³⁵S sont effectués 14 jours après le traitement au MIA. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'incorporation de ³⁵S dans le centre des rotules, la moyenne des résultats d'anabolisme des témoins non traités étant considérée comme une biosynthèse des protéoglycanes de 100 %. Les histogrammes représentent la moyenne et l'écart standard à la moyenne de chaque groupe (n=6 rotules par groupe).

Aucune différence significative de la fonction d'anabolisme n'a été relevée dans le centre des rotules entre les animaux électroporés et non électroporés, qu'il s'agisse du groupe préalablement traité au MIA, ou du groupe non traité. Nous pouvons cependant constater une diminution de la biosynthèse des protéoglycanes chez les animaux traités au MIA par rapport aux animaux non traités. Baisse qui est retrouvée dans la littérature concernant ce modèle.

C. Conclusion

L'utilisation de l'électroporation biphasique dans les modèles expérimentaux d'arthropathies s'avère être possible car elle n'engendre aucune dégradation supplémentaire de l'état de santé global de l'animal, elle ne provoque pas d'amplification de la dégénérescence des tissus articulaires (tel le cartilage ou la membrane synoviale) et elle n'entraîne pas d'accentuation de la baisse de biosynthèse de protéoglycanes. Enfin l'absence d'effet délétères de l'électroporation biphasique sur le taux de transcription des gènes codant pour les

marqueurs de l'inflammation dans le modèle aux parois de Mycobactéries implique que cette technique pourra être utilisée comme mode de transfection de plasmide d'intérêt visant à modifier l'expression des gènes codant pour les marqueurs de l'inflammation.

IV. Discussion

La vectorisation des séquences d'ADN dans le tissu articulaire cartilagineux est rendue relativement délicate par la présence d'une matrice extracellulaire, composée d'un réseau de fibres collagéniques et de protéoglycanes dense. Seules les techniques reposant sur l'utilisation de vecteurs viraux (adénovirus, AAV) permettent d'envisager l'introduction dans les chondrocytes de plasmides. Toutefois, même si ce type d'approche permet d'obtenir une efficacité de transfection importante, il n'en reste pas moins que la dissémination des particules virales dans les autres entités structurales constituant l'articulation est elle aussi importante. Parmi les approches non virales, l'utilisation de molécules de type polyplexes (polymères cationiques) ou lipoplexes (systèmes lipidiques) s'avère séduisante mais ne permet pas d'obtenir une transfection importante, en raison de la présence de la matrice extracellulaire et possiblement de la composition du liquide synovial intra-articulaire (riche en acide hyaluronique). De fait, l'utilisation d'impulsions électriques pour véhiculer une séquence nucléotidique dans le cartilage articulaire représente une approche originale, permettant de s'affranchir des certains écueils observés avec les méthodologies précédemment citées. Cette approche a été développée au laboratoire, en collaboration avec l'équipe de L. Mir à l'IGR, et nous a permis de valider le concept, sur des tissus articulaires d'animaux sains. Ces expériences ont été réalisées avec un appareillage permettant de délivrer des ondes carrées qui assurent à la fois la perméabilisation membranaire mais également la migration des molécules nucléotidiques. Les travaux réalisés sur le muscle ont montré que l'application de ce type d'impulsions électriques pouvait provoquer des lésions cellulaires et une infiltration au sein du tissu ciblé. C'est la raison pour laquelle il a été décidé d'évaluer les potentialités d'un nouveau type d'appareillage, le Cliniporator, qui permet de dissocier les impulsions de perméabilisation (Haut voltage, faible durée) et les impulsions électrophorétiques (LV, faible voltage). La faisabilité a tout d'abord été validée sur le muscle et les principaux résultats ont montré des atteintes plus limitées au niveau du tissu cible. Au vu de ces résultats, des essais ont été entrepris sur des animaux sains et ont permis de montrer une innocuité des différentes combinaisons (HV / LV) d'impulsions sur le cartilage articulaire rotulien d'animaux sains. Peu

de travaux ont été effectués pour étudier les effets biologiques sur des tissus pathologiques, les approches développées étant principalement basées soit sur une application préventive des impulsions électriques et des séquences nucléotidiques d'intérêt soit sur le passage par voie systémique des protéines recombinantes vers le tissu cible. Les travaux que nous avons réalisés ont permis de montrer que l'application d'impulsions électriques de haut et faible voltage sur des tissus lésés n'entraînait pas une aggravation des atteintes observées, aussi bien lors de l'utilisation de modèles dégénératifs (modèle d'arthrose expérimentale par injection intra-articulaire de MIA) qu'inflammatoires aigus (modèle aux parois de mycobactéries). En effet, l'application d'impulsions (HV) ou les combinaisons (HV/LV_(xn)) aurait pu s'avérer délétère pour l'homéostasie du cartilage et amplifier les processus de dégradation de la matrice extracellulaire, en augmentant par exemple les phénomènes d'apoptose chondrocytaire. Il était aussi important de démontrer que ce type d'impulsions, à l'instar de ce qui avait été observé avec des ondes carrées, ne favorisait pas les processus inflammatoires (augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires par les cellules résidentes, recrutement des cellules immunitaires), qui concourent à accélérer l'érosion du cartilage articulaire.

Cependant, même si nous avons pu démontrer l'efficacité des combinaisons HV/LV pour véhiculer des séquences nucléotidiques dans le cartilage articulaire (localisation similaire à celle observée avec un système d'ondes carrées), nous n'avons pas pu mesurer les effets chondroprotecteurs des protéines de stress surexprimées par transfert de gènes (Cliniporator) dans les modèles inflammatoires (Mycobacterium) ou dégénératifs (section ligament croisé antérieur) car il n'existe pas à l'heure actuelle de système d'électrodes permettant d'obtenir une biodistribution dans l'ensemble du cartilage articulaire (rotule, plateaux fémoraux-tibiaux, condyles). En effet, les électrodes à notre disposition nous permettent de cibler efficacement une entité anatomique comme la rotule mais ne permettent pas de distribuer le plasmide dans tout le cartilage articulaire. Dans ces deux modèles, les zones protégées par la surexpression auraient été trop faibles pour pouvoir évaluer correctement les effets biologiques, en raison l'hétérogénéité de la localisation des protéines d'intérêt.

Répétition des séquences. Des expériences complémentaires devront être effectuées, afin de déterminer la fréquence d'application des impulsions électriques sur tissu pathologique. En effet, une fois un jeu d'électrodes adapté au schéma articulaire développé, nous pourrions déterminer si des applications répétées d'impulsions électriques HV/LV ne peuvent pas générer / accroître les atteintes articulaires ou favoriser le recrutement des médiateurs de la réponse inflammatoire.

Adressage tissulaire. Dans un contexte plus général de vectorisation de composés à visée thérapeutique (SiRNA / MiRNA, molécules pharmacologiques *eg* AINS), les travaux réalisés permettent d'envisager de « nouvelles » voies d'administration locales et d'adressage tissulaire de molécules, intéressantes sur le plan thérapeutique, mais possédant des contre-indications liées à un manque de spécificité/affinité/sélectivité cellulaire (effets cytotoxique lié à la posologie nécessaire pour atteindre l'IC₅₀, effets opposés sur un type cellulaire adjacent,...). Il pourrait permettre de renforcer l'arsenal thérapeutique pour améliorer le traitement de certaines formes d'arthrose, en ramenant dans le pipeline thérapeutique des molécules qui avaient été écartées en raison de leurs effets indésirables.

CHAPITRE 3 : MG132 ET CARTILAGE ARTICULAIRE

Le second objectif de cette thèse était d'évaluer l'effet d'un inhibiteur réversible du protéasome : le MG132. Ces capacités chondroprotectrices *via* la diminution du processus apoptotique ayant déjà été démontrées sur le modèle expérimental d'arthrose au MIA [Grossin et coll., 2004]. Cette propriété semble être notamment due à l'induction des protéines de stress Hsp27 et Hsp70 par le MG132. Afin de vérifier ces effets bénéfiques, nous nous sommes intéressés à un autre modèle expérimental d'arthrose plus représentatif des différentes facettes de la pathologie arthrosique, le modèle par section du ligament croisé antérieur. En effet, ce modèle est plus adapté que le modèle par injection de MIA aussi bien au niveau de l'induction (due à l'usure biomécanique), que des lésions obtenues, l'inflammation de la membrane synoviale ou encore des mécanismes de mort cellulaire (plus de mort cellulaire par apoptose que par nécrose dans ce modèle). C'est pourquoi il est classiquement utilisé en industrie pharmaceutique comme modèle de choix pour une arthrose expérimentale. Nous nous sommes également intéressés à une autre facette du potentiel thérapeutique du MG132, présentés dans les travaux de Safranek et coll., 2006. Cette étude montre que le MG132 présentait des propriétés anti-inflammatoires chez le rat en état de choc septique, il était donc intéressant d'évaluer, *in vitro*, l'effet en traitement préventif du MG132 sur des cellules articulaires (chondrocytes et synoviocytes) stimulées à l'IL-1 β (mimant ainsi des conditions inflammatoires), afin de l'utiliser par la suite sur des modèles expérimentaux présentant une composante inflammatoire. Nous avons donc commencer par vérifier la non cytotoxicité du MG132 sur les cellules ciblées *in vitro*.

1. Test des effets du MG132 in vitro

A. Evaluation de la cytotoxicité du MG132 in vitro

Les études de cytotoxicité du MG132 sur les chondrocytes et les synoviocytes ont été estimées par test MTT en fonction du pourcentage d'atteintes des fonctions mitochondriales. Les cellules ont été cultivées en monocouche puis traitées durant 4 heures à des concentrations croissantes de MG132, allant de 0,15 μ M à 15 μ M. La cytotoxicité du MG132 a été évaluée

24, 48 et 72 heures après traitement au MG132. Au cours de ces expériences, le MG132 a été dilué dans une solution contenant soit du DMSO à 1‰ soit de l'éthanol à 1‰. Les tests de cytotoxicité ont donc été effectués pour chacun de ces deux cas.

1. Cas du MG132 dilué dans du DMSO 1‰

a. Dans les chondrocytes

La **figure 50** représente le pourcentage d'atteinte mitochondriale relevé 24, 48 et 72 heures après traitement au MG132 à différentes concentrations (entre 0,15 et 15 µM).

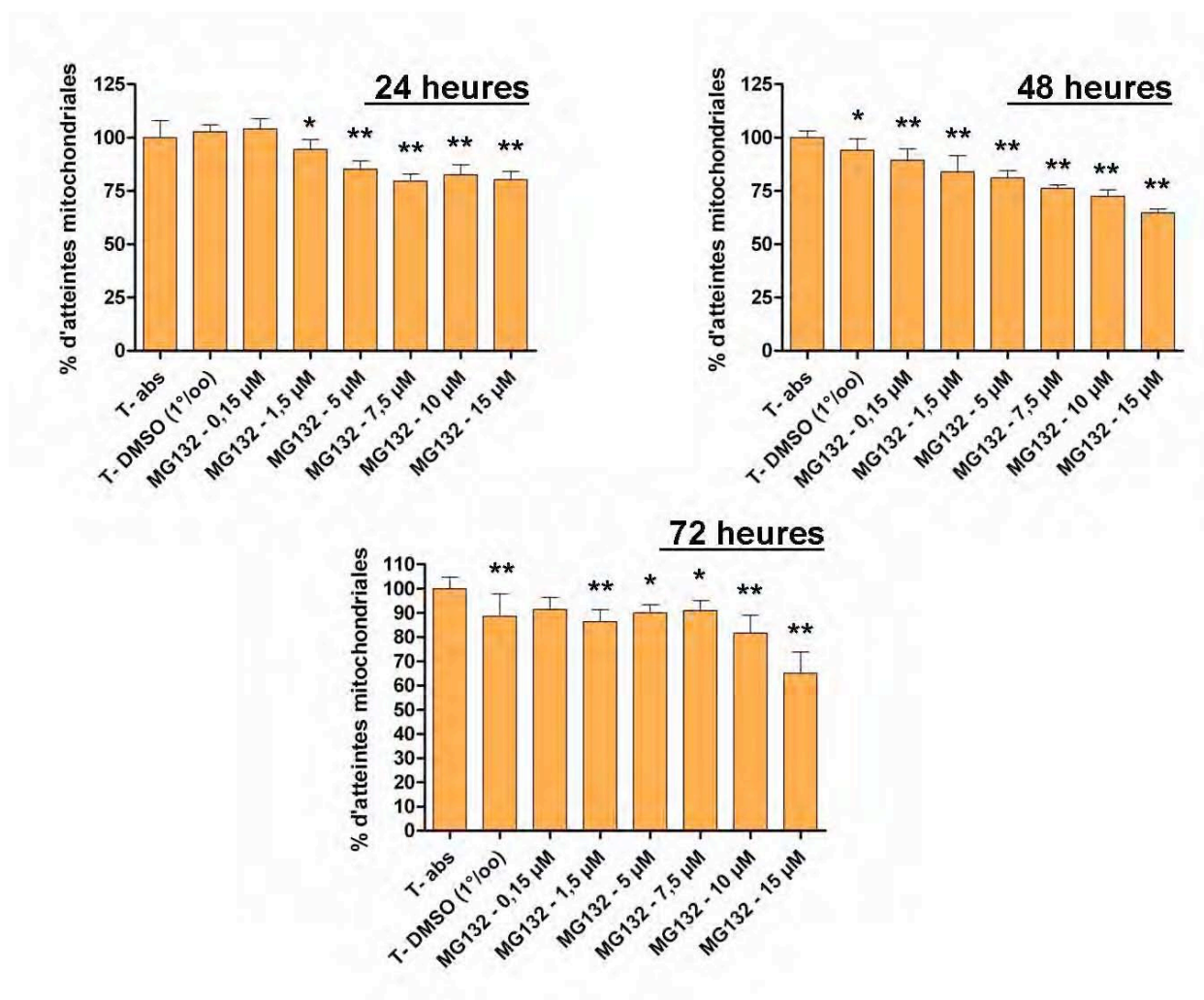


Figure 50 : Evaluation de la cytotoxicité du MG132 (DMSO 1‰) sur les chondrocytes *in vitro* par test MTT.

Les chondrocytes sont utilisés au premier passage, ils sont traités au MG132 (à des concentrations croissantes, de 0,15 µM, 1,5 µM, 5 µM, 7,5 µM, 10 µM et 15 µM dans du milieu de culture à 0,1% de DMSO) pendant 4 heures. Deux types de témoins sont utilisés, les témoins n'ayant subi aucun traitement, et ceux mis en présence de 0,1% de DMSO. Les tests MTT sont effectués 24, 48 et 72 heures après traitement au MG132. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'atteintes mitochondriales. Les histogrammes représentent la moyenne et l'écart type de chaque groupe (n=8, * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; ANOVA et test a posteriori)

Nous avons constaté à 24 heures que les atteintes mitochondriales étaient significativement plus importantes pour les concentrations supérieures ou égales à 1,5 μM de MG132. Cependant, ces atteintes n'excèdent pas 25 % pour la plus forte concentration. A 48 heures, l'effet cytotoxique du MG132 est significatif dès la plus faible concentration allant jusqu'à toucher 40 % des cellules à la plus forte concentration. Cependant, une partie de cette cytotoxicité semble être imputable au DMSO qui entraîne à lui seul des dommages non négligeables. A 72 heures, nous observons une tendance au retour à la normal avec des atteintes mitochondriales d'environ 10 % jusqu'à la concentration de 7,5 μM . Par contre les deux plus fortes concentrations de MG132 présentent un effet encore fortement cytotoxique.

b. Dans les synoviocytes

La **figure 51** représente le pourcentage d'atteintes mitochondriales relevé 24, 48 et 72 heures après traitement au MG132 à différentes concentrations (entre 0,15 et 15 μM).

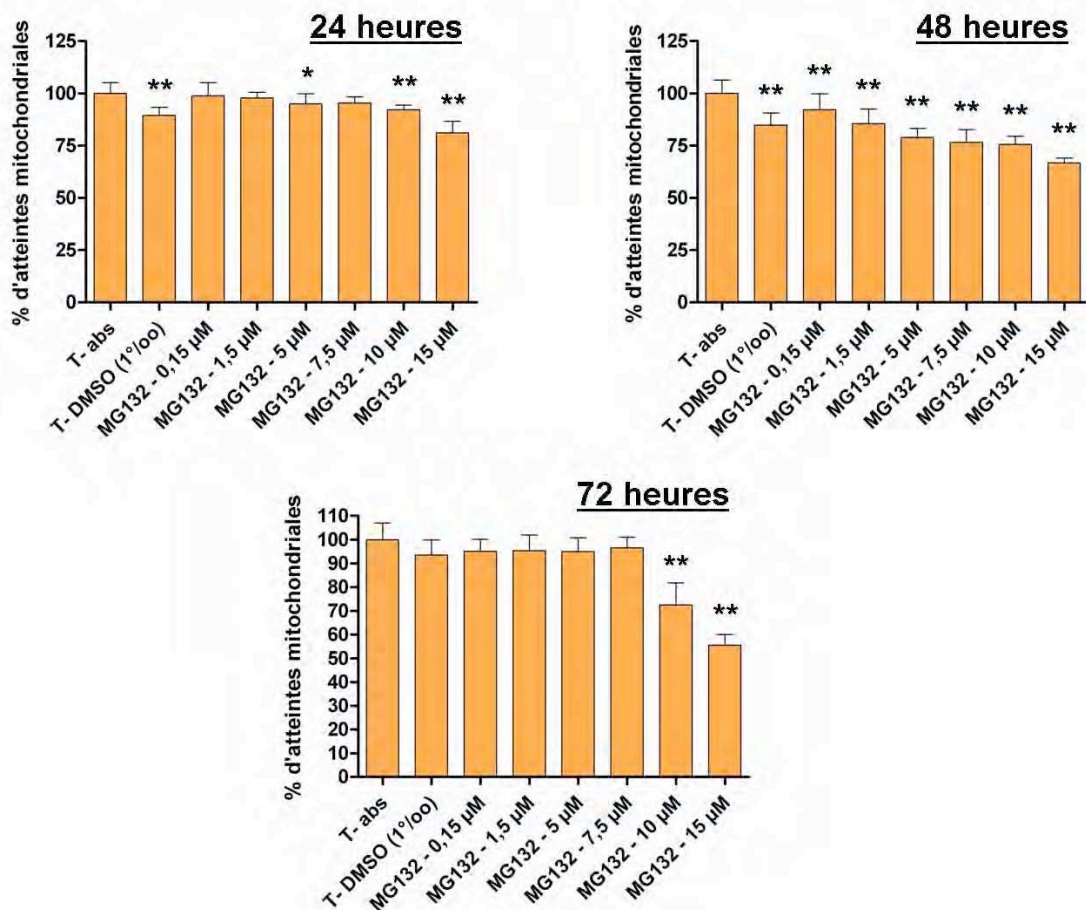


Figure 51 : Evaluation de la cytotoxicité du MG132 (DMSO 1%) sur les synoviocytes in vitro par test MTT.

Les synoviocytes sont utilisés au troisième passage, ils sont traités au MG132 (à des concentrations croissantes, de 0,15 μM , 1,5 μM , 5 μM , 7,5 μM , 10 μM et 15 μM dans du milieu de culture à 0,1% de DMSO) pendant 4 heures.

Deux types de témoins sont utilisés, les témoins n'ayant subi aucun traitement, et ceux mis en présence de 0,1% de DMSO. Les tests MTT sont effectués 24, 48 et 72 heures après traitement au MG132. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'atteintes mitochondriales. Les histogrammes représentent la moyenne et l'écart type de chaque groupe (n=8, * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; ANOVA et test a posteriori)

Nous avons constaté à 24 heures que l'augmentation des atteintes mitochondriales était principalement significative pour les concentrations supérieures ou égales à 10 μM de MG132. Cependant, ces atteintes sont toutes imputables au DMSO, vu que les valeurs observées ne sont pas significatives par rapport au témoin DMSO. A 48 heures, l'effet cytotoxique du MG132 est significatif dès la plus faible concentration allant jusqu'à toucher 40 % des cellules à la plus forte concentration. Cette cytotoxicité est en majorité due à la présence de DMSO qui entraîne à lui seul des dommages non négligeables. A 72 heures, nous observons un retour à la normal excepté pour les deux plus fortes concentrations de MG132 qui présentent un effet encore fortement cytotoxique (30 % d'atteintes mitochondriales pour la concentration de 10 μM et 45 % à 15 μM).

2. Cas du MG132 dilué dans de l'éthanol 1‰ dans les synoviocytes

La *figure 52* représente le pourcentage d'atteintes mitochondriales relevé 24, 48 et 72 heures après traitement au MG132 à différentes concentrations (entre 0,15 et 15 μM).

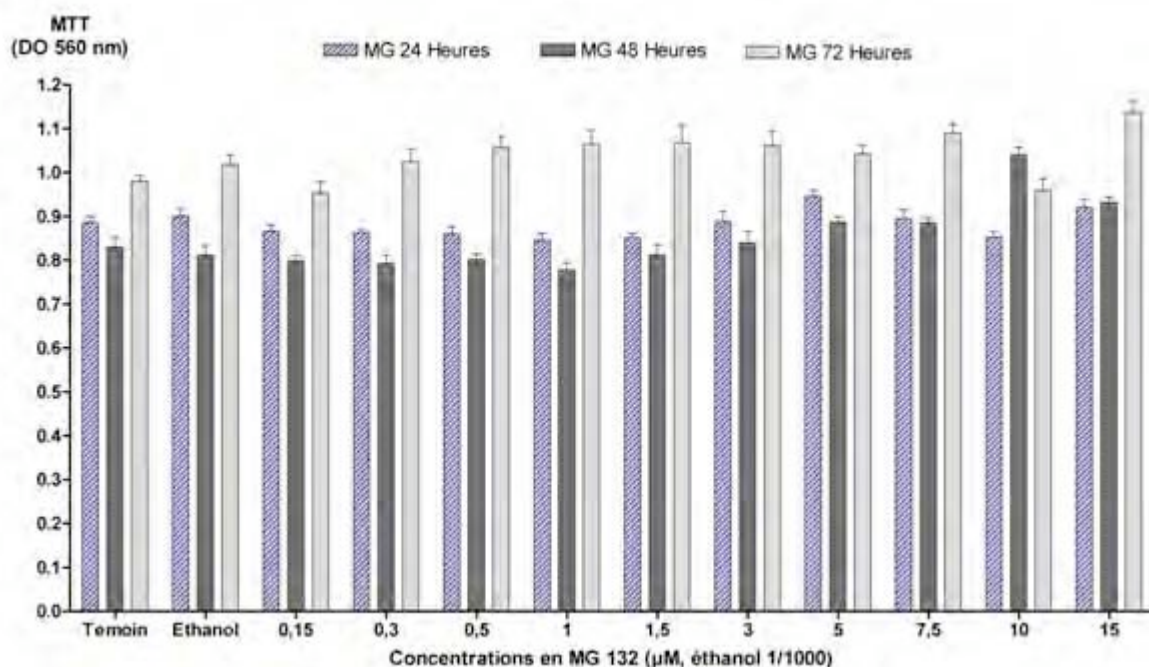


Figure 52 : Evaluation de la cytotoxicité du MG132 dilué dans l'EtOH sur les synoviocytes in vitro par test MTT.

Les synoviocytes sont utilisés au troisième passage, ils sont traités au MG132 (à des concentrations croissantes, de 0,15 μM , 1,5 μM , 5 μM , 7,5 μM , 10 μM et 15 μM dans du milieu de culture à 0,1% d'éthanol) pendant 4 heures. Deux types de témoins sont utilisés, les témoins n'ayant subi aucun traitement, et ceux mis en présence de 0,1% d'éthanol. Les tests MTT sont effectués 24, 48 et 72 heures après traitement au MG132. Les résultats sont

exprimés en pourcentage d'atteintes mitochondriales. Les histogrammes représentent la moyenne et l'écart type de chaque groupe (n=8, * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; ANOVA et test a posteriori)

Nous avons constaté un profil similaire à 24, 48 et 72 heures. Les résultats ne montrent pas d'atteintes mitochondriales dues au MG132, quelque soit la concentration utilisée. Nous pourrions seulement noter une légère tendance à l'augmentation des fonctions mitochondriales suite au traitement au MG132, à 72 heures.

Nous pouvons conclure que le MG132 n'est pas cytotoxique pour les cellules à des concentrations de 0,15 à 15 μ M, 24, 48 et 72 heures après traitement.

B. Induction des protéines Hsp70 et HSP27 par le MG132

1. Objectifs

La deuxième partie du travail réalisé *in vitro* s'est intéressée à utiliser un inhibiteur du protéasome réversible, le MG132 afin d'induire une augmentation de l'expression des protéines Hsp70 et Hsp27 dans les cellules articulaires de rat. En effet, l'accumulation de protéines anormales dans la cellule, normalement dégradées par le protéasome, conduit à l'augmentation de l'expression d'Hsp70.

De la même façon que pour la surexpression d'Hsp70/GFP et Hsp27/GFP, nous avons dans un premier temps vérifié l'efficacité d'induction d'Hsp70 et d'Hsp27 par le MG132.

Nous avons ensuite souhaité évaluer les potentialités anti-inflammatoires du MG132 vis à vis d'un stimulus inflammatoire (IL-1 β), afin démontrer un potentiel thérapeutique pour ce type de molécules.

2. Mise en évidence de l'expression des protéines Hsp70 et Hsp27

a. Par western-blot

Les résultats de western-blot présentant l'induction d'Hsp27 et d'Hsp70 après un traitement au MG132 de chondrocytes de rats sont présentés sur les *figures 53 et 54*.

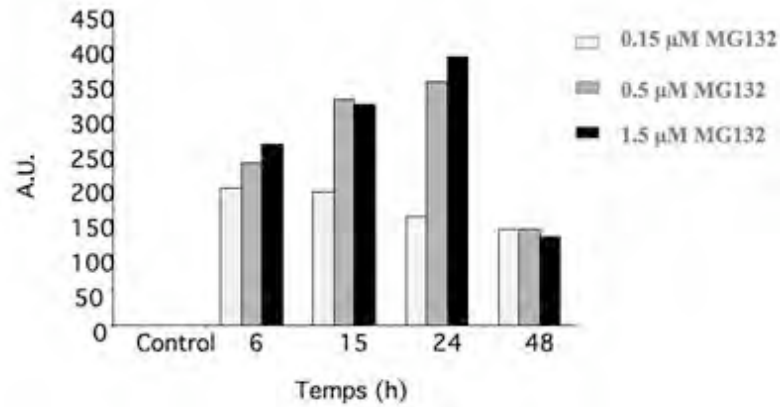
A**B**

Figure 53 : A : Cinétique d'induction d'Hsp27 dans les chondrocytes de rat par le MG132. Les chondrocytes ont été exposés à différentes concentrations de MG132 (0,15 ; 0,5 et 1,5 μM). Différents temps après la mise en contact, les protéines totales ont été extraites et dosées par la méthode de Bradford. La protéine Hsp27 a été détectée par western-blot avec un anticorps spécifique d'Hsp27 (n = 3 expériences indépendantes). **B :** Le niveau d'expression de la protéine Hsp27 a été évalué par analyse densitométrique de chaque bande obtenue en western blot et les résultats ont été exprimés en unités arbitraires.

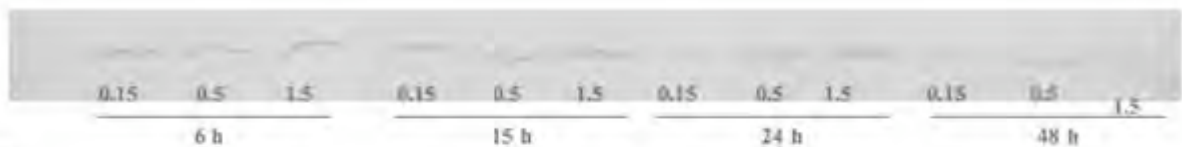
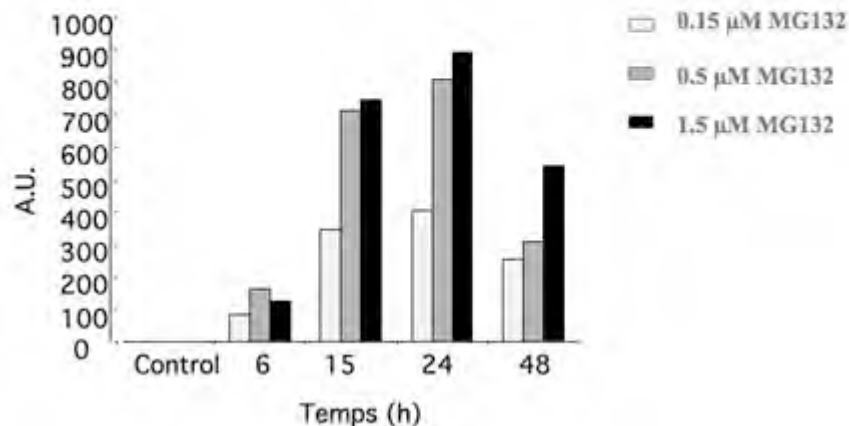
A**B**

Figure 54 : A : Cinétique d'induction d'Hsp70 dans les chondrocytes de rat par le MG132. Les chondrocytes ont été exposés à différentes concentrations de MG132 (0,15 ; 0,5 et 1,5 μM). Différents temps après la mise en contact, les protéines totales ont été extraites et dosées par la méthode de Bradford. La protéine Hsp70 a été détectée par western-blot avec un anticorps spécifique d'Hsp70 (n = 3 expériences indépendantes). **B :** Le niveau d'expression de la protéine Hsp70 a été évalué par analyse densitométrique de chaque bande obtenue en western blot et les résultats ont été exprimés en unités arbitraires.

Les résultats obtenus pour Hsp27 et Hsp70 présentent les mêmes profils, nous analyserons donc ceux d'Hsp70 sachant qu'Hsp27 s'est comporté de la même manière.

L'augmentation du taux des ARNm d'Hsp70 par le MG132 engendre une augmentation de la quantité de protéine Hsp70, dépendante également de la concentration de MG132. En effet, l'analyse en western blot montre une augmentation de la teneur en protéine Hsp70 dès 6 heures après mise en contact avec le MG132 pour les 3 concentrations utilisées avec un maximum d'expression 24 heures après l'exposition. Après 48 heures, le taux d'Hsp70 diminue, probablement du à la demi-vie relativement courte de la protéine et à la chute du taux d'ARNm après 24 heures.

Le résultat notable à retenir est que le traitement au MG132 engendre effectivement une induction des protéines Hsp70 et Hsp27, avec un pic entre 15 et 24 heures après traitement.

b. Par immunocytochimie

L'induction de la synthèse d'Hsp70 suite à la stimulation par le MG132 a été confirmée par immunocytochimie avec un anticorps anti-Hsp70. La *figure 55* illustre les résultats obtenus.

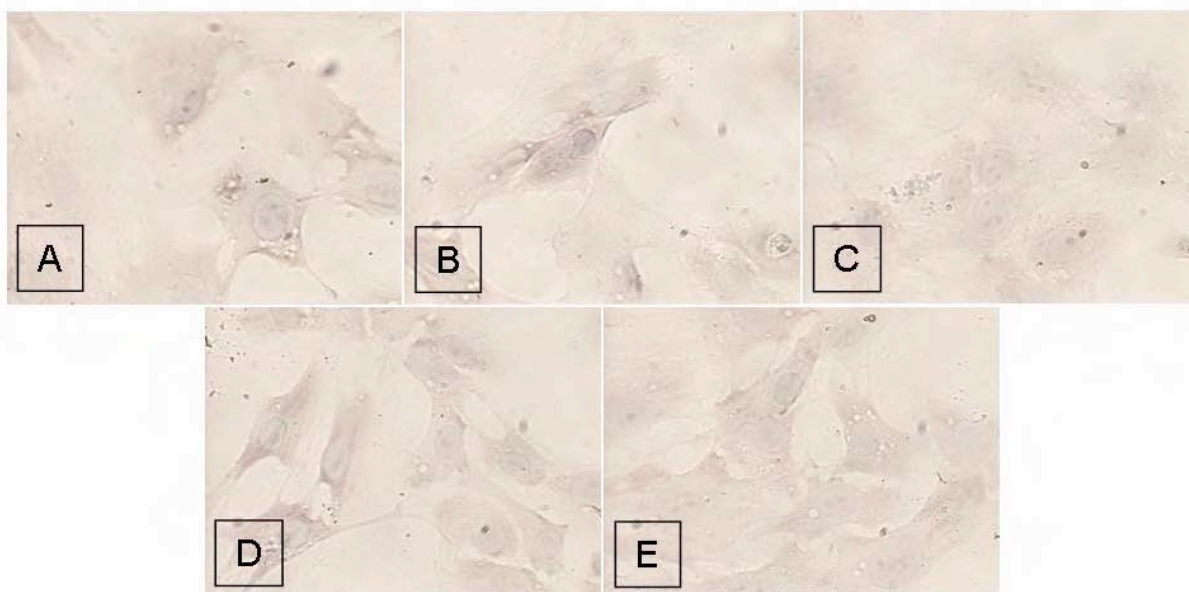


Figure 55 : Analyse par immunocytochimie à 24h de l'expression d'Hsp27 et Hsp70 après exposition au MG132 (1.5 µM) (objectif x10 x40). Les figures A, B, D et E représentent les cellules traitées au MG132. La figure C représente des cellules témoins non traitées. A, B et C sont des cellules mises en présence de l'anticorps anti-Hsp70. D et E sont des cellules mises en présence de l'anticorps anti Hsp27. Le témoin « cellules non traitées mises en présence de l'anticorps anti-Hsp27 » n'est pas montré mais à la même allure que la figure C.

3. Mise en évidence de l'expression des ARNm d'Hsp70 par RT-PCR

L'induction des ARNm de la protéine Hsp70 après traitement ou non au MG132 est montrée sur la figure. Les résultats de RT-PCR sur des chondrocytes de rat traités ou non par

différentes concentrations de MG132 (0.15, 0.5 et 1.5 μM) (quatre heures de traitement suivies de deux heures d'incubation à 37°C) montrent une augmentation des ARNm codant pour la protéine Hsp70 en fonction de la concentration de MG132. Les ARNm d'Hsp70 ne sont pas détectables dans les chondrocytes non traités par le MG132.

Une cinétique d'induction de plusieurs Hsp et cofacteurs par le MG132 (concentration de 1.5 μM) a été menée sur des synoviocytes et des chondrocytes de rats. Les cellules sont traitées par le MG132 pendant quatre heures avant d'être placées à nouveau dans du milieu de culture complet. La cinétique dure 24 heures et les cellules sont utilisées pour l'étude de la synthèse des ARNm codant pour Hsp70, Hsp27, HSF-1 et HSF-2, à différents temps reportés dans la *figure 56*.

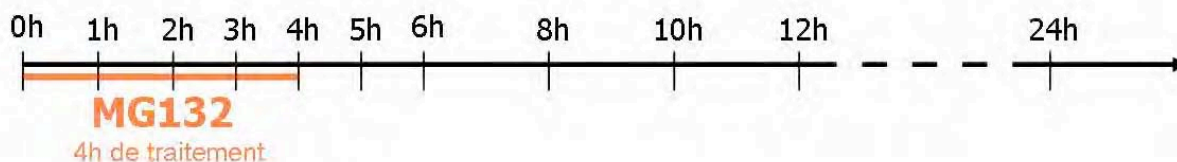


Figure 56 : Temps étudiés lors de la cinétique d'induction des HSPs et HSF, par le MG132

Les ARN totaux sont extraits à partir des cellules puis ils subissent une RT-PCR quantitative en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques. Des témoins non traités sont étudiés 4 et 12 heures après le traitement des autres cellules pour vérifier l'absence d'induction quand les cellules ne sont pas traitées au MG132. Une deuxième série de témoin traité uniquement avec la solution diluante du MG132 (milieu et DMSO 1%) est utilisée de la même manière pour vérifier que les inductions ne sont pas dues à la présence de DMSO dans la solution traitante.

4. Traitement des synoviocytes

Les résultats sont présentés dans la *figure 57*. Tout d'abord, l'observation des témoins absolus et des témoins DMSO, nous confirme que si nous constatons une induction au cours de la manipulation, celle-ci sera effectivement due à l'action du MG132, et non d'autres facteurs telle que le DMSO.

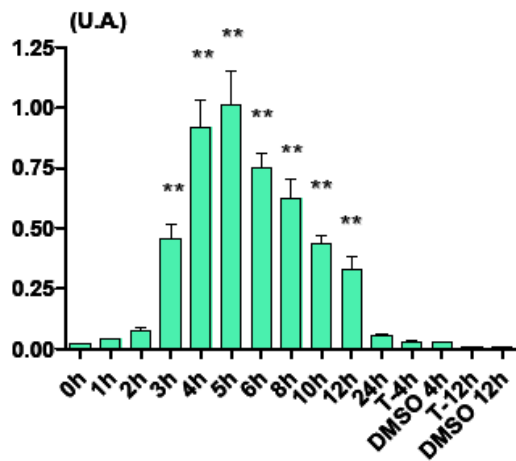
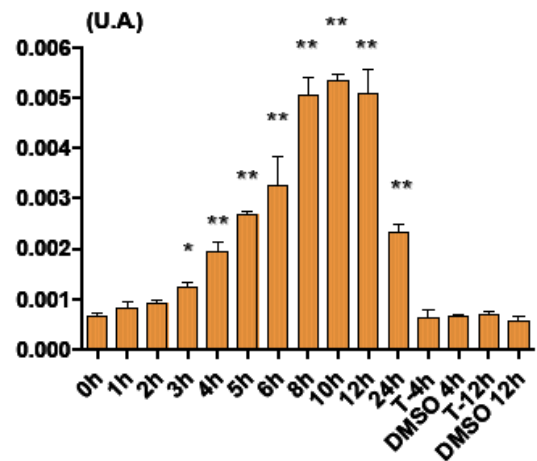
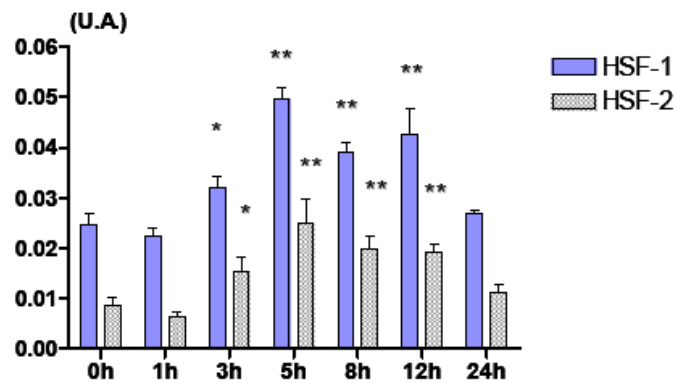
A Synthèse d'ARNm codant Hsp70**B Synthèse d'ARNm codant Hsp27****C Synthèse d'ARNm codant HSF-1 et HSF-2**

Figure 57 : Résultats de la cinétique d'induction de la synthèse des ARNm codant pour Hsp70, Hsp27, HSF-1 et HSF-2 dans les synoviocytes de rat traités au MG132.

Les synoviocytes sont utilisés au troisième passage, ils sont traités au MG132 (à 1,5 μ M dans du milieu de culture à 0,1% de DMSO) pendant 4 heures. Les ARN totaux sont extraits des cellules à différents temps après le début du traitement, puis les ARNm subissent une rétro-transcription avant d'être quantifiés par PCR en temps réel. Deux types de témoins sont utilisés, les témoins n'ayant subi aucun traitement, et ceux mis en présence de 0,1% de DMSO. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (U.A.) de synthèse d'ARNm codant pour les différentes protéines d'intérêt (A : Hsp70, B : Hsp27 ; C : HSF-1 et HSF-2) rapportée à celle des ARNm codant pour RP29. Les histogrammes représentent la moyenne et l'écart type de chaque groupe (n=3, * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; ANOVA et test a posteriori).

Nous avons pu observer une augmentation significative du taux d'ARNm codant pour Hsp70 et Hsp27. Cette augmentation débute entre 2 et 3 heures après traitement pour Hsp70 et Hsp27. L'induction maximale se situe entre 4 et 5 heures pour Hsp70, et entre 8 et 12 heures pour Hsp27. Cette hausse est supérieure à 46 fois le taux basal Hsp70 et 7,6 fois pour Hsp27. En ce qui concerne les ARNm codant pour HSF-1 et HSF-2, nous avons remarqué une augmentation significative à partir de 3 heures de traitement au MG132, qui perdure à 12

heures de traitement. L'augmentation maximale, se situant aux alentours de 5 heures de traitement et n'excède pas 2 à 3 fois le taux basal.

5. Traitement des chondrocytes

Les résultats sont présentés dans la *figure 58*. Tout d'abord, l'observation des témoins absolus et des témoins DMSO, nous confirme que si nous constatons une induction au cours de la manipulation, celle-ci sera effectivement due à l'action du MG132, et non d'autres facteurs telle que le DMSO.

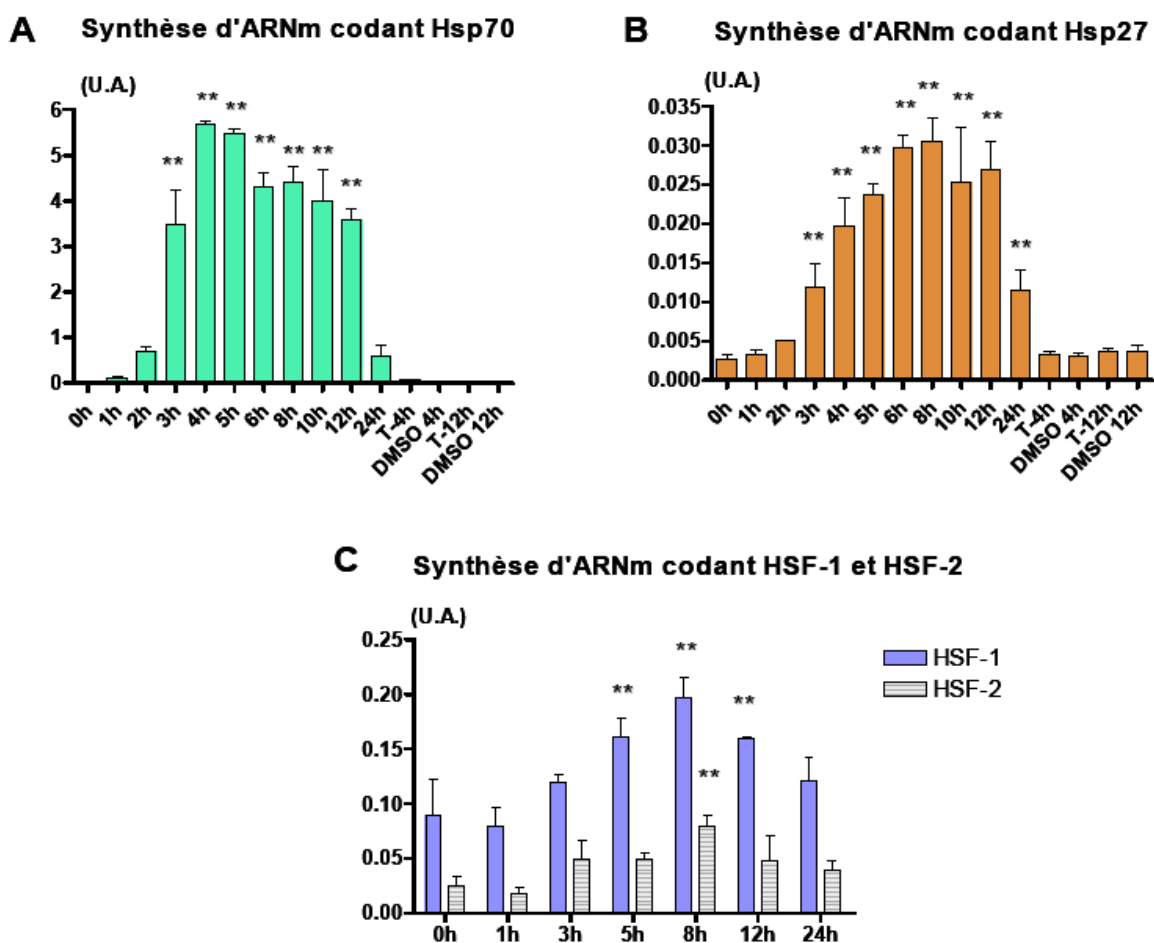


Figure 58 : Résultats de la cinétique d'induction de la synthèse des ARNm codant pour Hsp70, Hsp27, HSF-1 et HSF-2 dans les chondrocytes de rat traités au MG132.

Les chondrocytes sont utilisés au premier passage, ils sont traités au MG132 (à 1,5 μ M dans du milieu de culture à 0,1% de DMSO) pendant 4h. Les ARN totaux sont extraits des cellules à différents temps après le début du traitement, puis les ARNm subissent une rétro-transcription avant d'être quantifiés par PCR en temps réel. Deux types de témoins sont utilisés, les témoins n'ayant subi aucun traitement, et ceux mis en présence de 0,1% de DMSO. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (U.A.) de synthèse d'ARNm codant pour les différentes protéines d'intérêt (**A** : Hsp70, **B** : Hsp27 ; **C** : HSF-1 et HSF-2) rapportée à celle des ARNm codant pour RP29. Les histogrammes représentent la moyenne et l'écart type de chaque groupe (n=3, * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; ANOVA et test a posteriori).

Nous avons pu observer une augmentation significative du taux d'ARNm codant pour Hsp70 et Hsp27. Cette augmentation débute entre 2 et 3 heures après traitement pour Hsp70 et Hsp27. L'induction maximale se situe aux alentours de 4 heures de traitements pour Hsp70 et vers 8 heures de traitement pour Hsp27. Cette hausse est supérieure à 138 fois le taux basal Hsp70 et 11,7 fois pour Hsp27. En ce qui concerne les ARNm codant pour HSF-1, nous avons remarqué une augmentation significative entre 5 et 12 heures de traitement (le maximum étant à 8 heures). Par contre, le traitement au MG132, ne produit une hausse significative du taux d'ARNm codant pour HSF-2 qu'après 8 heures de traitement au MG132, bien que les variations observées semblent suivre celles retrouvées dans le cas d'HSF1. Dans les deux cas (HSF-1 et HSF-2) l'augmentation maximale n'excède pas 2 à 3 fois le taux basal.

C. Effet du MG132 *in vitro* en prétraitement sur des cellules stimulées à l'IL-1 β

1. Choix de la durée d'exposition à l'IL-1 β

Afin de déterminer l'effet du MG132 sur l'augmentation du taux d'ARNm codant pour IL-1 β à la suite d'un traitement à l'IL-1 β , nous avons du choisir la durée d'exposition à l'IL-1 β la plus adéquat pour permettre des comparaisons dans les expériences suivantes, c'est-à-dire celle induisant une augmentation maximale de ce taux d'ARNm. Dans cette optique, nous avons effectué une cinétique d'induction. Les résultats sont présentés dans la **figure 59**. La plus forte augmentation est retrouvée après huit heures de traitement à l'IL-1 β . Nous avons donc utilisé cette durée de traitement pour la suite des expériences.

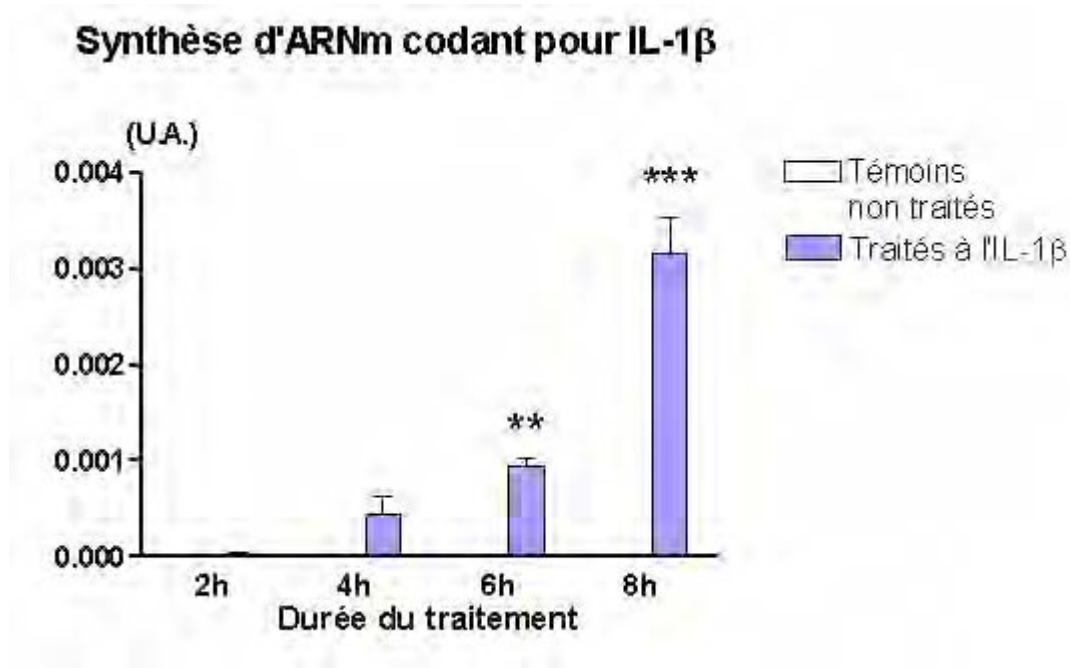


Figure 59 : Résultats de la cinétique d'induction de la synthèse des ARNm codant pour IL-1 β dans les synoviocytes de rat traités à l'IL-1 β .

Les synoviocytes sont utilisés au premier passage, ils sont traités à l'IL-1 β (à 10 ng/ml) pendant 2, 4, 6 ou 8 heures. Les ARN totaux sont ensuite extraits des cellules, puis les ARNm subissent une rétro-transcription avant d'être quantifiés par PCR en temps réel. Les témoins ne subissent aucun traitement. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (U.A.) de synthèse d'ARNm codant pour IL-1 β rapportée à celle des ARNm codant pour RP29. Les histogrammes représentent la moyenne et l'écart type de chaque groupe (n=3, ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001).

2. Mise en évidence

Les cellules sont traitées à différentes concentrations de MG132 (1,5 ou 3 μ M) pendant 4 heures, puis 15 heures plus tard elles sont exposées à l'IL-1 β durant 8 heures (**figure 60**).

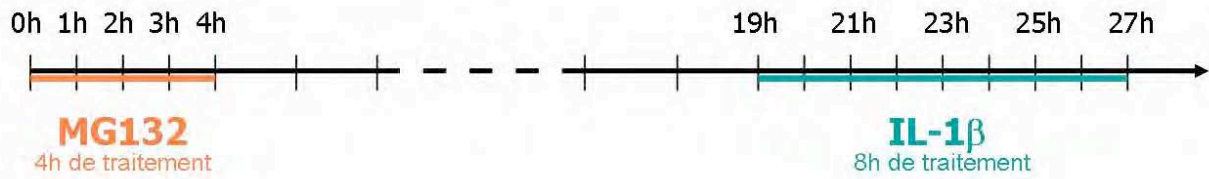


Figure 60 : Double traitement MG132 + IL-1 β dans le temps

Les cellules sont alors récupérées afin d'extraire les ARN totaux des cellules pour l'étude par RT-PCRq de l'expression des ARNm d'IL-1 β et TNF α . Plusieurs témoins sont effectués, le premier présente le taux d'expression en ARNm de cellules non traitées au MG132, le second, celui de cellules traitées avec une solution de DMSO 1‰ ou d'éthanol ‰ (selon le diluant ayant servi à solubiliser le MG132). Les résultats présentés tiennent compte de la différence entre ces deux diluants.

a. Cas du MG132 dilué dans du DMSO 1‰

La **figure 61** représente les taux d'expression des ARNm d'IL-1 β et de TNF α dans le cas du prétraitement au MG132 dilué dans du DMSO.

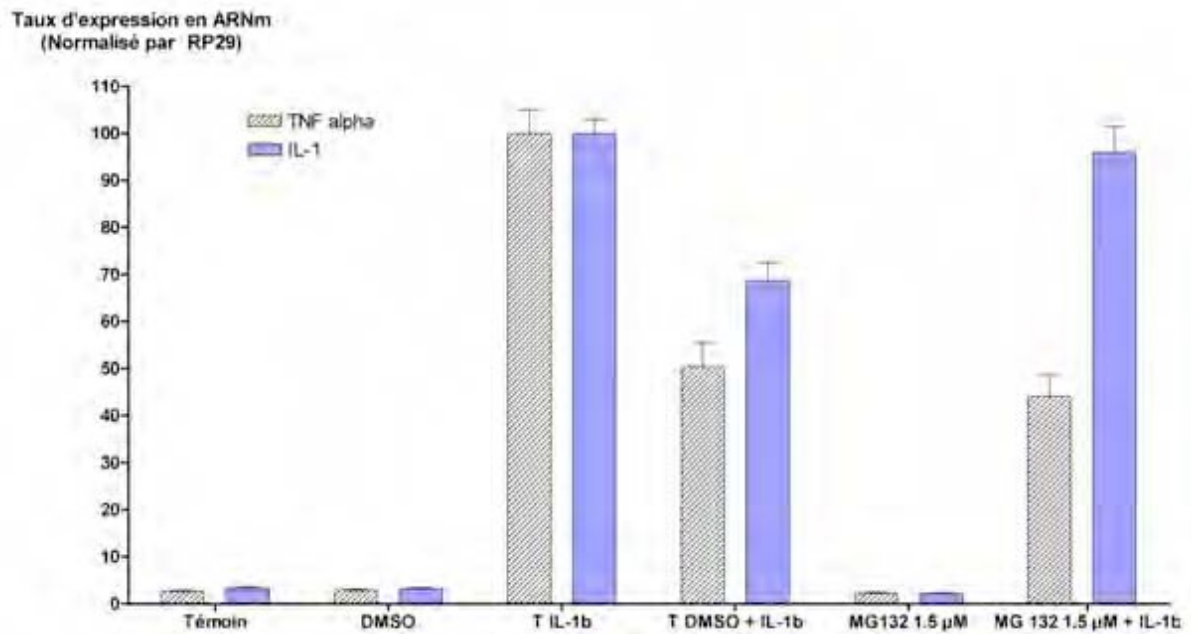


Figure 61 : Effet du traitement au MG132 (DMSO a 1‰), sur l'expression en ARNm d'IL-1 β et de TNF α dans des synoviocytes stimulées à l'IL-1. Le traitement au MG132 est effectué à deux concentrations différentes (1,5 et 3 μ M), le MG132 est dilué dans une solution contenant du DMSO a 1‰.

Nous avons vérifié l'augmentation attendue des taux d'expression en ARNm d'IL-1 β et de TNF α , dans les cellules traitées à l'IL-1 β , ce qui prouve l'efficacité de la stimulation. Par contre, les réponses anarchiques obtenues dans les cellules prétraitées au MG132 ou les témoins DMSO ne permettent pas de conclure quand à un effet du MG132. En effet, il s'avère que le DMSO modifie de façon aléatoire la réponse au stimulus inflammatoire.

b. Cas du MG132 dilué dans de l'éthanol 1%

La *figure 62* représente les taux d'expression des ARNm d'IL-1 β et de TNF α dans le cas du prétraitement au MG132 dilué dans de l'éthanol.

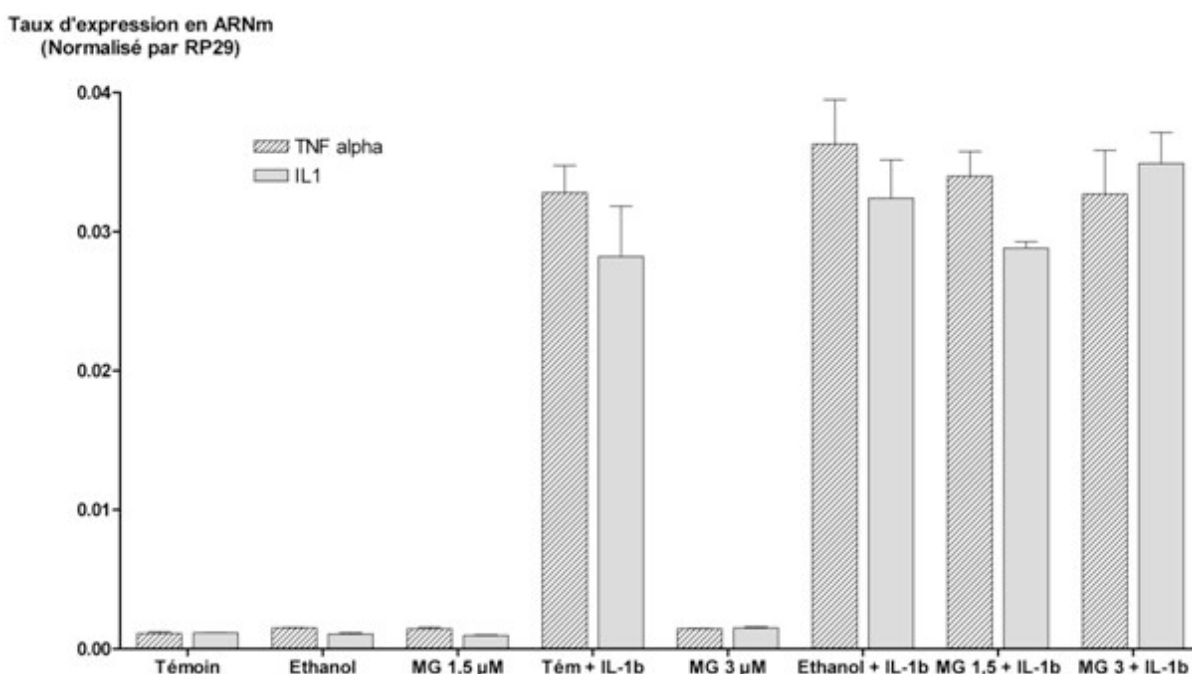


Figure 62 : Effet du traitement au MG132 (éthanol a 1%), sur l'expression en ARNm d'IL-1 β et de TNF α dans des synoviocytes stimulés à l'IL-1. Le traitement au MG132 est effectué à deux concentrations différentes (1,5 et 3 μ M), le MG132 est dilué dans une solution contenant de l'éthanol a 1%.

Nous avons vérifié l'augmentation attendue des taux d'expression en ARNm d'IL-1 β et de TNF α , dans les cellules traitées à l'IL-1 β , ce qui prouve l'efficacité de la stimulation. Nous n'avons pas observé de variations significatives du taux d'expression des ARNm d'IL-1 β et de TNF α pour les cellules prétraitées au MG132 et stimulée à l'IL-1 β , nous en concluons que le MG132 n'a pas d'effet sur les taux d'expression en ARNm de ces marqueurs de l'inflammation, aux concentrations étudiées.

II. Intérêt du MG132 in vivo, sur un modèle d'arthrose expérimentale par section des ligaments croisés antérieurs

A. Caractérisation du modèle

L'objectif de cette étude a été de caractériser le développement des lésions ostéoarticulaires sur les différentes surfaces articulaires dans le modèle d'arthrose expérimentale induite par section du ligament croisé antérieur (LCA) chez le rat (temps nécessaire au développement des lésions, types de modifications histologiques). Pour ce faire, une section du LCA au niveau du genou droit de rats Wistar mâles a été réalisée. Les rats ont été régulièrement pesés et leur mobilité spontanée nocturne ainsi que leur température corporelle ont été évaluées par biotélémetrie [Gegout-Pottie P, 1999].

Les rats ont été sacrifiés 7, 14 et 28 jours après la section et les genoux ont été prélevés, fixés, décalcifiés et inclus en paraffine. Des études macroscopiques, histologiques et de viabilité cellulaire (apoptose) ont été réalisées.

L'étude macroscopique des différentes surfaces articulaires a été réalisée immédiatement après la dissection. Des scores ont été établis permettant de définir l'atteinte articulaire. Les lésions macroscopiques ont été évaluées de la façon suivante : 0 = Surface normale ; 1 = Décoloration du cartilage ; 2 = Discrètes érosions du cartilage dans les zones portantes; 3 = Importantes érosions atteignant l'os sous-chondral ; 4 = Mise à nu de l'os sous-chondral. Les scores des 6 compartiments ont été additionnés (avec un maximum possible de 24) et la moyenne a été déterminée pour chaque groupe.

Les genoux ont ensuite été fixés, décalcifiés et inclus en paraffine. Des coupes sagittales ont été préparées puis colorées par de l'hématoxyline-éosine-safran, du bleu de toluidine et du rouge sirius afin d'établir un score histologique des lésions observées.

La détermination des cellules apoptotiques a été évaluée par une analyse immunohistologique avec un anticorps anti-caspase-3 active (données non montrées).

L'étude histologique (*figure 63*) met en évidence une prolifération importante de la membrane synoviale dès 7 jours après la section et une altération de la surface du cartilage (fibrillations surtout). Des lésions plus sévères du cartilage commencent à apparaître 14 jours après la section, et sont bien prononcées au bout de 28 jours. Des lésions chondrales sont présentes majoritairement sur les plateaux tibiaux mais peuvent s'étendre jusqu'aux zones portantes des condyles fémoraux internes. En ce qui concerne le cartilage rotulien, les lésions du cartilage restent modérées. Des changements macroscopiques similaires sont observés.

Une augmentation du nombre de cellules apoptotiques au sein du cartilage est détectée dès 7 jours après la section du ligament, et augmente jusqu'à 28 jours (12 % de chondrocytes en phase terminale d'apoptose par rapport à 1,5 % dans les chondrocytes de rats témoins).

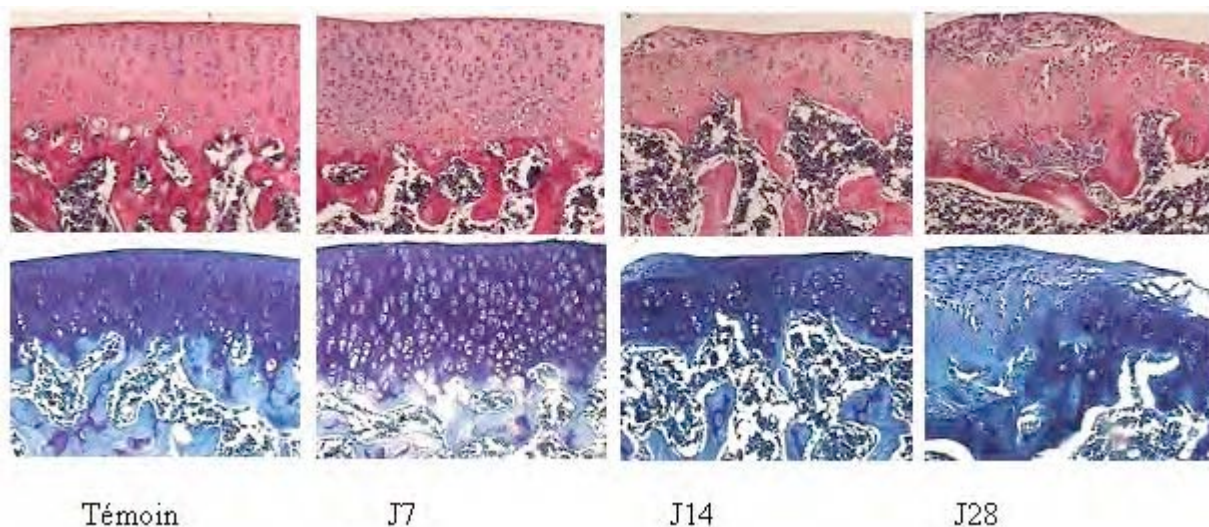


Figure 63 : Analyse histologique du cartilage articulaire (de plateaux tibiaux) de rats ayant subi une section du ligament croisé antérieur (objectif x10 x10). Les rats ont été sacrifiés 7, 14 et 28 jours après la section du LCA et les genoux des rats des différents groupes ont été fixés, décalcifiés et inclus en paraffine. Des coupes sagittales ont été préparées puis colorées par de l'hématoxyline-éosine-safran et du bleu de toluidine afin d'établir un score histologique des lésions observées. Les résultats ont été obtenus en double aveugle avec une variabilité inter-observateur inférieure à 5 % et ont été exprimés par la moyenne \pm SEM (n = 5 genoux par groupe), test t de Student).

B. Effet de l'Induction d'Hsps par le MG132

1. Objectifs

Le but de ce travail a été de valider le potentiel chondroprotecteur des protéines Hsp70 et Hsp27 *in vivo* sur un modèle d'arthrose expérimentale plus physiopathologique que le modèle par injection intra-articulaire de MIA. Pour cela, nous avons utilisé le modèle d'arthrose par section du ligament croisé antérieur, proche de certaines conditions physiopathologiques, décrit précédemment.

La caractérisation des lésions ostéo-cartilagineuses nous a permis de nous placer dans les conditions où les lésions sont maximales, c'est à dire une évolution jusqu'à 28 jours après l'opération.

Ainsi, après vérification de l'induction de la protéine Hsp70 par le MG132, les effets de la surexpression d'Hsp70 sur les lésions du cartilage chez le rat ont été évalués.

2. Induction des protéines de stress (Hsp70 & Hsp27) par le MG132

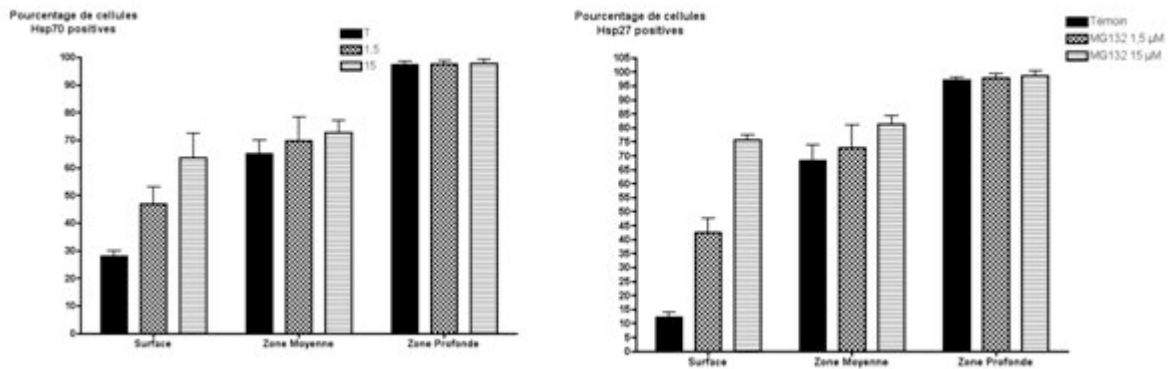


Figure 64 : Analyse de l' Expression d'Hsp70 & Hsp27 dans les chondrocytes du cartilage suite à 1 injection unique intra-articulaire de MG132 (coté droit). Après sacrifice des rats (J2), les genoux ont été prélevés, fixés, décalcifiés et inclus en paraffine. Une analyse immunohistologique avec des anticorps anti-Hsp70 & Hsp27 a été réalisée sur les genoux des cotés ipsilatéral et controlatéral. Les histogrammes représentent le pourcentage de cellules marquées Hsp70 et Hsp27 dans les différentes couches du cartilage en présence ou en absence de MG132. Les résultats sont obtenus en double aveugle (C. Cournil-Henrionnet et S. Etienne) avec une variabilité inter-observateur inférieure à 5 % et sont exprimés par la moyenne \pm SEM (n = 5 genoux par groupe), * = $p \leq 0.05$, test t de Student).

3. Optimisation de l'induction d'Hsp70 par le MG132

Nous avons utilisé le MG132 en injections intra-articulaires de façon à induire l'expression de la protéine Hsp70 dans les chondrocytes du cartilage du genou de rat de la même façon que pour l'étude avec le modèle d'arthrose par injection intra-articulaire de mono-iodo-acétate. Cependant, quelques modifications ont été apportées quant à la posologie administrée, l'objectif étant d'administrer à l'animal une dose plus faible ou égale que pour l'étude avec le MIA mais en injections répétées de façon à obtenir une surexpression d'Hsp70 sur une durée plus longue.

L'objectif de cette étude a donc été (1) de vérifier l'induction de l'expression de la protéine Hsp70 dans les chondrocytes du cartilage au cours du temps et (2) de vérifier l'innocuité d'un tel traitement pour les chondrocytes et leur matrice ainsi que pour les autres organes vitaux (foie, rein, rate).

a. Vérification de l'innocuité d'une injection intra-articulaire de MG132 par semaine pendant 1 mois

Deux concentrations de MG132 ont été étudiées, 1,5 µM et 15 µM. Les solutions ont été préparées dans du sérum physiologique (volume d'injection : 50 µl).

Nous avons réalisé sur des rats une première injection intra-articulaire de MG132 (1,5 ou 15 μM) à J0 puis les autres injections ont été réalisées une fois par semaine jusqu'au jour du sacrifice (J7, J14, J21). Les rats ont été sacrifiés au bout de 7, 14 et 28 jours.

Les études histologiques (coloration HES) sur la rotule et le reste du genou ne révèlent aucune lésion du cartilage au bout de 28 jours (surface et matrice du cartilage, chondrocytes). Les études histologiques des organes vitaux (foie, reins, rate) ne révèlent également aucune altération des tissus (données non présentées).

Les injections répétées de MG132 ne provoquent pas de variation du métabolisme des chondrocytes (synthèse stable des protéoglycanes du cartilage de la rotule et du reste du genou).

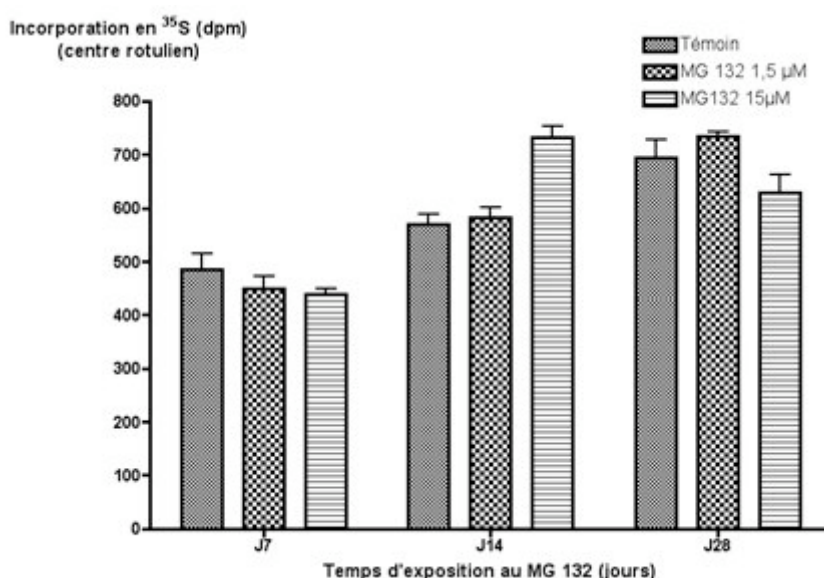


Figure 65 : Analyse de l'activité de biosynthèse des protéoglycanes dans le cartilage centropatellaire rotulien des animaux, exposés au MG132 sur une période de 28 jours. La synthèse des protéoglycanes est mesurée par incorporation de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ à 7, 14 et 28 jours. Les résultats sont exprimés incorporation de soufre radiomarqué dans la partie centrale de la rotule. Les histogrammes représentent la moyenne d'incorporation de chaque groupe (moyenne \pm SEM. * = $p < 0.05$; par rapport aux rats injectés avec du MIA seul, $n = 5$).

Les injections intra-articulaires répétées de MG132 n'induisent pas non plus de réaction d'apoptose des chondrocytes (absence de détection (immunohistologie) de la caspase-3 active).

b. Vérification de l'efficacité d'induction d'Hsp70 par le MG132

Une première injection intra-articulaire de MG132 (1.5 ou 15 μM) a été réalisée dans la cavité articulaire du genou droit des rats à J0 puis les autres injections ont été réalisées une fois par semaine jusqu'à J28. Les rats ont été sacrifiés de façon séquentielle de J0 à J28. Les

genoux droits et gauches ont été prélevés, fixés, décalcifiés et inclus en paraffine. Une analyse immunohistologique avec un anticorps anti-Hsp70 a été réalisée pour chaque temps de sacrifice (J0, J7, J14 et J28). La **figure 66** illustre les résultats obtenus à J28.

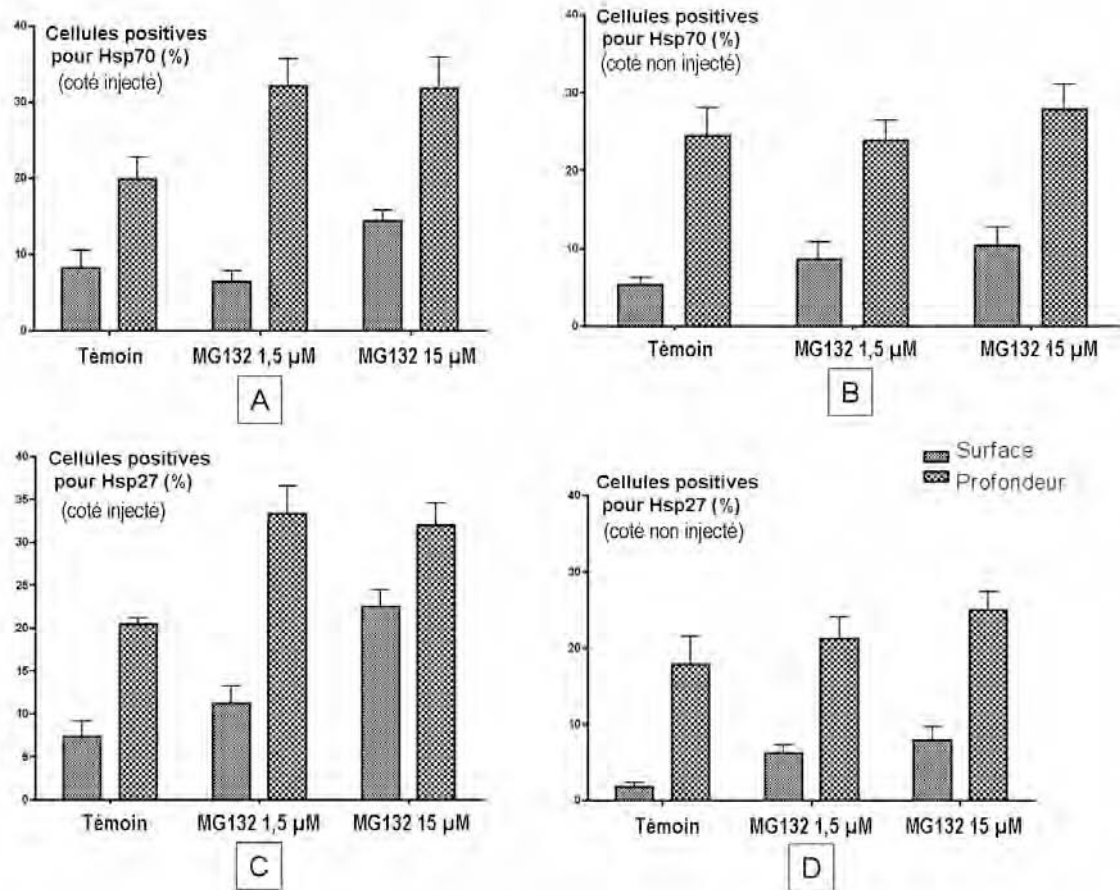


Figure 66 : Expression d'Hsp70 & Hsp27 dans les chondrocytes du cartilage suite à 1 injection hebdomadaire intra-articulaire de MG132 (coté droit) sur une période de 28 jours. Après sacrifice des rats (J28), les genoux ont été prélevés, fixés, décalcifiés et inclus en paraffine. Une analyse immunohistologique avec des anticorps anti-Hsp70 & Hsp27 a été réalisée sur les genoux des cotés ipsilatéral et controlatéral. Les histogrammes représentent le pourcentage de cellules marquées Hsp70 dans les différentes couches du cartilage de la rotule en présence ou en absence de MG132. Les résultats sont obtenus en double aveugle (C. Cournil-Henrionnet et S. Etienne) avec une variabilité inter-observateur inférieure à 5 % et sont exprimés par la moyenne \pm SEM (n = 5 genoux par groupe), * = $p \leq 0.05$, test t de Student).

- A : pourcentage de cellules positives pour Hsp70, dans le coté droit (injecté)
- B : pourcentage de cellules positives pour Hsp70, dans le coté gauche (non injecté)
- C : pourcentage de cellules positives pour Hsp27, dans le coté droit (injecté)
- D : pourcentage de cellules positives pour Hsp27, dans le coté gauche (non injecté)

Les résultats indiquent que l'expression de la protéine Hsp70 n'est significativement augmentée qu'à J28. Les rats ont donc besoin de quatre injections hebdomadaires de MG132 (1.5 ou 15 µM) pour que la synthèse d'Hsp70 soit stimulée de façon importante (facteur de 2,4 en surface (15 µM MG132) et 1,9 fois en profondeur (1.5 et 15 µM MG132)). Le taux d'induction de la protéine Hsp70 dans les chondrocytes de la couche profonde du cartilage est

identique pour les deux concentrations de MG132. En revanche, la faible concentration de MG132 n'est pas capable d'induire une surexpression d'Hsp70 dans les chondrocytes de la couche superficielle du cartilage.

Nous pouvons noter également qu'il n'y a pas d'effet inducteur des injections répétées de MG132 sur le coté controlatéral. L'expression basale d'Hsp70 reste stable jusqu'à J28.

Ces données indiquent que le traitement par de faibles concentrations de MG132 en injections intra-articulaires répétées (une injection par semaine) est capable d'augmenter de façon significative l'expression de la protéine Hsp70 dans les chondrocytes de toutes les zones du cartilage sans toxicité apparente ni dissémination de l'expression dans le reste de l'organisme.

C. Evaluation histologique du potentiel protecteur du MG132 sur le modèle de section du LCA

Les études d'induction de la protéine Hsp70 par injections répétées de MG132 ont mis en évidence une augmentation de l'expression d'Hsp70 dans les chondrocytes du cartilage articulaire au bout de 28 jours pour les deux concentrations testées. L'absence de lésions articulaires (histologiques, macroscopiques, métaboliques) et de toxicité pour les différents organes vitaux nous ont permis d'utiliser cette posologie du MG132 afin d'évaluer les effets bénéfiques d'une telle induction d'Hsp70 sur les lésions ostéoarticulaires suite à la section du ligament croisé antérieur chez le rat.

Pour ce faire, la veille de l'opération (J-1), une première injection intra-articulaire avec la plus faible concentration de MG132 (1,5 μ M) a été réalisée dans la cavité articulaire du genou à opérer (coté droit). Le coté gauche nous a servi de témoin. La section du LCA des rats a été réalisée à J0. Les autres injections intra-articulaires de MG132 ont eu lieu à J7, J14 et J21 du coté droit.

Les rats ont ensuite été sacrifiés à J7, J14 et J28 et les genoux ont été prélevés, fixés, décalcifiés et inclus en paraffine afin de réaliser les études histologiques du cartilage. Des coupes sagittales ont été préparées puis colorées par de l'hématoxyline-éosine-safran, du bleu de toluidine et du rouge sirius afin d'établir un score histologique des lésions observées. Les résultats sont présentés sur la figure. Les scores de tous les compartiments articulaires (fémurs et tibias internes et externes, rotule) ont été additionnés avec un maximum de 75 (score de 15 au maximum pour chaque compartiment, la membrane synoviale n'étant pas prise en compte) (*figure 69*).

Les résultats obtenus (*figures 67 et 68*) mettent en évidence la présence de lésions ostéoarticulaires caractéristiques suite à la section du ligament croisé antérieur dès J7 avec surtout des lésions de surface du cartilage (fibrillations) mais également une inflammation post-opératoire (synovite). De J14 à J28, les lésions articulaires deviennent plus prononcées avec des fissures du cartilage pouvant aller jusqu'à la zone radiale, une hypercellularité des chondrocytes et d'importants remaniements osseux (lésions évaluées à 31/75 à J28).

Les injections répétées de MG132 n'aggravent pas les lésions du cartilage observées et elles présentent une tendance bénéfique à J28 en diminuant la sévérité des lésions articulaires provoquées par la section du LCA (lésions évaluées à 21/75, soit une protection de 32 %). Ces résultats sont corrélés avec l'induction de l'expression d'Hsp70 par le MG132 (surexpression à J28). Le MG132 *via* l'induction de l'expression de la protéine Hsp70 semble agir en stabilisant les lésions histologiques de J14 à J28.

La séparation entre le côté interne et externe pour l'évaluation des scores histologiques (*figure 70*) a pu mettre en évidence une prédominance des lésions histologiques au niveau du côté interne (lésions évaluées à 15,5/30 et 11,9/30 à J28 pour les cotés internes et externes respectivement). Les injections répétées de MG132 ont une action bénéfique sur l'ensemble de l'articulation du genou, mais ne sont significatives que sur le compartiment médial (lésions évaluées à 8,5 soit une protection de 45 %).

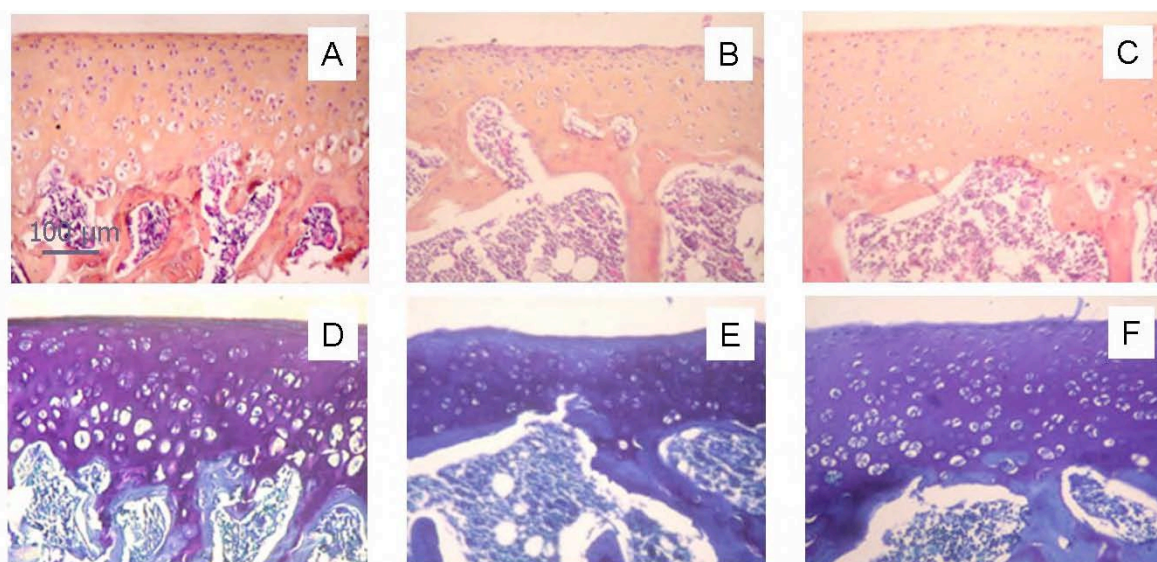


Figure 67 : Analyse histologique du cartilage articulaire de rats ayant subi une section du ligament croisé antérieur et une injection hebdomadaire de MG132 sur une période de 28 jours (objectif x10 x10). Les rats ont été sacrifiés 7, 14 et 28 jours après la section du LCA et les genoux des rats des différents groupes ont été fixés, décalcifiés et inclus en paraffine. Des coupes sagittales de plateaux tibiaux ont été préparées puis colorées par de l'hématoxyline-éosine-safran (A, B et C), et du bleu de toluidine (D, E et F) afin d'établir un score histologique des lésions observées. Les résultats ont été obtenus en double aveugle avec une variabilité inter-observateur inférieure à 5 % et ont été exprimés par la moyenne \pm SEM (n = 5 genoux par groupe), test t de Student). A et D : Témoin non injecté, B et E : SLCA et injection de sérum physiologique, C et F : Injection unilatérale de MG132.

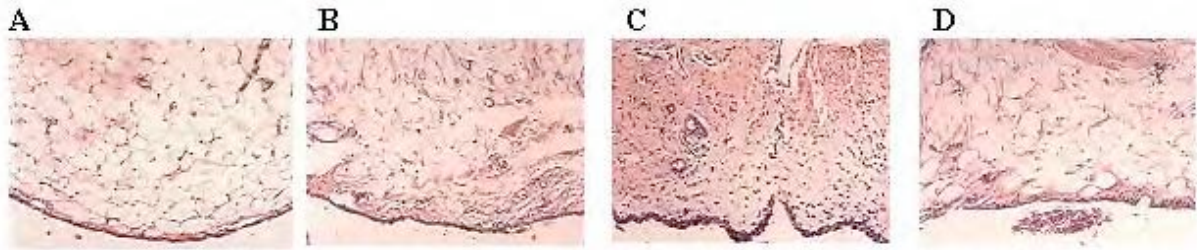


Figure 68 : Analyse histologique de la membrane synoviale des rats ayant subi une section du ligament croisé antérieur et 4 injections de MG132 sur une période de 28 jours (objectif x10 x10). Les rats ont été sacrifiés 7, 14 et 28 jours après la section du LCA et les membranes synoviales des rats des différents groupes ont été fixées, et incluses en paraffine. Des coupes sagittales ont été préparées puis colorées par de l'hématoxyline-éosine-safran, afin d'établir un score histologique des atteintes observées. Les résultats ont été obtenus en double aveugle avec une variabilité inter-observateur inférieure à 5 % et ont été exprimés par la moyenne \pm SEM (n = 5 genoux par groupe), test t de Student). **A** : injection de sérum physiologique, **B** : opération + injection de sérum physiologique, **C** : section + injection de sérum physiologique, **D** : section + injection de MG132.

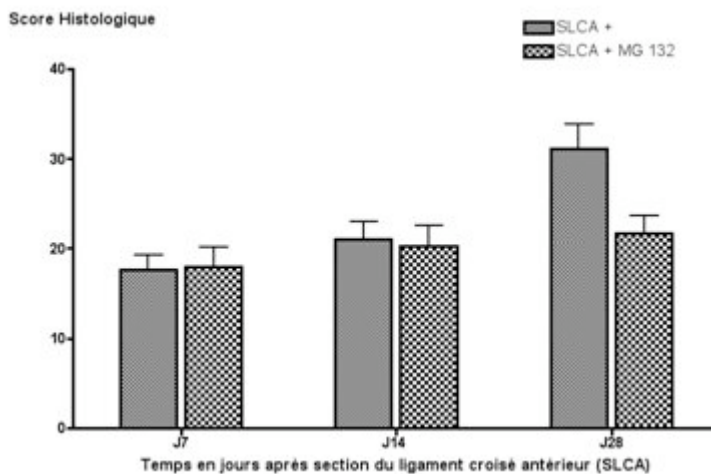


Figure 69 : Effet d'injections intra-articulaire hebdomadaire de MG132 sur les lésions histologiques du cartilage dues à la section du LCA. Les rats ont été sacrifiés 7, 14 et 28 jours après la section du LCA et les genoux des rats des différents groupes ont été fixés, décalcifiés et inclus en paraffine. Des coupes sagittales ont été préparées puis colorées par de l'hématoxyline-éosine-safran, du bleu de toluidine et du rouge sirius afin d'établir un score histologique des lésions observées. Les résultats ont été obtenus en double aveugle avec une variabilité inter-observateur inférieure à 5 % et ont été exprimés par la moyenne \pm SEM (n = 5 genoux par groupe), test t de Student).

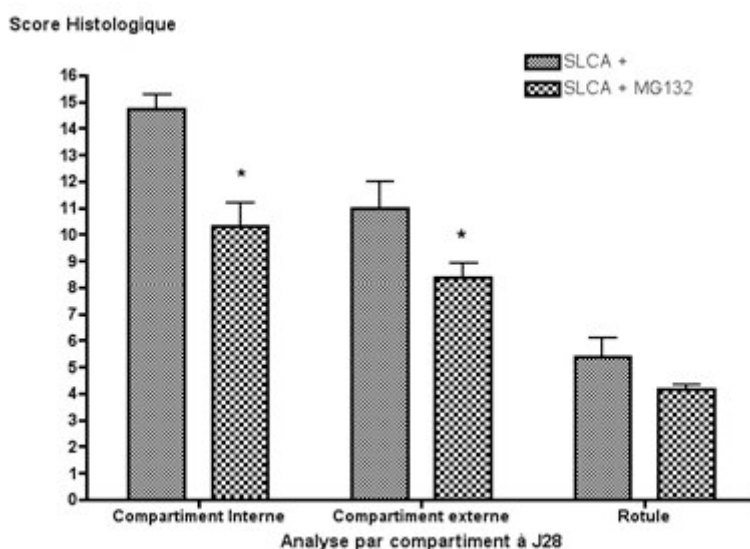


Figure 70 : Effet d'injections intra-articulaire hebdomadaire de MG132 sur les lésions histologiques du cartilage dues à la section du LCA. Les rats ont été sacrifiés 28 jours après la section du LCA et les genoux des rats des différents groupes ont été séparés en condyles et plateaux internes et externes. Ils ont été fixés, décalcifiés et inclus en paraffine. Des coupes sagittales ont été colorées par de l'hématoxyline-éosine-safran, du bleu de toluidine et du rouge sirius afin d'établir un score histologique des lésions observées. Les résultats ont été obtenus en double aveugle avec une variabilité inter-observateur inférieure à 5 % et ont été exprimés par la moyenne \pm SEM (n = 5 genoux par groupe), * = $p \leq 0.05$, test t de Student).

Ces données indiquent que le traitement par de faibles concentrations de MG132 en injections intra-articulaires répétées (une injection par semaine) est capable de diminuer la sévérité des lésions histologiques provoquées par la section du ligament croisé antérieur chez le rat, probablement via l'induction de la protéine Hsp70.

III. Discussion

Le modèle d'arthrose par section du ligament croisé antérieur (LCA) a été décrit et caractérisé initialement chez le chien [Pond, 1973 ; Brandt, 1994] mais il nécessite un délai de 90 jours pour observer des lésions arthrosiques. Ce modèle a ensuite été développé chez de plus petits animaux, avec comme avantage un délai d'apparition de l'arthrose plus court. C'est le cas chez le lapin [Kuo, 1994 ; Kaab, 2000] (arthrose développée en 60 jours) et plus récemment chez le rat ou la souris [Stoop, 2001, van den Berg WB., 2001] (lésions arthrosiques qui apparaissent dès 30 jours).

Le rôle arthrogène de la section du ligament croisé antérieur chez le rat a été démontré expérimentalement [Stoop, 2001 ; Williams, 1982]. La section de ce ligament provoque une dégradation du cartilage, s'accompagnant de modifications du collagène de type II et d'une augmentation du taux de prostaglandines. Les études que nous avons réalisées sur le rat

confirment ces résultats, à savoir une arthrose bien établie 30 jours après l'opération avec des lésions macroscopiques et histologiques caractéristiques (altérations de la surface du cartilage avec des fissures pouvant aller jusqu'à la zone intermédiaire, une hypercellularité, une importante réaction inflammatoire, une altération de la matrice extracellulaire avec une désorganisation des fibres de collagène ainsi qu'une dégradation des protéoglycanes). L'apoptose chondrocytaire semble également participer activement à l'établissement des lésions articulaires. Les études immunohistologiques réalisées avec un anticorps anti-caspase-3 active mettent en évidence un pourcentage de cellules apoptotiques non négligeable dès 7 jours après la section du ligament, et qui augmente progressivement jusqu'à 28 jours après la section pour atteindre 12 % de chondrocytes en apoptose (par rapport à 1,5 % dans les chondrocytes de rats témoins).

L'utilisation d'un inhibiteur du protéasome en administration locale ouvre d'intéressantes perspectives dans le traitement des pathologies articulaires. En effet, l'absence de toxicité (nécrose et apoptose) pour le cartilage (observations histologiques et immunohistologiques des chondrocytes et de leur matrice) et pour les autres organes vitaux (observations histologiques et immunohistologiques du foie, des reins et de la rate) permet d'envisager une surexpression dans les chondrocytes du cartilage, de façon ponctuelle, de la protéine Hsp70 dont les potentialités chondroprotectrices semblent bien établies. La faible dissémination de l'expression dans le reste de l'organisme permet de considérer le MG132, en tant qu'inhibiteur du protéasome réversible, comme un outil pharmacologique intéressant pour moduler l'apoptose chondrocytaire.

La réversibilité de l'inhibiteur du protéasome est indispensable pour son utilisation à visée thérapeutique *in vivo*. En effet, l'induction répétée des protéines de stress nécessite la déphosphorylation du facteur de transcription HSF1 pour une activation efficace des gènes de choc thermique lors d'une seconde induction. Un effet transitoire de l'inhibiteur du protéasome est donc nécessaire afin d'éviter la phosphorylation permanente de HSF1, puisque l'état d'hyperphosphorylation d'HSF1 (inhibition de la dégradation des HSF1-kinases par le protéasome) régule de façon négative l'expression d'Hsp70 [Kim, 1999].

La diminution significative des lésions ostéoarticulaires 28 jours après la section du LCA par un traitement répété par un inhibiteur réversible du protéasome semble confirmer les propriétés bénéfiques du MG132. La surexpression de la protéine Hsp70 dans les chondrocytes du cartilage au bout de 28 jours de traitement, par un mécanisme de sommation de l'expression dans le temps, est corrélée avec la protection histologique obtenue, et laisse penser que le

MG132 agit de façon bénéfique en partie par l'intermédiaire de la synthèse d'Hsp70. Il apparaît que la surexpression d'Hsp70 permette de stopper l'évolution des lésions histologiques de J14 à J28 après l'opération, par une diminution de la mort chondrocytaire. Des études immunohistologiques complémentaires avec un anticorps anti-caspase-3 permettrait de déterminer l'effet de cette surexpression sur l'apoptose induite par la section du LCA. En revanche, il ne semble pas y avoir d'amélioration nette sur les phénomènes d'inflammation (hyperplasie et fibrose de la synoviale importante). Cette observation peut s'expliquer par les travaux de Musial A, [2001]. En effet, il semble que le traitement par un inhibiteur du protéasome sur une inflammation déjà établie conduit à l'accumulation de iNOS au sein de la cellule et donc à une production accrue de NO, médiateur de l'inflammation, iNOS étant normalement dégradée par la voie dépendante du protéasome. Un traitement préventif, en revanche, permettrait de bloquer la dégradation de I κ B, et par conséquent l'activation transcriptionnelle de iNOS par la voie NF- κ B [Musial A, 2001].

Ainsi, les propriétés chondroprotectrices de la protéine Hsp70 observées lors du modèle d'arthrose expérimentale induit par le MIA chez le rat semblent se confirmer lors du modèle par section du ligament croisé antérieur qui se rapproche plus de la physiopathologie de l'arthrose observée en clinique. Un transfert direct du gène Hsp70 par la technique d'électroporation dans le modèle de section du LCA est envisagé afin de valider les effets bénéfiques de la protéine Hsp70.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

L'électroporation biphasique

L'électroporation biphasique est une technique novatrice qui permet de séparer les ondes électrophorétiques. En effet, elle combine des impulsions courtes de haut voltage assurant la perméabilisation et des impulsions de faible voltage assurant la migration. Cette propriété permet de diminuer les effets délétères retrouvés dans le cas de l'utilisation d'ondes carrées beaucoup plus longues, tels que la dissémination du transgène dans les autres compartiments non ciblés de l'articulation. Cette technique est efficace pour transférer de l'ADN plasmidique à l'intérieur du cartilage articulaire et ne provoque pas d'altération sur ce dernier. Comme le montre nos travaux effectués au cours de cette thèse, l'électroporation n'aggrave pas les lésions déjà présentes dans les modèles expérimentaux de pathologies ostéoarticulaires évalués, à savoir le modèle par injection de parois de Mycobactéries et le modèle par injection de MIA. Cette technique pourrait donc être utilisée dans ces modèles pathologiques pour vectoriser et évaluer l'effet de molécules polaires thérapeutiques. Enfin, la différenciation de la phase de migration, devrait nous permettre de déplacer le transgène injecté, plus profondément dans les différentes couches du cartilage articulaire, en faisant varier le nombre ou l'intensité des impulsions de faible voltage. En outre, l'électroporation s'avère être un outil de vectorisation qui n'est pas uniquement adapté au transfert d'ADN plasmidique, mais également pour vectoriser d'autres molécules polaires à visée thérapeutique (molécules pharmacologiques de type AINS, SiRNA). Ceci permettrait d'améliorer le ciblage de ces molécules et de pouvoir utiliser des doses plus faibles tout en augmentant l'efficacité thérapeutique. Nous sommes tout de même confrontés au problème de l'anatomie des articulations qui nécessiterait le développement de nouvelles électrodes pour cibler de manière plus adaptée, le cartilage articulaire ou bien la membrane synoviale.

Les protéines de choc thermique : Hsp70 et Hsp27

De nombreux travaux ont déjà prouvé le potentiel antiapoptotique et chondroprotecteur d'Hsp70 et d'Hsp27. Ces protéines protègent le cartilage à différents niveaux lors d'atteintes ostéoarticulaires. Elles agissent notamment en diminuant le processus dégénératif du à la mort des chondrocytes en agissant sur le phénomène apoptotique, ce qui engendre une survie cellulaire des chondrocytes mais également un maintien de l'homéostasie du cartilage. Il n'a pas été possible de démontrer les propriétés de ces protéines de stress au niveau de la transduction du signal dans le processus inflammatoire (démonstration tentée lors des expériences de double transfection avec les vecteurs pcDNA-GFP-Hsp70 et pcDNA-GFP-Hsp27 sur des cellules en monocouche par la suite stimulées à l'IL-1 β), car les doses

transfectées semblaient être inadéquates pour pouvoir visualiser une quelconque variation dans l'expression des marqueurs de l'inflammation. Enfin nous avons pu vérifier que la surexpression d'Hsp70 et Hsp27, ne provoquait pas d'effet délétère de type cancérogène, effet rendu envisageable du fait de leur implication dans le dérèglement du processus apoptotique.

Le MG132, inhibiteur réversible du protéasome

Notre étude de l'effet d'injections répétées de MG132 dans un modèle expérimental d'arthrose par section du ligament croisé antérieur, confirme le potentiel chondroprotecteur et les effets bénéfiques du MG132, préalablement démontrés sur le modèle par injection de MIA. Cette capacité à favoriser la survie cellulaire des chondrocytes semble être étroitement liée à la surexpression d'Hsp70 et Hsp27 engendrée par le traitement au MG132.

Cette molécule a le double avantage de favoriser la survie cellulaire des cellules en phase quiescente (style chondrocytes) et de limiter la prolifération des cellules à fortes divisions cellulaires (par exemple au niveau de la membrane synoviale). Ceci grâce à son effet anti-apoptotique (de part l'induction des protéines de stress Hsp70 et Hsp27) au niveau des chondrocytes, ce qui engendre une survie cellulaire et donc un maintien de l'homéostasie du cartilage, mais également par son effet pro-apoptotique qui empêche la prolifération de la membrane synoviale, et donc limite sa participation (*via* le relargage de cytokines) dans le processus inflammatoire. Il serait possible d'améliorer l'effet anti-inflammatoire du MG132, en assurant une meilleure vectorisation par exemple en encapsulant le MG132 dans des nanoparticules pour en améliorer l'adressage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adams, J. (2002). Proteasome inhibitors as new anticancer drugs. *Curr Opin Oncol* **14**, 628-34.
2. Adams, J., Behnke, M., Chen, S., Cruickshank, A. A., Dick, L. R., Grenier, L., Klunder, J. M., Ma, Y. T., Plamondon, L. & Stein, R. L. (1998). Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett* **8**, 333-8.
3. Andre, F. & Mir, L. M. (2004). DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Ther* **11 Suppl 1**, S33-42.
4. Andrews, J. M., Newbound, G. C. & Lairmore, M. D. (1997). Transcriptional modulation of viral reporter gene constructs following induction of the cellular stress response. *Nucleic Acids Res* **25**, 1082-4.
5. Arrigo, A. P. (2000). sHsp as novel regulators of programmed cell death and tumorigenicity. *Pathol Biol (Paris)* **48**, 280-8.
6. Bedwell, A. E., Elson, C. J. & Hinton, C. E. (1987). Immunological involvement in the pathogenesis of pristane-induced arthritis. *Scand J Immunol* **25**, 393-8.
7. Bloquel, C., Fabre, E., Bureau, M. F. & Scherman, D. (2004). Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications. *J Gene Med* **6 Suppl 1**, S11-23.
8. Brackertz, D., Mitchell, G. F. & Mackay, I. R. (1977). Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* **20**, 841-50.
9. Brandt, K. D. (1994). Insights into the natural history of osteoarthritis provided by the cruciate-deficient dog. An animal model of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci* **732**, 199-205.
10. Bruckner, P., van der Rest, M. (1994). Structure and function of cartilage collagens. *Microsc Res Tech.* **28**(5):378-84.
11. Bruey, J. M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S. A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A. P., Kroemer, G., Solary, E. & Garrido, C. (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* **2**, 645-52.
12. Bureau, M. F., Gehl, J., Deleuze, V., Mir, L. M. & Scherman, D. (2000). Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. *Biochim Biophys Acta* **1474**, 353-9.
13. Carlsen, S., Hansson, A. S., Olsson, H., Heinegard, D. & Holmdahl, R. (1998). Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)-induced arthritis in rats. *Clin Exp Immunol* **114**, 477-84.
14. Chang, Y. H., Pearson, C. M. & Abe, C. (1980). Adjuvant polyarthritis. IV. Induction by a synthetic adjuvant: immunologic, histopathologic, and other studies. *Arthritis Rheum* **23**, 62-71.
15. Charissoux, J. L., Grossin, L., Leboutet, M. J. & Rigaud, M. (1999). Treatment of experimental osteosarcoma tumors in rat by herpes simplex thymidine kinase gene transfer and ganciclovir. *Anticancer Res* **19**, 77-80.
16. Chateauvert, J. M., Grynepas, M. D., Kessler, M. J. & Pritzker, K. P. (1990). Spontaneous osteoarthritis in rhesus macaques. II. Characterization of disease and morphometric studies. *J Rheumatol* **17**, 73-83.
17. Chevalier, X. & Richette, P. (2005). Normal joint cartilage : anatomy, physiology, metabolism, ageing. *EMC-Rhumatologie Orthopédie* **2**, 41-58.
18. Chretien, P. & Landry, J. (1988). Enhanced constitutive expression of the 27-kDa heat shock proteins in heat-resistant variants from Chinese hamster cells. *J Cell Physiol* **137**, 157-66.

19. Ciocca, D. R., Oesterreich, S., Chamness, G. C., McGuire, W. L. & Fuqua, S. A. (1993). Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. *J Natl Cancer Inst* **85**, 1558-70.
20. Constantine, V. S. & Mowry, R. W. (1968). Selective staining of human dermal collagen. II. The use of picosirius red F3BA with polarization microscopy. *J Invest Dermatol* **50**, 419-23.
21. Coster, H.G. (1965). A quantitative analysis of the voltage-current relationships of fixed charge membrane and the associated property of "punch-through". *Biophys. J.*, **5**: 669-86
22. Davalos, R. V., Rubinsky, B. & Mir, L. M. (2003). Theoretical analysis of the thermal effects during in vivo tissue electroporation. *Bioelectrochemistry* **61**, 99-107.
23. Dumas, D., Grossin, L., Cauchois, G., Gentils, M., Santus, R. & Stoltz, J. F. (2003). Comparison of wide-field/deconvolution and confocal microscopy in bioengineering. Interest of multi-photon microscopy in the study of articular cartilage. *Biorheology* **40**, 253-9.
24. Dumonde, D. C. & Glynn, L. E. (1962). The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br J Exp Pathol* **43**, 373-83.
25. Edwards, J. C. (1994). The nature and origins of synovium: experimental approaches to the study of synoviocyte differentiation. *J Anat* **184 (Pt 3)**, 493-501.
26. Ehrnsperger, M., Graber, S., Gaestel, M. & Buchner, J. (1997). Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *Embo J* **16**, 221-9.
27. Eyre, D. (2002). Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* **4**, 30-5.
28. Fam, H., Bryant, J. T. & Kontopoulou, M. (2007). Rheological properties of synovial fluids. *Biorheology* **44**, 59-74.
29. Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 7413-7.
30. Fenteany, G., Standaert, R. F., Lane, W. S., Choi, S., Corey, E. J. & Schreiber, S. L. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* **268**, 726-31.
31. FitzGerald, O. & Bresnihan, B. (1995). Synovial membrane cellularity and vascularity. *Ann Rheum Dis* **54**, 511-5.
32. Fraley, R., Subramani, S., Berg, P., and Papahadjopoulos, D. (1980) Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. *J. Biol. Chem.*, **255**: 10431-5.
33. Galois, L., Etienne, S., Grossin, L., Watrin-Pinzano, A., Cournil-Henrionnet, C., Loeuille, D., Netter, P., Mainard, D. & Gillet, P. (2004). Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. *Osteoarthritis Cartilage* **12**, 779-86.
34. Gao, X., and Huang, L. (1996) Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry*, **35**: 1027-36.
35. Gegout-Pottie, P., Philippe, L., Simonin, M. A., Guingamp, C., Gillet, P., Netter, P. & Terlain, B. (1999). Biotelemetry: an original approach to experimental models of inflammation. *Inflamm Res* **48**, 417-24.
36. Gilroy, D. W., Tomlinson, A., Greenslade, K., Seed, M. P. & Willoughby, D. A. (1998). The effects of cyclooxygenase 2 inhibitors on cartilage erosion and bone loss in a model of Mycobacterium tuberculosis-induced monoarticular arthritis in the rat. *Inflammation* **22**, 509-19.
37. Goldblatt, F. & Isenberg, D. A. (2005). New therapies for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* **140**, 195-204.

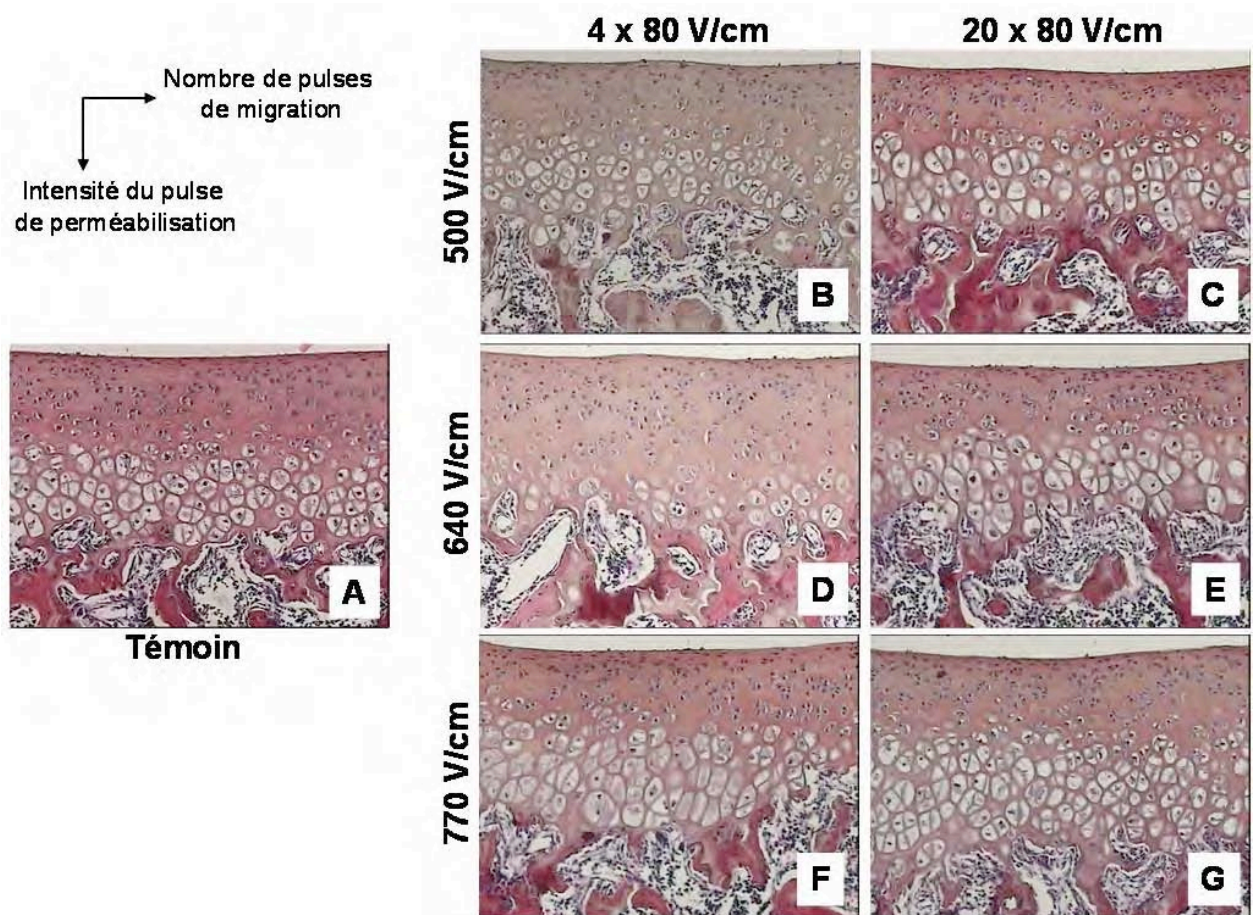
38. Gouze, J. N., Evans, C. H., Ghivizzani, S. C. & Gouze, E. (2007). Applications des techniques de thérapie génique aux maladies ostéo-articulaires. *Medecine sciences* **23**, 303-9.
39. Grossin, L., Charissoux, J. L., Teissier, M. P. & Rigaud, M. (1999). Selective killing of osteosarcoma cells in culture after retroviral mediated gene transfer of a herpes simplex thymidine kinase suicide gene. *Anticancer Res* **19**, 71-6.
40. Guingamp, C., Gegout-Pottie, P., Philippe, L., Terlain, B., Netter, P. & Gillet, P. (1997). Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum* **40**, 1670-9.
41. Gunther, E. & Walter, L. (1994). Genetic aspects of the hsp70 multigene family in vertebrates. *Experientia* **50**, 987-1001.
42. Heller, R., Jaroszeski, M., Atkin, A., Moradpour, D., Gilbert, R., Wands, J. & Nicolau, C. (1996). In vivo gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Lett* **389**, 225-8.
43. Hohfeld, J., Minami, Y. & Hartl, F. U. (1995). Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* **83**, 589-98.
44. Huber, M., Trattnig, S. & Lintner, F. (2000). Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest Radiol* **35**, 573-80.
45. Hunt, C. & Morimoto, R. I. (1985). Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 6455-9.
46. Iwanaga, T., Shikichi, M., Kitamura, H., Yanase, H. & Nozawa-Inoue, K. (2000). Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol* **63**, 17-31.
47. Jiang, J., Cyr, D., Babbitt, R. W., Sessa, W. C. & Patterson, C. (2003). Chaperone-dependent regulation of endothelial nitric-oxide synthase intracellular trafficking by the co-chaperone/ubiquitin ligase CHIP. *J Biol Chem* **278**, 49332-41.
48. Jouzeau, J. Y., Gillet, P. & Netter, P. (2000). Interest of animal models in the preclinical screening of anti-osteoarthritic drugs. *Joint Bone Spine* **67**, 565-9.
49. Kääh, M.J., Ito, K., Clark, J.M., Nötzli, H.P. (2000) The acute structural changes of loaded articular cartilage following meniscectomy or ACL-transection. *Osteoarthritis Cartilage*. **8**(6):464-73.
50. Kalbhen, D. A. & Blum, U. (1977). [Hypothesis and experimental confirmation of a new pharmacological model of osteoarthritis (author's transl)]. *Arzneimittelforschung* **27**, 527-31.
51. Kapadia, R. D., Badger, A. M., Levin, J. M., Swift, B., Bhattacharyya, A., Dodds, R. A., Coatney, R. W. & Lark, M. W. (2000). Meniscal ossification in spontaneous osteoarthritis in the guinea-pig. *Osteoarthritis Cartilage* **8**, 374-7.
52. Kappe, G., Franck, E., Verschuure, P., Boelens, W. C., Leunissen, J. A. & de Jong, W. W. (2003). The human genome encodes 10 alpha-crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10. *Cell Stress Chaperones* **8**, 53-61.
53. Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslari, E., Kiuoussis, D. & Kollias, G. (1991). Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo J* **10**, 4025-31.
54. Kelley, W. L. (1998). The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem Sci* **23**, 222-7.
55. Kiani, C., Chen, L., Wu, Y. J., Yee, A. J. & Yang, B. B. (2002). Structure and function of aggrecan. *Cell Res* **12**, 19-32.
56. Kim, D., Kim, S. H. & Li, G. C. (1999). Proteasome inhibitors MG132 and lactacystin hyperphosphorylate HSF1 and induce hsp70 and hsp27 expression. *Biochem Biophys Res Commun* **254**, 264-8.

57. Klein, T.M., Arentzen, R., Lewis, P.A., Fitzpatrick-McElligott, S. (1992) Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Biotechnology*, **10**: 286-91.
58. Klenchin, V. A., Sukharev, S. I., Serov, S. M., Chernomordik, L. V. & Chizmadzhev Yu, A. (1991). Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis. *Biophys J* **60**, 804-11.
59. Kuo, S. Y., Chu, S. J., Hsu, C. M., Chen, C. M., Chang, M. L. & Chang, D. M. (1994). An experimental model of osteoarthritis in rabbit. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* **54**, 377-81.
60. Lee, R.J., and Huang, L. (1996) Folate targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *J. Biol. Chem.*, **271**: 8481-7.
61. Leong, K. W. (1999) Biopolymer-DNA nanospheres. In: *Nonviral vectors for Gene Therapy*, Huang, L., Hung, M.C., Wagner, E. Academic Press, San Diego, pp267-87.
62. Li, S. & Ma, Z. (2001). Nonviral gene therapy. *Curr Gene Ther* **1**, 201-26.
63. Liu, F., Yang, J., Huang, L., and Liu, D. (1996) Effect of non-ionic surfactants on the formation of DNA/emulsion complexes and emulsion-mediated gene transfer. *Pharm. Res.* **13**: 1642-6.
64. Matsumoto, T., Komori, K., Shoji, T., Kuma, S., Kume, M., Yamaoka, T., Mori, E., Furuyama, T., Yonemitsu, Y. & Sugimachi, K. (2001). Successful and optimized in vivo gene transfer to rabbit carotid artery mediated by electronic pulse. *Gene Ther* **8**, 1174-9.
65. Mayer, M. P. & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**, 670-84.
66. Mehlen, P., Hickey, E., Weber, L. A. & Arrigo, A. P. (1997). Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against TNFalpha in NIH-3T3-ras cells. *Biochem Biophys Res Commun* **241**, 187-92.
67. Meng, L., Mohan, R., Kwok, B. H., Elofsson, M., Sin, N. & Crews, C. M. (1999). Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10403-8.
68. Mir, L. M., Bureau, M. F., Gehl, J., Rangara, R., Rouy, D., Caillaud, J. M., Delaere, P., Branellec, D., Schwartz, B. & Scherman, D. (1999). High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4262-7.
69. Muir, H. (1995). The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *Bioessays* **17**, 1039-48.
70. Musial, A. & Eissa, N. T. (2001). Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. *J Biol Chem* **276**, 24268-73.
71. Nagase, H. & Kashiwagi, M. (2003). Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* **5**, 94-103.
72. Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. & Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* **1**, 841-5.
73. Odunuga, O. O., Hornby, J. A., Bies, C., Zimmermann, R., Pugh, D. J. & Blatch, G. L. (2003). Tetratricopeptide repeat motif-mediated Hsc70-mSTII interaction. Molecular characterization of the critical contacts for successful binding and specificity. *J Biol Chem* **278**, 6896-904.
74. Ohashi, S., Kubo, T., Kishida, T., Ikeda, T., Takahashi, K., Arai, Y., Terauchi, R., Asada, H., Imanishi, J. & Mazda, O. (2002). Successful genetic transduction in vivo into synovium by means of electroporation. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 1530-5.
75. Orłowski, S., Belehradek, J., Jr., Paoletti, C. & Mir, L. M. (1988). Transient electroporation of cells in culture. Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochem Pharmacol* **37**, 4727-33.

76. Pazmany, T., Murphy, S. P., Gollnick, S. O., Brooks, S. P. & Tomasi, T. B. (1995). Activation of multiple transcription factors and fos and jun gene family expression in cells exposed to a single electric pulse. *Exp Cell Res* **221**, 103-10.
77. Pearson, C. M. (1956). Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med* **91**, 95-101.
78. Petit, B., Ronzière, M.C., Hartmann, D.J., Herbage, D. (1993) Ultrastructural organization of type XI collagen in fetal bovine epiphyseal cartilage. *Histochemistry* **100**(3):231-9.
79. Pond, M. J. & Nuki, G. (1973). Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis* **32**, 387-8.
80. Pritzker, K. P. (1994). Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects. *Ann Rheum Dis* **53**, 406-20.
81. Rajdev, S. & Sharp, F. R. (2000). Stress proteins as molecular markers of neurotoxicity. *Toxicol Pathol* **28**, 105-12.
82. Rowan, A. D. (2001). Cartilage catabolism in arthritis: factors that influence homeostasis. *Expert Rev Mol Med* **2001**, 1-20.
83. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual* (Laboratory, E. C. S. H., Ed.).
84. Sarzi-Puttini, P., Cimmino, M. A., Scarpa, R., Caporali, R., Parazzini, F., Zaninelli, A., Atzeni, F. & Canesi, B. (2005). Osteoarthritis: an overview of the disease and its treatment strategies. *Semin Arthritis Rheum* **35**, 1-10.
85. Seed, M. P., Parker, F. L., Johns, S., Curnock, A. P., Bowden, A. & Gardner, C. R. (1991). Mycobacterium tuberculosis - induced monoarticular arthritis in the rat, a new in vivo model for the assessment of anti-rheumatic drugs. *Clinical Rheumatology* **10**, 461-462.
86. Stoop, R., van der Kraan, P. M., Buma, P., Hollander, A. P., Billingham, R. C., Poole, A. R. & van den Berg, W. B. (1999). Type II collagen degradation in spontaneous osteoarthritis in C57Bl/6 and BALB/c mice. *Arthritis Rheum* **42**, 2381-9.
87. Strand, V., Kimberly, R. & Isaacs, J. D. (2007). Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 75-92.
88. Takayama, S. & Reed, J. C. (2001). Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nat Cell Biol* **3**, E237-41.
89. Tanguay, R. M., Wu, Y. & Khandjian, E. W. (1993). Tissue-specific expression of heat shock proteins of the mouse in the absence of stress. *Dev Genet* **14**, 112-8.
90. Titomirov, A. V., Sukharev, S. & Kistanova, E. (1991). In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim Biophys Acta* **1088**, 131-4.
91. Trentham, D. E., Townes, A. S. & Kang, A. H. (1977). Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* **146**, 857-68.
92. Voorhees, P. M. & Orłowski, R. Z. (2006). The proteasome and proteasome inhibitors in cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**, 189-213.
93. Wieland, H. A., Michaelis, M., Kirschbaum, B. J. & Rudolphi, K. A. (2005). Osteoarthritis - an untreatable disease? *Nat Rev Drug Discov* **4**, 331-44.
94. Wilk, S. & Orłowski, M. (1983). Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *J Neurochem* **40**, 842-9.
95. Williams, J. M., Felten, D. L., Peterson, R. G. & O'Connor, B. L. (1982). Effects of surgically induced instability on rat knee articular cartilage. *J Anat* **134**, 103-9.

96. Williams, R. O. (1998). Rodent models of arthritis: relevance for human disease. *Clin Exp Immunol* **114**, 330-2.
97. Wirth, D., Gustin, P., Drion, P. V., Dessy-Doize, C. & Christians, E. S. (2002). Les protéines de choc thermique (heat choc proteins). I : Classification, structure, fonctions et implications dans les processus pathologiques. *Ann. Méd. Vét.* **146**, 201-216.
98. Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., Felgner, P.L. (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, **247**: 1465-8.
99. Wong, T. K. & Neumann, E. (1982). Electric field mediated gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun* **107**, 584-7.
100. Wu, G.Y., and Wu, C.H. (1988) Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J. Biol. Chem.*, **263**: 14621-4.
101. Yamashita, M., Hirayoshi, K. & Nagata, K. (2004). Characterization of multiple members of the HSP70 family in platyfish culture cells: molecular evolution of stress protein HSP70 in vertebrates. *Gene* **336**, 207-18.

ANNEXES



Annexe 1 : Exemples représentatifs des résultats à 48h de la coloration à l'hématoxyline, l'éosine et le safran (HES) de coupes de rotules de rats exposés à différentes conditions d'électroporation biphasique.

Cette coloration permet d'évaluer la structure générale du cartilage rotulien.

Plusieurs impulsions électriques sont appliquées au niveau des rotules de rats sains. Un premier pulse de 500 V/cm, 640 V/cm ou 770 V/cm d'une durée de 100 μ s, va permettre la perméabilisation. Ce pulse sera suivi de 4 ou 20 pulses de 80 V/cm de 50 ms assurant la migration. Les animaux sont électroporés et les rotules sont prélevées 48h après.

A : Témoins non électroporés.

B : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

C : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

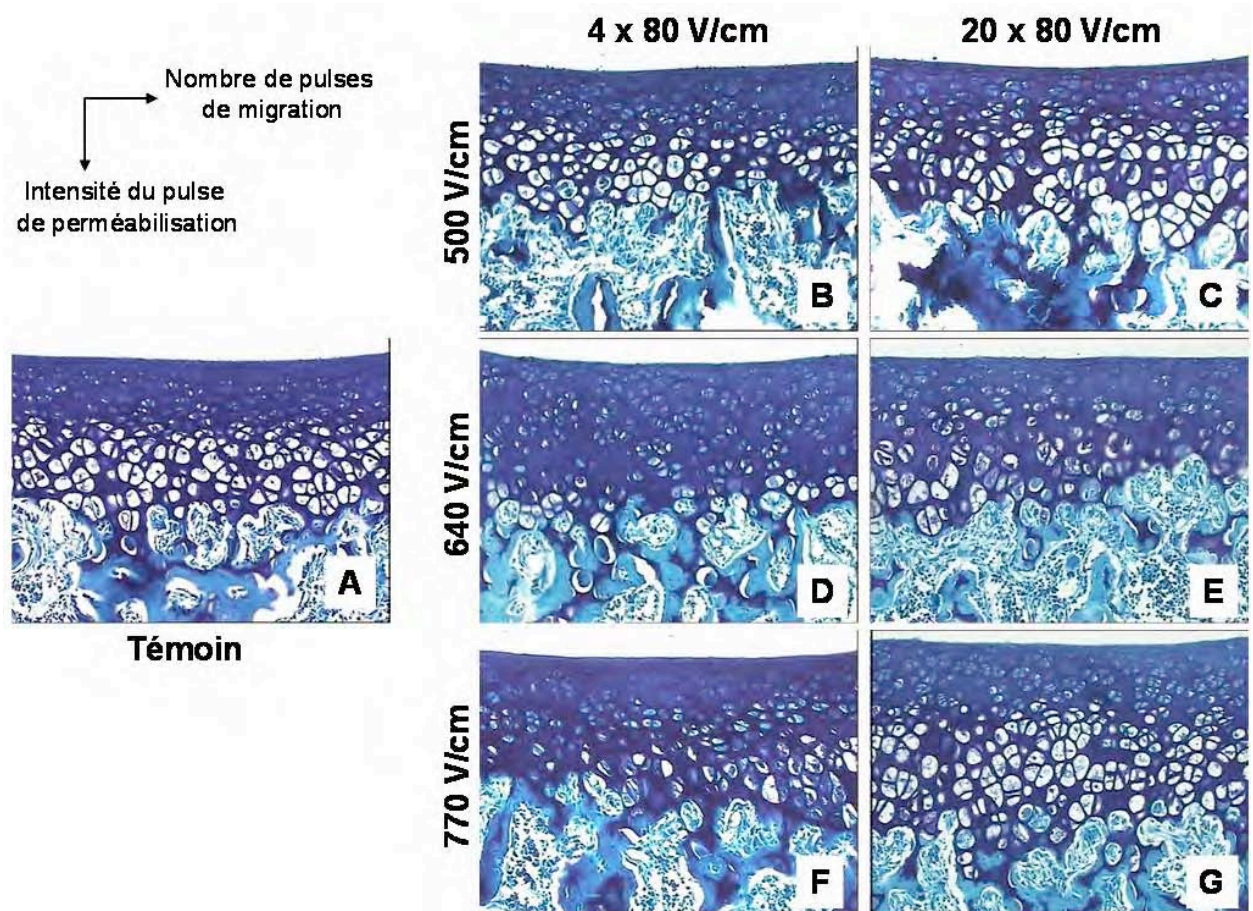
D : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

E : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

F : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

G : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

Pour chaque condition, la coloration HES a été effectuée sur 4 coupes de rotules différentes, la photo présentée est la plus représentative de chaque série.



Annexe 2 : Vérification à 48h de l'innocuité de différentes conditions d'électroporation biphasique sur le contenu en protéoglycanes du cartilage rotulien de rats sains par coloration au bleu de Toluidine (BT).

Plusieurs impulsions électriques sont appliquées au niveau des rotules de rats sains. Un premier pulse de 500 V/cm, 640 V/cm ou 770 V/cm d'une durée de 100 μ s, va permettre la perméabilisation. Ce pulse sera suivi de 4 ou 20 pulses de 80 V/cm de 50 ms assurant la migration. Les animaux sont électroporés et les rotules sont prélevées 48h après.

A : Témoins non électroporés.

B : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

C : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

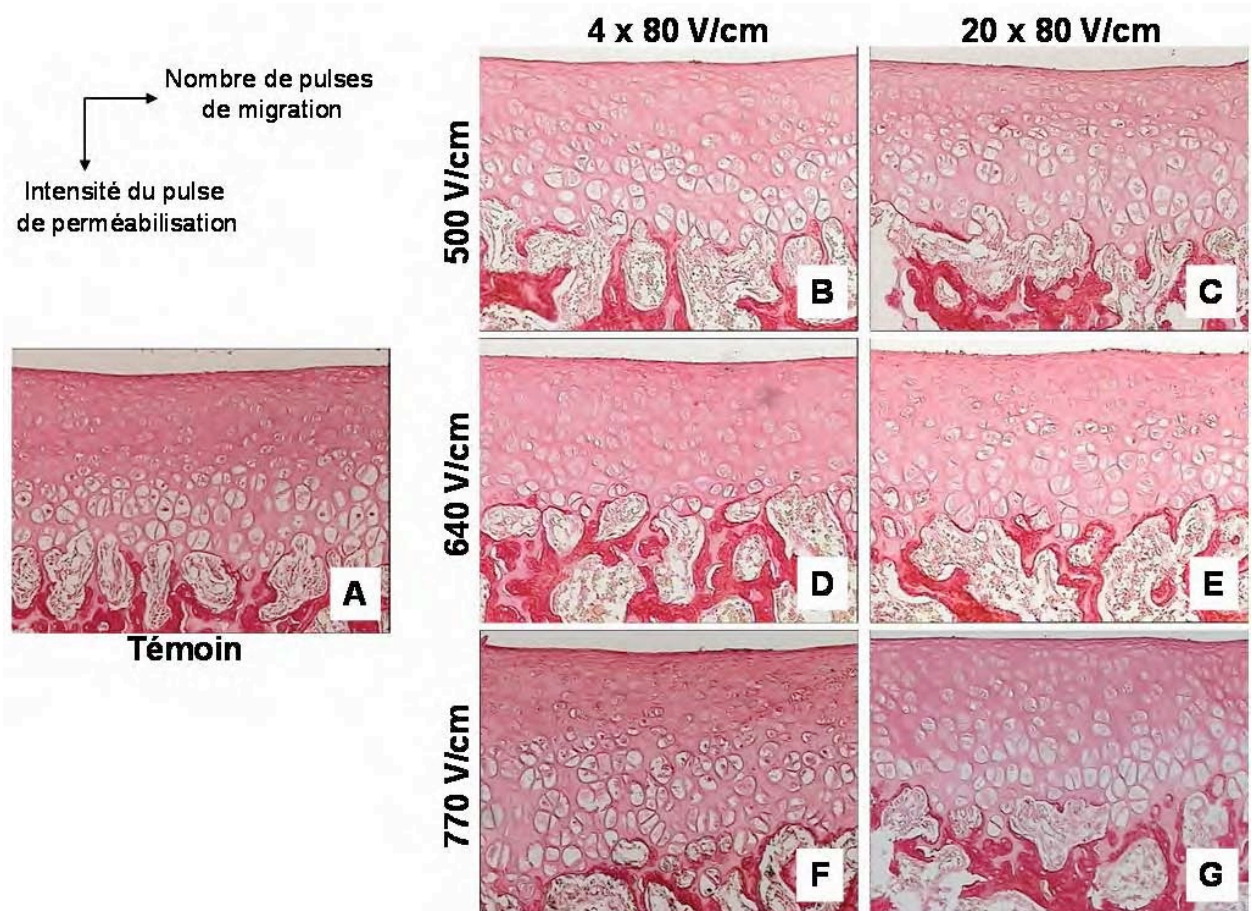
D : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

E : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

F : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

G : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

Pour chaque condition, la coloration BT a été effectuée sur 4 coupes de rotules différentes, la photo présentée est la plus représentative de chaque série.



Annexe 3 : Vérification à 48h de l'innocuité de différentes conditions d'électroporation biphasique sur le contenu en collagènes du cartilage rotulien de rats sains par coloration au Rouge Sirius (RS).

Plusieurs impulsions électriques sont appliquées au niveau des rotules de rats sains. Un premier pulse de 500 V/cm, 640 V/cm ou 770 V/cm d'une durée de 100 μ s, va permettre la perméabilisation. Ce pulse sera suivi de 4 ou 20 pulses de 80 V/cm de 50 ms assurant la migration. Les animaux sont électroporés et les rotules sont prélevées 48h après.

A : Témoins non électroporés.

B : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

C : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

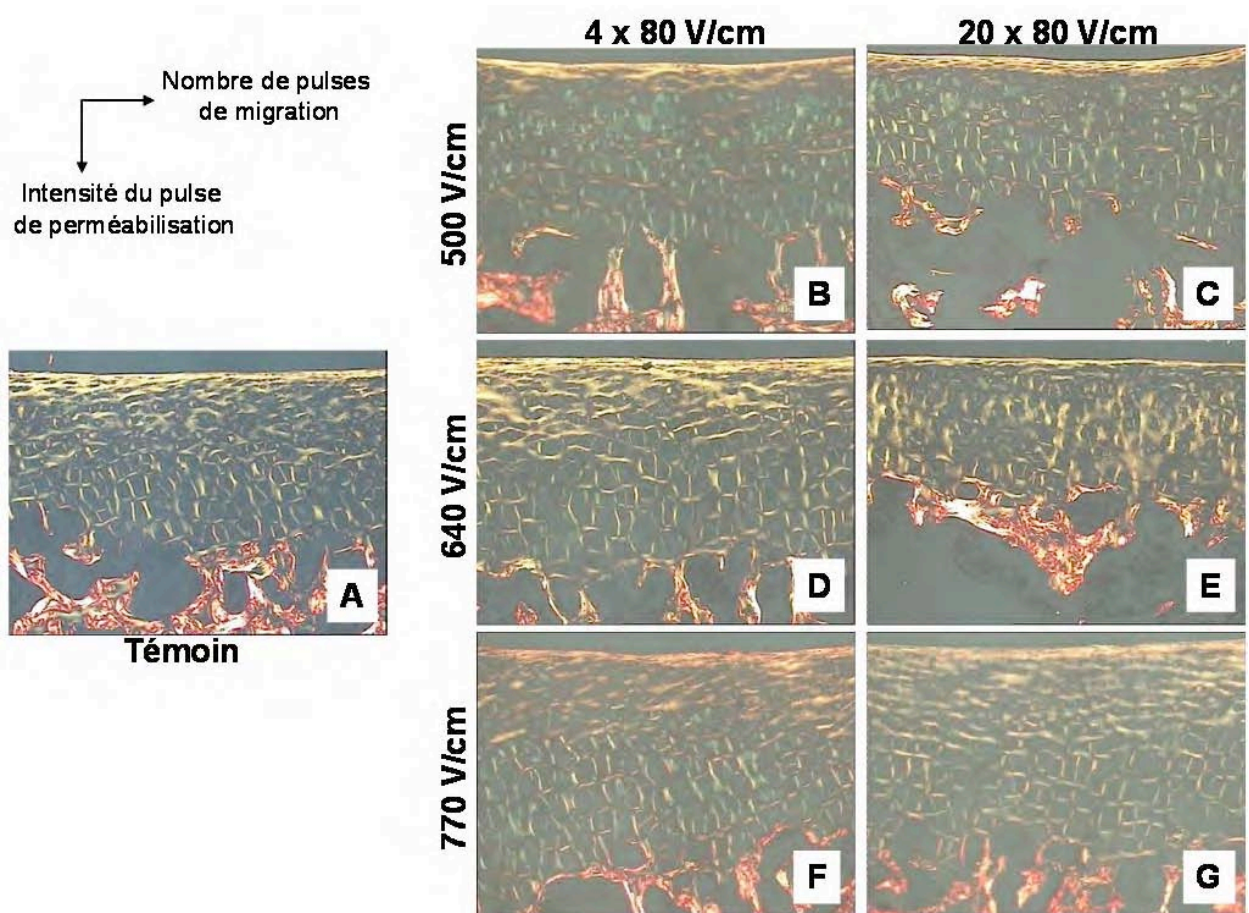
D : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

E : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

F : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

G : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

Pour chaque condition, la coloration RS a été effectuée sur 4 coupes de rotules différentes, la photo présentée est la plus représentative de chaque série.



Annexe 4 : Vérification à 48h de l'innocuité de différentes conditions d'électroporation biphasique sur le réseau des fibres collagéniques du cartilage rotulien de rats sains par coloration au Rouge Sirius (RS) et observation en lumière polarisée.

Plusieurs impulsions électriques sont appliquées au niveau des rotules de rats sains. Un premier pulse de 500 V/cm, 640 V/cm ou 770 V/cm d'une durée de 100 μ s, va permettre la perméabilisation. Ce pulse sera suivi de 4 ou 20 pulses de 80 V/cm de 50 ms assurant la migration. Les animaux sont électroporés et les rotules sont prélevées 48h après.

A : Témoins non électroporés.

B : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

C : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

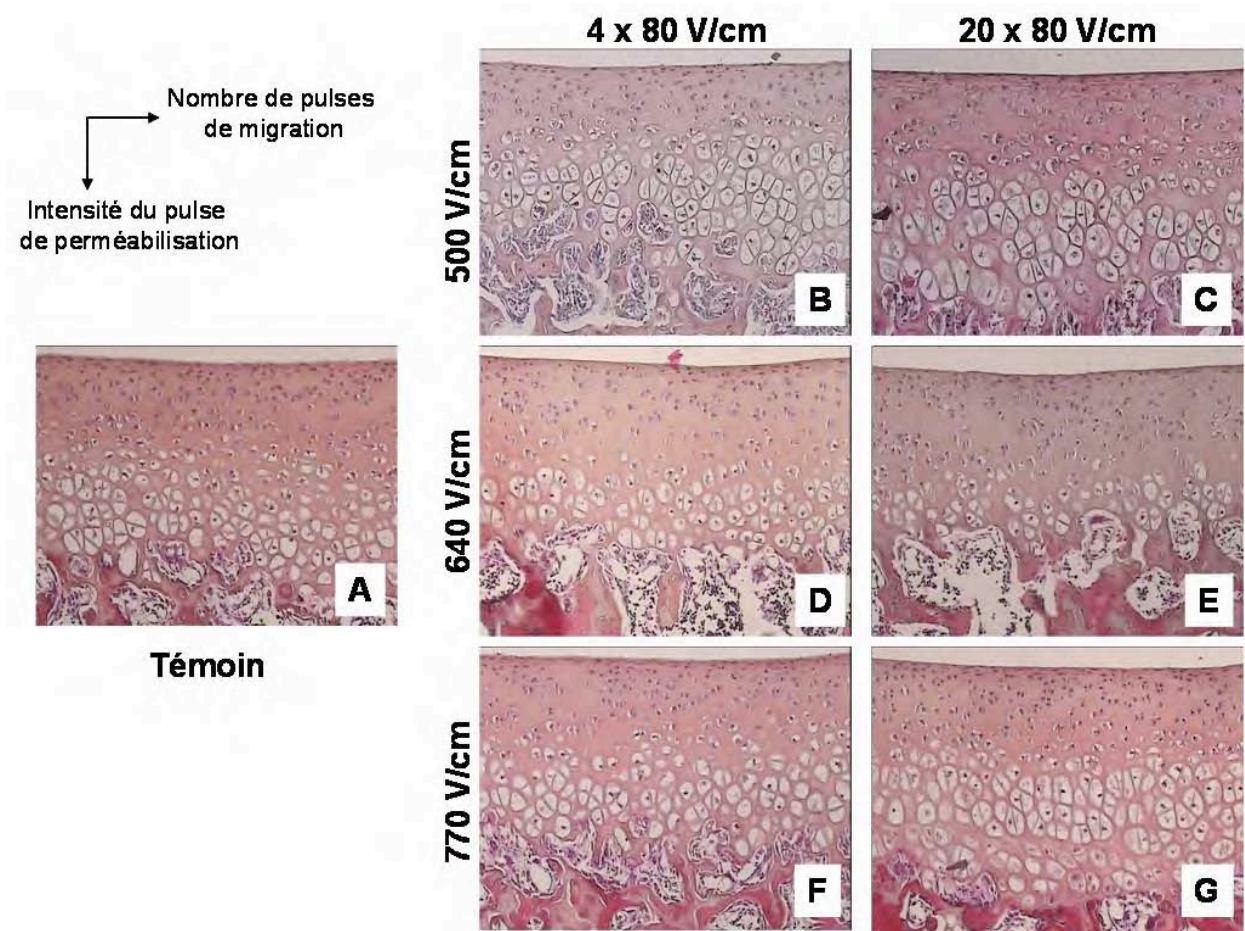
D : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

E : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

F : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

G : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

Pour chaque condition, la coloration RS a été effectuée sur 4 coupes de rotules différentes, la photo présentée est la plus représentative de chaque série.



Annexe 5 : Vérification à 7 jours de l'innocuité de différentes conditions d'électroporation biphasique sur la structure générale du cartilage rotulien de rats sains par coloration à l'hématoxyline, l'éosine et le safran (HES).

Plusieurs impulsions électriques sont appliquées au niveau des rotules de rats sains. Un premier pulse de 500 V/cm, 640 V/cm ou 770 V/cm d'une durée de 100 μ s, va permettre la perméabilisation. Ce pulse sera suivi de 4 ou 20 pulses de 80 V/cm de 50 ms assurant la migration. Les animaux sont électroporés et les rotules sont prélevées 7 jours après.

A : Témoins non électroporés.

B : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

C : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

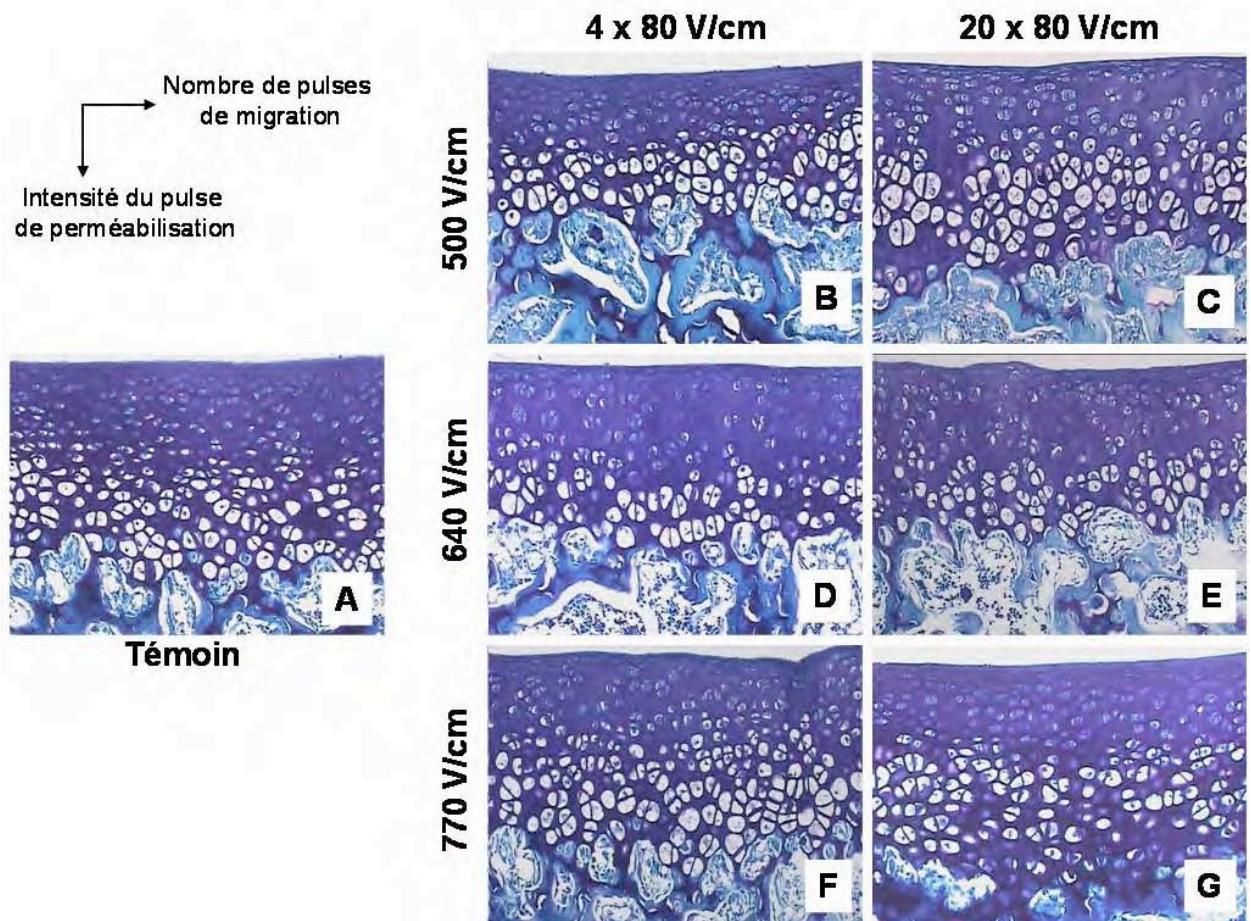
D : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

E : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

F : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

G : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

Pour chaque condition, la coloration HES a été effectuée sur 6 coupes de rotules différentes, la photo présentée est la plus représentative de chaque série.



Annexe 6 : Vérification à 7 jours de l'innocuité de différentes conditions d'électroporation biphasique sur la structure générale du cartilage rotulien de rats sains par coloration au bleu de Toluidine (BT).

Plusieurs impulsions électriques sont appliquées au niveau des rotules de rats sains. Un premier pulse de 500 V/cm, 640 V/cm ou 770 V/cm d'une durée de 100 μ s, va permettre la perméabilisation. Ce pulse sera suivi de 4 ou 20 pulses de 80 V/cm de 50 ms assurant la migration. Les animaux sont électroporés et les rotules sont prélevées 7 jours après.

A : Témoins non électroporés.

B : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

C : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

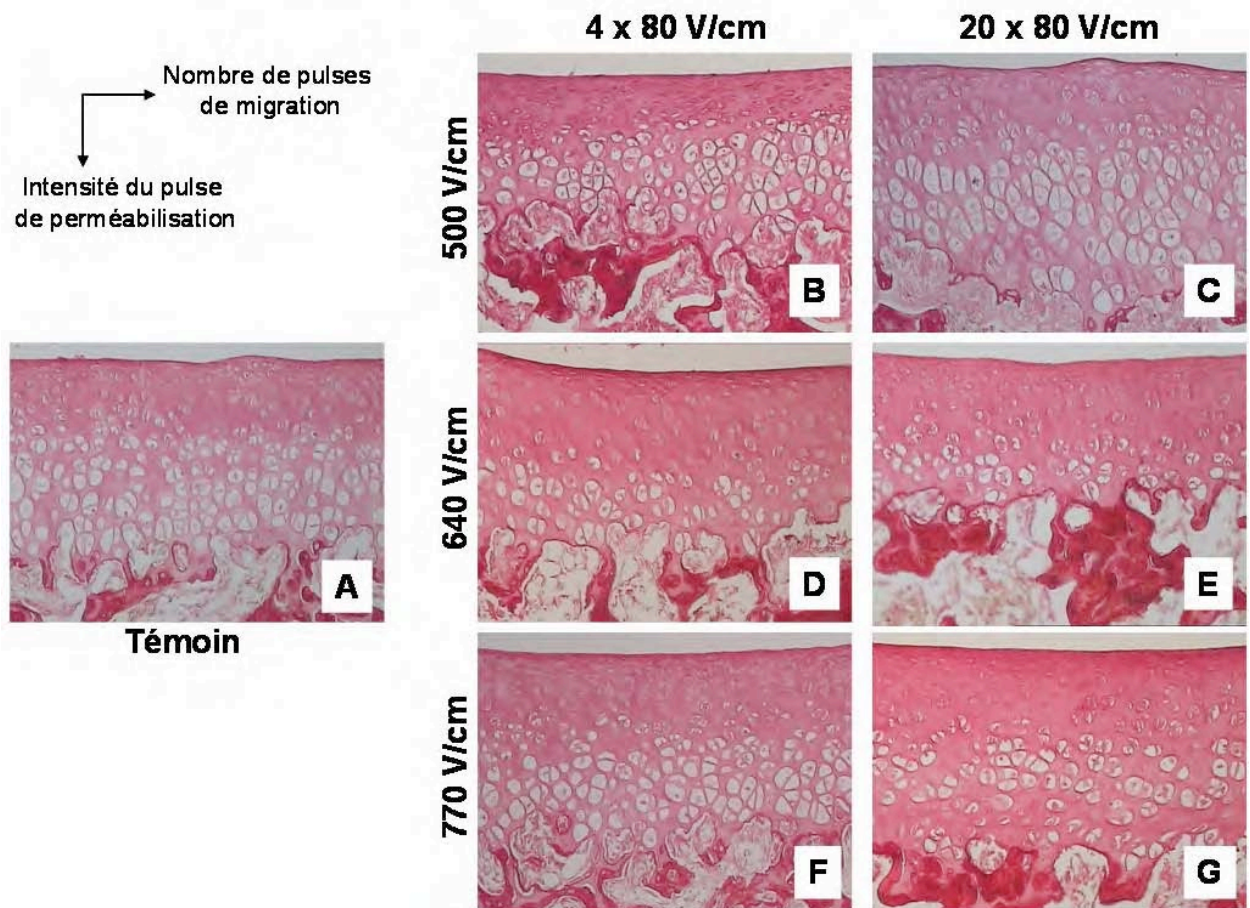
D : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

E : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

F : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

G : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

Pour chaque condition, la coloration BT a été effectuée sur 6 coupes de rotules différentes, la photo présentée est la plus représentative de chaque série.



Annexe 7 : Vérification à 7 jours de l'innocuité de différentes conditions d'électroporation biphasique sur le contenu en collagènes du cartilage rotulien de rats sains par coloration au Rouge Sirius (RS).

Plusieurs impulsions électriques sont appliquées au niveau des rotules de rats sains. Un premier pulse de 500 V/cm, 640 V/cm ou 770 V/cm d'une durée de 100 μ s, va permettre la perméabilisation. Ce pulse sera suivi de 4 ou 20 pulses de 80 V/cm de 50 ms assurant la migration. Les animaux sont électroporés et les rotules sont prélevées 7 jours après.

A : Témoins non électroporés.

B : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

C : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

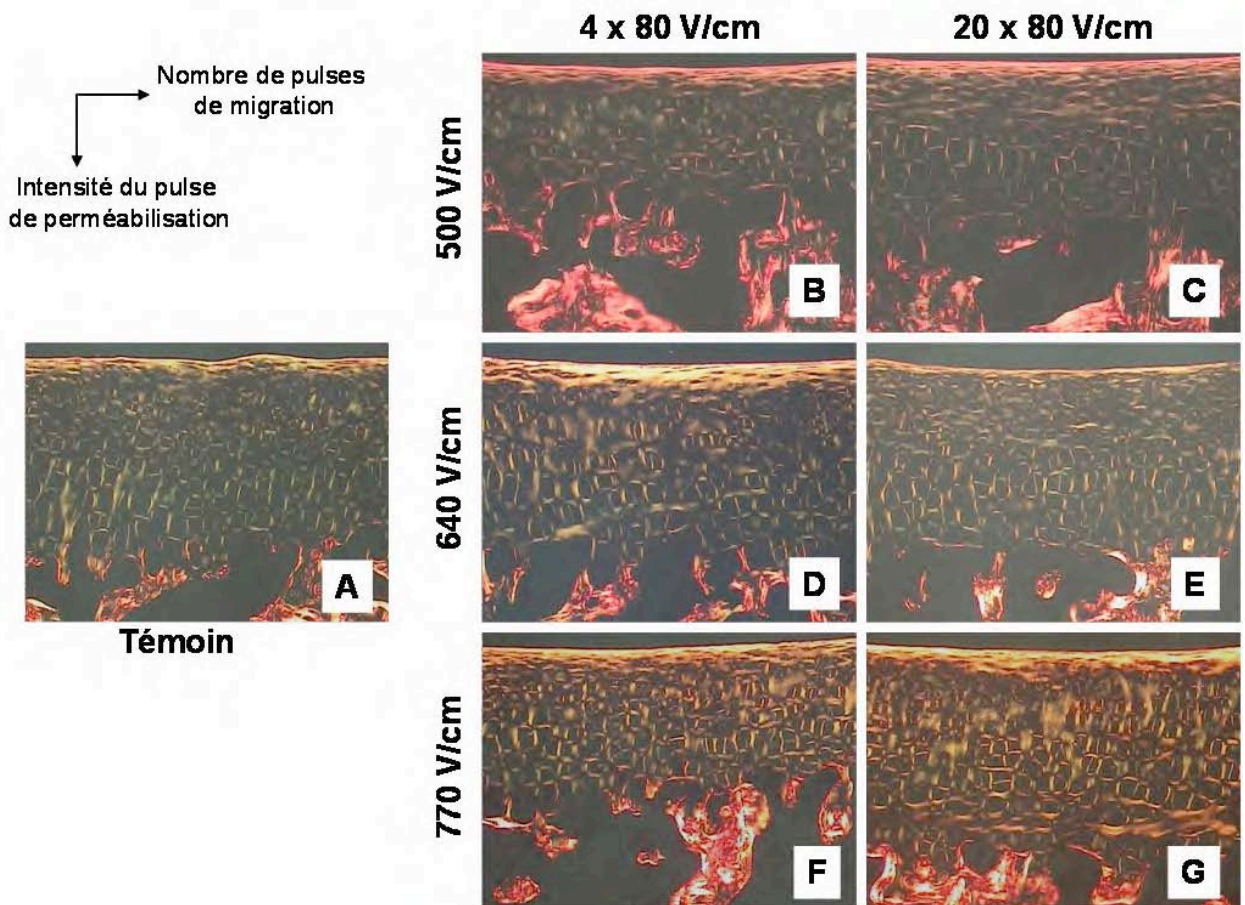
D : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

E : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

F : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

G : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

Pour chaque condition, la coloration RS a été effectuée sur 4 coupes de rotules différentes, la photo présentée est la plus représentative de chaque série.



Annexe 8 : Vérification à 7 jours de l'innocuité de différentes conditions d'électroporation biphasique sur le réseau des fibres collagéniques du cartilage rotulien de rats sains par coloration au Rouge Sirius (RS) et observation en lumière polarisée.

Plusieurs impulsions électriques sont appliquées au niveau des rotules de rats sains. Un premier pulse de 500 V/cm, 640 V/cm ou 770 V/cm d'une durée de 100 μ s, va permettre la perméabilisation. Ce pulse sera suivi de 4 ou 20 pulses de 80 V/cm de 50 ms assurant la migration. Les animaux sont électroporés et les rotules sont prélevées 7 jours après.

A : Témoins non électroporés.

B : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

C : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

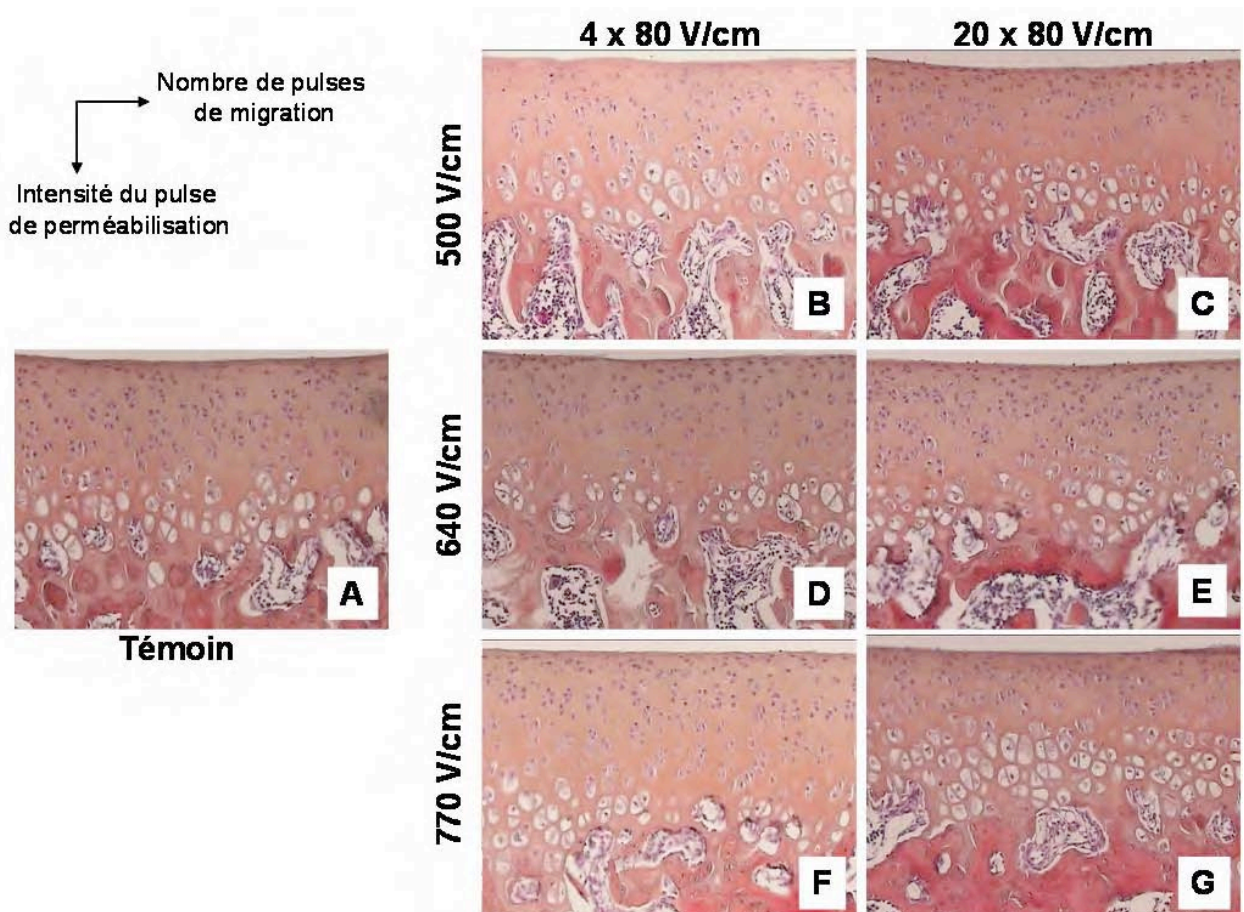
D : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

E : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

F : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

G : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

Pour chaque condition, la coloration RS a été effectuée sur 4 coupes de rotules différentes, la photo présentée est la plus représentative de chaque série.



Annexe 9 : Vérification à 14 jours de l'innocuité de différentes conditions d'électroporation biphasique sur la structure générale du cartilage rotulien de rats sains par coloration à l'hématoxyline, l'éosine et le safran (HES).

Plusieurs impulsions électriques sont appliquées au niveau des rotules de rats sains. Un premier pulse de 500 V/cm, 640 V/cm ou 770 V/cm d'une durée de 100 μ s, va permettre la perméabilisation. Ce pulse sera suivi de 4 ou 20 pulses de 80 V/cm de 50 ms assurant la migration. Les animaux sont électroporés et les rotules sont prélevées 14 jours après.

A : Témoins non électroporés.

B : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

C : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

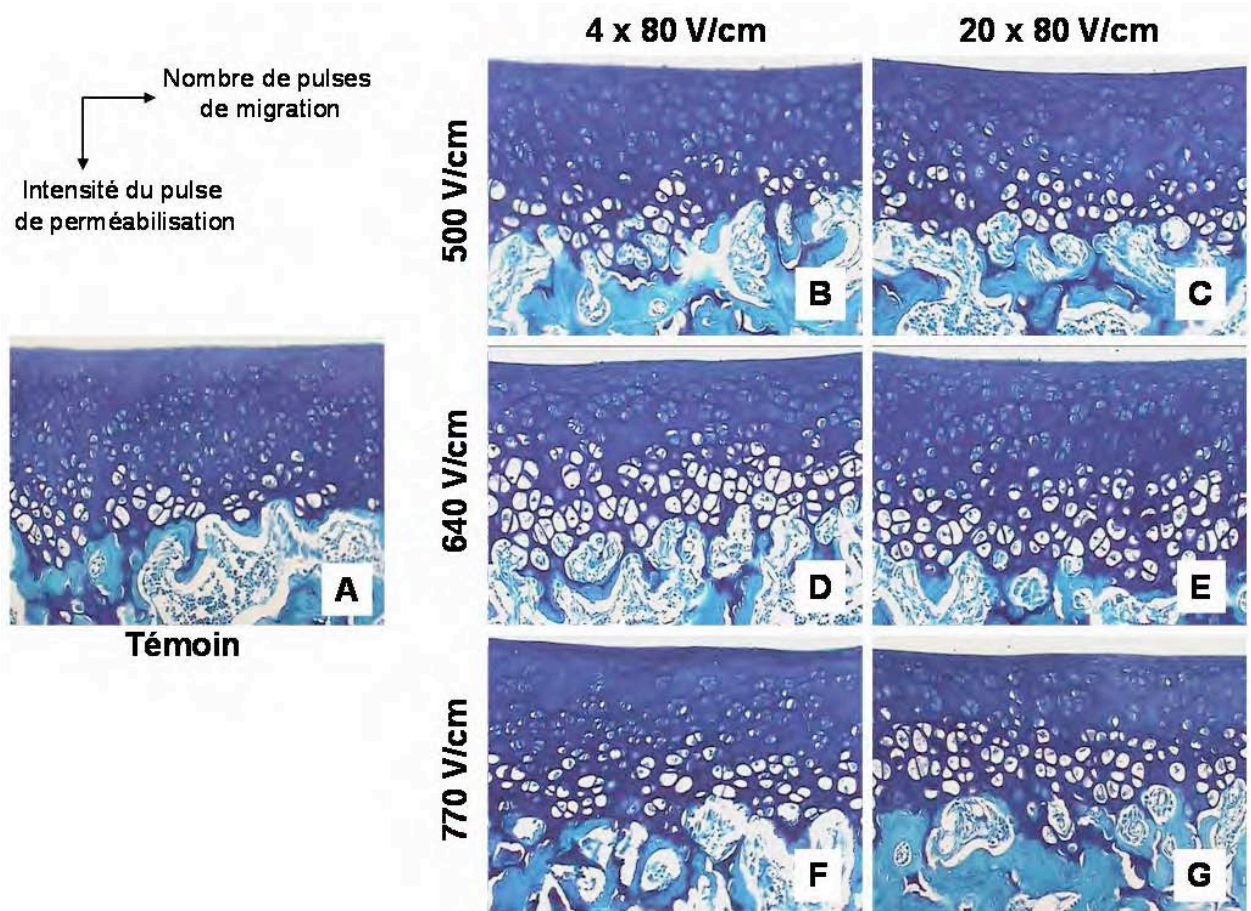
D : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

E : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

F : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

G : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

Pour chaque condition, la coloration HES a été effectuée sur 6 coupes de rotules différentes, la photo présentée est la plus représentative de chaque série.



Annexe 10 : Vérification à 14 jours de l'innocuité de différentes conditions d'électroporation biphasique sur la structure générale du cartilage rotulien de rats sains par coloration au bleu de Toluidine (BT).

Plusieurs impulsions électriques sont appliquées au niveau des rotules de rats sains. Un premier pulse de 500 V/cm, 640 V/cm ou 770 V/cm d'une durée de 100 μ s, va permettre la perméabilisation. Ce pulse sera suivi de 4 ou 20 pulses de 80 V/cm de 50 ms assurant la migration. Les animaux sont électroporés et les rotules sont prélevées 14 jours après.

A : Témoins non électroporés.

B : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

C : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

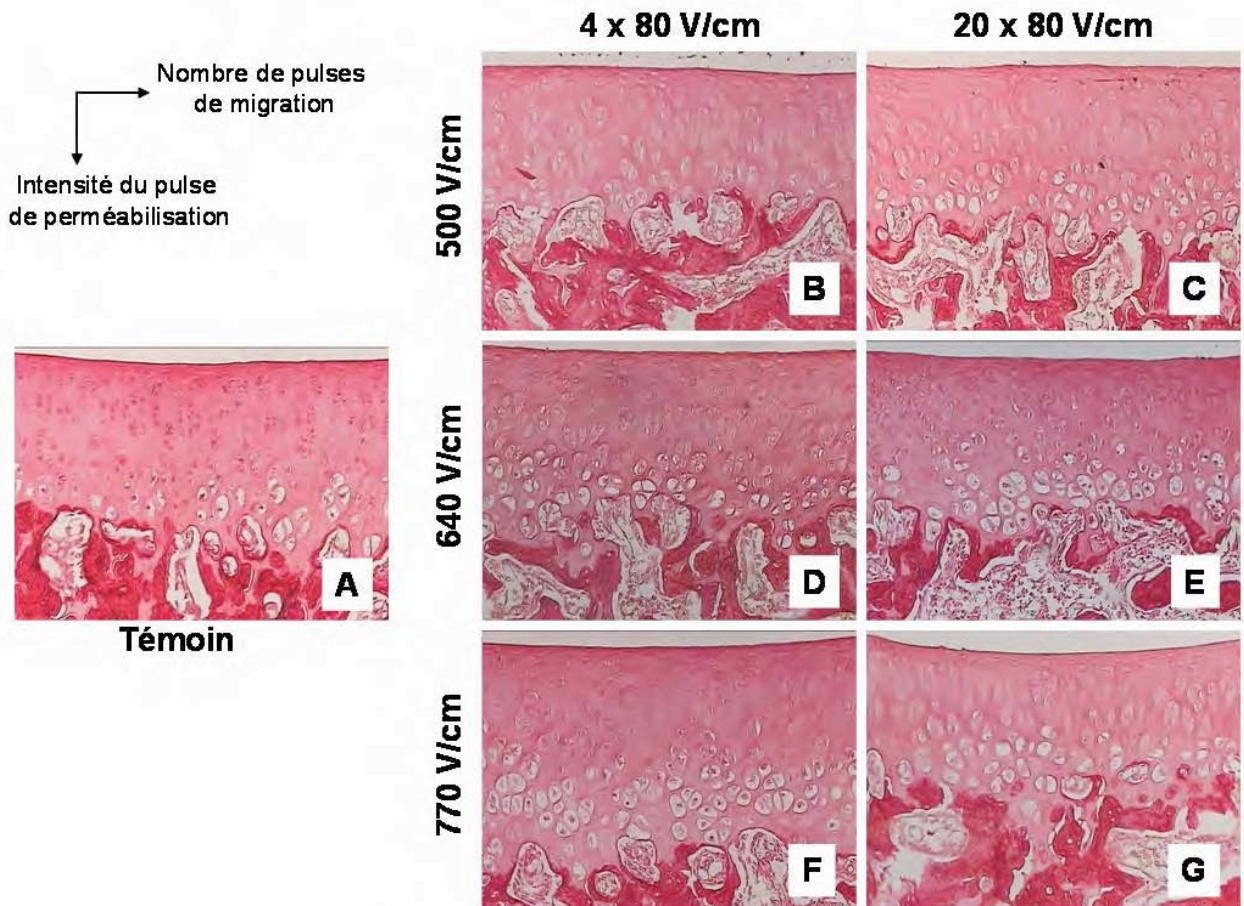
D : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

E : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

F : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

G : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

Pour chaque condition, la coloration BT a été effectuée sur 6 coupes de rotules différentes, la photo présentée est la plus représentative de chaque série.



Annexe 11 : Vérification à 14 jours de l'innocuité de différentes conditions d'électroporation biphasique sur le contenu en collagènes du cartilage rotulien de rats sains par coloration au Rouge Sirius (RS).

Plusieurs impulsions électriques sont appliquées au niveau des rotules de rats sains. Un premier pulse de 500 V/cm, 640 V/cm ou 770 V/cm d'une durée de 100 μ s, va permettre la perméabilisation. Ce pulse sera suivi de 4 ou 20 pulses de 80 V/cm de 50 ms assurant la migration. Les animaux sont électroporés et les rotules sont prélevées 14 jours après.

A : Témoins non électroporés.

B : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

C : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

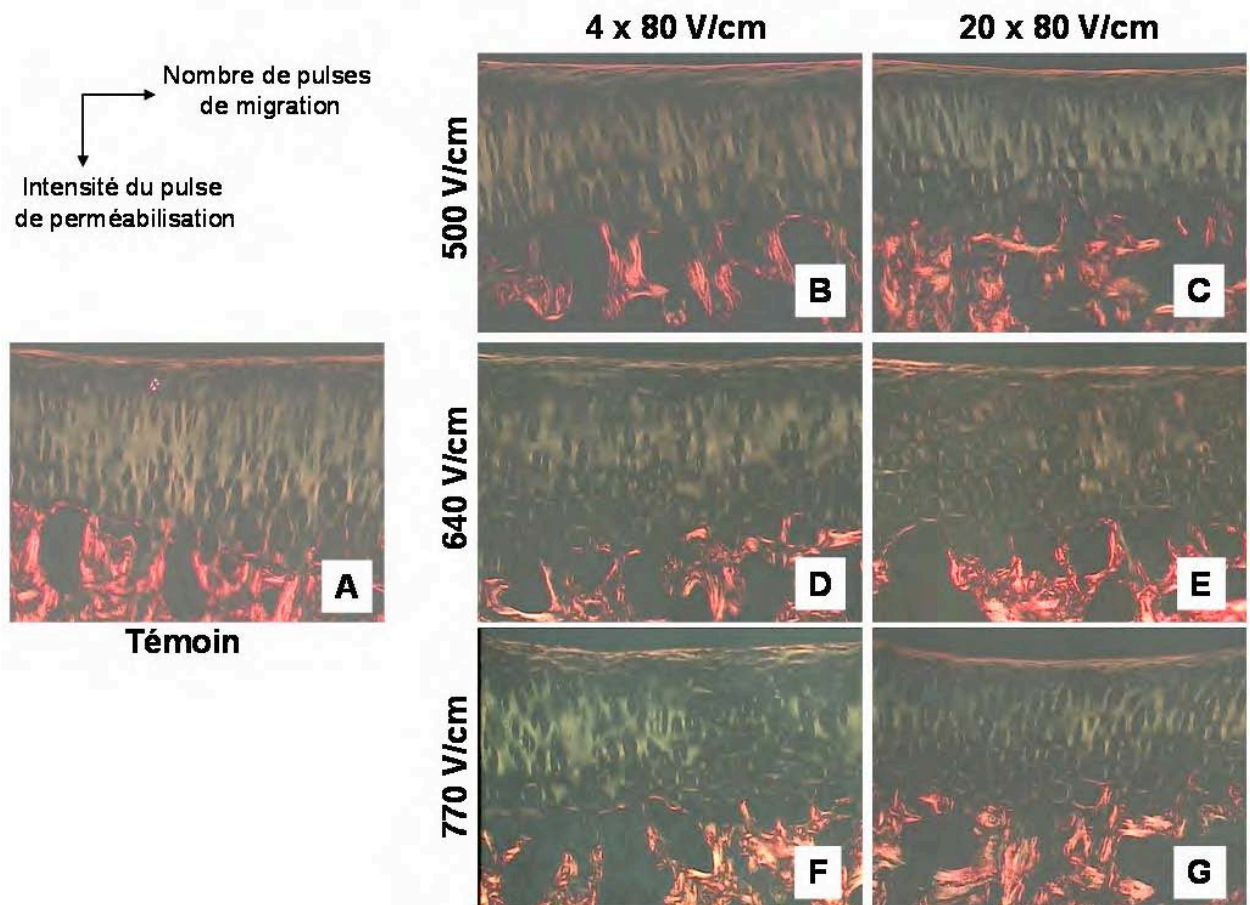
D : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

E : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

F : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

G : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

Pour chaque condition, la coloration RS a été effectuée sur 4 coupes de rotules différentes, la photo présentée est la plus représentative de chaque série.



Annexe 12 : Vérification à 14 jours de l'innocuité de différentes conditions d'électroporation biphasique sur le réseau des fibres collagéniques du cartilage rotulien de rats sains par coloration au Rouge Sirius (RS) et observation en lumière polarisée.

Plusieurs impulsions électriques sont appliquées au niveau des rotules de rats sains. Un premier pulse de 500 V/cm, 640 V/cm ou 770 V/cm d'une durée de 100 μ s, va permettre la perméabilisation. Ce pulse sera suivi de 4 ou 20 pulses de 80 V/cm de 50 ms assurant la migration. Les animaux sont électroporés et les rotules sont prélevées 14 jours après.

A : Témoins non électroporés.

B : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

C : Un pulse de perméabilisation de 500 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

D : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

E : Un pulse de perméabilisation de 640 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

F : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 4 pulses de migration à 80 V/cm.

G : Un pulse de perméabilisation de 770 V/cm suivi de 20 pulses de migration à 80 V/cm.

Pour chaque condition, la coloration RS a été effectuée sur 4 coupes de rotules différentes, la photo présentée est la plus représentative de chaque série.

PUBLICATIONS DE NADEGE GABORIT

Etienne S, Gaborit N, Henrionnet C, Pinzano A, Galois L, Netter P, Gillet P, Grossin L.
Local induction of heat shock protein 70 (Hsp70) by proteasome inhibition confers chondroprotection during surgically induced osteoarthritis in the rat knee.
Bio-medical Materials and Engineering, (*sous presse*)
(co-auteur en premier nom)

Watrin-Pinzano A, Etienne S, Grossin L, Gaborit N, Cournil-Henrionnet C, Mainard D, Netter P, Gillet P, Galois L.
Increased apoptosis in rat osteoarthritic cartilage corresponds to degenerative chondral lesions and concomitant expression of caspase-3.
Biorheology. 2006 ; 43(3-4):403-12.

Grossin L, Cournil-Henrionnet C, Pinzano A, Gaborit N, Dumas D, Etienne S, Stoltz JF, Terlain B, Netter P, Mir L and Gillet P.
Gene transfer with HSP 70 in rat chondrocytes confers cytoprotection in vitro and during experimental osteoarthritis.
FASEB. 2006 Jan; 20(1) : 65-75

Grossin L, Etienne S, Gaborit N, Pinzano A, Cournil-Henrionnet C, Gerard C, Payan E, Netter P, Terlain B, Gillet P.
Induction of heat shock protein 70 (Hsp70) by proteasome inhibitor MG 132 protects articular chondrocytes from cellular death in vitro and in vivo.
Biorheology. 2004 ; 41(3-4) : 521-34.

Dumas D, Gaborit N, Grossin L, Riquelme B, Gigant-Huselstein C, De Isla N, Gillet P, Netter P, Stoltz JF.
Spectral and lifetime fluorescence imaging microscopies: new modalities of multiphoton microscopy applied to tissue or cell engineering.
Biorheology. 2004 ; 41(3-4) : 459-67.

Grossin L, Gaborit N, Mir L, Netter P, Gillet P.
Gene therapy in cartilage using electroporation.
Joint Bone Spine. 2003 Dec ; 70(6) : 480-2.

Spectral and lifetime fluorescence imaging microscopies: New modalities of multiphoton microscopy applied to tissue or cell engineering

D. Dumas^{a,*}, N. Gaborit^b, L. Grossin^b, B. Riquelme^c, C. Gigant-Huselstein^a, N. de Isla^a, P. Gillet^b, P. Netter^b and J.F. Stoltz^a

^a *Laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, UMR CNRS 7563 LEMTA et IFR 111 CNRS, UHP-INPL-CHU, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

^b *Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires, UMR 7561 CNRS-UHP et IFR 111 CNRS, UHP-INPL-CHU Nancy 1, 54505 Vandoeuvre les Nancy, France*

^c *Grupo de Optica Aplicada, Instituto de Fisica de Rosario (CONICET-UNR), Argentina*

Abstract. Spectral and multiphoton imaging is the preferred approach for non-invasive study allowing deeper penetration to image molecular processes in living cells. But currently available fluorescence microscopic techniques based on fluorescence intensity, such as confocal or multiphoton excitation, cannot provide detailed quantitative information about the dynamic of complex cellular structure (molecular interaction). Due to the variation of the probe concentration, photostability, cross-talking, its effects cannot be distinguished in simple intensity images. Therefore, Time Resolved fluorescence image is required to investigate molecular interactions in biological systems. Fluorescence lifetimes are generally absolute, sensitive to environment, independent of the concentration of the probe and allow the use of probes with overlapping spectra but that not have the same fluorescence lifetime. In this work, we present the possibilities that are opened up by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, firstly to collect images based on fluorescence lifetime contrast of GFP variants used as a reporter of gene expression in chondrocytes and secondly, to measure molecular proximity in erythrocyte (glycophorin/membrane) by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FLIM-FRET).

Keywords: GFP variants, glycophorin, FRET, lifetime imaging, spectral, chondrocytes, erythrocytes

1. Introduction

There is a growing interest for screening programs (drug efficiency) in the potential of spectral imaging methods for discriminating fluorophores with closely related emission spectra. Unlike a fluorescence image, where each point represents the intensity at a different locations (x, y, z) in space, a spectral image is a sequence of image representing the intensity of the 2D plane of the sample at different wavelength (spectral information). Combination of fluorescence spectroscopy with image cytometry is useful

* Address for correspondence: Dumas Dominique, Service d'Imagerie et Biophysique Cellulaire et tissulaire de Lorraine, Laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, UMR CNRS 7563 et IFR 111, Faculté de Médecine, B.P. 184, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France. Tel.: +33 03 83 68 34 65; Fax: +33 03 83 59 26 43; E-mail: dumas@hemato.u-nancy.fr.

in biology by using fluorescent probes to identify and map several fluorophores and to improve the signal-to-noise ratio. The ability to identify a fluorophore signal based on spectral characteristics rather than intensity has significant advantages when trying to separate signals from undesirable background fluorescence (cartilage, blood cells, etc.), and when trying to separate signals from closely related fluorophore. Spectral imaging has also been used successfully to detect of micro-environmental changes (intracellular ion concentration), the measurement of auto-fluorescence from natural pigments (skin, etc.). Fluorescence resonant energy transfer (FRET) is a powerful technique for measuring intermolecular distances on a scale of a few nanometers, orientation and dynamic properties. However, due to the spectral overlap of donor and acceptor excitation/emission, the acceptor is often also excited directly by the donor excitation. Most of pair of fluorophore used in FRET experiment are difficult to separate spectrally by currently available methods based on fluorescence intensity.

Multi-photon excitation has evolved as a powerful way of performing three-dimensional fluorescence scanning microscopy in biological science. Compared to single-photon confocal microscopy, the multiphoton microscopy significantly improves performance, as the result of the pulsed excitation in the (infra) red region of the spectrum. This multiphoton process allows two or more photons of long wavelength light to create the same excitation as one photon of shorter wavelength light provided the photons arrive simultaneously. In order for a two-photon event to occur, a significantly density of incident photons is required. This phenomenon is made possible by the use of ultra-fast, mode-locked near-infrared lasers which can deliver a very high intensity combined with time-related concentration of a very brief laser flash (100–200 femtosecond pulse duration and very repetition rate (76 MHz) [1]. When confocal images of optical sections that are deep within a thick sample are obtained, the fluorescence signal is attenuated by light scatter. Since the red or near infrared illuminated light used for 2-P excitation has approximately twice the wavelength of that employed for 1-P excitation which is less scattered in biological tissue, allowing deeper penetration into highly scattering thick specimen [2]. Under the appropriate power, near-infrared light is far less damaging to many living samples. Because in multiphoton mode spatial resolution is the result of absorption (and excitation) confinement to the focal event (smaller of one femtoliter) [3], the photobleaching patterns and photo-generation of toxic products are restricted to the focal plane [4].

Spectral and multiphoton imaging is the preferred approach to image molecular processes in living cells based on fluorescence intensity. However, the intensity signal is only a good measure of the dye concentration if the quantum efficiency (QE) stays constant, and QE is often affected by the cell micro-environment (pH, viscosity, temperature, probe concentration, oxygen, . . .). To overcome the problems associated with intensity-based measurements (photobleaching, concentration and environment dependence, lost of dye, . . .) as given by the spectral imaging, the resolution and contrast of image can be enhanced by a time-resolved technique. The fluorescence lifetime is defined as the average time that a molecule remains in an excited state prior to returning to the ground state and offers many opportunities for studies of dynamic event of living cells. Fluorescence lifetime can be measured with different strategies either in the frequency domain or in the temporal domain [5]. In time-domain methods, pulsed light used as the excitation source, and fluorescence lifetimes are measured from the fluorescence signal directly or by photon counting. Lifetime imaging systems have been demonstrated using wide-field [6], confocal [7] and multiphoton [8] imaging modes. Time-correlated single photon counting (TCSPC) has been used in combination with two-photon laser scanning microscope to deliver clear images of deep tissue layers. Importantly, the lifetime value measured for each pixel and displayed a contrast by FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy) is a property of individual fluorescent molecules and is therefore largely independent of fluorophore concentration and photobleaching. These measurements

are generally absolute. Fluorescence lifetime imaging microscopy is a very sensitive detector for any environment changes surrounding the fluorophore. In previous study based on GFP fluorescence intensity in the presence of strong auto-fluorescence background [9], gene expression into chondrocytes *in vivo* after electro-permeabilization of GFP was located in definite areas (superficial layer, middle and deep areas) indicating that the target tissue was transduced (electroporation) in its whole depth. In addition by FLIM, the emission of specific fluorophores or wild-GFP can be contrasted against a strong auto-fluorescence background as encountered in articular cartilage.

In the case of multi-labelling experiments, FLIM provides a discrimination of molecules on their different lifetimes (contrast image) whereas their emission spectra overlap (GFP variants). The emerging of new assay based on FRET measured by Time Resolved fluorescence (TR-FRET) have been developed for screening programs (drug targets, signal transduction, cellular function). Similarly, FLIM can also be used to visualize the lifetime distribution in particular the decrease of the donor fluorescence lifetime in a pair of fluorophore undergoing fluorescence resonance energy transfer (FRET).

In this work, we present a description of the combined spectral and temporal system and present images which demonstrate that the spectra and the lifetime of biological samples can be resolved and discuss a range of possible future applications in screening programs applied to bio-engineering (signalling cascades, cellular functions, protein–protein interactions, . . .)

Firstly, we developed a FLIM-FRET method to characterize the hemoagglutination based on the interaction of pairs fluorophores combined respectively to secondary antibody directed against the primary agglutinin mAb–Alexa488TM or located in the RBC membrane (DiI).

Secondly, we used FLIM to deliver contrast lifetime images of different GFP variants used as a reporter of gene expression in chondrocytes because the discrimination of these GFP mutants by spectral imaging is hampered, by a high degree of spectral overlap with chondrocyte autofluorescence, low quantum efficiencies and extinction coefficients, or rapid photobleaching.

2. Material and methods

2.1. Sample preparation

2.1.1. FRET experiment on red blood cells

Fresh blood samples were collected from healthy donors by venepuncture in sterile vials containing EDTA as anticoagulant, stored at 5°C and analyzed within 24 hours. RBC was washed three times with phosphate buffered saline (PBS). A 2% suspension of RBC in PBS has been labeled with 3,3'-diiodoacetylcarbocyanine perchlorate (DiI, 2.15 mM, Molecular Probes). The DiI-RBC were agglutinated in the presence of mAb and revealed by secondary antibody combined to Alexa488TM. This is a donor (Alexa-488TM)–acceptor (DiI) couple in a Forster resonance energy transfer process (FRET), whereby the fluorescence of the donor is quenched by the acceptor whose fluorescence is enhanced provided these fluorophores are in close proximity and the fluorescence of the donor overlaps the absorption spectrum of the acceptor.

As primary antibodies we used four anti-GP specific mouse monoclonal antibody (mAb) (Table 1) provided by Dr. Blanchard (EFS Nantes, France). Briefly, 50 μ l of 2% RBC suspension were incubated at 37°C with 50 μ l of primary antibody. After 30 min of incubation, the samples were washed twice. Then, 50 ml of diluted secondary antibody combined with Alexa-488TM (goat anti-mouse IgG, Molecular Probes A-11001) were added and incubate at 20°C for 30 min. Finally, after washing twice with PBS,

Table 1

Anti-glycophorin specific mouse monoclonal antibody. RBC samples were prepared in similar form to the recommended protocol by 4th International Workshop on Monoclonal Antibodies against Human Red Blood Cells and Related Antigens, Paris, July 2001

Antibody	Code	Concentration $\mu\text{g/ml}$	Culture supernatant	Clone	Epitope
anti-GPA+B	3-16	55	Mouse IgG1	NaM167-8A2	GPA: 1–9 (weak) GPB: 1–9
anti-GPA	3-17	43	Mouse IgG2b	NaM228-2E2	GPA: 34–38 GPB: (weak)
Anti-GPA+B	3-46	65	Mouse IgG1	NaM26-3F4	GPA: 49–52 (weak) GPB: 34–37
Anti-GPA+B	3-47	5.3	Mouse IgG2a	NaM10-6G4	GPA: 38–43

the RBC was suspended in PBS containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) for subsequent FRET measurement (spectral and FLIM).

2.1.2. GFP variants

Isolation and culture of chondrocytes. Normal articular cartilage was obtained from Wistar male rats (180–200 g, Charles River, France) killed under anesthesia (ketamine 50 mg kg⁻¹, (Rhône-Mérieux) and acepromazine (1.25 mg kg⁻¹) (Sanofi Santé Animale). After joint surgery, articular cartilage pieces were aseptically dissected from femoral head caps and chondrocytes were obtained by sequential digestion with pronase (2 mg/ml) and collagenase B (1.5 mg/ml) (Roche Molecular Biochemical). The cells were washed two times in phosphate-buffered saline (PBS) and cultured to confluence in 25-cm² flasks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The medium used was DMEM/Ham's F-12 supplemented with L-glutamine (2 mM), gentamicin (50 $\mu\text{g/ml}$), amphotericin B (0.5 $\mu\text{g/ml}$), and heat-inactivated fetal calf serum (10%) (Invitrogen). Cells used at passage 2 or 3. In all experiments, chondrocytes were cultured under low FCS conditions (5%, v/v) and used at confluence.

Transfection of rat chondrocytes. Transfection of rat chondrocytes was performed with polyethylenimine (PEI) reagent (Exgen 500, Euromedex). Briefly, chondrocytes were seeded in 24-well plates in DMEM/F12 with 5% FCS at 37°C in 5% CO₂. For each well, at 70% confluence, chondrocytes were transfected with the expression vectors (500 ng of plasmid DNA; respectively, pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO, pSecTag/eGFP/FRT/V5-His-TOPO, and pSecTag2A/EYFP) according to manufacturer's recommendations during 3 hours. The mixture was removed and chondrocytes were seeded in DMEM/F12 during 48 hours. After 48 h transfection, chondrocytes were fixed with 4% paraformaldehyde, and placed between two slides in a mounting medium for microscopy analysis.

2.2. Single-photon confocal microscopy

For the image series and spectra measurement, a Leica TCS SP2 equipped with an acousto-optical beamsplitter (AOBS) was used. Excitation was achieved by the 488 nm line from an Ar laser (GFP variant, Alexa 488TM) and the 543 nm line from an HeNe laser (DiI). The bandwidths of the detected fluorescence wavelengths have been optimized for each probe (Alexa488TM/diI) or GFP variants (GFP, eGFP, YFP) to the maximum emission. All photomultipliers used were adjusted to the same sensitivity (gain/offset). We employed a 1.32 numerical aperture oil immersion lens (Leica 63 \times , Planapo, Wetzlar, Germany). Three-dimensional images of reconstituted tissues were either compiled into a single view projection using LCS3D image processing software (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) or compiled into a 3D projection using Imaris reconstruction software (Bitplane).

2.3. Two-photon microscopy

For two-photon excitation, we used a mode-locked Ti:sapphire laser (Coherent, Mira 900F) pumped by an 8 W argon-ion laser (Coherent, Verdi) which delivers a pulse width from 120 fs with a repetition rate of 76 MHz. The power of the excitation light in the focus was measured as about 5 mW. The detection was performed in a non-descanned mode (NDD-PMT).

2.4. FRET

Fluorescence resonance energy transfer, as described by Förster's theory, explains FRET as a dipole-dipole interaction between neighboring molecules and derives the dependence of the energy transfer efficiency E on their actual proximity R [10]. The direct non-linear dependence between E and R is described as: $E = 1/[1 + (R/R_0)^6]$ with R_0 the distance between the donor (Alexa488TM) and acceptor (DiI) for $E = 0.5$. The properties of Alexa488TM/DiI pair including acceptor quantum yield, spectral overlap between DiI-emission and Alexa488TM-excitation and the relative spatial Alexa488TM-DiI orientation are reflected by R_0 . E can be obtained directly from the experiment as $E = 1 - I_{\text{Alexa488}^{\text{TM}}\text{-DiI}}/I_{\text{Alexa488}^{\text{TM}}}$ with $I_{\text{Alexa488}^{\text{TM}}\text{-DiI}}$ the fluorescence intensity of the donor in the presence of the acceptor and $I_{\text{Alexa488}^{\text{TM}}}$ the fluorescence intensity of the donor alone. In single-photon mode at 488 nm, the donor (Alexa488TM) emission at 520 nm or, in case of FRET, the acceptor (DiI) emission at 570 nm could be separated easily using an acousto-optical beamsplitter (AOBS). First cells were excited at 488 nm and donor (520 nm) and acceptor (570 nm) emission was determined. To determine the amount of DiI present in sample, cells were excited at 543 nm. The spectra analysis cannot solve the problems due to the donor bleaching and FRET was measured by the decrease in donor fluorescence intensity (spectra) but also in lifetime (FLIM) by the presence of acceptor.

2.5. FLIM

For lifetime imaging, SPC-730 TCSPC Imaging module (Becker&Hickl, Berlin) was interfaced (signals, Pixel Clock, Frame Sync) to the scan controller of the Leica TCS-AOBS multiphoton laser scanning microscope. The PMT was typically built-in the microscope attached to the non-descanned port without discrimination for the different emission wavelengths of the different probes. The decay analysis measured by time-correlated single photon counting was performed using the SPCImage software (Becker&Hickl GmbH). The instrument response function was measured on erythrosine (full-width-half-maximum = 220 ± 15 ps) and used for deconvolution.

3. Results and discussion

3.1. FLIM-FRET on red blood cells

For FRET revealed in single-photon confocal microscopy, the excitation wavelength was adjusted to minimize the direct excitation of the acceptor (DiI) by the donor excitation at 488 nm. For 3-17 mAb (Anti-GPA), the proximity requirement for the occurrence of FRET cannot be met upon excitation at 488 nm (energy transfer efficiency, $E = 0\%$) as shown in Fig. 1 which displays the fluorescence spectrum without acceptor emission at 565 nm. The FRET from Alexa-488TM to DiI was found for 3-16 mAb ($E = 67\%$) with detection of fluorescence from acceptor. For 3-46 ($E = 8\%$) and 3-47 mAb

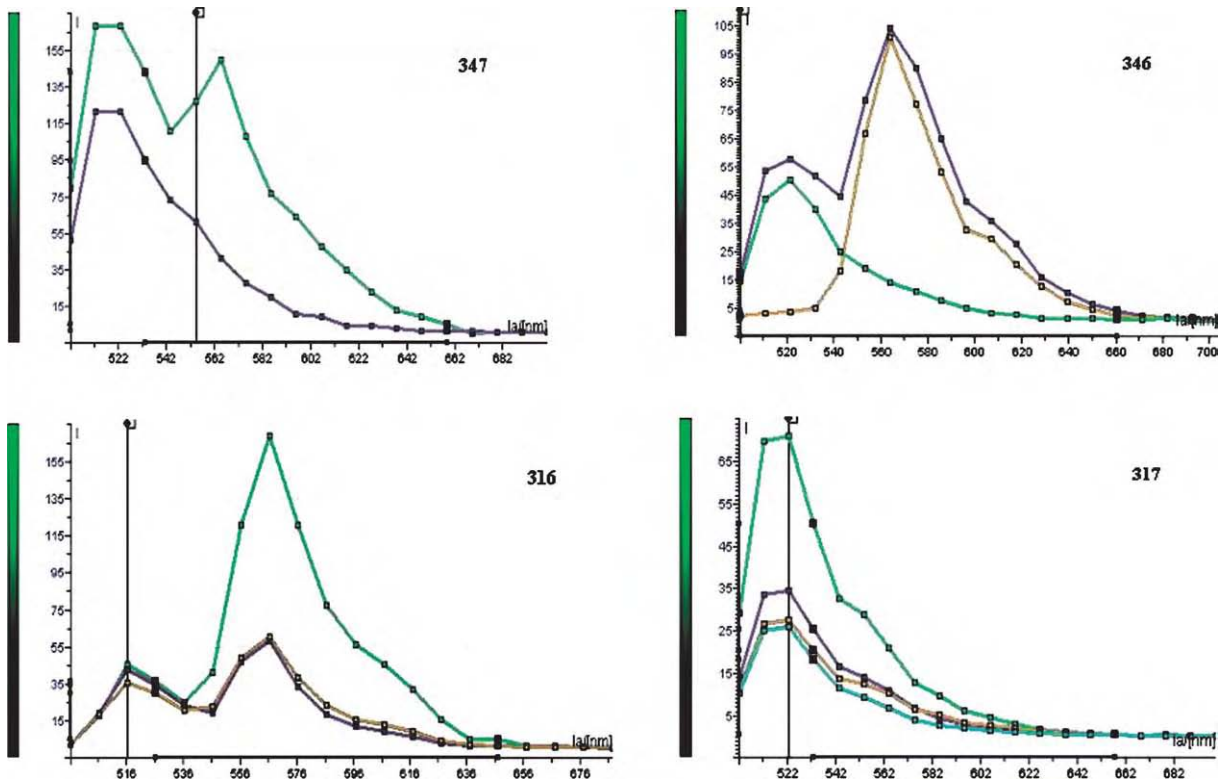


Fig. 1. Fluorescence spectra of RBC stained with DiI, then agglutinated with different anti-glycophorin A (3-17 and 3-47) or anti-glycophorin B (3-16 and 3-46) antibodies and revealed by secondary IgG antibody combined to Alexa-488TM.

($E = 5\%$), the spectra analysis cannot solve the problems of spectral contaminations that arise in steady-state (intensity) measurements, as specific detection of fluorescence alone from donor (without acceptor excitation) or acceptor (without detection of fluorescence from unpaired donor).

The reduced lifetime of Alexa-488TM (indirectly combined to 3-16 and 3-46 mAb) indicates a molecular interaction with DiI incorporated in the RBC membrane (Fig. 2). The proximity requirement for the occurrence of FRET was not met for the 3-47 and 3-17 mAb.

3.2. FLIM of GFP variants

Under single-photon excitation, the fluorescence spectra of wild-type GFP and variants shows respectively a strong emission band at 509 nm for GFP, at 507 nm for eGFP and at 530 nm for EYFP. These spectra are similar under two-photon excitation at respectively 880 nm for GFP, 900 nm for eGFP and 920 nm for YFP (Fig. 3) and the cell autofluorescence exhibits negligible emission. The 2P-fluorescence specifically due to GFP and its mutants in transfected cells was observed to be slightly weaker than in 1P-fluorescence in which autofluorescence was increased (Fig. 4). By FLIM, the fluorescence decays of GFP, eGFP and YFP were best described as a single-exponential fit with $\tau_{\text{GFP}} = 2.4 \pm 0.1$ ns, $\tau_{\text{eGFP}} = 2.1 \pm 0.1$ ns and $\tau_{\text{YFP}} = 3.6 \pm 0.2$ ns. These results are in agreement with Pepperkok et al. [11]. We used the τ information to create a mask for segmentation of lifetime images, as shown for eGFP (Fig. 5) and the emission of specific eGFP can be contrasted against an auto-fluorescence background.

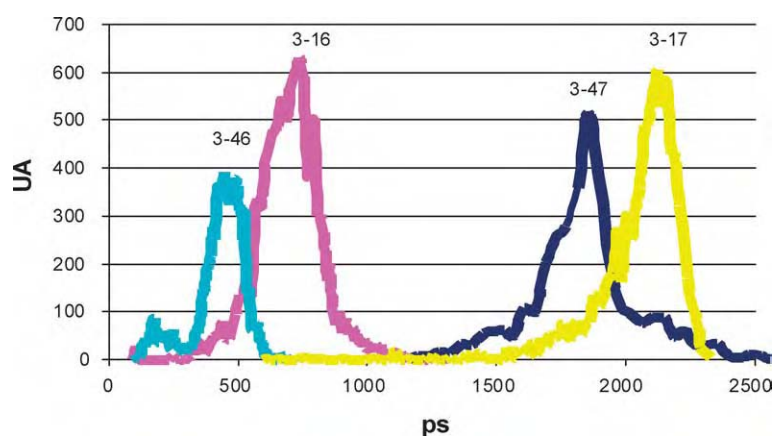


Fig. 2. Fluorescence lifetime microscopy. Temporal histogram depicting the Alexa-488TM fluorescence lifetime distribution. When the Alexa-488TM fluorophore is combined to secondary mAb (IgG), its average fluorescence lifetime is in the nanosecond range (1.7–2.2 ns) but upon transferring energy (FRET), it may drop in picoseconds (350–750 ps).

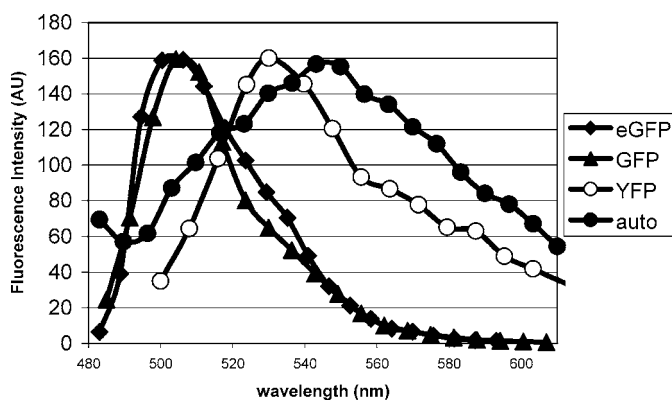


Fig. 3. Normalized fluorescence spectra in two-photon fluorescence of GFP (λ_{ex} : 880 nm), eGFP (λ_{ex} : 900 nm) and YFP (λ_{ex} : 920 nm) used as a reporter of gene expression in chondrocytes and showing the overlap with the undesirable chondrocyte fluorescence ($\times 10$).

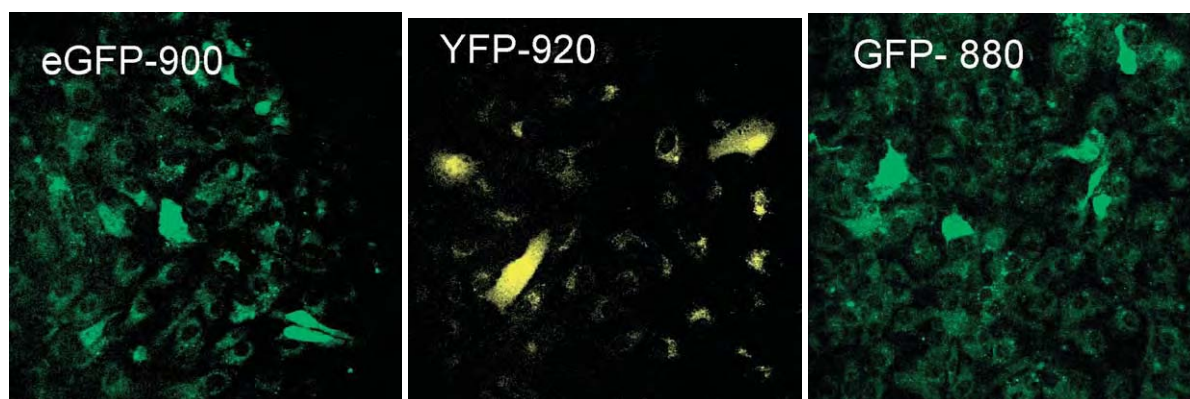


Fig. 4. Multiphoton excitation and expression of GFP (880 nm), EGFP (900 nm) and YFP (920 nm) vector transfected *in vitro* in chondrocytes from articular cartilage. The fluorescence detection channel was set to the following ranges: GFP and eGFP: 490–510 nm, YFP: 520–540 nm.

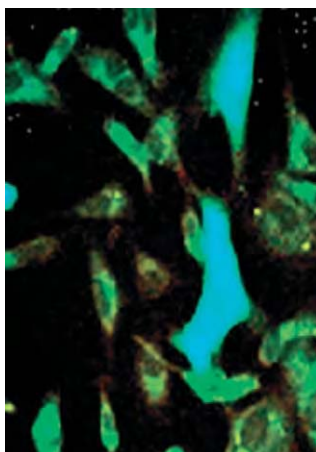


Fig. 5. Fluorescence lifetime imaging of EGFP vector transfected *in vitro* in chondrocytes from articular cartilage. Following Two-photon excitation (900 nm), the fluorescence decay of eGFP consisted in a major component (2.1 ± 0.1 ns) used to generate a mask for segmentation and to contrast the eGFP expression specifically against the cell autofluorescence.

4. Conclusion

4.1. RBC FRET

In view of the fluorescence properties depicted in RBC for the pair of fluorophore Alexa-488TM (donor) and DiI (acceptor), it may be expected that upon agglutination of RBC, effective FRET should be observed, whereby the fluorescence of the donor is quenched (with reduced lifetime) by the acceptor in close proximity whose fluorescence is enhanced (at 565 nm). Figure 2 demonstrates upon excitation at 780 nm the FLIM-FRET from Alexa488TM to DiI for the 3-16 and 3-46 mAbs only with a lifetime distribution in the picosecond range. Similarly, effective FRET was not observed for the 3-17 and 3-47 mAbs. The interaction of RBC surface glycoprotein and the receptor clustering and changes in their conformation could be resolved by these methods.

4.2. GFP variants

For transfection (PEI) in chondrocytes, several variants of GFP have been used that have differences in spectral characteristics to make them more suitable for specific purposes, as to improve the sensitivity of GFP detection by tuning the excitation (multiphoton) and emission spectrum, to provide a higher quantum yield (affected by pH, temperature, ions, . . .). The ability to distinguish fusion proteins labelled with different GFP variants opens up the possibility of multi-labelling imaging experiments in live cells. Discrimination of these co-expressed GFP variants by spectral imaging (wavelength) could be hampered by a high degree of spectral overlap with autofluorescence, low quantum efficiencies and extinction coefficients, or rapid bleaching.

5. Conclusion

To conclude, Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) is a powerful technique as a good indicator of close proximity in protein–protein interactions by FRET. Combined intensity (spectral) and

lifetime (FLIM) imaging was used to discriminate the signal of molecules on their different lifetimes whereas their emission spectra overlap as independent phenomena of the fluorophore concentration and photobleaching.

Acknowledgements

The author is grateful to the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and “Région de Lorraine” for financial support.

References

- [1] W. Denk, J.H. Stricklen W.W. Webb, Two-photon fluorescence scanning microscopy, *Science* **2** (1990), 248–273.
- [2] D. Dumas, L. Grossin, G. Cauchois, M. Gentils and J.F. Stoltz, Comparison of wide-field/deconvolution and confocal microscopy in bioengineering. Interest of multi-photon microscopy in the study of articular cartilage, *Biorheology* **40** (2003), 253–259.
- [3] A. Diaspro and M. Robello, Two-photon excitation of fluorescence for three-dimensional optical imaging of biological structures, *J. Photochem. Photobiol.* **55** (2000), 1–8.
- [4] H.J. Koester, D. Baur, R. Uhl and S.W. Hell, Ca²⁺ fluorescence imaging with pico-anf femtosecond two-photon excitation: signal and photodamage, *Biophys. J.* **77** (1999), 2226–2236.
- [5] D. Dumas, S. Muller, J.J. Padilla, V. Latger, S. Woodard, M.C. Carré, W. Blondel, F. Baros, M.L. Viriot and J.F. Stoltz, New trends in optical bioengineering: applications to cell biology, *Recent Res. Devel. Optical Engg.* **2** (1999), 295–315.
- [6] B. Pinsky, J. Ladasky, J.R. Lakowicz, K. Berndt and R.A. Hoffman, Phase-resolved fluorescence lifetime measurements for flow cytometry, *Cytometry* **14** (1993), 123–135.
- [7] R. Sanders, A. Draaijer, H.C. Gerritsen, P.M. Houpt and Y.K. Levine, Quantitative pH imaging in cells using confocal fluorescence lifetime imaging microscopy, *Analytical Biochemistry* **227** (1995), 302–308.
- [8] T. French, P.T. So, D.J. Weaver, T. Coelho-Sampaio, E. Gratton, E.W. Voss and J. Carrero, Two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy of macrophage-mediated antigen processing, *Journal of Microscopy* **185** (1997), 339–353.
- [9] L. Grossin, C. Cournil-Henrionnet, L.M. Mir, B. Liagre, D. Dumas, S. Etienne, C. Guimgamp, P. Netter and P. Gillet, Direct gene transfer into articular cartilage by in vivo electroporation, *FASEB J.* **17** (2003), 829–835.
- [10] I. Majoul, M. Straub, R. Dufen, S.H. Hell and H-D. Söling, Fluorescence resonance energy transfer analysis of protein–protein interactions in single living cells by multifocal multiphoton microscopy, *Reviews in Molecular Biotechnology* **82** (2002), 267–277.
- [11] R. Pepperkok, A. Squire, S. Geley and P.I. Bastiaens, Simultaneous detection of multiple green fluorescent proteins in live cells by fluorescence lifetime imaging microscopy, *Current Biology* **9** (1999), 269–272.

Local induction of heat shock protein 70 (Hsp70) by proteasome inhibition confers chondroprotection during surgically induced osteoarthritis in the rat knee

Stéphanie ETIENNE*, Nadège GABORIT*,
Christel HENRIONNET, Astrid PINZANO, Laurent GALOIS,
Patrick NETTER, Pierre GILLET[†] and Laurent GROSSIN

UMR 7561 CNRS - Nancy Université,
Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires
Faculté de Médecine, Avenue de la Forêt de Haye
BP 184, F 54505 Vandœuvre lès Nancy, France

* *Equal contribution to this work*

[†] *corresponding author* : p.gillet@chu-nancy.fr

ABSTRACT

Aim. to determine if chondrocytic Hsp70 induction, via intra-articular injections of a reversible proteasome inhibitor (MG132), can protect articular chondrocytes from cellular death in experimental rat OA knee induced surgically by anterior cruciate ligament transection (ACLT).

Materials and Methods. ACLT was performed on D0. Histological lesions in naive (sham) controls (ACLT+saline) and treated (ACLT+MG132) rats were assessed on D28 according to Mankin's score. Repeated intra-articular injections (1.5µM MG132 or saline) were performed on D-1, D7, D14 and D21. Rats were sacrificed sequentially on D7, D14 and D28. Detection of active caspase-3 and protein expression of Hsp70 was also determined on D28 by immunostaining methods.

Results. MG 132 significantly reduced OA lesions on D28 in the MG132 treated group. The expression of Hsp70 increased 11-fold in the MG132-treated group versus 2-3-fold in ACLT-control rats on D28. Concomitantly, cells expressing caspase-3 increased 4-fold in ACLT model and decreased 2-fold with MG132 treatment.

Conclusions. Intra-articular induction of Hsp70 by MG132 could be a safe and interesting tool in chondrocytes protection from cellular injuries and thus might be a novel chondroprotective modality in rat OA.

Osteoarthritis (OA) is characterized by a gradual degradation of extracellular matrix, resulting from an excess of chondrocyte cell death, mainly due to an increase in apoptosis. Pharmacological treatment of OA is comprised of analgesics, NSAIDs, chondroregulators such as glucosamine and chondroitin sulphate, local treatment such as with capsaicin or topical anti-inflammatories, and intra-articular therapy such as with glucocorticoids and hyaluronic acid. Unfortunately, there is still no way to stop the progress of osteoarthritis once it starts corrupting joints [1]. Treatment remains symptomatic, focusing on strategies to reduce pain and disability [2]. Future efforts to develop disease-modifying therapies may be based on ongoing research into dissecting biochemical processes of the disease. With this in mind, the apoptosis of chondrocytes (or programmed cell death) seems to be a potential target for therapeutic interventions in OA [3].

Recent studies have revealed an important role of HSP70 induction or surexpression in protecting chondral cells from stressful stimuli [4]. Therefore, overexpressing HSP70 in chondrocytes could represent a good strategy to prevent cytotoxicity [5], apoptotic chondrocytic events and ancillary extracellular matrix destruction [6]. Proteasome inhibitors (PIs, e.g. MG132) inhibit one of the major pathways of intracellular proteolysis – adenosine triphosphate (ATP) dependent ubiquitin-proteasome proteolytic pathway [7] and are thus well-known pharmacological tools used to induce HSPs [8, 9]. In addition, previous works

conducted with MG132 demonstrated anti-inflammatory properties in the rat sepsis [10] and chondroprotective potentialities during the mono-iodo-acetate induced OA in rat knee [11].

This study was thus designed to show whether in vivo intra-articular administration of the reversible proteasome inhibitor MG-132 was safe and able to protect hyaline cartilage during the mechanical experimental rat knee OA induced by anterior cruciate ligament transection (ACLT).

MATERIALS AND METHODS

Animals. Male Wistar rats weighing 150 g (Charles River Laboratories) were housed in solid-bottomed plastic cages designed to allow easy access to standard laboratory food and water *ad libitum*. Rats were kept in a 12:12 light-dark cycle (light-on period, 6:00 am–6:00 pm) in a controlled temperature chamber. All experiments were performed in adherence to the International Guidelines on the Use of Laboratory Animals.

Induction of ACLT. As we previously described [12], rats underwent an ACLT (D0) under anaesthesia (*i.p.* injection of a mixture of acepromazine 1.25 mg/kg + ketamine 38 mg/kg). A para-patellar skin incision was performed on the medial side of the right knee joint, and thereafter on the medial side of the patellar tendon. Patella was then dislocated laterally to provide access to the joint space and ACL was transected in the flexed knee. A positive anterior drawer test validated complete transection of the ligament. The joint was then irrigated with sterile saline to avoid ancillary inflammatory process, and a purpose-made suture was processed.

Treatment procedure. As a proteasome inhibitor we used MG-132 (Z-Leu-Leu-Leu-al; Sigma chemicals, St. Louis, MO, USA) that has been shown to inhibit proteasome in living rodents and to induce Hsp70 production in a dose-dependant manner [11]. MG-132 was dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO), diluted with physiologic saline to 1 ml and administered intra-articularly (*i.a.*; 1.5 μ M, 50 μ l) through the infrapatellar ligament (D-1, D7, D14, D21). Preliminary internal results (data not shown) have demonstrated that such repeated *i.a.* injections of 1.5 μ M of MG132 were not chondrotoxic and had no influence on patellar chondrocytic metabolism. On the other hand, they induce on D28 a 2-fold induction of Hsp70 expression as demonstrated with immunohistology. Additionally, there was no concomitant Hsp70 induction at a distance, as demonstrated by RTPCR of rat spleen, liver and kidneys.

Histological assessment. On various days (D7, D1, D28) after ACLT transection rats were killed and the whole knee joints were fixed immediately with 10% (v/v) formalin, decalcified, and embedded in paraffin. Sagittal sections were prepared and stained with hematoxylin–eosine–safran, toluidine blue or Sirius red. The severity of OA lesions was graded by 2 independent observers in a blind manner, using a modified form of Mankin's score [13]. Three groups were simultaneously assessed: sham rats (naive), ACLT (controls) and ACLT-MG 132 pre-treated rats (treated).

Immunohistochemistry. Immunohistochemistry was performed on the serial paraffin sections as previously described [12]. Tissue sections were deparaffinized and rehydrated. The sections were pre-treated with chondroitinase ABC (0.25 U/ml in PBS, pH 8.0; Sigma, St. Louis, MO, USA) for 90 min at 37°C. Permeability was enhanced by using 0.3% Triton X-100 in PBS (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 30 min. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubating sections with freshly prepared 3% hydrogen peroxide (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 30 min. Non-specific staining was blocked by incubation of the sections with

blocking serum supplied by Novostain superABC kit (Novocastra, Newcastle, UK) for 60 min.

Sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies in a humidified chamber. A biotin-labelled goat anti-rabbit IgG (Novostain superABC kit) was used as a secondary antibody for 45 min. A biotin-avidin detection system (Novostain superABC kit) was used according to the manufacturer's recommendations. The peroxidase was detected using liquid diaminobenzidine substrate kit (Novocastra, Newcastle, UK). After counterstaining with methyl green, slides were dehydrated and mounted with Eukitt (Labonord, France). The primary antibodies used in this study were: rabbit polyclonal active Caspase 3 antibody (R & D Systems, Abington, U.K.) diluted at a ratio of 1:300 and rabbit polyclonal Hsp70 antibody (StressGen Biotechnologies, Victoria, Canada) diluted at a ratio of 1:300.

The presence of antigen was estimated by determining the number of specific chondrocytes staining positive in the superficial zone (superficial and upper intermediate cartilage layers) and in deep zone (lower intermediate and deep layers). Each zone was divided into 4 different sections. The cell count scores were determined separately for the medial and lateral sides of condyles and plateaus. The total number of chondrocytes and the number of chondrocytes staining positive for the specific antigen were determined at 40× magnification for the superficial and the deep zones, respectively..

Statistics. Data are expressed as mean ± standard error of the mean (s.e.m.). One-way ANOVA followed by a Student's t test was used to determine the statistical significance of the differences between ACLT group versus naïve sham rats and ACLT rats pre-treated with i.a. MG132. P values lesser than 0.05 were considered significant. A total of 60 rats were used in this study.

RESULTS

Articular cartilage from the sham-operated knee joints remained histologically normal throughout the experiment. Articular cartilage from the sham-operated knee joints was histologically normal throughout the study. In ACLT rats, histological score progressively increased. On D7, a mild transient synovitis inherent to the surgical procedure of arthrotomy was noted. Structural alterations appeared in the ACLT group, predominating in the medial condyle. Slight proteoglycan depletion and diffuse hypercellularity were present in all compartments. On D14, condyle lesions were stable.

Structural alteration of cartilage increased in medial and lateral tibial plateaus. This tibial alteration consisted of clefts to radial zone, leading in some cases to bone exposure. A dramatic decrease in cellularity was observed in the whole cartilage. Proteoglycan depletion was stable and the fibrosis persisted. On day 28, degenerative lesions were homogeneous in all compartments (plateaus and condyles). Mirror-image lesions were observed specially in the medial compartment. Subchondral remodelling was more pronounced at this stage.

Repeated intra-articular injections of MG132 (1.5µM) exerted a significant chondroprotective effect as depicted on Mankin's score. Interestingly, an histological anti-inflammatory effect of MG132 was observed on fibrous synovitis.

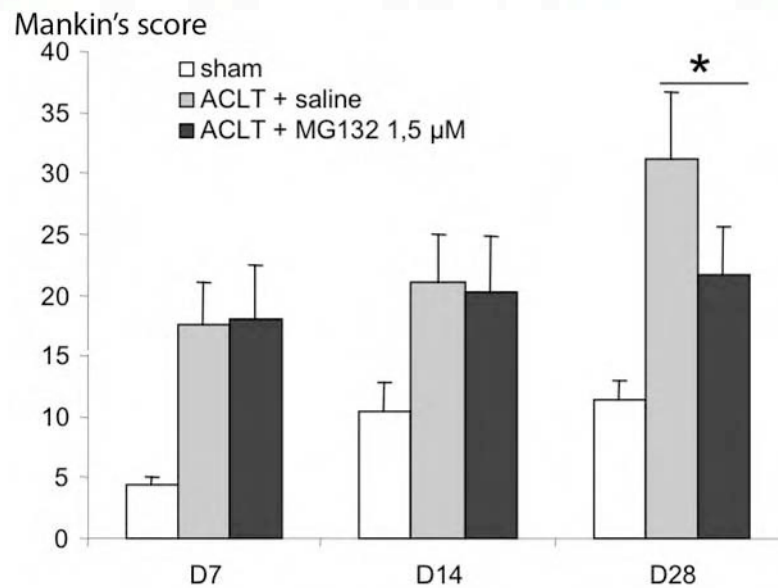
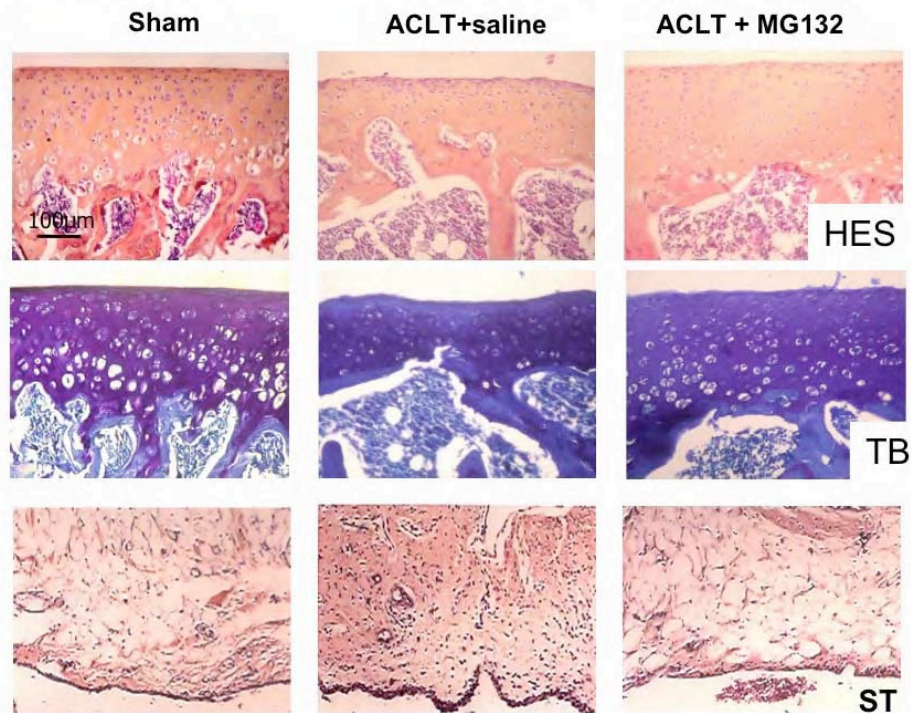


Figure 1: Characterization and time course of Histological lesions in ACLT rats.

Top: Typical chondral lesions in the control group (ACLT+saline) versus naive (sham) rats with hypocellularity on HES (hematoxylin eosin saffron) staining and matricial alterations on TB (toluidin blue) staining. Note an hyperplasia of the synovial tissue (ST) in OA (ACLT) rats. Repeated intra-articular injections of MG 132 (1.5 µM) lessened the severity of both chondral lesions and synovitis.

Bottom: Histological grading of OA lesions in the 3 groups demonstrating the chondroprotective effect of MG132.

Magnificationx100; n=5 rats per group on D7 and D14, n=10 rats/group on D28.

Data are mean ± sem. *: <.05 versus control rats (ACLT+saline)

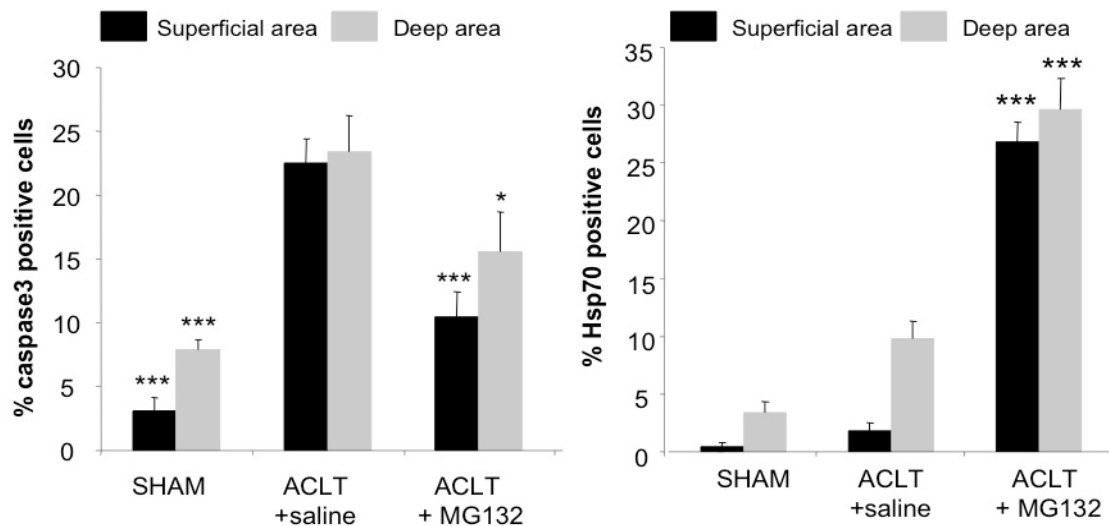


Figure 2: Immunostaining of Caspase 3 and Hsp 70 in naive, OA and MG132 pretreated rats at D28. n=10 rats/group. Data are mean±sem. *: <.05, **<.01, ***<.001 versus control rats (ACLT+saline)

Apoptosis (according to caspase 3 immunostaining [13]) was more frequent in rat OA cartilage than in nonarthritic control cartilage in both models: 4-5-fold in ACLT-induced OA (Fig. 2) versus age- and model-matched controls. One-way ANOVA showed that the differences between OA and control groups were highly significant ($p < 0.05$). The basal level of apoptosis in controls was inherent to the maturation process and physiological enchondral ossification in the deep layer in these young animals. Besides, Hsp70 immunostaining was slightly, but non significantly enhanced in ACLT group (5-10%) vs control group (3-5%). As expected, in the MG 132 pre-treated group, a dramatic overexpression of Hsp70 (5 fold versus saline) was present in both superficial and deep areas. This overexpression was accompanied by a concomitant significant decrease of chondral apoptotic events.

DISCUSSION

The aim of this study was to evaluate the chondroprotective effect of MG132, a transient inhibitor of the proteasome pathway, in a mechanical experimental OA model in the rat. In fact, numerous reports have described both pro and antiapoptotic properties of a variety of proteasome inhibitors (PIs) in a dose- or cell-dependant manner [14]. In general, inhibition of the 26S proteasome elicits either an anti-apoptotic effect interminally differentiated cells and non-rapidly dividing cells, or a pro-apoptotic process in fast-dividing cells. Besides, accumulation of abnormal or short-lived protein inside cell cytoplasm, due to the inhibition of the proteasome pathway, induces *de facto* the overexpression of stress proteins such as Hsp70 [9], exerting well known anti-apoptotic and cytoprotective properties.

The results presented herein confirm that chondrocyte exposure to a transient proteasome inhibitor led to such an overexpression of Heat shock proteins, mainly Hsp70, without any signs of chondrotoxicity *in vivo*. As we previously observed in mono-iodoacetate-induced OA in the rat [11], inhibition of proteasome pathway was able to protect chondrocyte cells from lethal stresses, even if the precise molecular cytoprotective mechanism was not clearly understood. This effect is believed to be similar to other heat shock proteins in behaving as a molecular chaperone and thus preventing denaturation and misfolding of cytoplasmic proteins.

This protective effect might also be due to the ability of proteasome inhibition to assist to the transfer of newly synthesized proteins into the mitochondria, thus helping to maintain overall mitochondria integrity, or, in an other way, by preventing apoptosis by inhibiting caspases activation. *In vitro*, the chondroprotective effect of MG132 against MIA toxicity seems to be essentially mediated by Hsp70. We have previously reported that a single intra-articular injection of MG132 in rat knee was able to induce Hsps overexpression (Hsp70 and Hsp27) in articular chondrocytes: this induction was detectable up to 48–72 hours after a single injection, and then decreasing to its basic level [11].

The interest of a reversible PI in altering the course of chondral lesions in experimental OA has been poorly previously assessed. PIs are potent inducers of Hsp70 and also exert by themselves anti-apoptotic properties [15]. Among them, MG132 exerts both anti-inflammatory [10] and anti-apoptotic [9] properties. This original concept appears as an interesting way to improve or reinforce chondrocytes to withstand against cellular stresses leading to cell death, and therefore, to cartilage degradation. Interestingly, in this model, apoptotic events also play a pivotal role in the establishment and progression of the disease [13], and its severity may be modulated by endogeneous HSP70 induction [12]. In this case, the dual effect of proteasome inhibitor on inflammatory synovial cells (synovitis) and apoptotic chondrocyte may be of a great interest, especially during OA flares. With this in mind, ia injection of MG132 should both improve chondrocytes resistance to apoptotic events and simultaneously sensitize highly proliferating synovial cells to apoptotic process.

Moreover, an increase of Hsp70 in synoviocytes and chondrocytes could present another interest, due to its ability to inhibit the NF κ B related transduction signal, pathway leading to the overexpression of proinflammatory cytokines (IL-1 β , TNF α , ...). Anti-inflammatory properties of Hsp70 have been demonstrated *in vitro* [16]. A number of studies have also shown that elevated HSP70 suppressed NF- κ B activity. However, its exact molecular basis is still enigmatic. Because phosphorylation and degradation of I κ B α are related to IKK, and the effect of IKK is counterbalanced by intracellular phosphatase activity, the net phosphorylated state of I κ B α is dependent on both IKK activity and phosphatase activity. On the other hand, the inhibitory effects of HSP70 on cytokine production does not seem to include effects on MAPK activity [17]. In the present study we observed a beneficial histological effect on knee synovitis (see Fig1), this inflammatory component being characteristic of this model, thus mimicking OA flare.

CONCLUSION

The PI bortezomib has been approved as a cytostatic drug for the therapy of multiple myeloma, and is currently being tested in clinical trials for a variety of other malignancies. At the same time, a growing number of animal studies suggest that PIs may also prove to be valuable remedies for the treatment of non-tumorous diseases [7]. HSP-70-mediated regulations of pro-inflammatory cytokine production may thus contribute to proteasome inhibitor molecules' beneficial effects, while reducing cytokine tissular toxicity associated with their unrestrained release. In the field of OA, single or repeated intra-articular injections of MG132, a transient PI, could increase chondrocytes viability in rendering articular cells less sensitive to pro-inflammatory cytokines [18] and their ancillary apoptotic signals. With this in mind, the combination of these anti-apoptotic and anti-inflammatory properties could delay the degradation of the extracellular matrix occurring during OA progression.

ACKNOWLEDGMENTS : Thanks are due to M Thiery for his good care to the animals and PE Poleni for his technical contribution in deciphering immunostaining. Authors have no conflict of interest. This work is part of S Etienne's memo of EPHE (Ecole Pratique des Hautes Etudes) and N Gaborit's PhD

REFERENCES

- [1] D.T. Felson and Y.J. Kim, The futility of current approaches to chondroprotection, *Arthritis Rheum*, **56** (2007), 1378-1383.
- [2] J.F. Wilson, To stop osteoarthritis, fixing cartilage may not be enough, *Ann Intern Med*, **147** (2007), 437-439.
- [3] H.A. Kim and F.J. Blanco, Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage, *Curr Drug Targets*, **8** (2007), 333-345.
- [4] D.A. Sawatzky, R. Foster, M.P. Seed and D.A. Willoughby, Heat-shock proteins and their role in chondrocyte protection, an application for autologous transplantation, *Inflammopharmacology*, **12** (2005), 569-589.
- [5] H. Tonomura, K.A. Takahashi, O. Mazda, Y. Arai, A. Inoue, R. Terauchi, M. Shin-Ya, T. Kishida, J. Imanishi and T. Kubo, Glutamine protects articular chondrocytes from heat stress and NO-induced apoptosis with HSP70 expression, *Osteoarthritis Cartilage*, **14** (2006), 545-553.
- [6] L. Grossin, C. Cournil-Henrionnet, A. Pinzano, N. Gaborit, D. Dumas, S. Etienne, J.F. Stoltz, B. Terlain, P. Netter, L.M. Mir and P. Gillet, Gene transfer with HSP 70 in rat chondrocytes confers cytoprotection in vitro and during experimental osteoarthritis, *FASEB J*, **20** (2006), 65-75.
- [7] P.J. Elliott and J.S. Ross, The proteasome: a new target for novel drug therapies, *Am J Clin Pathol*, **116** (2001), 637-646.
- [8] D. Doll, A. Sarikas, R. Krajcik and O. Zolk, Proteomic expression analysis of cardiomyocytes subjected to proteasome inhibition, *Biochem Biophys Res Commun*, **353** (2007), 436-442.
- [9] N. Awasthi and B.J. Wagner, Upregulation of heat shock protein expression by proteasome inhibition: an antiapoptotic mechanism in the lens, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **46** (2005), 2082-2091.
- [10] R. Safranek, N. Ishibashi, Y. Oka, H. Ozasa, K. Shirouzu and M. Holecek, Modulation of inflammatory response in sepsis by proteasome inhibition, *Int J Exp Pathol*, **87** (2006), 369-372.
- [11] L. Grossin, S. Etienne, N. Gaborit, A. Pinzano, C. Cournil-Henrionnet, C. Gerard, E. Payan, P. Netter, B. Terlain and P. Gillet, Induction of heat shock protein 70 (Hsp70) by proteasome inhibitor MG 132 protects articular chondrocytes from cellular death in vitro and in vivo, *Biorheology*, **41** (2004), 521-534.
- [12] L. Galois, S. Etienne, L. Grossin, A. Watrin-Pinzano, C. Cournil-Henrionnet, D. Loeuille, P. Netter, D. Mainard and P. Gillet, Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study, *Osteoarthritis Cartilage*, **12** (2004), 779-786.
- [13] A. Watrin-Pinzano, S. Etienne, L. Grossin, N. Gaborit, C. Cournil-Henrionnet, D. Mainard, P. Netter, P. Gillet and L. Galois, Increased apoptosis in rat osteoarthritic cartilage corresponds to degenerative chondral lesions and concomitant expression of caspase-3, *Biorheology*, **43** (2006), 403-412.
- [14] S. Meiners, A. Ludwig, V. Stangl and K. Stangl, Proteasome inhibitors: Poisons and remedies, *Med Res Rev* (2007).
- [15] Y.Y. Shi, G.W. Small and R.Z. Orłowski, Proteasome inhibitors induce a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent anti-apoptotic program involving MAPK phosphatase-1 and Akt in models of breast cancer, *Breast Cancer Res Treat*, **100** (2006), 33-47.
- [16] X.Z. Ding, C.M. Fernandez-Prada, A.K. Bhattacharjee and D.L. Hoover, Over-expression of hsp-70 inhibits bacterial lipopolysaccharide-induced production of cytokines in human monocyte-derived macrophages, *Cytokine*, **16** (2001), 210-219.
- [17] Y. Shi, Z. Tu, D. Tang, H. Zhang, M. Liu, K. Wang, S.K. Calderwood and X. Xiao, The inhibition of LPS-induced production of inflammatory cytokines by HSP70 involves inactivation of the NF-kappaB pathway but not the MAPK pathways, *Shock*, **26** (2006), 277-284.
- [18] P.J. Elliott, T.M. Zollner and W.H. Boehncke, Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy, *J Mol Med*, **81** (2003), 235-245.

Research lectures

Gene therapy in cartilage using electroporation

Laurent Grossin ^a, Nadège Gaborit ^a, Lluís Mir ^b, Patrick Netter ^{a,*}, Pierre Gillet ^a

^a UMR 7561 CNRS, Laboratoire de pharmacologie, faculté de médecine de Nancy, Université Nancy I, avenue de la Forêt-de-Haye BP 184, 54505 Vandœuvre-les-Nancy, France

^b UMR 8121 CNRS, Institut Gustave-Roussy, 39, rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France

Received and accepted 23 July 2003

Keywords: Gene therapy; Cartilage; Electroporation

Application of an electric field to administer medications is an old idea that is encountering new possibilities as a result of advances in microelectronics. Electrotransfer of medications is based on two mechanisms: (1) electricity can serve as a force that carries electrically charged agents and (2) electric pulses can increase cell membrane permeability. This last mechanism, called electroporation, relies on brief high-voltage electric pulses to create water pores in the cell membrane. Electroporation may be of considerable assistance for transferring macromolecules into cells, permeabilizing tumor cells to cytotoxic agents, and, above all, delivering DNA or oligonucleotides in non-viral gene therapy [1].

1. Electrotransfer in gene therapy

In vitro, the ability of electric pulses to increase cell membrane permeability is widely used to enhance the penetration of agents into cells. In gene therapy experiments, the optimal electroporation conditions for transfecting cells vary across cell lines and must be determined empirically. In simple terms, the electric pulses create cell membrane pores through which exogenous DNA can travel by electrophoresis. Transfection efficiency is governed by the strength of the electric field needed to create pores and by the duration of the pulses [2]. The electroporation conditions must strike the best possible compromise between optimal permeabilization and minimal cell injury.

In vivo, electroporation-enhanced gene delivery has been used for about 10 years. After a local injection of naked plasmid DNA, electric pulses are applied to the target tissue. This technique has many potential advantages [3].

- Since the DNA is injected locally, its degradation by nucleases and its immunogenic potential are limited.
- The DNA penetrates within the cytoplasm of the permeabilized cells; abundant evidence indicates that the DNA does not undergo insertion into the cell genome and that the likelihood of insertion is particularly small in cells with low division rates such as chondrocytes.
- Transfection occurs only in the cells exposed to the electric field, so that the treatment can be applied to a specific target. Thus, the risk of systemic dissemination is limited. Targeting can be made even more accurate by the use of inducible promoters (e.g. TetOn) and/or of organ-specific promoters (Coll II).
- Electrotransfer can be used for all tissue types, including the cartilage, where the transfected material can be made to cross the extracellular matrix, a natural physical barrier to gene therapy.

Experimentally, transfection via electrotransfer has been achieved in vivo in many tissues [4] including the skin, liver, muscle, testis, arteries, kidney and various tumors. Early studies done with reporter genes showed that electroporation increased transfection efficiency 10–10 000-fold as compared to injection of naked plasmid DNA alone [5]. Prolonged (5–10 ms) medium-voltage (250–1000 V/cm) square pulses seemed to provide the highest yields.

For gene therapy of joint diseases, two strategies are generating special interest. In the “protein pump” strategy, a plasmid encoding an anti-inflammatory cytokine [6] or an anti-cytokine agent [7] is injected intramuscularly. The plasmid can be detected in the plasma for several weeks. The second strategy, which is the focus of our studies, involves intraarticular injection of negatively charged plasmid DNA followed by electroporation by means of electrodes placed on either side of the joint to target the cartilage (rat patella in our work).

* Corresponding author.

E-mail address: Patrick.Netter@medecine.uhp-nancy.fr (P. Netter).



Fig. 1. Electroporation of a rat knee. Under general anesthesia, 50 μ l of plasmid solution is injected into the knee (midline infrapatellar route). The electrodes are positioned on either side of the knee and used to deliver electric pulses.

2. Electroporation of a reporter gene in rat patellar cartilage

We studied the patellar cartilage, which is a superficial anatomic entity. First, we checked that electroporation did not induce damage to normal patellar cartilage in rats. To this end, we evaluated the incorporation of radio-labeled sulfur as a means of assessing metabolic damage and we obtained histological sections to examine cellularity, proteoglycan content, and the collagen network. We found electroporation to be safe. Consequently, we performed electrotransfer of a reporter gene into the patellar cartilage. A suspension of plasmid DNA encoding the reporter gene green fluorescent protein (GFP) was injected into the knee, and electrodes were then positioned on either side of the joint (Fig. 1). Square electric pulses were delivered (eight pulses of 20 ms each, 250 V/cm) while the animals were under general anesthesia.

Under these conditions, biodistribution of the transgene was noted in the various layers of the patellar cartilage 48 h after electroporation. Expression of the recombinant protein persisted at least 2 months [8] (Fig. 2). However, over time, the distribution of the transgene confined itself to a specific area of the cartilage, the hypertrophic chondrocytes, which are characterized by a high rate of metabolic activity. A study of the synovial membrane (Hoffa's ligament) showed minimal dissemination of the transgene to the adjacent tissues and a modest inflammatory effect (no synovitis, small increases

in IL-1 β and iNOS expression). These data indicate that electroporation holds considerable promise for conveying a therapeutic gene into chondrocytes through the surrounding compact extracellular matrix that hampers gene transfer by other viral or non-viral systems.

3. Electroporation of Hsp70 in patellar cartilage

In the second phase of our research program, we performed electrotransfer of a gene encoding a protein with anti-apoptotic effects, the heat shock protein 70 (Hsp70) [9]. Many studies suggest that apoptosis may contribute actively to the development of osteoarthritis. Healthy rats were subjected to electroporation using the above-described protocol with an expression vector previously shown to be functional in vitro in chondrocytes. This construct ensures expression of a fusion protein (Hsp70 plus GFP) (Fig. 3). An immunohistological method using two different anti-bodies allowed us to identify the patellar chondrocytes that expressed both recombinant proteins, i.e. that had incorporated the plasmid construct.

Transgene biodistribution was similar to that in the earlier experiments, with dissemination throughout the patellar cartilage after 48 h and expression confined to the hypertrophic chondrocytes after 1 month. Overexpression of the recombinant protein did not induce deleterious effects on the carti-

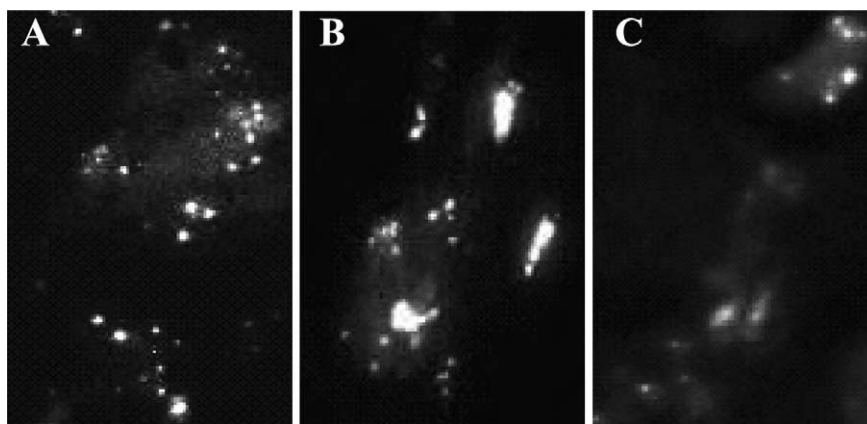


Fig. 2. Immunolocalization of GFP in the rat patella 48 h (A), 1 month (B), and 2 months (C) after electrotransfer of a plasmid encoding GFP (Cell Scan® light microscope, $\times 60$).

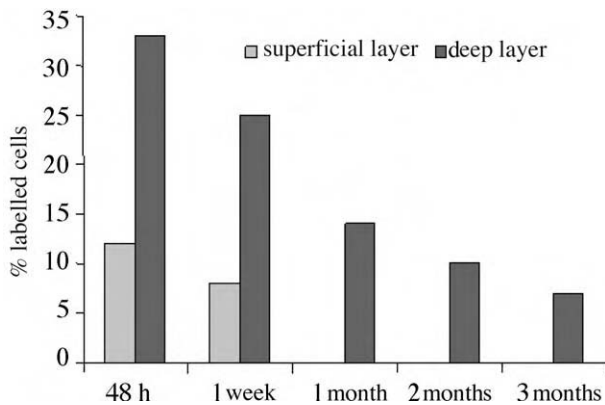


Fig. 3. Transgene expression kinetics in cartilage after electroporation in vivo in the rat knee. Biodistribution of GFP after transfection of the plasmid pcDNA3.1Hsp70/GFP (30 μ g by the intraarticular route).

lage: thus, no structural (histology) or metabolic (radiolabeled sulfur incorporation) abnormalities were found up to 3 months after electroporation. However, the anti-apoptotic effect of Hsp70 induced an increase in cellularity in the intermediate and deep layers in the rats expressing the transgene. Hsp70 overexpression in these layers seems to have decreased the apoptotic processes inherent in maturation (enchondral ossification involving apoptosis of hypertrophic chondrocytes).

The ability of Hsp70 to inhibit apoptosis was used in a rat model of arthritis induced by intraarticular injection of mono-iodoacetate. Preventive delivery of Hsp70 by electroporation diminished cartilage lesion severity in this model [10], in relation with a decrease in chondrocyte apoptosis.

4. Conclusion

Application of high-voltage electric pulses holds promise for delivering therapeutic genes to cartilage. Electroporation is a reliable and inexpensive technique that shares with elec-

trochemotherapy an ability to target the chondrocytes despite the barrier effect of the extracellular matrix and without using viral vectors.

Acknowledgements

This work received support from the GIP HMR AVENTIS (grant FR99RHU037) and the Lorraine region.

References

- [1] Niidome T, Huang L. Non-viral vectors. *Gene Ther* 2002;9:1647–52.
- [2] Gehl J. Electroporation: aspects and perspectives. *Acta Physiol Scand* 2003;177:437–47.
- [3] Preat V. Administration de médicaments et de gènes par électrotransfert. *Ann Pharm Fr* 2001;55:239–44.
- [4] Bigey P, Bureau MF, Scherman D. In vivo plasmid DNA electrotransfer. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:443–7.
- [5] Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, et al. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4262–7.
- [6] Saldenberg-Kermanac'h N, Bessis N, Deleuze V, Bloquel C, Bureau M, Scherman D, et al. Efficacy of interleukin-10 gene electrotransfer into skeletal muscle in mice with collagen-induced arthritis. *J Gene Med* 2003;5:164–71.
- [7] Kim JM, Ho SH, Hahn W, Jeong JG, Park EJ, Lee HJ, et al. Electro-gene therapy of collagen-induced arthritis by using an expression plasmid for the soluble p75 tumor necrosis factor receptor-Fc fusion protein. *Gene Ther* 2003;10:1216–24.
- [8] Grossin L, Courmil-Henrionnet C, Mir LM, Liagre B, Dumas D, Etienne S, et al. Direct gene transfer into rat articular cartilage by in vivo electroporation. *FASEB J* 2003;17:829–35.
- [9] Terauchi R, Takahashi KA, Arai Y, Ikeda T, Ohashi S, Imanishi J, et al. Hsp70 prevents nitric oxide-induced apoptosis in articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2003;48:1562–8.
- [10] Grossin L, Henrionnet C, Liagre B, Mir L, Dumas D, Etienne S, et al. Electric gene transfer of Hsp70 in rat patella protects in vivo from iodoacetate induced chondrotoxicity. *Arthritis Rheum* 2002;46(Suppl 9):S221 [Abstract 513].

Gene transfer with HSP 70 in rat chondrocytes confers cytoprotection in vitro and during experimental osteoarthritis

Laurent Grossin,* Christel Cournil-Henrionnet,*[†] Astrid Pinzano,* Nadège Gaborit,* Dominique Dumas,[‡] Stéphanie Etienne,* Jean François Stoltz,[‡] Bernard Terlain,* Patrick Netter,* Lluís M. Mir,^{†,1} and Pierre Gillet*^{1,2}

*Unité Mixte de Recherches 7561, Centre National de la Recherche Scientifique-Université Henri Poincaré Nancy 1, Faculté de Médecine, Vandoeuvre lès Nancy, France; [†]Unité Mixte de Recherche 8121 "Vectorologie et transfert de gènes" Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Gustave-Roussy, Villejuif Cedex, France; [‡]Unité Mixte de Recherches 7563 "Mécanique et Ingénierie cellulaire et tissulaire" (LEMTA), Centre National de la Recherche Scientifique, Université Henri Poincaré Nancy 1, Faculté de Médecine, Vandoeuvre lès Nancy, France

ABSTRACT Osteoarthritis is characterized by a gradual degradation of extracellular matrix, resulting from an excess of chondrocyte cell death, mainly due to an increase in apoptosis. Recent studies have revealed the essential role of HSP70 in protecting cells from stressful stimuli. Therefore, overexpressing HSP70 in chondrocytes could represent a good strategy to prevent extracellular matrix destruction. To this end, we have developed a vector carrying HSP70/GFP, and transduced chondrocytes were thus more resistant to cell death induced by mono-iodoacetate (MIA). To overcome the barrier-effect of matrix, we investigated the efficacy of plasmid delivery by electroporation (EP) in rat patellar cartilage. Two days after EP, 50% of patellar chondrocytes were HSP/GFP+. After 3 months, long-term expression of transgene was only depicted in the deep layer (20–30% positive cells). HSP70 overexpression inhibited the natural endochondral ossification in the deep layer, thus leading to a lesser decrease in chondrocyte distribution. Moreover, overexpression of HSP70, after a preventive EP transfer in rat patella, was sufficient to decrease the severity of osteoarthritis-induced lesions, as demonstrated histologically and biochemically. In conclusion, intracellular overexpression of HSP70, through EP delivery, could protect chondrocytes from cellular injuries and thus might be a novel chondroprotective modality in rat OA.—Grossin, L., Cournil-Henrionnet, C., Pinzano, A., Gaborit, N., Dumas, D., Etienne, S., Stoltz, J. F., Terlain, B., Netter, P., Mir, L. M., Gillet, P. Gene transfer with HSP 70 in rat chondrocytes confers cytoprotection in vitro and during experimental osteoarthritis. *FASEB J.* 20, 65–75 (2006)

Key Words: gene delivery • patellar cartilage • apoptosis • MIA

ARTICULAR CARTILAGE is a highly specialized and uniquely structured tissue that forms the smooth, glid-

ing surface of the diarthrodial joints. It consists of an extracellular matrix that is synthesized by the sparsely distributed resident cells, i.e., chondrocytes. Osteoarthritis (OA) is a typical slow degenerative disease of the joints characterized by fibrillation and erosion of hyaline cartilage, subchondral bone sclerosis and osteophyte formation at the joint margins, leading to a gradual loss of articular cartilage.

These changes result from poorly understood events (trauma, mechanical and biochemical injuries) occurring over a long period that leads to both cartilage matrix degradation and inhibition of matrix components synthesis. Cartilage hypo-cellularity also contributes to the development of clinical (1) or experimental (2) OA due to chondrocyte death by either apoptosis or necrosis (3). In fact, chondrocytes are critical to the OA process in that the progression of OA can be judged by the viability of chondrocytes and their ability to resist apoptosis. Thus, therapeutic strategies designed to modulate the imbalance between anabolic and catabolic pathways in OA may include inhibition of signaling pathways which result in apoptosis dependent on mature caspase activity (4).

One family of molecules, stress proteins, also called heat shock proteins (HSPs), are a highly conserved family of protein that promote cell survival during the apoptotic process (5). Among them, HSP70 is induced under various forms of stresses, e.g., thermal, biochemical (energy deprivation, free radical stress...) or biomechanical (6). HSPs play a protective role as molecular chaperones in cells by facilitating the folding, intracel-

¹ Equal seniorship.

² Correspondence: Unité Mixte de Recherches 7561, Centre National de la Recherche Scientifique-Université Henri Poincaré Nancy 1, Faculté de Médecine, Ave. de la Forêt de Haye, BP184, F-54505 Vandoeuvre lès Nancy, France. E-mail: Pierre.Gillet@medecine.uhp-nancy.fr

doi: 10.1096/fj.04-2889com

lular transport, assembly, and disassembly of other proteins. In addition, HSPs protect cells from oxidative damage both in vivo and in vitro and protect cells from either necrosis or apoptosis (7).

Concerning cartilage, some experiments have demonstrated that inducible HSP70 is overexpressed in early stages of OA and could be regarded as a protective phenomenon by the articular cartilage (8). In vitro, overexpression of HSP70 via gene delivery prevents nitric oxide-induced apoptosis in articular chondrocytes (9). In vivo, a preventive induction of chondrocytic HSP70 via intra-articular injection of MG132, a reversible proteasome inhibitor, diminishes the severity of mono-iodoacetate (MIA)-induced OA in rat knee (10). However, this protective effect may be contaminated by factors other than HSP70, because MG132 induces the increase of other anti cell death factor, e.g., HSP27.

To dissect direct role of HSP70 on cyto- and/or chondroprotection during experimental OA, we considered that a method to alter genetic information might be suitable. In this study, we first investigated in vitro the cytoprotective properties of HSP70 gene transfer against mono-iodoacetate (MIA)-induced chondrocyte cell death. Iodoacetate, a glycolytic inhibitor, is widely used to induce apoptotic and necrotic phenomena both in vitro (11) and in vivo (12), MIA destabilizing the functionality of mitochondria in chondrocytes by a decrease in the mitochondrial membrane potential, thus leading to the loss of the main source of ATP and energy of cartilage cells. Second, we investigated whether the in vivo electric gene transfer with HSP70 in rat patella could introduce overexpression of HSP70 in the cartilage and thus confer chondroprotection during MIA-induced experimental OA (13, 14). Previous work has established that EP provides an efficient approach for tissue targeted local cartilage expression, e.g., in rat patellar cartilage, with a relatively high and stable level of expression in spite of the density of extracellular matrix (15).

MATERIAL AND METHODS

In vitro studies

Plasmid construction

The coding sequence of rat inducible HSP70 (HSP70 i) was amplified by RT-PCR, using the forward primer 5'-AGCGA-CATGGCCAAGAAAACAGCG-3' and the reverse PCR primer 5'-CCAGAAAAGCCTC(C)AATCCACCTCC-3', which was mutated on the stop codon. The PCR product (1.946 kb) was visualized by electrophoresis on 1% agarose gel (ethidium bromide staining). The PCR fragment was extracted, purified, cloned into pcDNA_{3.1}/CT-GFP-TOPO vector (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) to express the PCR product fused to the GFP. Recombinant plasmid was transformed into competent cells (*E. coli* TOP 10, Invitrogen), and purified with "Plasmid mini kit" (Qiagen, Courtaboeuf, France). Recombinant plasmid was amplified with "Endofree Plasmid Maxi kit" (Qiagen) and plasmid sequencing was performed at

Genome Express (Grenoble, France) to confirm the orientation and the identity of HSP70i cDNA.

Isolation and culture of rat chondrocytes

Normal articular cartilage was obtained from Wistar male rats (175–200 g, Charles River Laboratories, l'Arbresle, France) killed under anesthesia (ketamine 50 mg·kg⁻¹ and acepromazine (1.25 mg·kg⁻¹). After joint surgery, articular cartilage pieces were aseptically dissected from femoral head caps and chondrocytes were obtained by sequential digestion with pronase (2 mg/mL) and collagenase B (1.5 mg/mL) (Roche, Meyland, France). The cells were washed two times in phosphate-buffered saline (PBS) and cultured to confluence in 75 cm² flasks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The medium used was DMEM/Ham's F-12 supplemented with L-glutamine (2 mM), gentamicin (50 µg/mL), amphotericin B (0.5 µg/mL), and heat-inactivated fetal calf serum (FCS, 10%) (Invitrogen). In all experiments, chondrocytes were cultured under low FCS conditions (5%, v/v) and used at confluence.

Transfection of rat chondrocytes

Transfection of rat chondrocytes was performed with polyethylenimine (PEI) reagent (Exgen 500, Euromedex, Mundolsheim, France). Briefly, chondrocytes were seeded in 24-well plates in DMEM/F12 with 5% FCS at 37°C in 5% CO₂. For each well, 500 ng of plasmid DNA was layered onto the cells for 3 h according to the manufacturer's recommendations. The mixture was removed and chondrocytes were seeded in DMEM/F12 for 24 h before MIA treatment.

Assessment of cytotoxicity by MTT assay

Cells were seeded in 96-well plates at a density of 5×10^4 cells per well. Cell stress was induced using different concentrations of MIA (2, 5, and 10 µM). The assay is based on the cleavage of the soluble yellow tetrazolium salt MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma, Saint Quentin-Fallavier, France) by dehydrogenase activity in intact mitochondria, forming insoluble purple formazan crystals. After washing, the formazan crystals were solubilized and absorbance of the resulting colored solution was measured at 550 nm (MR 5000 DYNATECH, Guyancourt, France). Cells were incubated with 100 µL of DMEM/F12 and 25 µL of MTT solution (5 mg/mL). After 4 h, the supernatant was removed and 100 µL of solubilization solution (sodium-dodecyl-sulfate/di-methyl-formamide) was added into each well. The plate was incubated overnight before measurement.

Assay for lactate dehydrogenase activity.

Cells were seeded in 24-well plates at a density of 2×10^5 cells per well. "Cytotoxicity Detection Kit" (Roche) measures the lactate dehydrogenase (LDH) activity released from the cytosol of damaged cells into the supernatant and allows to evaluate the percentage of cell death. One hundred microliters of supernatant were incubated with 100 µL of the reaction mixture. After 10 min incubation in the dark, the reaction was stopped by 50 µL of HCl (1N). Absorbance was measured using a plate reader at 490 nm (MR 5000, DYNATECH). Cytotoxicity was determined in comparison using a positive test with a Triton X100 (2%, v/v) diluted in DMEM/F12 solution.

Cells were seeded in 6-well plates at a density of 5×10^5 cells per well, then transfected with the plasmid containing HSP70 as described previously. Chondrocytes were washed twice with PBS, and total RNAs were extracted using Trizol™ reagent (Invitrogen). The amount of total RNA was quantified at 260 nm. cDNA was obtained by reverse transcription using 1 µg of total RNA and oligodT primers. Then, PCR amplification was performed using specific primers for HSP70i (1946-bp product), HSF-1 (615 pb) and GAPDH (816-bp product). Samples were first heated at 94°C for 15 min to activate the HotStar™ Taq polymerase (Qiagen) and amplification was performed for 30 cycles (94°C for 45 s, 60°C for 45 s and 72°C for 1 min). Amplification products were resolved by electrophoresis in a 1% (w/v) agarose gel, stained by ethidium bromide, and photographed under UV light by a computer-assisted camera (WV-CL350, Panasonic, Osaka, Japan).

In vivo studies

Preventive DNA injection and electric pulses delivery

Experiments with animals were conducted in accordance with institutional guidelines following the recommendations of the NIH for the animal experimentation. Six-wk-old male Wistar rats were kept in a 12:12 light-dark cycle (light-on period, 6:00 AM–6:00 PM) in a controlled temperature chamber ($24 \pm 1^\circ\text{C}$). Before the electric pulses delivery, rats were anaesthetized using ketamine hydrochloride ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) mixed with acepromazine ($1.25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) injected intraperitoneally. As described (15), rat legs were shaved, and DNA ($30 \mu\text{g}$) resuspended in $50 \mu\text{L}$ of NaCl 0.9% was injected intra-articularly (ia) into both shaved rat knees through the infra-patellar ligament (day 0). After 1 min, transcutaneous electric pulses were applied by means of two custom-made stainless steel parallel plate electrodes (2 cm long, 2 cm large, 1 mm wide and 12.5 mm apart) placed at each side of the knee, previously covered with a conductive gel. Square-wave electric pulses were generated by a PS-15 Jouan electropulsator (GHT 1281, Jouan, St Herblain, France). Pulses were controlled by means of a digital oscilloscope (VC 6025, Hitachi, Tokyo, Japan). As described for mice and rat skeletal muscle (16), we applied 8 pulses of 20 ms delivered at a repetition frequency of 1 Hz.

Induction of MIA-induced OA

One dose of MIA (0.03 mg, Merck-Clevenot, Nogent-sur-Marne, France), dissolved in $50 \mu\text{L}$ of sterile physiologic saline, was injected through the infra-patellar ligament (13), 48 h after the electrotransfer of the plasmid coding for the GFP alone or for the GFP fused to the HSP70 coding sequence. Controls animals received an injection of $50 \mu\text{L}$ of saline (0.9% NaCl) instead of pDNA and were submitted or not to electro gene transfer.

Histological assessment

Rats were killed 10 or 15 days after the MIA or saline injections and the whole knee joints were fixed immediately in 4% paraformaldehyde, decalcified, and embedded in paraffin. Sagittal sections were stained with hematoxylin-eosine-safran (HES), Toluidine blue or Sirius red. The severity of the OA lesions was graded according to Mankin's score (17) with minor modifications. This scale evaluates the severity of OA lesions based on proteoglycan integrity (scale 0–4),

cellular changes (scale 0–3), collagen fibers integrity (scale 0–3), invasion of the tidemark by blood vessels (scale 0–1), bone modifications (scale 0–2) and structural changes (scale 0–5), where 0=normal cartilage structure and 5=erosion of the cartilage down to the subchondral bone).

Measurement of proteoglycan synthesis

Proteoglycan synthesis was assessed as described (13). Briefly, 10 or 15 days after intra-articular injection of MIA or saline, rats were killed and the patellae from the treated (MIA) or control (saline) knees were carefully dissected out. The amount of ^{35}S -sulfate incorporated in the central part of the patella was counted using scintillation fluid (Hionic Fluor, Packard) in a β counter (Packard Bell, Paris, France). Results are expressed as the differences between untreated patellae and the MIA-treated ones (*i.e.*, only electroporated patellae and the MIA-electroporated patellae) as the mean percentage of ^{35}S incorporated.

Detection of HSP70 and GFP expression by immunohistochemistry

Patellae and knees were isolated and fixed in 4% paraformaldehyde, decalcified in 10% EDTA, and embedded in paraffin. Sections ($5 \mu\text{m}$) of paraffin-embedded samples were deparaffinized in toluene, rehydrated in a graded series of ethanol, and incubated with chondroitinase ABC in PBS, pH 8.0 for 1 h 30 min at 37°C . Slices were washed in PBS, then incubated in Triton X 100 (0.3%) in PBS, pH 7.4. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the sections with 3% (v/v) hydrogen peroxide in water for 30 min. They were further incubated with blocking serum and overlaid with antibodies (rabbit polyclonal anti-HSP70; 1: 300 or rabbit polyclonal anti-GFP, 1/50) overnight at 4°C in a humidified chamber. Biotin-labeled goat anti-rabbit was used as a secondary antibody (45 min at room temperature).

A biotin-streptavidin-peroxidase detection system was used according to the manufacturers' recommendations. Color was developed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma) containing hydroxide peroxide and slides were counterstained for 1 min in 1% methyl green. The counterstaining gives green-stained nuclei and specific staining appears as brown-stained cytoplasm. The percentage of positive chondrocytes was measured by counting the positive cells and the total number of cells in the different cartilage layers. For each specimen, 3 microscopic fields were examined in each layer of the cartilage (the superficial, intermediate and deep layers). Each slide was subjected to a double-blind evaluation by trained investigators (CCH, SE) and a maximal variation of only 5% was obtained.

Detection of caspase dependent apoptosis

Caspase-dependent apoptosis was quantified histologically in patellar cartilage by the detection of active caspase-3 into patellar chondrocytes (18). We used the same technique of immunostaining as described above (except that the primary antibody was a rabbit polyclonal anti-active caspase-3; 1:300, R&D System, Euromedex). The percentage of positive chondrocytes was measured by counting the positive cells and the total number of cells in the different cartilage layers. For each specimen, 3 microscopic fields were examined in each layer of the cartilage (the superficial, intermediate and deep layers). Each slide was subjected to a double-blind evaluation by trained investigators (CCH, SE) and a maximal variation of only 5% was obtained.

All the results in the figures are expressed as mean and SD. All analyses and figures editing were performed using GraphPad Prism (release 4, GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA). Student's *t* test was used to compare a batch to its own control and ANOVA with post hoc Bonferroni when required (i.e., when >2 groups are involved).

RESULTS

In vitro studies

Efficiency of gene transfer

The sequence encoding for the rat inducible HSP70 protein was isolated from total retrotranscribed RNA messengers and cloned into plasmid pcDNA3/CT-GFP. The use of modified oligonucleotides (reverse primer mutated on stop codon) for PCR amplification allowed the creation of a special mRNA, encoding for a chimerical recombinant protein HSP70/GFP. The correctness of the sequence was confirmed by sequencing the plasmid DNA. No mutations were detected in the whole sequence, with the exception of the termination triplet. This plasmid was then amplified according to standard procedures and used to transfect rat chondrocytes cultivated in monolayers.

No HSPs induction (HSP27, HSP40, HSP47, HSP90, data not shown) was revealed after gene transfer in all conditions, meaning that the pDNA delivery approach was not stressful for chondrocytes (data not shown). These results were confirmed by RT-PCR analysis of HSP70 gene expression in chondrocytes transfected with either the GFP alone or the HSP70/GFP plasmids. A very faint PCR product was detected in wild-type cells and in cells expressing the GFP, due to the presence of a slow "constitutive" expression of HSP70i mRNA in chondrocytes. When cells transfected with HSP70/GFP vector were submitted to RT-PCR analysis, an overexpression of HSP70 mRNA was observed, as early as 12 h after gene transfer (Fig. 1A). After a maximal expression at 48 h, expression rate of HSP70 mRNA returned to the basal level in 72 h (data not shown). These findings clearly indicated that our plasmid construct was able to generate a transient overexpression of HSP70 in rat chondrocytes.

Functionality of the construct

To confirm the functionality of the recombinant protein, we also studied by RT-PCR analysis, the expression of a cytoplasmic co-factor of this protein, HSF1, which is bound to HSP70 in the absence of stress conditions. The results depicted in Fig. 1C demonstrated that an induction of HSF1 in HSP70/GFP transfected cells when compared with nontransfected cells.

After these prerequisites, we assessed the functionality of recombinant HSP70/GFP fusion protein, by exposing rat chondrocytes to a cytotoxic compound,

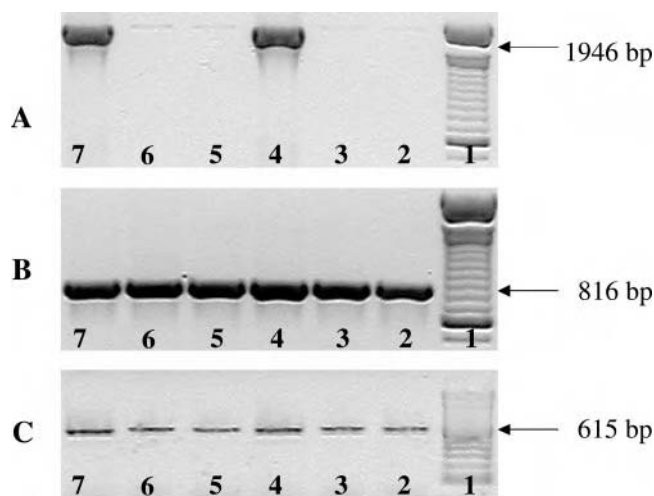


Figure 1. Assessment of transfection efficiency by RT-PCR analysis. Chondrocytes grown in culture were transfected with PEI alone, PEI-pcDNA3.1-GFP and PEI-pcDNA3.1-HSP70/GFP for 3H h. After transfection, cells were harvested at different times (12 and 24 h), total RNAs were extracted and submitted to RT-PCR analysis. PCR was performed to detect HSP70 (A, expected size 1946 bp), GAPDH (B, expected size 816 bp) and HSF1 (C, expected size 615 bp) mRNA and PCR products were visualized on agarose gel, with ethidium bromide staining. Lane 1, molecular weight ladder (100 bp); lane 2, chondrocytes transfected with PEI (without plasmid) for 12 h; lane 3, chondrocytes transfected with PEI and plasmid encoding for GFP alone for 12 h; lane 4, chondrocytes transfected with PEI and plasmid encoding for HSP/GFP fusion protein for 12 h; lane 5, chondrocytes transfected with PEI (without plasmid) for 24 h; lane 6, chondrocytes transfected with PEI and plasmid encoding for GFP alone for 24 h; lane 7, chondrocytes transfected with PEI and plasmid encoding for HSP/GFP fusion protein for 24 h.

mono iodo-acetate (MIA). Thus, cells were transfected with plasmid carrying HSP70/GFP sequence and, 24 h after gene delivery, cells were exposed to MIA treatment for 6 and 24 h. MIA toxicity was determined by two independent methods measuring either the percentage of lactate dehydrogenase (LDH) release or the reduction of tetrazolium salt (MTT). The results are presented in Fig. 2A, B, respectively. In untransfected cells, after 6 h of exposure to MIA, toxicity was only detected, by LDH analysis (Fig. 2A), with a dose of 10^{-5} M while no deleterious effects were found with the lower concentrations of MIA.

In cells expressing the HSP70 construction, MIA treatment was unable to induce a detectable level of cellular death by LDH analysis, even at the highest concentration (10^{-5} M). MTT experiments confirmed these results: a weak toxicity was observed with the doses of 5×10^{-6} M (20%) in unmodified cells but only with 10^{-5} M of MIA in HSP70 expressing cells (35%) (Fig. 2B). After 24 h of MIA exposure, LDH and MTT analyses revealed a strong cytotoxic effect of MIA in all cells, except for the lowest dose (2×10^{-6} M). Cells transfected with HSP70 expression vector seemed to be less susceptible to MIA cytotoxicity but overexpression

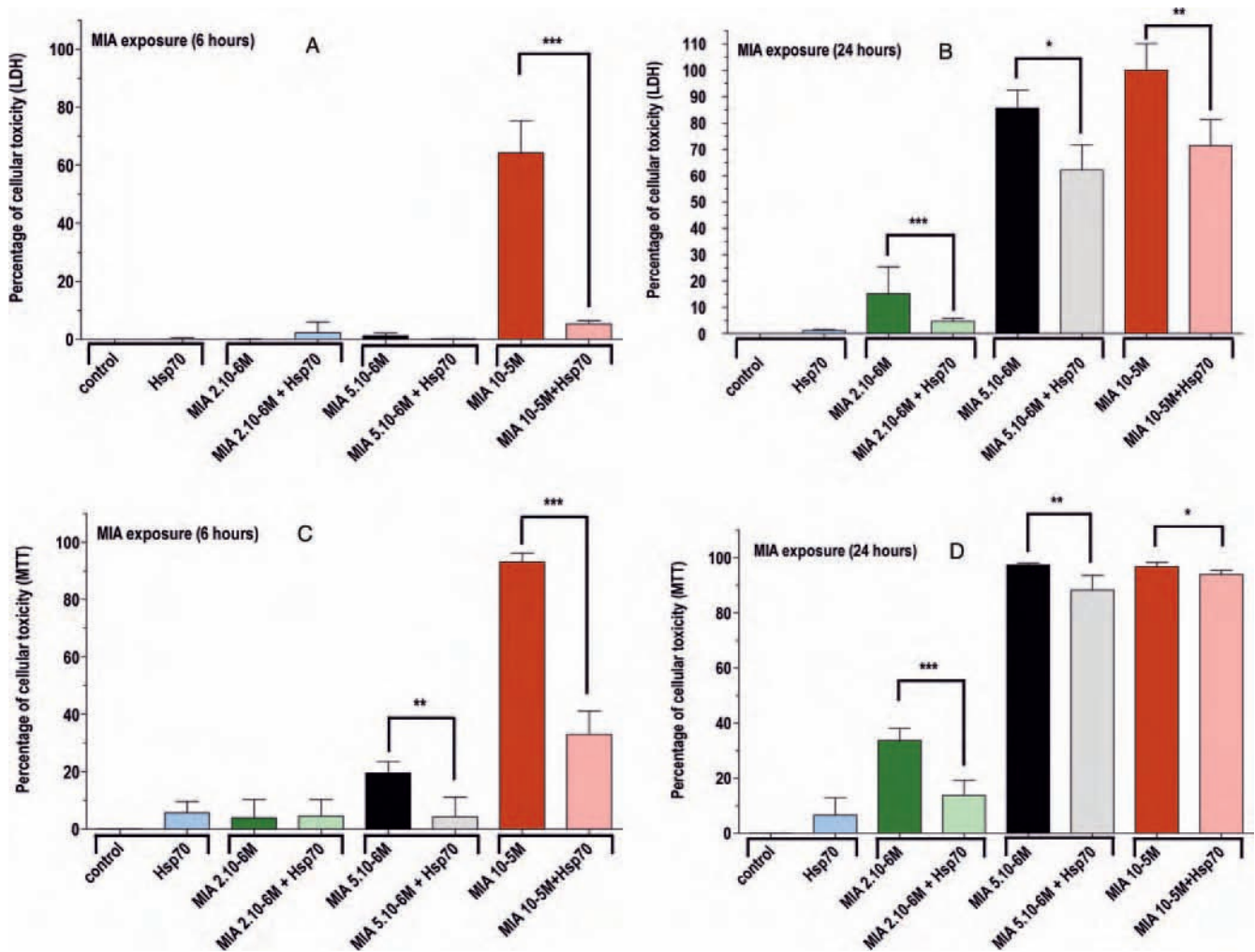


Figure 2. Evaluation of cytoprotective effect of HSP70 gene transfer against MIA toxicity. Chondrocytes grown in culture were transfected with PEI alone and PEI-pcDNA3.1-HSP70/GFP for 3 h. At 24 h after transduction, cells were exposed to various concentrations of MIA for 6 h and 24 h. The toxicity of MIA was evaluated both by LDH release (estimation of membrane integrity) (A, B), and by measuring MTT reduction to formazan (percentage of mitochondrial alterations) (C, D) (means of 3 experiments, 8 samples by conditions). Bars show the mean and sd score (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.005$, *** $P \leq 0.0005$, Student's *t* test).

of recombinant protein was not sufficient to protect the cells in the case of a prolonged exposure to MIA.

In vivo experiments

Gene delivery into rat patellae

After these in vitro preliminary studies, which demonstrated the chondroprotective potential of HSP70 over-expression vs. MIA cytotoxicity, in vivo experiments were performed to 1) demonstrate the feasibility of electroporation to achieve pDNA delivery in rat patella and 2) validate the “chondroprotective” potential of HSP70 expression in cartilage cells.

Safety

Rats were submitted to electro gene transfer either with the empty vector coding for the GFP alone or with the plasmid containing the fusion sequence HSP70/GFP.

Initially, we evaluated the possible damages that could be caused by external electrical pulses and pDNA injection on rat patellae. To ensure that electric pulses generated no deleterious side effects, a histological study was performed to evaluate the chondrotoxicity of the electric pulses on cartilage. Rats were killed at different times (2 days, 1 wk, 1, 2, and 3 months) after gene delivery and patellar cartilage was carefully removed. Histological stainings were performed to visualize the proteoglycan content (Toluidine blue), the cell viability (HES) and collagen network (Picrosirius red) (15).

No deleterious effects were observed at 2 days and at 1 wk (data not shown), for rats submitted to electric pulses alone and for those who received pDNA (either GFP or HSP70/GFP) before the electric pulses delivery. Proteoglycan biosynthesis has been shown to be one of the earlier parameters that could be modified during cartilage alteration. We thus evaluated chondrocyte capacity to synthesize this key component of the ECM:

neither the electric pulses alone nor the pDNA injection led to a decrease in the biosynthetic activity of articular chondrocytes (15).

Time course expression of HSP70/GFP in patellar cartilage

Considering these results, a follow-up study was thus designed to evaluate transgene persistency and recombinant protein expression after in vivo pDNA electrotransfer (Fig. 3). Preliminary immunohistological studies demonstrated that GFP expression could be detected up to 2 months after the gene transfer, mainly in the deep zone of the cartilage (containing hypertrophic chondrocytes). In another set of experiments, the expression of both proteins was studied (Fig. 4). Immunostaining of HSP70 (Fig. 3) revealed a basal expression of the protein, localized principally in the deep layer of patellar cartilage in control rats and EGT rats with the reporter gene. No visible variation was observed between both groups. For HSP70/GFP construction-treated rats, a significant overexpression was depicted as soon as 48 h (50% of chondrocytes were positively stained (with GFP antibody) after HSP/GFP

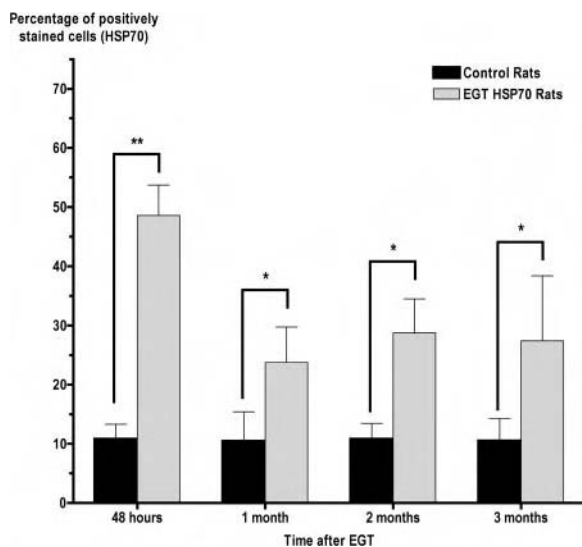


Figure 3. Time course of transgene expression in rat patellae, after electro-gene transfer. Rats received, intra-articularly, 30 μ g of plasmid DNA (pcDNA3.1-GFP and pcDNA3.1-HSP70/GFP) in 50 μ L of NaCl (0.9 %), followed by electric pulses. At the indicated time after electrotransfer, rats were sacrificed and joint tissues were classically prepared for immunohistochemistry, to detect HSP70. Cells expressing the transgene (HSP70/GFP) developed a brown staining, whereas no signal was observed in sections from control group. The total number of chondrocytes and the number of chondrocytes staining positive using specific antibodies were evaluated separately for each zone of cartilage (superficial and deep zones). Each slide was subjected to a double-blind evaluation by trained investigators and a maximal variation of only 5% was obtained. Histogram represents the cell score for transgene expression in patellar cartilage at different times (black, control rat; grey, animals submitted to HSP70/GFP gene transfer). Bars show the mean and SD score ($n=12$ patellae/group) ($*P\leq 0.05$, $**P\leq 0.005$, Student's t test).

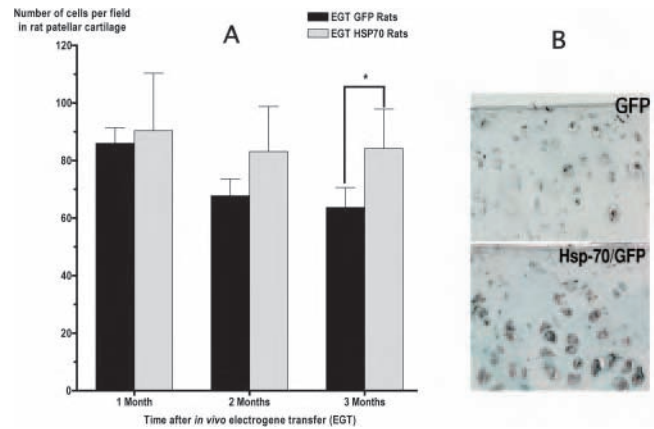


Figure 4. Study of cellular viability in rat patellar cartilage after electrotransfer of pcDNA3/HSP70/GFP plasmid. Rats received, intra-articularly, 30 μ g of plasmid DNA (pcDNA3.1-GFP and pcDNA3.1-HSP70/GFP) in 50 μ L of NaCl (0.9 %), followed by electric pulses. At the indicated time after electrotransfer (1 month, 2 months, 3 months), rats were sacrificed and joint tissues were classically prepared for classical histology to assess cellular viability. The total number of living chondrocytes was evaluated separately for each zone of cartilage (superficial and deep zones) in three different areas of the patella. Each slide was subjected to a double-blind evaluation by trained investigators and a maximal variation of only 5% was obtained. A) Histogram represents the number of cells present in patellar cartilage from different groups of rats (dark grey, rat submitted to pcDNA3.1GFP gene transfer; pale grey, animals submitted to pcDNA3.1-HSP70/GFP gene transfer). Bars show the mean and SD score ($n=12$ patellae per group) ($*P\leq 0.05$, Student's t test). B) Pictures of articular cartilage of rats, submitted to EGT with pcDNA3.1-GFP (GFP) and pcDNA3.1-HSP/GFP constructions, 3 months after electrotransfer. Each slide was subjected to immunostaining with HSP70 specific antibody (Stressgen) and counterstained.

gene transfer, $P<0.05$, Fig. 3), in all areas of cartilage and this sustained expression was maintained for 3 months, mainly in the deep layer.

To confirm that overexpression of HSP70 was related to the plasmid transfer into chondrocytes, the same patellae sections were submitted to another immunostaining analysis with a specific GFP antibody (data not shown). Examination of the slides revealed a positive staining of patellar chondrocytes from day 2 to month 3 and positively stained cells were localized in concordant zones of patellar cartilage. We could notice that the number of GFP positive chondrocytes was lower (15–20%) than the number of GFP positive cells in rats transfected with the reporter gene alone (30%, data published in (15)), at the same time point. To ensure that HSP70 overexpression was consistent with electric pulses mediated gene transfer, an in situ hybridization with a digoxigenin-DNA labeled probe was performed and the results clearly demonstrated the persistency of plasmid DNA in patellar cartilage (data not presented).

Examination of the sections revealed that the maturation-related chondrocytic hypocellularity was lessened, in HSP70/GFP vs. GFP immunostaining positive chondrocytes. In fact, at month 1, cells localized in the superficial layer no more expressed the transgene but

ISH staining demonstrated the presence of plasmid DNA. Studies on time course expression revealed a difference between patellae electroporated with GFP expressing vector and those submitted to EP transfer with HSP70/GFP. The number of chondrocytes (localized in the middle and deep layers) was increased (due to a lesser decrease) in animals treated with the HSP70/GFP fusion protein (Fig. 4), and this increase was detectable 1 month after transfection (NS) but was only statistically significant at month 3 ($P < 0.05$ Student's *t* test). When performing a 2-way ANOVA, the treatment significantly affected the result, whereas there was only a trend ($P = 0.0651$) concerning the time effect.

Cytoprotective effect of HSP70 gene transfer in MIA-induced osteoarthritis

In vitro studies have demonstrated that overexpression of HSP70 by gene transfer was able to protect chondrocytes in culture from the cytotoxic effects of MIA treatment. Previous experiments performed by various groups have established that a single or repeated intra-articular injections of MIA could induce OA-related lesions in a rat model. Experimental OA lesions are very reproducible and dose and time dependant: there have been extensively studied by our group and others (13, 19–21). Previous experiment (data not shown) have demonstrated that EGT pulses with GFP vector do not alter the pathological response to MIA exposure.

To determine whether HSP70 overexpression could protect cartilage cells from MIA toxicity, rats were first electroporated with GFP or HSP70/GFP constructs. Forty-8 h after in vivo gene delivery, rats were injected intra-articularly (day 0) with MIA (0.03 mg). HSP70-mediated protection against OA lesions induced by MIA treatment was evaluated by both macroscopic and microscopic examinations, 10 and 15 days after MIA injection (time required for the development of lesions).

A significant change was histologically detected only at 15 days: the severity of OA lesions was more pronounced in control and in rats electroporated with reporter gene alone than in rats transfected with the HSP70/GFP (Fig. 5A). Indeed, HES staining revealed a strong remodeling of subchondral bone, disappearance of hypertrophic chondrocytes layer and a decrease in cellularity in animals submitted to EP with pcDNA3.1/GFP followed by MIA injection. In rats expressing recombinant HSP70/GFP fusion protein, the structure of patellar cartilage was quite similar to controls, with sufficient cellularity, presence of hypertrophic chondrocytes and lack of bone remodeling. The Toluidine blue staining revealed a decrease in proteoglycan content in animals submitted to EP (pcDNA3.1/GFP and pcDNA3.1HSP70/GFP) exposed to MIA, which was more significant in animals transfected only with the reporter gene. A similar pattern of coloration was observed with picosirius red staining, which demonstrated a decrease in collagen content. As

for Toluidine blue, this reduction of collagen content was more pronounced in animal expressing the GFP only than in animal transfected with pcDNA3.1-HSP70/GFP.

The slices were then submitted to active caspase 3 immunostaining and the percentage of positively stained cells (Fig. 5B) was markedly reduced in animals expressing HSP70 rather than in rats expressing GFP or naive animals injected with MIA. To confirm these results, we evaluated proteoglycan biosynthesis by measuring radiosulfate intake after MIA treatment (Fig. 6). Proteoglycan biosynthesis was markedly reduced in control rats as in GFP transfected animals (decrease of 45%) whereas rats expressing HSP70/GFP protein displayed only a slight decrease in biosynthetic activity (15%) on day 10. Anabolism study performed 15 days after intra-articular MIA injection confirmed the cytoprotective effect of HSP70 gene transfer, because rats expressing HSP70 recombinant protein presented the lowest decrease of proteoglycan biosynthesis, when compared with control group or animals treated with reporter construct.

DISCUSSION

Apoptosis and OA

Apoptosis and necrosis are the two forms of chondrocyte death (22). Apoptosis is the process in which each cell systematically inactivates its function and disassembles its structure. Recently, the occurrence of apoptotic events was confirmed in the articular chondrocytes of OA patients (23). In parallel, numerous in vivo experimental studies have confirmed that chondrocytic apoptotic events are linked with the severity of experimental OA (24, 25). Understanding the interactions that promote chondrocyte apoptosis and cartilage hypocellularity is essential for developing appropriate targeted therapies for inhibition of chondrocyte apoptosis and the treatment of OA. With this in mind, experimental OA models are crucial to establish the linkage between chondrocyte hypocellularity and apoptosis, and to assess that controlled pharmacological inhibition of key steps in cell death process could be targeted for novel therapeutic strategies for the treatment of OA.

Experimental OA and apoptosis

Among experimental OA models (26), MIA-induced OA in the rat easily and quickly reproduces dose, time, and site-dependant OA-like lesions, and, in certain circumstances, functional impairment, similar to that observed in human disease (13). These parameters, as well as proteoglycan metabolism and cytokine expression in weight bearing areas (20), could serve as indicators for studying chondroprotective drugs (27, 28) or for evaluating the ability of imaging techniques to detect and evaluate chondral lesions (29). Proapoptotic properties of MIA, an ATP depleting agent

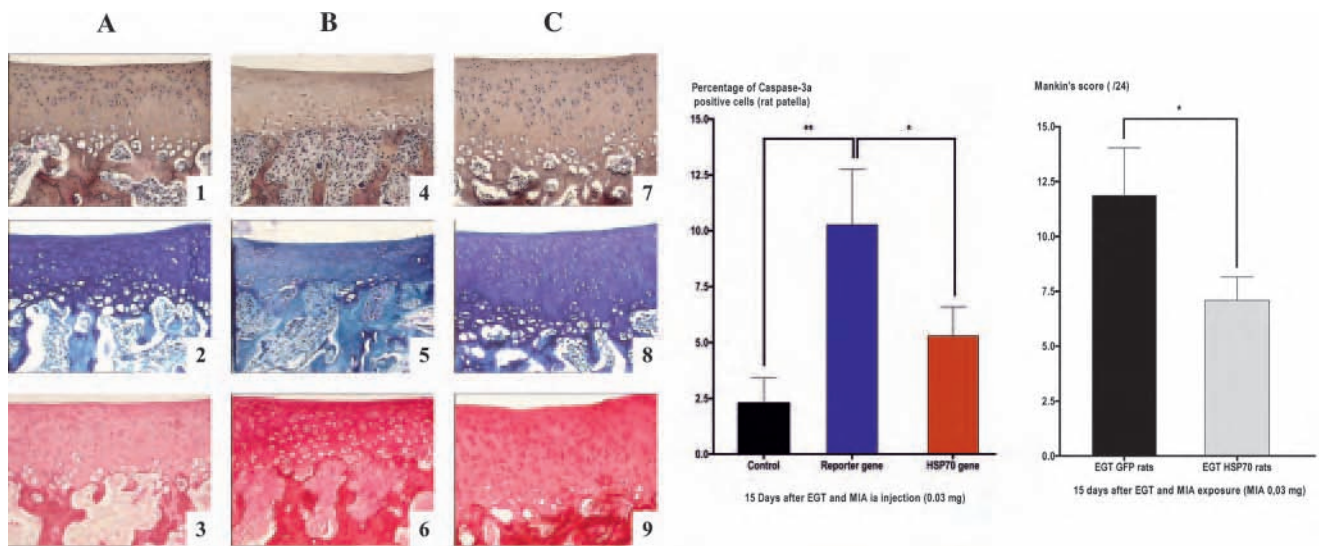


Figure 5. Evaluation of HSP70 mediated protection against OA-lesions induced by MIA treatment. Rats received, intra-articularly, 30 μ g of plasmid DNA (pcDNA3.1-GFP and pcDNA3.1-HSP70/GFP) in 50 μ L of NaCl (0.9 %) and submitted to electric pulses. Forty-8 h after gene transfer, animals received an intra-articular injection of MIA solution (0.03 mg). Rats were then sacrificed 15 days after MIA exposure and joint tissues were classically prepared for histological and immunohistological analyses, according to standard procedures. *A*) Histologic changes in the knee joints after intra-articular injection of MIA 0.03 mg with or not a preliminary injection of plasmid DNA. A histological grading of cartilage was performed on each animal of separate groups, and for each compartments of the joint (patellae, femoral condyles, and tibial plateaus). Sections of articular cartilage were submitted to classical colorations: 1, 4, 7) eosine/safran/hematoxyline (HES) analyzed cell density and viability, 2, 5, 8) Toluidine blue (BT) the amount (not quantitative values) of proteoglycans, and 3, 6, 9) Sirius red staining appreciates the collagen content in the articular cartilage. *A*) Control rats, submitted only to electric pulses. *B*) Rats injected with GFP plasmid and submitted to MIA (0.03 mg) for 15 days. *C*) Animals injected with HSP70/GFP plasmid and submitted to MIA (0.03 mg) for 15 days. Original magnification ($\times 640$) *B*) Evaluation of apoptotic process in MIA-induced OA model, after gene transfer of pDNA into the articular cavity of rats. At 15 days after electroporation, rats were sacrificed and joint tissues were classically prepared for immunohistochemistry, with a specific antibody directed against active-Caspase 3 (Casp3-a). The total number of stained chondrocytes was evaluated separately for each zone of cartilage in three different areas of the patella. Each slide was subjected to a double-blind evaluation by trained investigators and a maximal variation of only 5% was obtained. Control rats, only submitted to electric pulses Rats injected with GFP plasmid and submitted to MIA (0.03 mg) for 15 days. Rats injected with HSP70/GFP plasmid and submitted to MIA (0.03 mg) for 15 days. Bars show the mean and SD ($n=12$ patellae per group). $**P < 0.005$, Student's *t* test. *C*) Histogram representing the Histological assessment of OA lesion in MIA-induced OA model, after gene transfer of pDNA into the articular cavity of rats. A histological grading of cartilage was performed on each animal of separate groups, and for each compartments of the joint (patellae, femoral condyles, and tibial plateaus). Sections of articular cartilage were submitted to classical colorations: (eosine/safran/hematoxyline (HES) analyzed cell density and viability, BT the amount (not quantitative values) of proteoglycans, and Sirius red staining appreciate the collagen content in the articular cartilage. Other parameters are evaluated, like cartilage surface (normal, irregular, fissures), subchondral bone remodeling, collagen network architecture, presence of hypertrophic chondrocytes, and the aspect of synovial membrane. Each slide was subjected to a double-blind evaluation by trained investigators and a maximal variation of only 5% was obtained.

inhibiting glycolysis, are well established in vitro on various cell lines, like neurons (30), Jurkat cells (31), cardiomyocytes (32), macrophages (33). Necrotic and proapoptotic properties of MIA have also been demonstrated in rat chondrocytes in vitro (10), this anaerobic cell line being especially sensitive to MIA-induced mitochondrial dysfunction, MIA destabilizing the functionality of mitochondria in chondrocytes by a alteration in the mitochondrial membrane potential (changes in the $\Delta\Psi_m$ as measured by JC1 staining) thus leading to the loss of the main source of ATP and energy of cartilage cells (data not shown). Preliminary data have established that caspase-dependant apoptosis occurs in MIA-induced OA in the rat (34), as recently confirmed in human OA (23). Caspase 3 in its active form is one of the key mediators of apoptosis in its execution phase and its expression may herald imminent apoptosis better than TUNEL assay (35) and may

act as a surrogate specific marker for early chondrocyte apoptosis (22, 36–38).

HSP70 and chondroprotection

Consequently, therapeutic modulation of apoptotic caspases could be of great benefits during early phases of OA, and may hold the key for new therapies that prevent progressive hypocellularity and cartilage matrix loss in animals and humans. Among natural caspases inhibitors, HSP 70 prevents the activation and activity of caspases and interact with the caspases recruitment domain of Apaf-1, preventing its oligomerization and the formation of a functional apoptosome. The role of HSP70 is not limited to caspases, and can prevent apoptosis in a caspases independent but mitochondrial dependant manner by a direct interaction with the AIF (7).

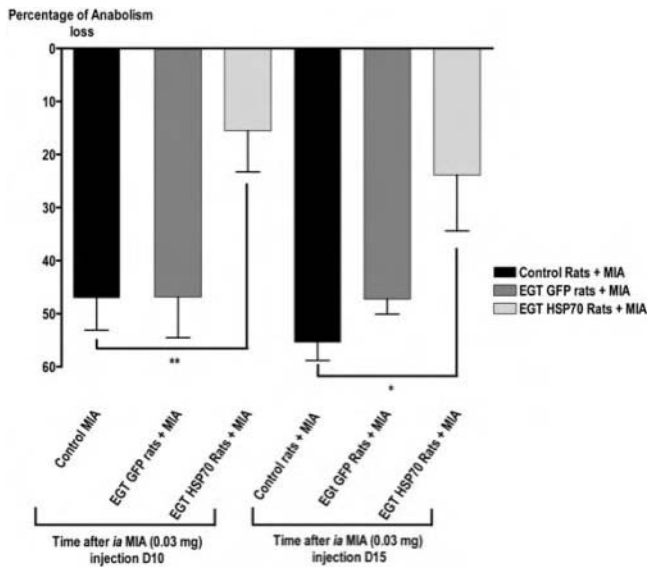


Figure 6. Assessment of matrix synthesis in patellar chondrocytes from electroporated rats, after MIA treatment. Rats received, intra-articularly, 30 μ g of plasmid DNA (pcDNA3.1-GFP and pcDNA3.1-HSP70/GFP) in 50 μ L of NaCl (0.9 %), followed by electric pulses. Then 48 h after, an intra-articular injection of MIA (0.03 mg) was performed into both knees. Rats were sacrificed at 10 and 15 days after MIA injection. Proteoglycan biosynthesis in patellar cartilage, is measured by $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ incorporation. Results are expressed as the percentage of change in ^{35}S sulfate incorporation in the central part of the patella of electroporated rats vs. the control rats ($n=6$ patellae per group). Rats only treated with a single injection of MIA (0.03 mg) (dark grey), Rats were injected with a reporter gene (GFP) and 48 h after, submitted to an intra-articular injection of MIA (0.03 mg) (pale grey), Rats were injected with the gene of interest (HSP70/GFP) and 48 h after, submitted to an intra-articular injection of MIA (0.03 mg) (light grey). Bars show the mean \pm sd. * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$, vs. rats injected with MIA only, Student's t test.

Numerous in vitro studies (reviewed in (39)) have demonstrated that transfection increases the synthesis of cytoprotective HSP70 may prove to be of clinical use in critical situations like organ transplantation or ischemia. Concerning chondrocytes, HSP70 induction by proteasome inhibitor MG132 protects articular chondrocytes from cellular death in vitro (10) and it has been recently demonstrated that HSP70 transfection protects in vitro chondrocytes from NO-induced apoptosis (9). Several authors have recently demonstrated the effectiveness of in vivo gene transfection of HSP70 in various models, like ischemia reperfusion injury of rat lungs (40), rat (41) or rabbit heart (42), and rat brain (43). On the basis of these encouraging results, we transfected the HSP70 plasmid construct into rat chondrocytes to study in vitro and in vivo its effect on subsequent MIA chondrotoxicity.

EGT of HSP70 in rat patella

With this in mind, we had evaluated a strategy of gene transfer by means of the delivery of external electric pulses to the rat patella after intra-articular injection of

a reporter gene (15). The present study demonstrated in vivo that the fusion protein developed herein was correctly expressed because GFP expression was dependent from the CMV promoter, localized upstream of the HSP70 sequence. Time course expression of GFP revealed a decrease in the GFP staining, probably due to a loss of efficiency in transcription/translation processes, when compared with the expression level obtained with pcDNA3.1-GFP vector. Histological studies of EGT patellae with HSP70/GFP plasmid also revealed an increase (more precisely a lesser decrease) in cell density vs. controls, detectable after 1 month and statistically different after 3 months. This increase in cell density is probably inherent to the overexpression of HSP70, which is able to inhibit apoptosis inherent to the maturation process.

Chondroprotection and HSP70 in rat patella

Histologically and metabolically, the cytoprotective properties of HSP70 gene transfer in cartilage are concordant with those already observed experimentally in vivo with viral gene transfer HSP70 in various models (see above) and with our previous results obtained in the MIA rat model via the induction of HSP70 via MG132 (21). However, these protective effects seen in our previous study after MG132 pretreatment could potentially be caused by factors other than HSP70, thus reinforcing the interest of our gene-specific and site-targeted study. Furthermore, the design of a plasmid coding for the GFP fused to the HSP70 coding sequence permits to separate the physiological roles of HSP70, especially in chondrocytes of growing plate in the rat tibia (44). With this in mind, overexpression of HSP70 may account for the relative hypercellularity localized in the middle and deep layers in control animals transfected with the HSP70/GFP fusion protein, this increase being detectable 1 month after transfection, but statistically significant at month 3.

As observed in the clinics, caspase-dependant chondrocyte death, either necrotic or apoptotic, is observed in this particular rat model of OA after intra-articular MIA injection, as earlier shown in ACLT and meniscectomized rats (45). Consequently, therapeutic modulation of apoptotic caspases could be of great benefits during early phases of OA (46). Previous studies have demonstrated that the chondrocytic expression of HSP70 is positively correlated with the clinical severity of OA (8) and that HSP70 could play a role in cell protection from stress, especially in the early events. Our results suggest that the protective effect of HSP70 in our experimental conditions might be the result of anti-apoptotic mechanisms via interfering with apoptosis downstream of caspase activation and activity, as suggested by our results with active caspase 3 immunostaining. We routinely use this index in evaluating experimental OA (18, 34), because TUNEL is less specific and apoptosis is overestimated by TUNEL assay compared with caspase 3 detection.

Limitations of the study

We have thus evaluated the chondroprotective potential of a preventive electric gene transfer of HSP70/GFP in rat patella during MIA-induced OA in the rat, this model leading to OA-like histological and metabolic changes in all knee compartments, i.e., medial and lateral femoro-tibial compartments as well as femoro-patellar compartment. Hence, rat patella, as an anatomical entity, appears, in this peculiar model, as the archetypal candidate for studying the potential of “purpose-made” targeted electric gene transfer during a “diffuse” metabolically induced OA in the rat knee. To the best of our knowledge, the lack of such studies using non-viral gene transfer to the cartilage has largely been a result of the difficulty of transferring foreign genetic materials to postmitotic, nondividing chondrocytes in hyaline cartilage. Our laboratory recently took advantage of plasmid DNA electrotransfer for intracellular and long-lasting secreted protein expression in patellar cartilage (15), thus avoiding the extracellular matrix “barrier” negative influence, as described earlier in cornea, tendon, and even the brain (47). As a laboratory tool, electrotransfer appears to be, in vivo, an interesting method since it is chondroneutral, non-immunogenic, easy and efficient enough to allow postgenome functional studies and gene validation, especially HSP70, particularly in patellar cartilage. Nevertheless, the influence of anti-apoptotic properties of HSP70 on physiologic maturation as well on ageing of normal patellar articular cartilage remains to be established in rat knee.

In summary, our study provides strong evidence for a possible role of HSP70 overexpression in cytoprotection of rat chondrocytes toward MIA toxicity in vitro and in vivo. A possible role for overexpression of HSP70 in chondroprotection is supported by the following: 1) gene transfer prior to MIA exposure in vitro is sufficient to enhance chondrocyte survival and 2) preventive electroporation of a functional HSP70 plasmid in rat patella before an intra-articular injection of MIA significantly ameliorates ancillary chondral lesions. Electroporation appears “chondroneutral” and allows a specific plasmid targeting in rat patella, thus limiting putative site effects of HSP dissemination (e.g., in synovium) and avoiding the use of viral mediated gene transfer approach. Although these findings suggest that HSP70 gene transfer may confer “chondroprotection” in rat patella during MIA-induced OA, further work is necessary to understand the molecular mechanisms, for instance, at the mitochondrial level, by which HSP70 afford cytoprotection and avoid possible unwanted side effects. F

The authors thank Bertrand LIAGRE for providing HSP70-GFP construction, Venkatesan NARAYANAN and Jean Yves JOUZEAU for their expert advices and Michel THIERY for his good care to animals. This study was supported by grants from CNRS, Région Lorraine, CPRC CHU Nancy, GIP Fonds de recherches HMR AVENTIS (FR99RHU037), Institut Gustave Roussy and the EU Commission through the project

Cliniporator (QLK3-1999-00484). This work is part of the Ph.D. manuscript of C.C.H.

REFERENCES

1. Aigner, T., and Kim, H. A. (2002) Apoptosis and cellular vitality: issues in osteoarthritic cartilage degeneration. *Arthritis Rheum.* **46**, 1986–1996
2. van den Berg, W. B. (2001) Lessons from animal models of osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **13**, 452–456
3. Aigner, T. (2002) Apoptosis, necrosis, or whatever: how to find out what really happens? *J. Pathol.* **198**, 1–4
4. Malemud, C. J., Islam, N., and Haqqi, T. M. (2003) Pathophysiological mechanisms in osteoarthritis lead to novel therapeutic strategies. *Cells Tissues Organs* **174**, 34–48
5. Takayama, S., Reed, J. C., and Homma, S. (2003) Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* **22**, 9041–9047
6. Sironen, R. K., Karjalainen, H. M., Elo, M. A., Kaarniranta, K., Torronen, K., Takigawa, M., Helminen, H. J., and Lammi, M. J. (2002) cDNA array reveals mechanosensitive genes in chondrocytic cells under hydrostatic pressure. *Biochim. Biophys. Acta* **1591**, 45–54
7. Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S. A., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J. M., Garrido, C., et al. (2001) Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat. Cell Biol.* **3**, 839–843
8. Takahashi, K., Kubo, T., Goomer, R. S., Amiel, D., Kobayashi, K., Imanishi, J., Teshima, R., and Hirasawa, Y. (1997) Analysis of heat shock proteins and cytokines expressed during early stages of osteoarthritis in a mouse model. *Osteoarthritis Cartilage* **5**, 321–329
9. Terauchi, R., Takahashi, K. A., Arai, Y., Ikeda, T., Ohashi, S., Imanishi, J., Mazda, O., and Kubo, T. (2003) Hsp70 prevents nitric oxide-induced apoptosis in articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **48**, 1562–1568
10. Grossin, L., Cournil-Henrionnet, C., Watrin-Pinzano, A., Terlain, B., Jouzeau, J., Netter, P., and Gillet, P. (2003) Overexpression and induction of heat shock protein 70 protect chondrocytes from cell death in vitro and in vivo. *Arthritis Res. Ther.* **5**, Suppl. **3**, 53
11. Sperling, O., Bromberg, Y., Oelsner, H., and Zoref-Shani, E. (2003) Reactive oxygen species play an important role in iodoacetate-induced neurotoxicity in primary rat neuronal cultures and in differentiated PC12 cells. *Neurosci. Lett.* **351**, 137–140
12. Lee, S. W., Lee, H. J., Chung, W. T., Choi, S. M., Rhyu, S. H., Kim, D. K., Kim, K. T., Kim, J. Y., Kim, J. M., and Yoo, Y. H. (2004) TRAIL induces apoptosis of chondrocytes and influences the pathogenesis of experimentally induced rat osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **50**, 534–542
13. Guingamp, C., Gegout-Pottie, P., Philippe, L., Terlain, B., Netter, P., and Gillet, P. (1997) Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum.* **40**, 1670–1679
14. Concannon, C. G., Gorman, A. M., and Samali, A. (2003) On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* **8**, 61–70
15. Grossin, L., Cournil-Henrionnet, C., Mir, L. M., Liagre, B., Dumas, D., Etienne, S., Guingamp, C., Netter, P., and Gillet, P. (2003) Direct gene transfer into rat articular cartilage by in vivo electroporation. *FASEB J.* **17**, 829–835
16. Mir, L. M., Bureau, M. F., Gehl, J., Rangara, R., Rouy, D., Caillaud, J. M., Delaere, P., Branell, D., Schwartz, B., and Scherman, D. (1999) High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4262–4267
17. Mankin, H. J., Dorfman, H., Lippipello, L., and Zarins, A. (1971) Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J. Bone Joint Surg. Am.* **53**, 523–537
18. Galois, L., Etienne, S., Grossin, L., Watrin-Pinzano, A., Cournil-Henrionnet, C., Loeuille, D., Netter, P., Mainard, D., and Gillet, P. (2004) Dose-response relationship for exercise on severity of

- experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. *Osteoarthritis Cartilage* **12**, 779–786
19. Saied, A., Cherin, E., Gaucher, H., Laugier, P., Gillet, P., Floquet, J., Netter, P., and Berger, G. (1997) Assessment of articular cartilage and subchondral bone: subtle and progressive changes in experimental osteoarthritis using 50 MHz echography in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **12**, 1378–1386
 20. Dumond, H., Presle, N., Pottie, P., Pacquelet, S., Terlain, B., Netter, P., Gepstein, A., Livne, E., and Jouzeau, J. Y. (2004) Site specific changes in gene expression and cartilage metabolism during early experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **12**, 284–295
 21. Grossin, L., Etienne, S., Gaborit, N., Pinzano, A., Cournil-Henrionnet, C., Gerard, C., Payan, E., Netter, P., Terlain, B., and Gillet, P. (2004) Induction of heat shock protein 70 (Hsp70) by proteasome inhibitor MG 132 protects articular chondrocytes from cellular death in vitro and in vivo. *Biorheology* **41**, 521–534
 22. Kuhn, K., D'Lima, D. D., Hashimoto, S., and Lotz, M. (2004) Cell death in cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **12**, 1–16
 23. Sharif, M., Whitehouse, A., Sharman, P., Perry, M., and Adams, M. (2004) Increased apoptosis in human osteoarthritic cartilage corresponds to reduced cell density and expression of caspase-3. *Arthritis Rheum.* **50**, 507–515
 24. Hashimoto, S., Takahashi, K., Amiel, D., Coutts, R. D., and Lotz, M. (1998) Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **41**, 1266–1274
 25. Pelletier, J. P., Mineau, F., Boileau, C., and Martel-Pelletier, J. (2003) Diacerein reduces the level of cartilage chondrocyte DNA fragmentation and death in experimental dog osteoarthritic cartilage at the same time that it inhibits caspase-3 and inducible nitric oxide synthase. *Clin. Exp. Rheumatol.* **21**, 171–177
 26. Jouzeau, J. Y., Gillet, P., and Netter, P. (2000) Interest of animal models in the preclinical screening of anti-osteoarthritic drugs. *Joint Bone Spine* **67**, 565–569
 27. Janusz, M. J., Hookfin, E. B., Heitmeyer, S. A., Woessner, J. F., Freemont, A. J., Hoyland, J. A., Brown, K. K., Hsieh, L. C., Almstead, N. G., De, B., et al. (2001) Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis Cartilage* **9**, 751–760
 28. Bove, S. E., Calcaterra, S. L., Brooker, R. M., Huber, C. M., Guzman, R. E., Juneau, P. L., Schrier, D. J., and Kilgore, K. S. (2003) Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **11**, 821–830
 29. Loeuille, D., Gonord, P., Guingamp, C., Gillet, P., Blum, A., Sauzade, M., and Netter, P. (1997) In vitro magnetic resonance microimaging of experimental osteoarthritis in the rat knee joint. *J. Rheumatol.* **24**, 133–139
 30. Gutmann, B., Hutter-Paier, B., Skofitsch, G., Windisch, M., and Gmeinbauer, R. (2002) In vitro models of brain ischemia: the peptidergic drug cerebrolysin protects cultured chick cortical neurons from cell death. *Neurotox. Res.* **4**, 59–65
 31. Beltran, B., Mathur, A., Duchon, M. R., Erusalimsky, J. D., and Moncada, S. (2000) The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 14602–14607
 32. Malhotra, R., and Brosius, F. C., III (1999) Glucose uptake and glycolysis reduce hypoxia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **274**, 12567–12575
 33. Albina, J. E., Cui, S., Mateo, R. B., and Reichner, J. S. (1993) Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **150**, 5080–5085
 34. Boileau, C., Dumond, H., Presle, N., Etienne, S., Gegout-Pottie, P., Terlain, B., Netter, P., and Jouzeau, J. Y. (2002) Effect of selective COX2 inhibitor on cartilage lesion and chondrocyte apoptosis during experimental osteoarthritis in rat. *Fund. Clin. Pharm.* **16**, Suppl. 1, A47
 35. Grasl-Kraupp, B., Ruttkay-Nedecky, B., Koudelka, H., Bukowska, K., Bursch, W., and Schulte-Hermann, R. (1995) In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* **21**, 1465–1468
 36. Pelletier, J. P., Jovanovic, D. V., Lascau-Coman, V., Fernandes, J. C., Manning, P. T., Connor, J. R., Currie, M. G., and Martel-Pelletier, J. (2000) Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis Rheum.* **43**, 1290–1299
 37. Grogan, S. P., Aklin, B., Frenz, M., Brunner, T., Schaffner, T., and Mainil-Varlet, P. (2002) In vitro model for the study of necrosis and apoptosis in native cartilage. *J. Pathol.* **198**, 5–13
 38. Matsuo, M., Nishida, K., Yoshida, A., Murakami, T., and Inoue, H. (2001) Expression of caspase-3 and -9 relevant to cartilage destruction and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Acta Med. Okayama* **55**, 333–340
 39. Kiang, J. G., and Tsokos, G. C. (1998) Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Ther.* **80**, 183–201
 40. Weiss, Y. G., Maloyan, A., Tazelaar, J., Raj, N., and Deutschman, C. S. (2002) Adenoviral transfer of HSP-70 into pulmonary epithelium ameliorates experimental acute respiratory distress syndrome. *J. Clin. Invest.* **110**, 801–806
 41. Suzuki, K., Sawa, Y., Kaneda, Y., Ichikawa, H., Shirakura, R., and Matsuda, H. (1997) In vivo gene transfection with heat shock protein 70 enhances myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in rat. *J. Clin. Invest.* **99**, 1645–1650
 42. Okubo, S., Wildner, O., Shah, M. R., Chelliah, J. C., Hess, M. L., and Kukreja, R. C. (2001) Gene transfer of heat-shock protein 70 reduces infarct size in vivo after ischemia/reperfusion in the rabbit heart. *Circulation* **103**, 877–881
 43. Hoehn, B., Ringer, T. M., Xu, L., Giffard, R. G., Sapolsky, R. M., Steinberg, G. K., and Yenari, M. A. (2001) Overexpression of HSP72 after induction of experimental stroke protects neurons from ischemic damage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **21**, 1303–1309
 44. Tiffée, J. C., Griffin, J. P., and Cooper, L. F. (2000) Immunocalcification of stress proteins and extracellular matrix proteins in the rat tibia. *Tissue Cell* **32**, 141–147
 45. Kouri-Flores, J. B., Abbud-Lozoya, K. A., and Roja-Morales, L. (2002) Kinetics of the ultrastructural changes in apoptotic chondrocytes from an osteoarthrosis rat model: a window of comparison to the cellular mechanism of apoptosis in human chondrocytes. *Ultrastruct. Pathol.* **26**, 33–40
 46. Nuttall, M. E., Nadeau, D. P., Fisher, P. W., Wang, F., Keller, P. M., DeWolf, W. E., Jr., Goldring, M. B., Badger, A. M., Lee, D., Levy, M. A., et al. (2000) Inhibition of caspase-3-like activity prevents apoptosis while retaining functionality of human chondrocytes in vitro. *J. Orthop. Res.* **18**, 356–363
 47. Bloquel, C., Fabre, E., Bureau, M. F., and Scherman, D. (2004) Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications. *J. Gene Med.* **6**, Suppl. 1, S11–S23

Received for publication November 18, 2004.

Accepted for publication October 3, 2005.

Induction of heat shock protein 70 (Hsp70) by proteasome inhibitor MG 132 protects articular chondrocytes from cellular death *in vitro* and *in vivo*¹

Laurent Grossin, Stéphanie Etienne, Nadège Gaborit, Astrid Pinzano, Christel Cournil-Henrionnet, Catherine Gerard, Elisabeth Payan, Patrick Netter, Bernard Terlain and Pierre Gillet *

UMR 7561 CNRS – Université Nancy I, Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine de Nancy, BP 184, F54505 Vandœuvre, France

Abstract. The aim of this work was to determine whether Hsp70 overexpression via proteasome inhibitor MG132 was able to protect chondrocytes towards mono-iodoacetate (MIA) cytotoxicity both *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, overexpression of Hsp70 via MG132 was significantly able to protect chondrocytes from MIA toxicity (MTT/LDH analyses). Hsp70 essentially mediated this chondroprotective effect as demonstrated by antisense strategy. *In vivo*, chondrocytic overexpression of Hsp70, after a preventive intra-articular injection of MG132 in rat knee, was sufficient to decrease the severity of OA-induced MIA lesions, as demonstrated histologically and biochemically. In conclusion, intracellular overexpression of Hsp70, through proteasome inhibition, could be an interesting tool in protecting chondrocytes from cellular injuries, either necrotic or apoptotic in nature, and thus might be a novel chondroprotective modality in rat experimental OA.

1. Introduction

Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease, characterized by hyaline cartilage fibrillations and erosions, subchondral bone sclerosis and osteophyte formation at joint margins. These changes result from poorly understood events occurring over a long period, thus leading to both cartilage extracellular (ECM) matrix degradation and ECM synthesis inhibition. Furthermore, cartilage hypocellularity due to cell death also contributes to the development of OA, either apoptotic in nature, due to programmed cell death [1], or necrotic as an end result, ensuing from cellular injury. In fact, chondrocyte apoptosis is observed during OA, in both human OA [2] and OA experimental models [15].

An indicator of cellular suffering is the induction of heat shocks proteins (Hsps). Hsps are a set of conserved proteins in Prokaryotes and Eukaryotes, in which Hsps expression is induced by a lot of cellular stresses. Hsps also play a protective role as molecular chaperones in cells, by facilitating folding,

¹This work received support from the GIP HMR AVENTIS (grant FR99RHU037), Region Lorraine and CPRC of the CHU of Nancy.

* Address for correspondence: UMR 7561 CNRS – Université Nancy I, Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine de Nancy, BP 184, F54505 Vandœuvre, France. E-mail: pierre.gillet@medecine.uhp-nancy.fr.

intracellular transport, assembly, and disassembly of proteins. Hsps as well protect cells from oxidative damage both *in vivo* and *in vitro* [22] and additionally protect cell from either necrosis [31] or apoptosis [24]. An increase in the expression of Hsp70 in chondrocytes has been related to the severity of the joint lesions in humans. Therefore, Hsp70 could be an indicator of early stages of OA [29] and cellular suffering, and Hsp70 was thus suggested to have an important influence on OA progression. The same authors [28] found that the enhancement of Hsp70 expression protects cells from cell death induced by stress [18], mechanical, and biological factors [23].

In several cell types, proteasome inhibitors, like MG132, induce heat shock proteins. However, data in chondrocytes are currently scanty. The 26S proteasome is a multisubunit complex, which recognizes and degrades proteins, including poly-ubiquitinated, misfolded and short-lived regulatory proteins. Inhibition of the degradation of intracellular proteins by an inhibitor results in the accumulation of altered proteins, which, as an end result, induces the overexpression of Hsps [17].

The aim of the present work was to determine the chondroprotective properties of Hsp70 overexpression towards mono-iodoacetate (MIA) induced cytotoxicity *in vitro* and *in vivo*. To this end, we have used the peptide aldehyde inhibitor of proteasome MG132 as a potent inducer of Hsp70 expression in chondrocytes. This study assessing the chondroprotective properties of the overexpression of Hsp70 *via* preventive MG132 exposure was realized both *in vitro* in rat chondrocytes exposed to MIA and *in vivo* during the MIA-induced OA model in rat knee. It is noteworthy that MIA, when injected intra-articularly in rat knee, reproduces OA-like lesions, functional joint impairment and chondrocytic apoptosis and necrosis whose severity are clearly related to the dose of MIA used [13].

2. Material and methods

2.1. Cell culture

2.1.1. Reagents

Iodoacetic acid (MIA) was purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France) and proteasome inhibitor (Z-Leu-Leu-leucinal, MG132) was purchased from Calbiochem (VWR, Fontenay-sous-Bois, France).

2.1.2. Isolation and culture of chondrocytes

Articular chondrocytes were obtained from femoral head caps of male Wistar rats (175–200 g) (Charles River Laboratories, Saint-Aubin-les-Elbeuf, France, France). After sacrifice, hips were quickly dissected under sterile conditions and chondrocytes isolated by sequential digestion with pronase (2 mg/ml) and collagenase B (1.5 mg/ml) (Roche, Meylan, France). Cells were then plated in DMEM/Ham's F12 medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, gentamicin, amphotericin B (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Cells were cultured at confluence at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂, and were used at passage 2. In all experiments, chondrocytes were cultured under low FCS conditions (5%, v/v) and were used in monolayers at confluence.

2.1.3. Mono-iodoacetate (MIA) cytotoxicity

Cell stress was induced using different concentrations of MIA (2; 5 and 10 μ M). For Hsps induction, cells were treated with DMSO (0.1% (v/v) final concentration) as vehicle control or with Z-Leu-Leu-leucinal (MG132) [31] during 4 h followed by an incubation for 14 h in DMEM/F12. MG132 was used at 0.15, 0.5 and 1.5 μ M diluted in DMEM/F12 solution (0.1% (v/v) DMSO).

2.2. Assessment of cytotoxicity

2.2.1. Assay for lactate dehydrogenase activity

Cells were seeded in 24-well plates at a density of 2×10^5 cells per well. Cytotoxicity Detection Kit (Roche) measures the lactate dehydrogenase (LDH) activity released from the cytosol of damaged cells into the supernatant and evaluates the percentage of cell death. One hundred microliters of supernatant were incubated with 100 μ l of the reaction mixture. After 10 min of incubation in the dark, the reaction was stopped by 50 μ l of an HCl 1 N solution. Absorbance was measured using plate reader at 490 nm (MR5000, Dynatech). Cytotoxicity was determined in comparison using a positive test with a Triton X-100 2% (v/v) diluted in DMEM/F12 solution.

2.2.2. MTT assay

Cells were seeded in 96-well plates at a density of 5×10^4 cells per well. The assay is based on the cleavage of the yellow tetrazolium salt MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromure) to purple formazan crystals by dehydrogenase activity in intact mitochondria. Then, the formazan crystals are solubilized and absorbance of the resulting colored solution is measured at 550 nm (Dynatech). Cells were incubated with 100 μ l of DMEM/F12 and 25 μ l of MTT solution (5 mg/ml in PBS). After 4 h, the supernatant was removed and 100 μ l of a solubilization solution (sodium dodecyl sulfate + di-methyl formamide) were added into each well. The plate was incubated overnight before measurement.

2.3. Reverse transcription and polymerisation chain reaction

Cells were seeded in 6-well plates at a density of 5×10^5 cells per well. Hsp70 expression was increased by stimulation with MG132 in the range of 0.15 to 1.5 μ M for 4 h. Chondrocytes were washed twice with PBS, and total RNAs were extracted by the guanidium thiocyanate-phenol-chloroform method [7] using Trizol™ (Invitrogen). Total RNA amount was quantified by spectrophotometry at 260 nm. cDNA was obtained by reverse transcription (Omniscript® Reverse Transcriptase, Qiagen, Courtaboeuf, France) using 1 μ g of total RNA and oligodT primers (polydT₁₂₋₁₈, Invitrogen). Then, PCR amplification was performed using specific primers for Hsp70i (1946 bp product), Hsp27 (636 bp product) and GAPDH (816 bp product) (Table 1). Samples were first heated at 94°C for 15 min to activate the HotStarTaq polymerase (Qiagen). Amplification was performed for 30 cycles at 94°C for 45 s, 62°C for 45 s and 72°C for 1 min using a thermocycler (Eppendorf, VWR). The final extension step lasted 10 min (72°C). Amplification products were resolved by electrophoresis in a 1% (w/v) agarose gel, stained by ethidium bromide (0.5 μ g/ml), and photographed under UV light by a computer-assisted camera (GelDoc, Biorad, Marnes-la-Coquette, France).

2.4. Western blot analysis

Cells were seeded in 6-well plates at a density of 5×10^5 cells per well. After MG132 exposure, cells were washed with PBS, scrapped and lysed by sonication in 200 μ l of PBS. Proteins concentrations were measured by the method of Bradford [3]. Chondrocyte lysates were diluted with the gel loading buffer in a ratio of 1 : 1 (152 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 10% (v/v) 2-mercapto-ethanol and 0.004% (v/v) bromophenol blue), and heated at 95°C for 5 min. Electrophoresis was performed using 10% (w/v) SDS-polyacrylamide gel (20 μ g protein per lane) according to Laemmli [19].

Table 1
Primers used to evaluate expression of the genes GAPDH and Hsp70i by RT-PCR

	Forward	Reverse
GAPDH	5'-ACGGATTGGCCGTATTGGCCGC-3'	5'-TGGTCCTCAGTGTAGCCCAGGAT-3'
Hsp70i	5'-AGCGACATGGCCAAGAAAACAGCG-3'	5'-CCAGAAAAGCCTCCAATCCACCTCC-3'
Hsp27	5'-GCCAAGACCATGACCGAG-3'	5'-CTTCCACTGGCTCCAGAC-3'

Separated proteins were transferred onto PVDF membranes (Immobilon-P, Biorad) and non-specific binding sites were blocked overnight at 4°C with 3% (w/v) BSA in TBST solution (9 mM Tris-HCl, pH 9.0, 154 mM NaCl, 0.05% v/v Tween 20). Membranes were incubated with primary antibodies, rabbit polyclonal anti-Hsp70 (1/20000) (Stressgen, Tebu, Le Perray en Yvelines, France) or rabbit polyclonal anti-Hsp27 (1/2000) (Stressgen) for 1 h. After 6 washes with TBST solution, membranes were further incubated for 1 h with the secondary antibody (goat anti-rabbit IgG) conjugated to alkaline phosphatase (1/40000). Membranes were washed again with TBST, incubated for 5 min with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT, Roche) and reaction was stopped with methanol. Protein expression was evaluated by densitometry analysis of each band (NIH Image) in arbitrary units.

2.5. Antisense strategy

The antisense oligonucleotide against Hsp70i was performed in order to determine if this oligonucleotide was able to inhibit the protective effect of MG132 towards the toxicity of MIA. Optimized antisense oligomers, 5'-CACCTTGCCGTGCTGGGAA-3' (10 μM), located in the starting-coding region of the rat Hsp70, were mixed with polyethylenimine reagent (Exgen 500, Euromedex, Mundolsheim, France) (3%, v/v) and then incubated 15 min at room temperature. An equal volume of complete medium was mixed to a final volume of 200 μl for the 6-well plates and 30 μl for 96-well plates and added to the cells. After incubation for 4 h at 37°C, medium was changed and cells were incubated for an additional 20 h sequence. A second transfection was done, in the same conditions (PEI 3% v/v, 10 μM antisense oligomers). After 90 min, the supernatant was removed and experiments were started. Control using nonsense oligonucleotide (5'-TGGATCCGACATGTCAGA-3') were done concurrently.

2.6. Experimental in vivo procedures in the rat

2.6.1. Induction of MIA induced OA and treatment procedure

Male Wistar rats weighing 150 g (Charles River Laboratories) were housed in solid-bottomed plastic cages designed to allow easy access to standard laboratory food and water *ad libitum*. Rats were kept in a 12 : 12 light-dark cycle (light-on period, 6:00 am–6:00 pm) in a controlled temperature chamber. Several doses of MIA (0.03 or 0.3 mg, Sigma), dissolved in 50 μl of sterile physiologic saline, were injected through the intra-patellar ligament [18]. MG132 was dissolved in 50 μl of a sterile solution of PEG (polyethylene glycol, Sigma) and this solution was injected 3 h before MIA. For each study, two control groups of rats received concomitantly sterile saline solution and sterile solution of PEG, respectively.

2.6.2. Histological assessment

Fifteen days after injection with either MIA, saline, or MG132, rats were killed and the whole knee joints were fixed immediately with 10% (v/v) formalin, decalcified, and embedded in paraffin. Sagittal sections were prepared and stained with hematoxylin–eosine–safran, toluidine blue or Sirius red. The severity of OA lesions was graded on a scale of 0–21, by 2 independent observers, using a modified form

of histological/histochemical scale of Mankin [5,11]. This scale evaluates the severity of OA lesions based on proteoglycan integrity (scale 0–4), cellular changes (scale 0–3), collagen fibers integrity (scale 0–3), invasion of the tidemark by blood vessels (scale 0–1), bone modifications (scale 0–2) and structural changes (scale 0–5, were 0 = normal cartilage structure and 5 = erosion of the cartilage down to the subchondral bone).

2.6.3. Gross evaluation

Rat knee joints were isolated on day 15 and carefully dissected to assess the severity of macroscopic chondral alterations after injections of either MIA alone, MG132 (15 μ M) and MIA (0.3 mg) or saline. All the compartments of the knee (medial and lateral tibial plateaus, medial and lateral condyles, patellae, and femoral groove) were observed. Macroscopic lesions were graded as follow: 0 = normal appearance; 1 = slight yellowish discoloration of the chondral surface; 2 = little cartilage erosions in load-bearing areas; 3 = large erosion extending down to the subchondral bone; 4 = large erosions with large areas of subchondral bone exposure. The 6 compartment scores were combined (for a maximum possible score of 24) and the mean was determined for each group.

2.6.4. Measurement of proteoglycan biosynthesis

Proteoglycan synthesis was assessed as described by van der Kraan et al. [30], with some modifications. Fifteen days after injections, rats were killed as described earlier and the patellae from the injected right knees were carefully dissected out. The patellae from the injected left knees were used to determine sulphated GAG concentrations. They were placed in 1 ml of medium consisting of RPMI 1640 with HEPES and sodium bicarbonate, supplemented with L-glutamine (2 mM), penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 μ g/ml) (Invitrogen), and $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (0.7 μ Ci/ml; Amersham, Les Ulis, France). After incubation for 3 h (37°C, 5% CO_2), patellae were washed with 1 ml of cold physiologic saline and fixed overnight in 0.5% cetylpyridinium chloride (Sigma) in phosphate buffered formalin. After decalcification in 5% formic acid for 6 h, the central area of the patella was sampled with a 2 mm-diameter biopsy punch (Stiefel, Nanterre, France). The punched-out part of the patellae and the remaining peripheral part of the patellae were separately dissolved overnight in 0.5 ml of Soluene-350 (Packard, Rungis, France). The amount of ^{35}S -sulfate incorporated in each compartment was counted using scintillation fluid (Hionic Fluor; Packard). Results were expressed as the differences between the MIA-injected, the MG132-injected and the MIA + MG132-injected patellae and control patellae in the mean percentage of ^{35}S incorporated.

2.6.5. Immunostaining

Bilateral injections of MG132 (15 μ M) were realized through infra-patellar ligament and rats were sacrificed at 24 h or 48 h. Patellae and knees were isolated and fixed in 4% paraformaldehyde, decalcified in 10% EDTA and embedded in paraffin. Sections (5 μ m) of paraffin-embedded samples were deparaffinized in toluene, rehydrated in a graded series of ethanol, and incubated with trypsin 0.1% in CaCl_2 0.1% for 30 min at 37°C. Slices were then washed in PBS, and endogenous peroxidase was inhibited in 3% hydrogen peroxide/TNT buffer (Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5; NaCl 0.15 M; 0.05% Tween 20) for 10 min. They were further incubated with TNB buffer (Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5; NaCl 0.15 M; 0.5% blocking reagent) and overlaid with antibodies (rabbit polyclonal anti-Hsp70; 1 : 300) (Stressgen) for 1 h at room temperature in a humidified chamber. Each slide was washed 3 times in TNT buffer, pH 7.4, then incubated in DNP amplification reagent (Kit NEN amplification, Novocastra, Tebu) for 7 min. After 3 washing in TNT buffer in a shaking water bath, slides were incubated with anti-DNP-HRP antibodies from the kit for 30 min in a humidified chamber and then washed again in TNT buffer. Color was developed with DAB containing hydroxide peroxide and slides were counterstained for 3 min in 1% methyl

green. The counterstaining gives green-stained nuclei and specific staining appears as brown-stained cytoplasm. The percentage of positive chondrocytes was measured by counting the positive cells and the total number of cells in the different cartilage layers. For each specimen, 3 microscopic fields were examined (magnification, $\times 40$), in each layer of cartilage (the superficial, intermediate and deep layers). Each slide was subjected to a double-blind evaluation with a maximal variation of 5% observed.

3. Results

3.1. Overexpression of Hsps and cytoprotection in MG132-treated cells

3.1.1. Hsp70i and Hsp27 mRNA expression in chondrocytes in response to MG132 treatment

RT-PCR led to amplicons of the expected size: 1946, 636 and 816 bp for Hsp70i, Hsp27 and GAPDH respectively (Fig. 1). In each sample, expression of the gene encoding for Hsp70i was normalized according to that GAPDH mRNA (Fig. 1). Hsp70i and Hsp27 mRNA were not detected in control chondrocytes. A MG132 exposure stimulated the mRNA expression of Hsp70i in a dose-dependent manner, the lowest dose of MG132 also being able to induce mRNA overexpression. The same pattern of expression was observed, in a lesser extent, for Hsp27.

3.1.2. Hsp70i and Hsp27 proteins expression in chondrocytes in response to MG132 treatment

As expected, MG132 also induced Hsp70i (70 kDa) protein expression in chondrocytes (Fig. 2). The protein was detected 6 h after MG132 exposure, the signal intensity increasing until 24 h. At 48 h, Hsp70 level decreased, probably related to the short half-life of the protein. In fact, at 48 h, Hsp70i protein level was around 3.3-fold less expressed, when compared to 24 h with 1.5 μM MG132 treatment.

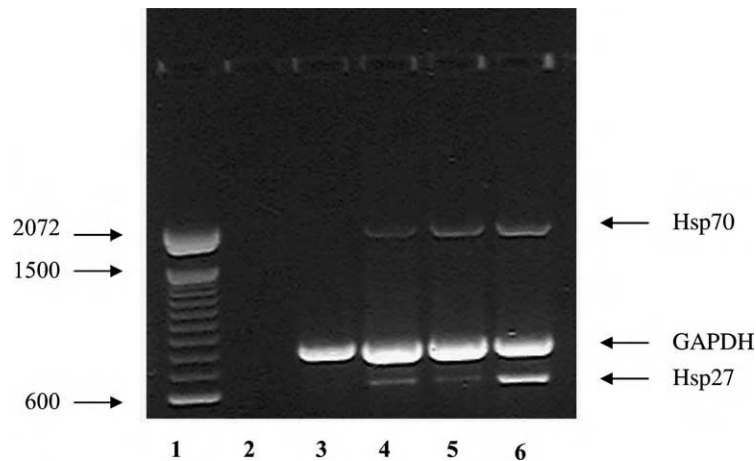


Fig. 1. Electrophoretic profile of RT-PCR products of Hsp70i, Hsp27 and GAPDH using specific primers. Chondrocytes are submitted to MG132 exposure at several concentrations (0.15 μM , 0.5 μM , 1.5 μM) for 6 h. Then total RNA are extracted and submitted to RT-PCR reaction. PCR products generated by amplification are visualized on 1% agarose gel, stained with ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Lane 1, molecular weight markers; Lane 2, negative PCR control; Lane 3, control cells without MG132; Lane 4, cells treated with 0.15 μM MG132; Lane 5, cells treated with 0.5 μM MG132 (lane 5); Lane 6, cells treated with 1.5 μM MG132. Induction of Hsps proteins were observed with each concentration of proteasome inhibitor (MG132), as soon as 6 h after exposure and the maximum of induction was depicted with 1.5 μM of MG132, without any signs of cytotoxicity.

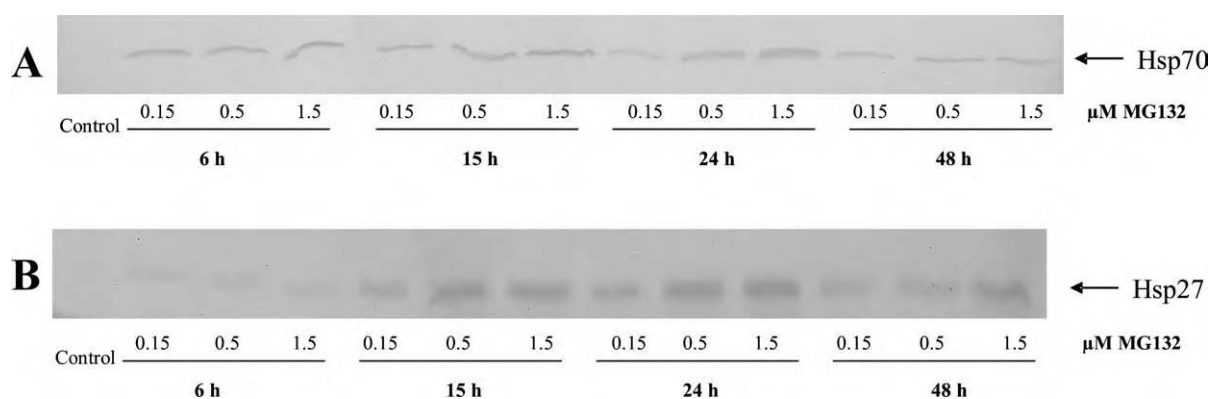


Fig. 2. Expression levels of the proteins Hsp70i in chondrocytes treated with MG132. Cells were treated either with the vehicle (0.1% DMSO in medium) or 0.15; 0.5 or 1.5 μM MG132 for 4 h, and then incubated in fresh medium for 2, 11, 20 or 44 h. Cells were lysed and the lysates were used to perform SDS/PAGE. For each sample, 20 μg of total proteins were loaded on the gel. Specific primary antibody against the inducible form of Hsp70i was used. Level of expression of the protein were estimated by densitometry. For Hsp70i, induction was already detected at 6 h after exposure and the maximum amount of proteins was observed at 24 h with the highest concentration of MG312 (1.5 μM). For Hsp27, a weak induction was observed at 6 h and as for Hsp70, the maximum induction was reached at 24 h after proteasome inhibitor exposure.

3.1.3. MG132 protection against MIA-induced cell death

Cells were pre-treated or not with different concentrations of MG132 (0.15, 0.5 or 1.5 μM) and then were incubated with different concentrations of MIA (2, 5 and 10 μM) for 6 h, 24 h and 48 h, respectively. Cell survival was quantified by measuring lactate dehydrogenase release. Figure 3 shows the results obtained after MIA treatment (A: 6 h, B: 24 h, C: 48 h). A pretreatment with MG132 has a significantly advantage against cell injury during MIA treatment. Moreover, cytoprotection was MG132 dose-dependent, and, in an other hand, clearly related to MIA dose and time exposure. These results were confirmed by MTT test and they showed the same effect of MG132 on MIA toxicity (data not shown). Moreover, data showed that MG132 was not chondrotoxic and not a pro-apoptotic in our experimental conditions as assessed by TUNEL method (data not shown).

3.1.4. Effects of antisense oligonucleotides

To determine whether the proteasome inhibitor was related to the level of Hsp70i expression and affected protection, rat chondrocytes were pre-treated with 10 μM antisense oligonucleotides specific against the heat-inducible Hsp70 mRNA prior to 1.5 μM MG132 stimulation. The resulting increases in Hsp70i protein in response to MG132 stimulation were blocked by Hsp70 oligonucleotides, shown by western-blot. Pre-treatment of cells with antisense oligonucleotides decreased the protection of MG132 towards MIA (10 μM , 6 h), as observed by the MTT test (Fig. 4). In fact, addition of 10 μM Hsp70 antisense oligonucleotides reduced significantly ($p < 0.005$) MG132 protection towards MIA to 18% protection in MG132-treated cells when compared with a 60% to 70% protection in cells pretreated with MG132 alone or with 10 μM nonsense oligonucleotides.

4. In vivo experimental studies in the rat

4.1. Increased Hsps expression after MG132 stimulation

Immuno-histochemical analysis of cartilage with Hsp70i antibody after injection of MG132 or saline is shown in Fig. 5. The results showed a higher level of Hsp70 protein in the lower hypertrophic chon-

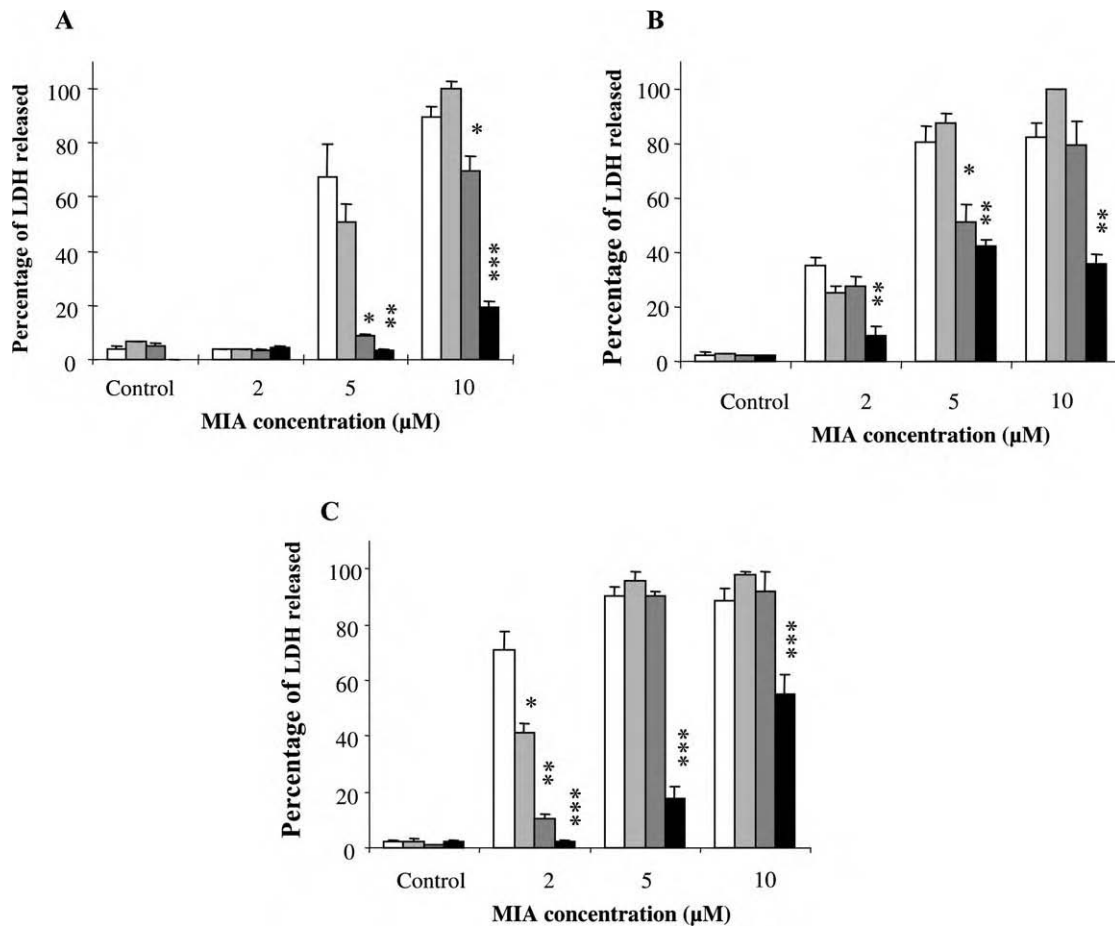


Fig. 3. Protective properties of MG132 towards MIA cytotoxicity. The release of LDH from cells pretreated with various doses of MG132 (□, chondrocytes without preventive exposure to MG132; ▒, chondrocytes preventively exposed to proteasome inhibitor MG132 (0.15 μM); ▓, chondrocytes preventively exposed to proteasome inhibitor MG132 (0.5 μM); ■, chondrocytes preventively exposed to proteasome inhibitor MG132 (1.5 μM) or treated with different concentrations of MIA (2 μM; 5 μM and 10 μM) for 6 h (panel A), 24 h (panel B) or 48 h (panel C) was measured. Results are expressed as percentage of LDH released from the cells over total LDH for each sample. There were normalized to the amount of LDH released by control cells. Errors bars show the mean ± SEM ($n = 3$ per group in 3 repeated experiments). * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$ (Student's *t*-test).

drocytes either in control than treated rats (100% of positive cells). In control rats, there was a weak expression of Hsp70 in the superficial layer (around 20% of positive cells). In contrast MG132 *ia* injection into rat knee joint induced the expression of Hsp70 in chondrocytes of the superficial and middle layer ($n = 8$ patellae). Moreover, after one injection of MG132, Hsp70 proteins in the superficial layer were expressed 24 h after injection and expression was maximal at 48 h. In fact, the percentage of positive cells for Hsp70i in the superficial zone was significantly higher in response to MG132 injection ($44 \pm 12\%$ for 24 h and $63 \pm 18\%$ at 48 h) than in normal cartilage ($27 \pm 4\%$) (Fig. 5).

4.1.1. Macroscopic study after MIA *ia* injection and effect of MG132 pre-treatment

Fifteen days after the *ia* injection of 0.3 mg of MIA, preceded or not by a preventive *ia* injection of MG132 (0.35 μg), articular cartilage of the different compartments was observed macroscopically

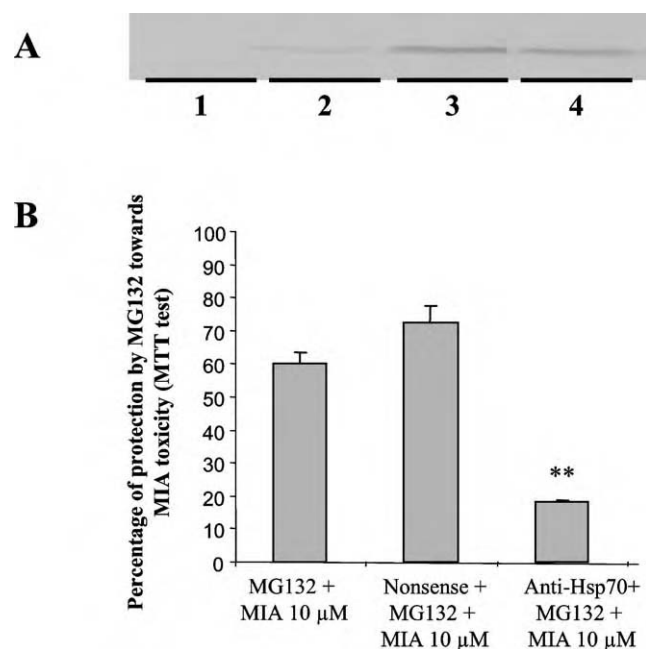


Fig. 4. Antisense experiments. Panel A: Western blot analysis of Hsp70i after treatment of chondrocytes with Hsp70i antisense oligonucleotides. Cells were treated with 10 μ M nonsense or 10 μ M antisense oligonucleotides in the presence or absence of 1.5 μ M MG132. Lane 1, no exposure to neither MG132 or oligonucleotides; Lane 2, exposure to antisense oligonucleotide prior to MG132 exposure; Lane 3, exposure to non-sens oligonucleotide prior to MG132 exposure; Lane 4, exposure to MG132 exposure; Panel B: Toxicity of MIA in cells treated with Hsp70i antisense oligonucleotides. Cells were first treated with either 10 μ M nonsense or 10 μ M antisense oligonucleotides and then stimulated with 1.5 μ M MG132 for 4 h. After an incubation for 14 h at 37°C–5% CO₂, cells were treated by 10 μ M MIA for 6 h before MTT test. Errors bars show the mean \pm SEM ($n = 3$ per group). ** $p < 0.005$ (Student's t -test).

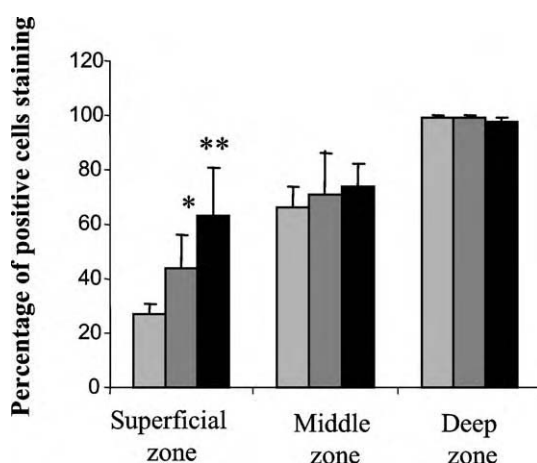


Fig. 5. Immunohistochemistry of Hsp70 in articular cartilage. Rats received an intra-articular injection of MG132 0.35 μ g (15 μ M in 50 μ l) into the knee joints and were sacrificed at 24 and 48 h. Percentage of positive cell staining for Hsp70i in cartilage from the different layers in the presence or absence of MG132. □, control patellae of rats, receiving an intra-articular injection of saline solution; ▒, patellae of rats, submitted to an intra-articular injection of MG132 (15 μ M) for 24 hours; ■, Patellae of rats, submitted to an intra-articular injection of MG132 (15 μ M) for 48 hours. Bars show the mean \pm SEM ($n = 8$ patellae). * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$ (Student's t -test).

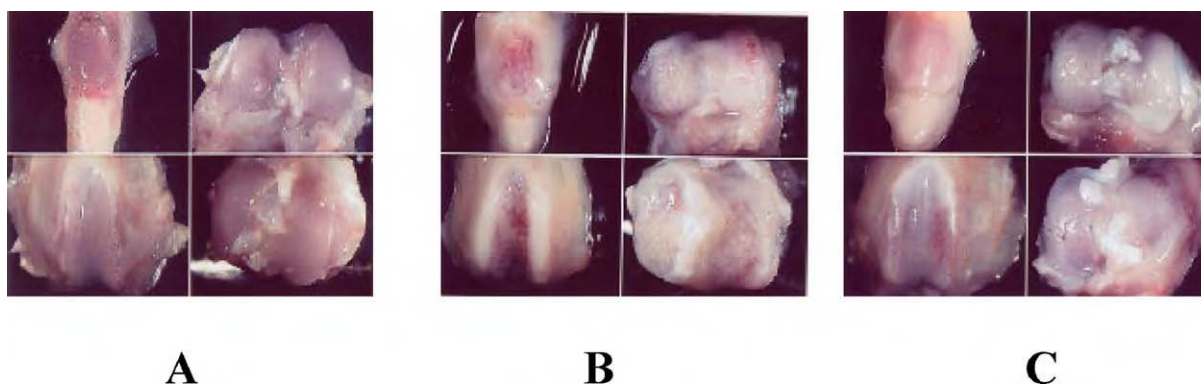


Fig. 6. Macroscopic changes in the knee joint compartments after intra-articular injection of MIA 0.3 mg with or not a previous injection of MG132 0.35 μg . The knees of 3 rats per group were carefully dissected on day 15, under a magnifying glass. The different articular surfaces shown in each part of the figure are the patella (upper left), the femoral groove (lower left), the femoral condyles (upper right) and the tibial plateaus (lower right). Panel A: No macroscopic lesion can be seen in the normal rat knee. Panel B: After intra-articular injection of 0.3 mg MIA, large subchondral bone exposures are present in the different compartments and osteophytes are prominent in the peripatella and femoral groove. Panel C: A previous intra-articular injection of MG132 0.35 μg , allowed to reduce the lesions.

(Fig. 6). Injection of MIA alone led to lesions affecting all articular cartilage of the knee joint, especially in the femoro-tibial joint, with large chondral erosions and subchondral bone exposure in both tibial plateaus and femoral condyles (mean score: 18.5 ± 0.96). Large osteophytes were present in the nonweight-bearing areas of femoral condyles and tibial plateaus. Patella and femoral groove were also affected, but in a lesser extent. In rat knees, previously injected with MG132, lesions were less severe on day 15. Hyaline cartilage of central weight-bearing areas of each articular surface was thin and yellowish, with focal erosions in femoral condyles and tibial plateaus. Patella and femoral groove seemed to be not affected. We have not assessed macroscopically the protective effect of MG132 on the lowest dose of MIA (0.03 mg) because macroscopic lesions observed at this dose-regimen were not important enough to observe a protective effect of MG132 [18] (mean score: 6.33 ± 2.67 , $p < 0.005$).

4.1.2. Histological study after MIA ia injection and effect of MG132 pre-treatment

On day 15 after *ia* injection of 0.03 or 0.3 mg of MIA preceded or not by a preventive *ia* injection of MG132 (0.35 μg), the whole knee joints that had been injected with either MIA, saline or MG132 were fixed, decalcified and embedded in paraffin. Sagittal sections were prepared and stained with hematoxylin–eosine–safran, toluidine blue and sirius red. Histologic scores for the lesions on cartilage patellae, condyles and plateaus were realised (Fig. 7). Histological scoring for of the lesions was higher in knees injected with MIA (0.3 mg and 0.03 mg) than those injected with saline or MG132. Morphologic changes characteristic of experimental MIA-induced OA [13] were observed: subchondral bone exposure, subchondral bone sclerosis, synovial membrane hyperplasia and fibrosis, slight infiltration of mononuclear leukocytes, hypocellularity and clusters of chondrocytes, and decrease of proteoglycan integrity. Interestingly, a minimal toxicity of MG132 (lesions graded 4.5) was present, when compared with saline alone: synovial membrane was hyperplastic and fibrotic, but, in contrast, cartilage cellularity and matrix integrity were not affected. In contrast, in the MG132-pretreated group, the lesions were significantly less severe (lesions graded 9.62 ± 1.99 for MIA 0.03 mg and 12.00 ± 3.17 for MIA 0.3 mg) compared with those in the MIA alone group (0.03 mg, lesions graded 18.96 ± 1.37 ; 0.3 mg, lesions graded 20.50 ± 0.29).

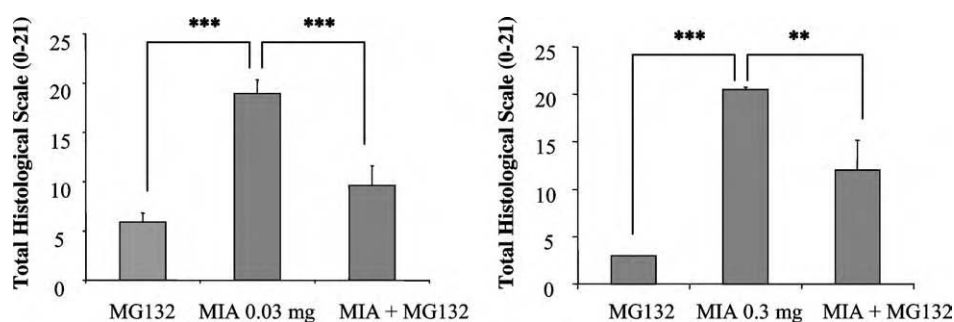


Fig. 7. Histologic changes in the knee joints after intra-articular injection of MIA 0.3 mg and 0.03 mg with or not a previous injection of MG132. First, rats received or not an intra-articular injection of MG132 0.35 μ g (15 μ M in 50 μ l) into the knee joints followed by an injection of MIA (0.3 mg and 0.03 mg) and were sacrificed at 15 days after MIA injection. Histologic grading of cartilage from the patellae, femoral condyles and tibial plateaus. Bars show the mean and SEM ($n = 12$ patellae per group). ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$ (Student's t test).

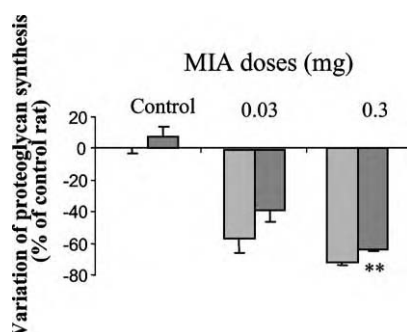


Fig. 8. Chondrocytes metabolism. Rats received or not an intra-articular injection of MG132 0.35 μ g (15 μ M in 50 μ l) into the knee joints followed by an injection of MIA (0.3 mg and 0.03 mg) and were sacrificed at 15 days after MIA injection. Proteoglycan biosynthesis in patellar cartilage, measured by $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ incorporation after intra-articular injection of MG132 and/or MIA in rat knee joint. Results are expressed as the percentage of change in ^{35}S incorporation in the central part of the patella versus the control rats ($n = 6$ patellae per group). \square , Rats only treated with a single injection of MIA (0.3 mg; 0.03 mg); \blacksquare , Rats were submitted to an intra-articular injection of MG132 (15 μ M). Bars show the mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$, versus rats injected with MIA only (no injection of MG132), Student's t test.

4.1.3. Effects of MIA on proteoglycan biosynthesis and chondroprotective effect of MG132

Fifteen days after injection of either 0.03 mg or 0.3 mg of MIA into rat knee joint, ^{35}S -sulphate incorporation in the central patella was strongly inhibited by $56.32 \pm 8.47\%$ and $72.41 \pm 1.29\%$ respectively (Fig. 8). A previous injection of MG132 0.35 μ g reduced the strong inhibition of anabolism (-62% , $p < 0.005$, 0.3 mg). Moreover, the MG132 alone did not affect significantly proteoglycan anabolism.

5. Discussion

The aim of this study was to evaluate the protective effect of MG132, a transient inhibitor of the proteasome pathway, in chondrocytes submitted to cytotoxic potencies of mono-iodoacetate (MIA). In a first step, these experiments were performed *in vitro* to determine that this cytoprotection was mediated *via* Hsp induction. Secondly, according to these data, *in vivo* studies were then conducted in the MIA-

induced OA model in the rat to confirm the chondroprotective effect of Hsp overexpression ancillary to the temporary inhibition of the proteasomal degradation pathway.

In fact, numerous reports have described both pro and antiapoptotic properties of a variety of proteasome inhibitors. In general, inhibition of the 26S proteasome elicits either (1) an anti-apoptotic effect in terminally differentiated cells [20,25,27] and non-rapidly dividing cells, or (2) a pro-apoptotic process in fast-dividing cells [10]. Besides, accumulation of abnormal or short-lived protein inside cell cytoplasm, due to the inhibition of the proteasome pathway, induces *de facto* the overexpression of stress proteins, such as Hsp70 [6].

The results presented herein demonstrate that chondrocyte exposure to a transient proteasome inhibitor led to such an overexpression of Heat shock proteins, mainly Hsp70 and Hsp27, without any signs of chondrotoxicity *in vitro* and *in vivo*. Additionally, we have reported in this study that a preventive treatment of chondrocytes with several doses of proteasome inhibitor confers a relative cytoprotection versus the cytotoxic effect generated by MIA exposure. This resistance against cellular stress was mainly mediated *via* the induction of Hsp70, as demonstrated by oligonucleotide antisense strategy, despite the induction, in a lesser extent, of all the members of Heat Shock Proteins family and relative cofactors (personal data). Thus, the persistence of a weak protection, even when Hsp70 expression was knock-out, was probably related to others Hsps (e.g., Hsp27) and also to other factors, such as HSF1 [17].

To the best of our knowledge, this is the first report in which a transient inhibition of the proteasome pathway was able to protect chondrocytes cells from lethal stresses, even if the precise molecular cytoprotective mechanism was not clearly understood. This effect is believed to be similar to other heat shock proteins in behaving as a molecular chaperone and thus preventing denaturation and misfolding of cytoplasmic proteins [21]. This protective effect might also be due to the ability of proteasome inhibition to assist to the transfer of newly synthesized proteins into the mitochondria, thus helping to maintain overall mitochondria integrity [26], or, in an other way, by preventing apoptosis by inhibiting caspases activation [23]. *In vitro*, the chondroprotective effect of MG132 against MIA toxicity seems to be essentially mediated by Hsp70 whereas Hsp27 does not take an important part in this effect. In contrast, the induction of Hsp27 *in vivo* should be of importance due to its ability to inhibit cell death process induced by other pathways [4,8,12].

We have previously reported (internal data) that a single intra-articular injection of MG132 in rat knee was able to induce Hsps overexpression (Hsp70 and Hsp27) in articular chondrocytes: this induction was detectable up to 48–72 hours after a single injection, and then decreasing to its basic level. Additionally, cartilage biosynthetic activity seems to be not affected by this single injection thus suggesting that an intra-articular (*ia*) injection of MG132 was not deleterious for chondrocytes viability and metabolism. With this in mind, *in vivo* experiments were then performed in order to determine whether the induction of Hsps was sufficient to protect chondrocytes from cellular stresses generated by MIA exposure which reproduces OA-like lesions in rat knee 10 to 15 days after *ia* injection [14]. The results presented here clearly indicate that a preventive injection of transient proteasome inhibitor is able to decrease the severity of macroscopical and histological lesions secondary to MIA exposure. This beneficial influence was also confirmed by measuring the biosynthetic activity of chondrocytes (proteoglycan synthesis), which is partially restored after MG132 exposure, when compared with controls only submitted to MIA injection.

The interest of a reversible proteasome inhibitor in altering the course of chondral lesions in experimental OA has not been previously assessed. This original concept appears as an interesting way to improve or reinforce chondrocytes to withstand against cellular stresses leading to cell death, and therefore, to cartilage degradation. This chondroprotective potency during MIA-induced OA needs therefore

to be confirmed during in others OA models, e.g., anterior cruciate ligament transection which also closely mimics OA progression. Interestingly, in this model, apoptotic events also play a pivotal role in the establishment and progression of the disease. In this case, the ambivalent effect of proteasome inhibitor on proliferating and nondividing cells could be of a particular interest since a proliferation of synovial cells (synovitis) is associated to chondral erosion, thus mimicking OA flare.

With this in mind, *ia* injection of MG132 should both improve chondrocytes resistance to apoptotic events and simultaneously sensitize highly proliferating synovial cells to apoptotic process [16]. Moreover, an increase of Hsp70 in synoviocytes and chondrocytes could present another interest, due to its ability to inhibit the NF κ B related transduction signal, pathway leading to the overexpression of proinflammatory cytokines (IL-1 β , TNF α , . . .) [9]. Finally, single or repeated *ia* injections of a transient proteasome inhibitor could increase chondrocytes viability in rendering articular cells less sensitive to inflammatory mediators and ancillary apoptotic signals. The combination of these effects could delay the degradation of the extracellular matrix occurring during osteoarthritis.

Acknowledgment

We gratefully thank Michel Thiery for his good care to the animals.

References

- [1] T. Aigner and H.A. Kim, Apoptosis and cellular vitality: issues in osteoarthritic cartilage degeneration, *Arthritis Rheum.* **46** (2002), 1986–1996.
- [2] F.J. Blanco, R. Guitian, E. Vazquez-Martul, F.J. de Toro and F. Galdo, Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology, *Arthritis Rheum.* **41** (1998), 284–289.
- [3] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72** (1976), 248–254.
- [4] J.M. Bruey, C. Ducasse, P. Bonniaud, L. Ravagnan, S.A. Susin, C. Diaz-Latoud, S. Gurbuxani, A.P. Arrigo, G. Kroemer, E. Solary and C. Garrido, Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c, *Nat. Cell Biol.* **2** (2000), 645–652.
- [5] J.A. Buckwalter and H.J. Mankin, Articular cartilage repair and transplantation, *Arthritis Rheum.* **41** (1998), 1331–1342.
- [6] K.T. Bush, A.L. Goldberg and S.K. Nigam, Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance, *J. Biol. Chem.* **272** (1997), 9086–9092.
- [7] P. Chomczynski and N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction, *Anal. Biochem.* **162** (1987), 156–159.
- [8] C.G. Concannon, A.M. Gorman and A. Samali, On the role of Hsp27 in regulating apoptosis, *Apoptosis* **8** (2003), 61–70.
- [9] X.Z. Ding, C.M. Fernandez-Prada, A.K. Bhattacharjee and D.L. Hoover, Over-expression of hsp-70 inhibits bacterial lipopolysaccharide-induced production of cytokines in human monocyte-derived macrophages, *Cytokine* **16** (2001), 210–219.
- [10] H.C. Drexler, Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (1997), 855–860.
- [11] M.G. Ehrlich, H.J. Mankin, H. Jones, A. Grossman, C. Crispin and D. Ancona, Biochemical confirmation of an experimental osteoarthritis model, *J. Bone Joint Surg. Am.* **57** (1975), 392–396.
- [12] C. Garrido, J.M. Bruey, A. Fromentin, A. Hammann, A.P. Arrigo and E. Solary, HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9, *FASEB J.* **14** (1999), 2061–2070.
- [13] C. Guingamp, P. Gegout-Pottie, L. Philippe, B. Terlain, P. Netter and P. Gillet, Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry, *Arthritis Rheum.* **40** (1997), 1670–1679.
- [14] R.E. Guzman, M.G. Evans, S. Bove, B. Morenko and K. Kilgore, Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis, *Toxicol. Pathol.* **31** (2003), 619–624.

- [15] S. Hashimoto, L. Creighton-Achermann, K. Takahashi, D. Amiel, R.D. Coutts and M. Lotz, Development and regulation of osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, **10** (2002), 180–187.
- [16] A. Kawakami, T. Nakashima, H. Sakai, A. Hida, S. Urayama, S. Yamasaki, H. Nakamura, H. Ida, Y. Ichinose, T. Aoyagi, I. Furuichi, M. Nakashima, K. Migita, Y. Kawabe and K. Eguchi, Regulation of synovial cell apoptosis by proteasome inhibitor, *Arthritis Rheum.* **42** (1999), 2440–2448.
- [17] D. Kim, S.H. Kim and G.C. Li, Proteasome inhibitors MG132 and lactacystin hyperphosphorylate HSF1 and induce hsp70 and hsp27 expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254** (1999), 264–268.
- [18] T. Kubo, Y. Arai, K. Takahashi, T. Ikeda, S. Ohashi, I. Kitajima, O. Mazda, M. Takigawa, J. Imanishi and Y. Hirasawa, Expression of transduced HSP70 gene protects chondrocytes from stress, *J. Rheumatol.* **28** (2001), 330–335.
- [19] U.K. Laemmli, F. Beguin and G. Gujer-Kellenberger, A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation, *J. Mol. Biol.* **47** (1970), 69–85.
- [20] A.B. Meriin, V.L. Gabai, J. Yaglom, V.I. Shifrin and M.Y. Sherman, Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis, *J. Biol. Chem.* **273** (1998), 6373–6379.
- [21] D.D. Mosser, A.W. Caron, L. Bourget, A.B. Meriin, M.Y. Sherman, R.I. Morimoto and B. Massie, The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis, *Mol. Cell. Biol.* **20** (2000), 7146–7159.
- [22] B.S. Polla, S. Kantengwa, D. Francois, S. Salvioli, C. Franceschi, C. Marsac and A. Cossarizza, Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996), 6458–6463.
- [23] L. Ravagnan, S. Gurbuxani, S.A. Susin, C. Maise, E. Daugas, N. Zamzami, T. Mak, M. Jaattela, J.M. Penninger, C. Garrido and G. Kroemer, Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor, *Nat. Cell Biol.* **3** (2001), 839–843.
- [24] J.D. Robertson, K. Datta, S.S. Biswal and J.P. Kehrer, Heat-shock protein 70 antisense oligomers enhance proteasome inhibitor-induced apoptosis, *Biochem. J.* **344** (1999), 477–485.
- [25] R. Sadoul, P.A. Fernandez, A.L. Quiquerez, I. Martinou, M. Maki, M. Schroter, J.D. Becherer, M. Irmeler, J. Tschopp and J.C. Martinou, Involvement of the proteasome in the programmed cell death of NGF-deprived sympathetic neurons, *EMBO J.* **15** (1996), 3845–3852.
- [26] A. Samali, J.D. Robertson, E. Peterson, F. Manero, L. van Zeijl, C. Paul, I.A. Cotgreave, A.P. Arrigo and S. Orrenius, Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli, *Cell Stress Chaperones* **6** (2001), 49–58.
- [27] C. Stefanelli, F. Bonavita, I. Stanic, C. Pignatti, G. Farruggia, L. Masotti, C. Guarneri and C.M. Caldarera, Inhibition of etoposide-induced apoptosis with peptide aldehyde inhibitors of proteasome, *Biochem. J.* **332** (1998), 661–665.
- [28] K. Takahashi, T. Kubo, Y. Arai, J. Imanishi, M. Kawata and Y. Hirasawa, Localization of heat shock protein in osteoarthritic cartilage, *Scand. J. Rheumatol.* **26** (1997), 368–375.
- [29] K. Takahashi, T. Kubo, R.S. Goomer, D. Amiel, K. Kobayashi, J. Imanishi, R. Teshima and Y. Hirasawa, Analysis of heat shock proteins and cytokines expressed during early stages of osteoarthritis in a mouse model, *Osteoarthritis Cartilage* **5** (1997), 321–329.
- [30] P.M. van der Kraan, E.L. Vitters, H.M. van Beuningen, W.B. van den Berg, Proteoglycan synthesis and osteophyte formation in ‘metabolically’ and ‘mechanically’ induced murine degenerative joint disease: an in-vivo autoradiographic study, *Int. J. Exp. Pathol.* **73** (1992), 335–350.
- [31] M. Vayssier, N. Banzet, D. Francois, K. Bellmann and B.S. Polla, Tobacco smoke induces both apoptosis and necrosis in mammalian cells: differential effects of HSP70, *Am. J. Physiol.* **275** (1998), L771–L779.

Increased apoptosis in rat osteoarthritic cartilage corresponds to degenerative chondral lesions and concomitant expression of caspase-3

Astrid Watrin-Pinzano^a, Stéphanie Etienne^a, Laurent Grossin^a, Nadège Gaborit^a, Christel Cournil-Henrionnet^a, Didier Mainard^{a,b}, Patrick Netter^a, Pierre Gillet^{a,*} and Laurent Galois^{a,b,1}

^a *Unité Mixte de Recherche 7561, CNRS - Université Nancy 1, Faculté de Médecine, Avenue de la Forêt de Haye, BP184, F-54505 Vandoeuvre lès Nancy, France*

^b *Service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique, CHU de Nancy, Hôpital Central, CO34, Avenue de Lattre de Tassigny, 54035 Nancy Cedex, France*

Keywords: Cartilage, osteoarthritis, apoptosis, caspase, experimental model

1. Introduction

Articular cartilage is a specialized and uniquely structured tissue that forms the smooth, gliding surface of the diarthrodial joints. It consists of an extracellular matrix (ECM) that is synthesized by the sparsely distributed resident cells, the chondrocytes. Osteoarthritis (OA) is a typical slow degenerative disease of the joints characterized by fibrillation and erosion of hyaline cartilage, subchondral bone sclerosis and osteophyte formation at the joint margins, leading to a gradual loss of articular cartilage [20]. These progressive changes result from poorly understood events occurring over a long period that leads to both cartilage ECM degradation and inhibition of ECM components synthesis. Additionally, cartilage hypo-cellularity also contributes to the development of clinical or experimental OA, due to chondrocyte death by either apoptosis or necrosis. In fact, the progression of OA can be judged by the viability of chondrocytes and their ability to resist to apoptosis. Nevertheless, it is not clear if apoptosis is caused by senescence or is the cause of senescence [22].

Apoptosis and necrosis are the two forms of chondrocyte death. Apoptosis is the process in which each cell systematically inactivates its function and disassembles its structure. Apoptosis can occur to a

* Address for correspondence: Pierre Gillet, Unité Mixte de Recherche 7561, CNRS - Université Nancy 1, Faculté de Médecine, Avenue de la Forêt de Haye, BP184, F-54505 Vandoeuvre lès Nancy, France. Tel.: +33 383 683 950; Fax: +33 383 683 959; E-mail: Pierre.Gillet@medecine.uhp-nancy.fr.

¹Equal seniorship.

single cell, even though the cells surrounding it are normal. Recently, the occurrence of apoptotic events was confirmed in the articular chondrocytes of OA patients. In parallel, numerous *in vivo* experimental studies have confirmed that apoptotic events in chondrocytes are linked with the severity of experimental OA [12]. In fact OA cartilage is heavily involved with apoptosis, resulting in the decimation of chondrocytes [5].

Understanding the interactions that promote chondrocyte apoptosis (recently called chondroptosis [19]) and cartilage hypocellularity is essential for developing appropriate targeted therapies for inhibition of chondrocyte apoptosis and subsequent treatment of OA. With this idea in mind, experimental OA models are crucial to establish the linkage between chondrocyte hypocellularity and apoptosis [25], and also to assess that controlled pharmacological inhibition of key steps in cell death process could be targeted for novel therapeutic strategies for the treatment of OA.

Recent investigations [23] have questioned the true extent of apoptosis in human OA cartilage and the specificity of the widely used TUNEL method versus expression of a key enzyme, caspase 3, that mediate the final stage of cell death by apoptosis [10]. The aims of this study were thus to determine the extent of chondrocyte apoptosis by using concomitantly TUNEL method and caspase 3 immunostaining, and to investigate the relationship between the process and the severity of chondral lesions in articular cartilage obtained at key points from rat knees with biochemical (mono-iodo acetate, MIA model [8]) and surgical (anterior cruciate ligament transection, ACLT model [4]) induced-OA and from nonarthritic controls.

2. Material and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (200 g; 8 weeks old) were obtained from Charles River Laboratories (St Aubin les Elbeuf, France). The maintenance and care of the experimental rats were in accordance with the guidelines of the NIH for Animal Welfare Act. Rats were kept in individual plastic cages in a 12 : 12 light–dark cycle (light-on period, 6:00 AM–6:00 PM) in a controlled temperature chamber on sawdust bedding. They were fed a standard diet and had access to tap water *ad libitum*. Body weight was recorded at regular intervals.

2.2. Surgically-induced rat OA

On day 0, rats underwent an ACLT under anesthesia (*i.p.* injection of a mixture of acepromazine 1.25 mg/kg + ketamine 38 mg/kg). According to Williams [26], a para-patellar skin incision was performed on the medial side of the right knee joint, and thereafter on the medial side of the patellar tendon. Patella was then dislocated laterally to provide access to the joint space and ACL was transected in the flexed knee. A positive anterior drawer test validated complete transection of the ligament. The joint was then irrigated with sterile saline to avoid ancillary inflammatory process, and a purpose-made suture was processed. A naive group (sham group) undergoing arthrotomy without ACLT was included as an internal control. Rats were killed on Day 28 [4].

2.3. Biochemically-induced OA

On Day 0, one dose of MIA (0.03 mg, Merck-Clevenot, Nogent-sur-Marne, France), dissolved in 50 μ l of sterile physiologic saline, was injected through the infra-patellar ligament [11] in both knees.

Controls animals received an intra-articular injection of 50 μ l of saline (0.9% NaCl). The animals were sacrificed at D10 and D15 [7].

2.4. Histological assessment

Animals were killed at various key points by cervical dislocation under anesthesia. Whole knee joints were dissected, fixed in 4% paraformaldehyde (pH 7.4), decalcified with “*Rapid Decalcifiant Osseux*” (RDO, Apex, Canada), dehydrated through a descending series of ethanol with the use of an automated tissue processing apparatus. After embedding in paraffin, serial sections with a thickness of 5 μ m were prepared for histological examination and immunohistochemistry. The sections were stained with hematoxylin–eosin to observe cellularity, and toluidine blue to assess proteoglycan content.

The severity of OA lesions was graded on a scale adapted from Mankin’s score [4] by two independent observers (LG and SE). This score ranged from 0 to 15 according to structure, cellularity, toluidine blue staining, thickness of hypertrophic chondrocyte layer, bone remodeling and osteolysis. Structure was graded from 0 to 5 (0 = Normal, 1 = Pannus and surface irregularities, 2 = Clefts to transitional zone, 3 = Clefts to radial zone, 4 = Clefts to calcified zone, 5 = Complete disorganization). Cellularity was graded from 0 to 3 (0 = Normal, 1 = Diffuse hypercellularity, 2 = Cloning, 3 = Hypocellularity). Toluidine blue staining was graded from 0 to 3 (0 = Normal, 1 = Slight reduction, 2 = Moderate reduction, 3 = Severe reduction). Thickness of hypertrophic chondrocyte layer graded from 0 to 2 (0 = Normal, 1 = Moderate decrease, 2 = Total decrease). Bone remodelling and bone osteolysis were graded from 0 to 1, respectively, with 0 = No and 1 = Yes.

2.5. TUNEL method

TUNEL is a specific immunohistochemical technique that enables sensitive and specific staining of the high concentrations of DNA 3-OH ends that are localized in apoptotic bodies. Apoptotic nuclei were stained as described in the protocol provided by the manufacturer by using the “*In situ* cell death detection, AP” kit (Boehringer Mannheim). To perform the TUNEL assay, slides were first deparaffinized, sections circled with PAP pen. Each section was incubated with ABC chondroitinase (0.25 U/ml) for 45 min at 37°C, then permeabilized respectively with Triton X-100 (0.3% PBS, 30 min) and Proteinase K (20 μ g/ml, 30 min, 37°C), with PBS wash between the two steps. The slides were then flooded with TdT-enzyme and digoxigenin-dUTP reaction buffer (TUNEL) reagent for 60 min in a humidity chamber at 37°C, washed with PBS, and incubated for 30 minutes with Converter-AP solution. After 3 washes in PBS, substrate solution (NBT/BCIP/1 mM levamisole) was added to each slide and incubated at room temperature (monitoring under microscope). The slides were washed 3 times with PBS and mounted for optical observations. The stained mounted cells were examined at 10 \times , and 40 \times magnification (Olympus BH-2 microscope). Cell death was quantified by counting positively stained cells (versus total present cells) in 3–5 separate fields of view per section, and noting the percentage of apoptotic cells based on morphological appearance.

2.6. Detection of activated caspase 3

Immunohistochemistry was performed on the serial paraffin sections as previously described. Tissue sections were deparaffinized and rehydrated. The sections were pre-treated with chondroitinase ABC (0.25 U/ml in PBS, pH 8.0; Sigma, St. Louis, MO, USA) for 90 min at 37°C. Permeability was enhanced

by using 0.3% Triton X-100 in PBS (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 30 min. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubating sections with freshly prepared 3% hydrogen peroxide (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 30 min. Non-specific staining was blocked by incubation of the sections with blocking serum supplied by Novostain super ABC kit (Novocastra, Newcastle, UK) for 60 min. Sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies in a humidified chamber. A biotin-labelled goat anti-rabbit IgG (Novostain superABC kit) was used as a secondary antibody for 45 min. A biotin-avidin detection system (Novostain superABC kit) was used according to the manufacturer's recommendations. The peroxidase was detected using liquid diaminobenzidine substrate kit (Novocastra, Newcastle, UK). After counterstaining with methyl green, slides were dehydrated and mounted with Eukitt (Labonord, France).

The primary antibodies used in this study were: rabbit polyclonal active caspase 3 antibody (R & D Systems, Abington, UK) diluted at a ratio of 1 × 300. The presence of antigen was estimated by determining the number of specific chondrocytes staining positive in the superficial zone (superficial and upper intermediate cartilage layers) and in deep zone (lower intermediate and deep layers). Each zone was divided into 4 different sections. The total number of chondrocytes and the number of chondrocytes staining positive for the specific antigen were determined at 40× magnification for the superficial and the deep zones, respectively.

2.7. Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). One-way ANOVA followed by a Student's *t* test was used to determine the statistical significance of the differences between OA groups and control rat. *P* values lesser than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. ACLT model

Articular cartilage from the sham-operated knee joints was histologically normal. On D28, in ACLT rats, proteoglycan depletion and hypocellularity were present in all compartments. Structural alteration of cartilage consisted of clefts to radial zone, leading in some cases to bone exposure. A dramatic decrease in cellularity was observed in the whole cartilage (Fig. 1). Degenerative lesions were homogeneous in all compartments (plateaus and condyles). Mirror-image lesions were observed specially in medial compartment. Subchondral remodeling was pronounced at this stage, leading to a Mankin's score of 8.75 ± 0.89 vs. 1.2 ± 0.56 in sham operated rats.

3.2. MIA model

As depicted in Fig. 2, on D10 and D15 HES staining revealed a strong remodeling of subchondral bone, disappearance of hypertrophic chondrocytes layer and a decrease in cartilage cellularity. The toluidine blue staining revealed a decrease in proteoglycan content in animals exposed to MIA. Mankin's score was quite similar on D10 and D15 (8.17 ± 0.54 and 8.00 ± 1.30 , NS), while no chondral lesion was observed in saline control matched rats (0.17 ± 0.16).

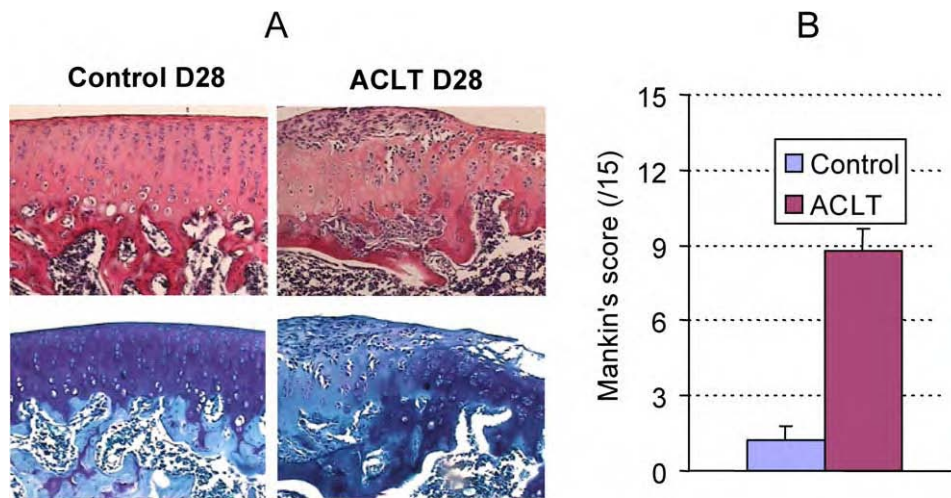


Fig. 1. A. Histological lesions (medial tibial plateaus) in ACLT rats (D28). Proteoglycan content was evaluated by toluidine blue staining (bottom images), cellularity, and surface integrity by Hematoxylin-Eosin HES staining (upper images). Loss of proteoglycans, reduced cellularity, and subchondral bone modifications are present. Clefts were pronounced at this stage. Magnification $\times 10$. B. Mankin's score in control and ACLT groups ($n = 5/\text{batch}$, mean \pm s.e.m.). Each slide was subjected to a double-blind evaluation by trained investigators and a maximal variation of only 5% was obtained.

3.3. TUNEL

Apoptosis (according to the TUNEL reaction) was more frequent in rat OA cartilage than in nonarthritic control cartilage in both models: 2–3-fold in ACLT-induced OA (Fig. 3) and 5–6-fold in MIA-induced OA cartilage (Fig. 4) versus age- and model-matched controls. One-way ANOVA showed that the differences between OA and control groups were highly significant ($p < 0.05$). The basal level of apoptosis in controls was inherent to the maturation process and physiological enchondral ossification in the deep layer in these young animals.

3.4. Caspase 3

Concomitantly, the cells expressing caspase 3 increased 3 fold in ACLT and 7–8-fold in MIA models, respectively. There was a highly significant positive correlation between TUNEL-positive cells and expression of caspase-3 in both models (Figs 5 and 6). Spearman's correlation coefficient for the correlation between the percentages of TUNEL positive and caspase 3 positive cells were excellent. Besides, TUNEL appears less specific and that apoptosis seems overestimated by TUNEL assay compared with caspase 3 detection.

4. Discussion

The data presented here confirm that apoptosis (TUNEL positive chondrocytes) in OA cartilage was present in ACLT and MIA models, 2 to 6 fold higher than that in nonarthritic controls, depending on the model and the severity of the degenerative lesions. Expression of caspase 3 was also higher in rat OA cartilage and correlated with apoptosis as determined by the TUNEL method. These results suggest,

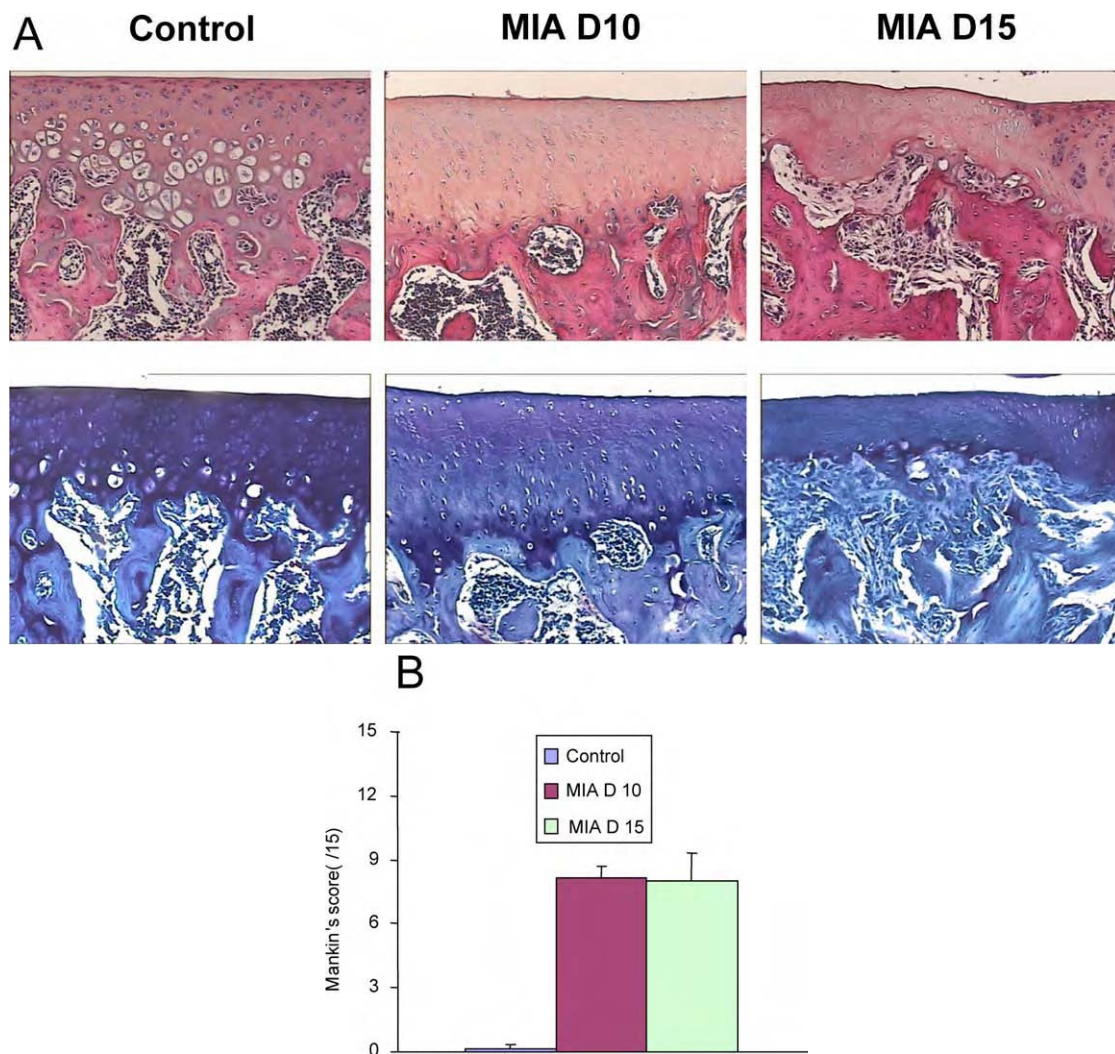


Fig. 2. A. Histological lesions (medial tibial plateaus) in MIA rats (D10 and D15): subchondral bone remodeling, hypocellularity and clusters of chondrocytes, and decrease in proteoglycans integrity are present. Magnification $\times 10$. B. Mankin's score in control and MIA groups ($n = 5/\text{batch}$, mean \pm s.e.m.). Each slide was subjected to a double-blind evaluation by trained investigators and a maximal variation of only 5% was obtained.

as in humans [23], that a significant proportion of chondrocytes die by apoptosis in experimental OA cartilage, leading to a reduced density of living cells.

Experimental OA can be induced in various ways [11]: abnormal biomechanical forces resulting from joint destabilization, displaced loading or structural alterations resulting either from a degradation of the extracellular matrix by physical, enzymatic means (papain, collagenase) or from a disturbance of chondrocyte metabolism (e.g. iodoacetate, vitamin A).

Anterior cruciate ligament transection (ACLT) model has widely been studied in various animal species (rabbits [9], dogs [17] and more recently in the rat [3,24]), thus providing new insights into pathogenic mechanisms of apoptosis in experimental OA. Biomechanical calculations suggest that damage of the surface zone leads to increased loading of the cartilage matrix and higher stress on the under-

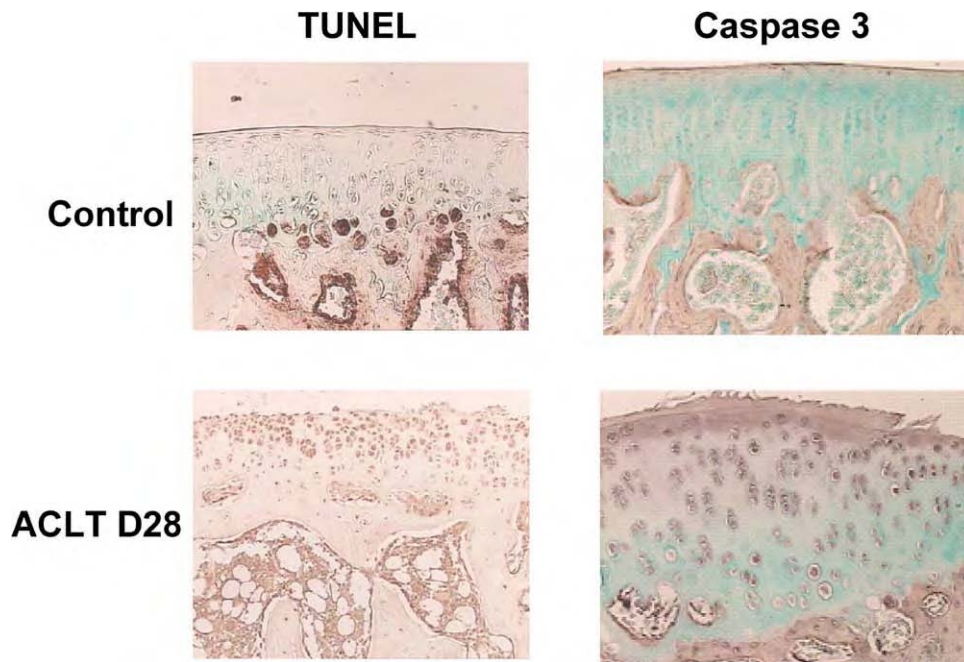


Fig. 3. Apoptotic chondrocytes (TUNEL) in the ACLT model versus age-matched controls and corresponding immunostaining for activated caspase 3. (Magnification $\times 40$.)

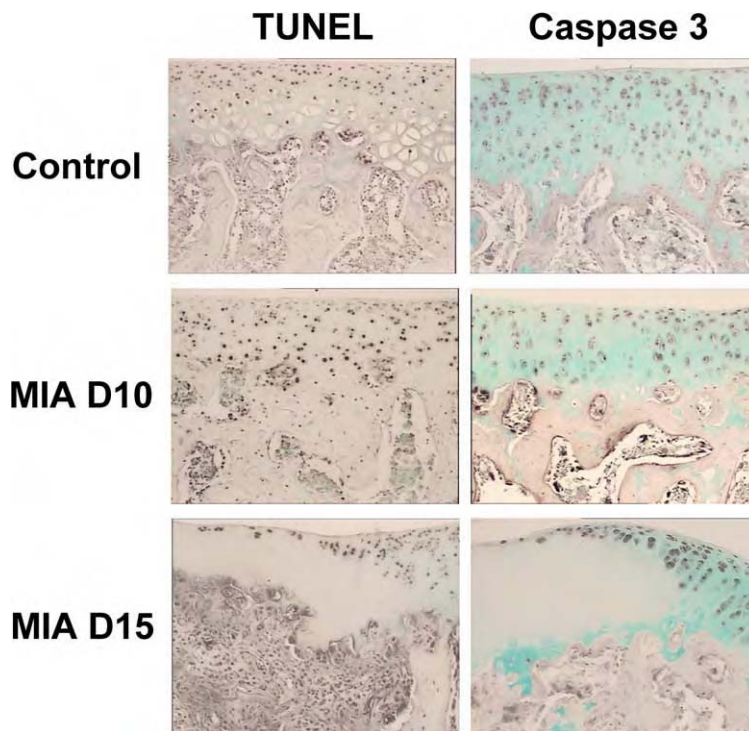


Fig. 4. Apoptotic chondrocytes (TUNEL) in the MIA model versus control rats and corresponding immunostaining for activated caspase 3. (Magnification $\times 40$.)

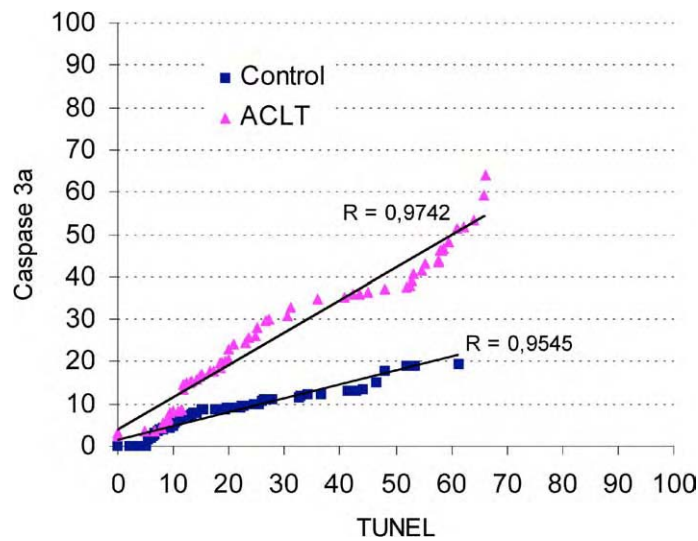


Fig. 5. Good correlation between TUNEL-positive cells and expression of caspase-3 in the ACLT model.

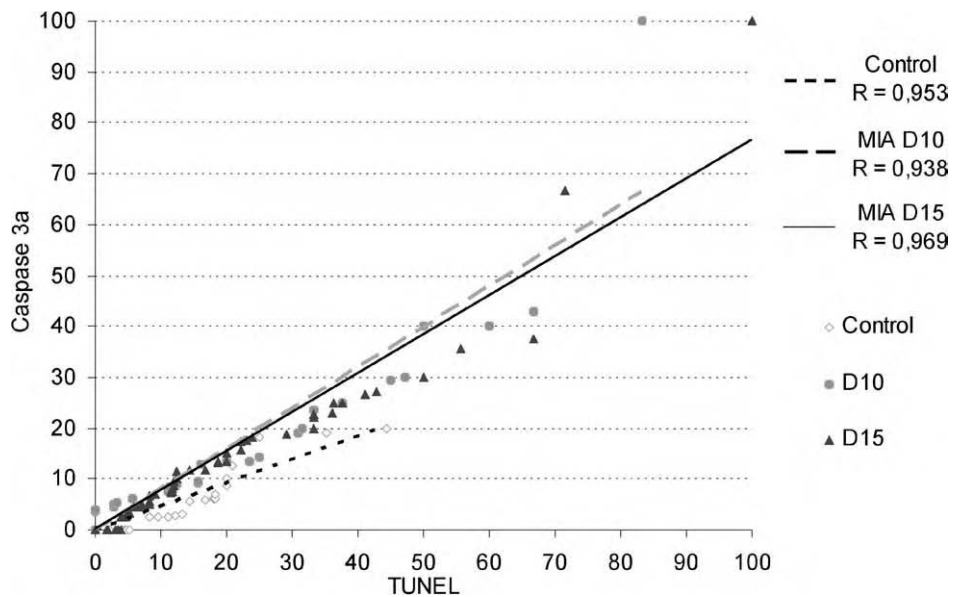


Fig. 6. Good correlation between TUNEL-positive cells and expression of caspase-3 in the MIA model.

lying cartilage, leading to a sequence of events in which the degeneration of the superficial zone develops into fibrillations of the cartilage and eventually results in erosions and ulcerations. In rat ACLT, there is an increase in the number of cells exhibiting signs of degeneration or even death [24], often related to chondrocyte apoptosis, as previously shown in the dog [17] and in the rabbit [9]. The present data confirm that caspase-dependent apoptosis of chondrocytes also occurs in ACLT-induced OA in the rat.

MIA-induced OA in the rat easily and quickly reproduces dose, time, and site-dependant OA-like lesions, and, in certain circumstances, functional impairment, similar to that observed in human disease [8]. These parameters, as well as proteoglycan metabolism and cytokine expression in weight-

bearing areas [2], could serve as indicators for studying chondroprotective drugs, or for evaluating the ability of imaging techniques to detect and evaluate chondral lesions. Pro-apoptotic properties of MIA, an ATP depleting agent inhibiting glycolysis, are well established *in vitro* on various cell-lines, including chondrocytes [7] as an archetypal anaerobic cell-line being especially sensitive to MIA-induced mitochondrial dysfunction. These data confirm that caspase-dependant apoptosis also occurs in MIA-induced OA in the rat and the prevalence of caspase 3 positive cells is significantly correlated with the severity of OA.

Histologic studies of rat knees showed in both ACLT and MIA models structural changes including the characteristics of OA. Most OA chondrocytes displayed a positive TUNEL reaction whereas only a few cells in control cartilage did. To corroborate the implication of caspase 3 in the pathophysiology of OA we used 2 *in vivo* OA models, i.e., a surgical and a biochemical, to avoid any bias inherent to the induction process, as previously published by Lee et al. [14] who used the same approach for studying the expression of TRAIL in experimentally induced OA with confirmed apoptosis.

Caspases are a family of proteases that have been demonstrated to play a prominent role in determining DNA damages and ancillary caspase-dependent cell-death [13]. The initial death signals can activate the apoptotic pathway which involves a cascade of highly regulated hierarchical molecular events [5,21]. These events are mediated by a proteolytic cascade in which upstream activator caspases initiate and amplify the maturation of effector caspases that, in turn, cleave a discrete subset of cellular polypeptides to manifest the apoptotic phenotype [12]. Caspase 3 in its active form is one of the key mediators of apoptosis in its execution. It is activated by initiator caspases such as caspase 8 and 9, and cleaves vital intra-cellular proteins. As performed in clinics [15], we routinely use active caspase 3 immunostaining in evaluating experimental OA, because TUNEL is less specific [6,16,21] and apoptosis is overestimated by TUNEL assay compared with caspase 3 detection.

5. Conclusion

Our results suggest that positivity for caspase 3 in experimental rat OA closely correlates with OA grade and percentage of apoptosis as depicted by TUNEL. Caspase 3 expression may herald imminent apoptosis better than TUNEL assay [1,15,18], and thus, may act as a surrogate specific marker for early chondrocyte apoptosis (or chondroptosis). Finally, the key role that caspase 3 plays in executing apoptosis make it a potential target for apoptosis modulation [7,12,13].

Acknowledgments

Authors thank Venkatesan Narayanan for his expert advices and Michel Thiery for his good care to animals. This study was supported by grants from Région Lorraine, GIP Fonds de recherches HMR AVENTIS (FR99RHU037) and CPRC CHU Nancy.

References

- [1] T. Aigner, Apoptosis, necrosis, or whatever: how to find out what really happens?, *J. Pathol.* **198** (2002), 1–4.
- [2] H. Dumond, N. Presle, P. Pottie, S. Pacquelet, B. Terlain, P. Netter, A. Gepstein, E. Livne and J.Y. Jouzeau, Site specific changes in gene expression and cartilage metabolism during early experimental osteoarthritis, *Osteoarthritis Cartilage* **12** (2004), 284–295.

- [3] L. Galois, S. Etienne, L. Grossin, C. Cournil, A. Pinzano, P. Netter, D. Mainard and P. Gillet, Moderate-impact exercise is associated with decreased severity of experimental osteoarthritis in rats, *Rheumatology (Oxford)* **42** (2003), 692–693; author reply 693–694.
- [4] L. Galois, S. Etienne, L. Grossin, A. Watrin-Pinzano, C. Cournil-Henrionnet, D. Loeuille, P. Netter, D. Mainard and P. Gillet, Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study, *Osteoarthritis Cartilage* **12** (2004), 779–786.
- [5] R. Goggs, S.D. Carter, G. Schulze-Tanzil, M. Shakibaei and A. Mobasheri, Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis, *Vet. J.* **166** (2003), 140–158.
- [6] S.P. Grogan, B. Aklin, M. Frenz, T. Brunner, T. Schaffner and P. Mainil-Varlet, In vitro model for the study of necrosis and apoptosis in native cartilage, *J. Pathol.* **198** (2002), 5–13.
- [7] L. Grossin, S. Etienne, N. Gaborit, A. Pinzano, C. Cournil-Henrionnet, C. Gerard, E. Payan, P. Netter, B. Terlain and P. Gillet, Induction of heat shock protein 70 (Hsp70) by proteasome inhibitor MG 132 protects articular chondrocytes from cellular death in vitro and in vivo, *Biorheology* **41** (2004), 521–534.
- [8] C. Guingamp, P. Gegout-Pottie, L. Philippe, B. Terlain, P. Netter and P. Gillet, Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry, *Arthritis Rheum.* **40** (1997), 1670–1679.
- [9] S. Hashimoto, K. Takahashi, D. Amiel, R.D. Coutts and M. Lotz, Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis, *Arthritis Rheum.* **41** (1998), 1266–1274.
- [10] R.U. Janicke, M.L. Sprengart, M.R. Wati and A.G. Porter, Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis, *J. Biol. Chem.* **273** (1998), 9357–9360.
- [11] J.Y. Jouzeau, P. Gillet and P. Netter, Interest of animal models in the preclinical screening of anti-osteoarthritic drugs, *Joint Bone Spine* **67** (2000), 565–569.
- [12] K. Kuhn, D.D. D’Lima, S. Hashimoto and M. Lotz, Cell death in cartilage, *Osteoarthritis Cartilage* **12** (2004), 1–16.
- [13] I.N. Lavrik, A. Golks and P.H. Krammer, Caspases: pharmacological manipulation of cell death, *J. Clin. Invest.* **115** (2005), 2665–2672.
- [14] S.W. Lee, H.J. Lee, W.T. Chung, S.M. Choi, S.H. Rhyu, D.K. Kim, K.T. Kim, J.Y. Kim, J.M. Kim and Y.H. Yoo, TRAIL induces apoptosis of chondrocytes and influences the pathogenesis of experimentally induced rat osteoarthritis, *Arthritis Rheum.* **50** (2004), 534–542.
- [15] M. Matsuo, K. Nishida, A. Yoshida, T. Murakami and H. Inoue, Expression of caspase-3 and -9 relevant to cartilage destruction and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage, *Acta Med. Okayama* **55** (2001), 333–340.
- [16] D. Mistry, Y. Oue, M.G. Chambers, M.V. Kayser and R.M. Mason, Chondrocyte death during murine osteoarthritis, *Osteoarthritis Cartilage* **12** (2004), 131–141.
- [17] J.P. Pelletier, D.V. Jovanovic, V. Lascau-Coman, J.C. Fernandes, P.T. Manning, J.R. Connor, M.G. Currie and J. Martel-Pelletier, Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level, *Arthritis Rheum.* **43** (2000), 1290–1299.
- [18] A.R. Resendes, N. Majo, J. Segales, J. Espadamala, E. Mateu, F. Chianini, M. Nofrarias and M. Domingo, Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal, conventional pigs at different ages detected by TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues, *Vet. Immunol. Immunopathol.* **99** (2004), 203–213.
- [19] H.I. Roach, T. Aigner and J.B. Kouri, Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes?, *Apoptosis* **9** (2004), 265–277.
- [20] P. Sarzi-Puttini, M.A. Cimmino, R. Scarpa, R. Caporali, F. Parazzini, A. Zaninelli, F. Atzeni and B. Canesi, Osteoarthritis: an overview of the disease and its treatment strategies, *Semin. Arthritis Rheum.* **35** (2005), 1–10.
- [21] D.R. Schultz and W.J. Harrington, Jr., Apoptosis: programmed cell death at a molecular level, *Semin. Arthritis Rheum.* **32** (2003), 345–369.
- [22] D.J. Schurman and R.L. Smith, Osteoarthritis: current treatment and future prospects for surgical, medical, and biologic intervention, *Clin. Orthop. Relat. Res.* (2004), S183–189.
- [23] M. Sharif, A. Whitehouse, P. Sharman, M. Perry and M. Adams, Increased apoptosis in human osteoarthritic cartilage corresponds to reduced cell density and expression of caspase-3, *Arthritis Rheum.* **50** (2004), 507–515.
- [24] R. Stoop, P. Buma, P.M. van der Kraan, A.P. Hollander, R.C. Billingham, T.H. Meijers, A.R. Poole and W.B. van den Berg, Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats, *Osteoarthritis Cartilage* **9** (2001), 308–315.
- [25] R. Todd Allen, C.M. Robertson, F.L. Harwood, T. Sasho, S.K. Williams, A.C. Pomerleau and D. Amiel, Characterization of mature vs aged rabbit articular cartilage: analysis of cell density, apoptosis-related gene expression and mechanisms controlling chondrocyte apoptosis, *Osteoarthritis Cartilage* **12** (2004), 917–923.
- [26] J.M. Williams, D.L. Felten, R.G. Peterson and B.L. O’Connor, Effects of surgically induced instability on rat knee articular cartilage, *J. Anat.* **134** (1982), 103–109.

Titre : Intérêt de la vectorisation et/ou de l'induction des protéines de stress dans les modèles expérimentaux de pathologies ostéoarticulaires. Validation de l'électroporation biphasique (HV / LV).

Résumé. Lors des pathologies articulaires, les chondrocytes sont soumis à différents processus qui concourent à la dégradation du cartilage articulaire soit en entraînant la mort par apoptose (non-renouvellement des constituants de la matrice) soit par l'activation de protéases détruisant les constituants matriciels.

Le potentiel chondroprotecteur des protéines de stress (Hsp70 / Hsp27) lors des pathologies dégénératives ayant été démontré, nous avons souhaité évaluer l'intérêt thérapeutique de l'induction de ces protéines par un inhibiteur réversible du protéasome (MG132) dans un modèle expérimental : modèle par section du ligament croisé antérieur (SLCA).

Au cours de cette étude, nous avons évalué un nouveau système de vectorisation afin de surexprimer les protéines de stress dans le cartilage articulaire. Cette technique (électroporation biphasique) repose sur la dissociation des impulsions perméabilisantes et électrophorétiques. Nous avons donc développé des plasmides nous permettant de surexprimer ces protéines, fusionnées à une protéine traceur, facilitant ainsi leur détection dans le tissu ciblé. Puis, nous avons évalué l'innocuité et l'efficacité des impulsions sur des tissus sains et pathologiques (dégénératifs et inflammatoires). Nous avons constaté que cette technique, en plus de limiter les altérations du tissu articulaire ou les phénomènes de dissémination, offrait des propriétés d'adressage tissulaire de part la multiplicité des combinaisons d'impulsions (nombre, fréquence et intensité).

Enfin, les effets de l'induction (MG132) des Hsps sur un modèle physiopathologique (SLCA) ont été évalués et nous avons pu montrer une diminution de la sévérité des atteintes articulaires, tant au niveau du cartilage que de la membrane synoviale. Cette molécule non seulement permet à la fois de renforcer la résistance des chondrocytes aux atteintes mais également de limiter l'amplitude de la réponse inflammatoire qui participe à la dégradation.

Mots clés: cartilage, Hsps, électroporation, modèles expérimentaux, inhibiteur protéasome.

Title : Interest of cellular overexpression or induction of Heat Shock proteins in experimental model of articular diseases. Validation of a new electroporation system (HV / LV)

Abstract. During articular diseases, chondrocytes suffer different mechanisms which take part in the degradation of the cartilage, either by generating cell death by apoptosis (without renewal of extracellular matrix components), or by protease activation which destroy matrix components.

Based on the cytoprotective potential of Heat Shock proteins (Hsp70 and Hsp27) during degenerative diseases, we evaluated the therapeutic interest of these proteins induced by a transient proteasome inhibitor (MG132), in an experimental model, by transection of the anterior cruciate ligament (ACLT).

During this study, we have evaluated a new electroporation system to overexpress HSPs in articular cartilage. This technique is based on two sets of electric pulses, which have two roles, to permeabilize the target and to transport DNA across the permeabilized membrane.

We have developed expression vectors to generate a fusion protein (Hsps linked to GFP). Effectively, GFP permit to detect simply the fusion protein in the targeted tissue by fluorescence. Besides, we have evaluated safety and efficiency of electric pulses on healthy and altered tissues (degenerative and inflammatory). We have reported that this technique could limit articular tissue damages and, moreover, could offer the ability to target more specifically this tissue. Indeed, this apparatus allows a great number of electric pulses combinations (number, frequency, intensity).

Finally, the effects of the induction via MG132 of Hsps in a physiopathological ACLT model, have been evaluated and we have shown a decrease of severity of joint lesions, in cartilage and synovial tissues. This molecule has the advantage to reinforce the resistance of chondrocytes at stressful stimuli and moreover, to limit the amplitude of inflammatory response which contribute to the magnification of extracellular matrix destruction.

Key words : cartilage, electroporation, Hsps, experimental models, proteasome inhibitor.