



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 BioSE (Biologie, Santé, Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR de l'Université HENRI POINCARÉ

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Pierre-Jean FRANCIN**

**Rôle des adipokines dans la physiopathologie de l'arthrose :
exemple de la leptine et de l'adiponectine**

Soutenue le 01 septembre 2010

Membres du jury :

Rapporteurs

Monsieur le Professeur Francis BERENBAUM
Monsieur le Professeur Frédéric MALLEIN-GERIN

PU-PH UMR 7079, Paris
DR-CNRS UMR 5086, Lyon

Examineurs

Monsieur le Professeur Yves HENROTIN
Monsieur le Professeur Didier MAINARD

PU Université de Liège
PU-PH UMR 7561, Nancy,
Directeur de thèse
CR-CNRS UMR 7561, Nancy,
Co-directrice de thèse

Madame le Docteur Nathalie PRESLE

Membre invité

Monsieur le Professeur Bernard TERLAIN

Ancien Professeur associé, UMR
7561, Nancy

UMR7561 Nancy Université-CNRS « Laboratoire de Physiopathologie, Pharmacologie et Ingénierie Articulaires », Faculté de Médecine, Avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy, France.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

1) Publications dans des revues à comité de lecture

1- Francin PJ*, Pallu S. *, Guillaume C., Gegout P., Netter P., Mainard D., Terlain B., Presle N.

Obesity affects the chondrocyte responsiveness to leptin in patients with osteoarthritis

Arthritis Research and Therapy (sous presse)

2- Francin PJ., Guillaume C., Gegout P., Terlain B., Netter P., Mainard D., Presle N.

Leptin and adiponectin are markers of the chondrocyte phenotypes

Experimental Cell Research (soumis)

3- Pottie P., Francin PJ., Mainard D., Presle N. Adipokines in osteoarthritis : friends or foes of cartilage homeostasis ?

Joint Bone Spine, 2008 Dec ; 75(6):669-71

2) Communications avec actes publiés

1- Francin PJ., Presle N., Pottie P., Terlain B., Mainard D.

Adipokines in human chondrocyte : evidence for a role of cell differentiation in their expression and for a dualistic contribution in osteoarthritis.

8th World Congress of the International cartilage repair Society, Miami, USA, 23-26 mai 2009, P125

2- Francin PJ., Pallu S., Pottie P., Terlain B., Netter P., Mainard D., Presle N.

Chondrocyte responsiveness to leptin is strongly dependent on the body mass index of patients with osteoarthritis.

World Congress on Osteoarthritis, Montreal, Canada, 10-13 septembre 2009

Osteoarthritis and Cartilage, 2009, 17 : S124

3- Francin PJ., Guillaume C., Pottie P., Netter P., Mainard D., Presle N.

Chondrocyte phenotype is determinant for the expression of adipokines and their receptors.

World Congress on Osteoarthritis, Montreal, Canada, 10-13 septembre 2009

Osteoarthritis and Cartilage, 2009, 17 : S219

3) Communications sans acte publié

1- Francin.PJ., Guillaume C., Humbert AC, Pottie P, Mainard D., Netter P., Presle N.

Adipokines in osteoarthritis : friends or foes for cartilage homeostasis ?

4^{ème} journées scientifiques du Pôle Lorrain Ingénierie du Cartilage, septembre 2007, Nancy

4) Ouvrages

Mainard D., Presle N., Francin PJ., Gegout P., Gillet P.

Relevant conditions in animal experiments for clinical challenge in cartilage tissue engineering.

Cartilage Repair Book, 2010, chapter 5

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Jacques MAGDALOU et Monsieur le Professeur Patrick NETTER, qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans leur laboratoire. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance pour m'avoir accueilli.

Je remercie Madame le docteur Nathalie PRESLE pour toute l'aide qu'elle m'a apportée que ce soit pendant mon M2R, pour l'obtention de ma bourse de thèse et plus généralement durant toute ma thèse. Merci aussi pour toutes ces discussions concernant notre belle gastronomie française et le sport.

Je remercie Monsieur le Professeur Didier MAINARD pour m'avoir permis de réaliser mes travaux de recherche tout au long de ces 3 années. Je lui témoigne ma reconnaissance pour son aide et son sens de la rigueur scientifique.

Je remercie Monsieur le Professeur Francis BERENBAUM et Monsieur le Professeur Frédéric MALLIN-GERIN de l'honneur qu'ils me témoignent en acceptant d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je leur suis reconnaissant du temps qu'ils me consacrent.

Je suis également très honoré que le Professeur Yves HENROTIN ait accepté d'être examinateur de cette thèse, venant de Belgique pour l'occasion.

Je remercie aussi Monsieur Bernard TERLAIN d'avoir accepté mon invitation.

Je remercie Monsieur le Professeur Jean-Yves JOUZEAU qui m'a accueilli au sein de son équipe et l'excellent canadien Pascal REBOUL.

Je tiens à remercier également Madame Cécile GUILLAUME pour son aide et sa compagnie lors de nos très, très, très longues séries de PCR et pour tout le reste.

Merci à Stéphanie ETIENNE pour son sang-froid dans les longues séances de coupes de blocs,

Merci au reste de l'équipe Pascale, Arnaud et Meriem pour ce que vous m'avez apporté tout au long de ces 3 ans,

Un grand merci à Michel THIERY pour sa bonne humeur et son entrain journalier, pour toutes ses blagues (surtout celle du perroquet chauve !) et nos grandes discussions sportives. Tu sais Michel un jour tu pourras peut être porter plus lourd que moi !

Je remercie aussi le très prochainement docteur Joseph PAQUET pour sa bonne humeur quotidienne (je ne t'ai jamais vu bouder) et ses astucieux conseils d'achat en bourse pour de « grandes banques françaises ».

Je remercie aussi mon pote Val qui est un sacré numéro et qui n'est pas si méchante en finalité. Petit conseil : attention à l'eau, ça mouille !

Je remercie le docteur David MOULIN pour sa voie de baryton et ses grands moments dignes de la nouvelle star, je sais que nous pouvons compter sur toi pour nous secourir avec ton beau costume.

Merci à mes 2 voisins de bureau que sont les docteurs Astrid PINZANO et J-C GOEBEL pour tous ces moments Wilsoniens de détente,

Merci à l' « ami-ennemi » du 5-7, j'ai nommé le docteur Patrick Saowzonouu, pour son soutien et les délires que nous partageons. Be cairefoul with le fromage à raclette.

Et son compatriote Hervé ZILLE pour toutes ces nombreuses fois où nous sommes allés à la piscine.

Enfin merci à Claudie Focan et ses bières, c'était excessivement chiant de bosser à côté de toi qui mangeais des chips mais bon, courage à toi

Je remercie les docteurs Armelle ROPARS, Hélène DUMOND et Simon THORNTON, ainsi que les professeurs Henri SCHROEDER et Didier DESOR pour m'avoir permis d'effectuer tous ces services d'enseignement.

Merci aux secrétaires Ghislaine, Nadia et Hélène pour votre dévouement,

Enfin merci à tout le personnel du laboratoire de pharmacologie pour tous les bons (et quelques mauvais et oui ça arrive!) moments passés avec vous.

A ma maman et à mon papa,

A ma mamie,
et mes autres grands-parents que j'aurais aimé connaître.

A mon petit Gabin, à mon frère Pyf et à Cécile,

Pour tout votre amour et votre soutien permanent,

A toute ma famille,
Et surtout mes amis
Dany, Baboune, Roméo, Dorine, Vincent, Joseph, Christophe A, Cricri (B) et Christophe T,
Thomas, Julien, Irène, Momo, Patrick, Emilie, Séverine et Sébastien, le petit Emile mais aussi
Paul et Mathilde...

A Hélène pour les « encore meilleurs » moments qui vont venir,

Je dédie ce travail de thèse

Liste des abréviations

ACC : Acetyl Coa Carboxylase

ADAMTS : A Disintegrin And Metalloproteinase with a Thrombospondin motifs

AH : Acide Hyaluronique

AMPK : 5'AMP Activated Protein Kinase

APPL1 : Adaptator Protein containing Pleckstin homology domain, Phosphotyrosin binding domain and Leucine zipper motif

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

CS : Chondroïtine Sulfate

DMO : Densité Minérale Osseuse

GAGs : Glycosaminoglycanes

GLUT : Glucose Transporter

IGF : Insulin Growth Factor

IL : Interleukine

iNOS : NO synthase inductible

IMC : Indice de Masse Corporelle

IRS-PI3 : Insulin Receptor Substrate/Phosphoinositide 3-Kinase

JAK : Janus Kinase

KO : Knock-Out

KS : Kératane Sulfate

LPS : Lipopolysaccharides

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MEC : Matrice Extra-cellulaire

MIA : Mono Iodo Acetate

MMPs : Matrix MetalloProteinases

MT-MMPs : Membrane Type-Matrix Metalloproteinase

NO : Monoxyde d'azote

OPG : Ostéoprotégérine

PG : Protéoglycanes

PPAR : Peroxisome Proliferator Activated Receptor

PTP-1B : Protein Tyrosin Phosphatase 1B

RE : Réticulum Endoplasmique

SNC : Système Nerveux Central

SOCS-3 : Suppressor Of Cytokine Signaling

STAT : Signal Transducer and Activator of Transduction

TGF : Transforming Growth Factor

TIMPs : Tissue Inhibitor of Metalloproteinases

TNF : Tumor Necrosis Factor

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

A. Introduction.....	10
B. Etude bibliographique.....	13
Chapitre 1 Le cartilage articulaire	14
I. La structure du cartilage hyalin.....	14
II. Les chondrocytes.....	22
Chapitre 2 La physiopathologie de l'arthrose.....	30
I. Facteurs étiologiques.....	30
II. Description.....	31
III. Facteurs impliqués.....	35
IV. Les traitements de l'arthrose	38
V. Les modèles d'arthrose expérimentale.....	39
Chapitre 3 Les adipokines.....	42
I. Le tissu adipeux	42
II. La leptine	43
III. L'adiponectine.....	52
C. Objectifs et stratégie de l'étude	58
D. Matériel et méthodes	62
Chapitre 1 Etude chez l'homme.....	63
I. Recueil des prélèvements.....	63
II. Culture des chondrocytes	63
III. Protocoles d'étude.....	64
Chapitre 2 Etude chez l'animal	67
I. Animaux.....	67
II. Modèle d'arthrose expérimentale au MIA	67
Chapitre 3 Paramètres d'évaluation	68
I. Analyse de l'expression des gènes	68
II. Analyses histologiques.....	70
III. Etudes immunohistochimiques.....	71
IV. Dosages des adipokines.....	71
V. Détermination de l'activité des STATs.....	72
VI. Analyses statistiques	72
E. Résultats et discussions	73
Chapitre 1 : Influence des conditions de culture sur l'expression des adipokines et de leurs récepteurs dans les chondrocytes humains.....	74
Chapitre 2 : Rôle du ligament adipeux de Hoffa dans la production des adipokines.....	84
I. Production d'adipokines dans le ligament de Hoffa et la graisse sous-cutanée	85
II. Influence du sexe sur la production des adipokines	86
III. Influence de l'IMC sur la production des adipokines par le ligament adipeux de Hoffa et la graisse sous-cutanée	87
IV. Relation entre le ligament adipeux de Hoffa et la graisse sous-cutanée.....	88
V. Relation entre la production de leptine et celle d'adiponectine.....	89
VI. Effet du ligament de Hoffa sur le métabolisme chondrocytaire	90
Chapitre 3 : Rôle de l'adiponectine dans l'arthrose : comparaison avec la leptine.....	97
I. Production d'adiponectine par les chondrocytes arthrosiques : influence du sexe.....	98
II. Influence de la sévérité des lésions cartilagineuses et de l'IMC sur la production d'adiponectine....	99
III. Relation entre l'adiponectine et la leptine dans le cartilage	103
IV. Relations entre l'expression de l'adiponectine et de ses récepteurs et celle d'éléments matriciels et de facteurs régulateurs du métabolisme chondrocytaire	105
V. Effet d'un traitement à l'adiponectine.....	108

Chapitre 4 : Influence de l'obésité sur la réponse des chondrocytes à la leptine	115
I. Expression basale des gènes dans les chondrocytes non stimulés.....	116
II. Influence de la concentration de leptine et de l'IMC sur la réponse chondrocytaire à la leptine	117
III. Effet de l'IMC et de la concentration de leptine sur la voie JAK/STATs	121
Chapitre 5 : Rôle de la leptine dans le développement d'une arthrose expérimentale.....	125
I. Modèle d'arthrose au MIA chez le rat Wistar	126
II. Modèle d'arthrose chez le rat Zucker (Fa/Fa)	130
<i>F. Conclusion et perspectives</i>	<i>137</i>
<i>G. Références bibliographiques.....</i>	<i>141</i>

A. Introduction

Les arthropathies de nature dégénérative comme l'arthrose constituent une des principales causes de consultation médicale et de consommation médicamenteuse. En effet, l'arthrose est la résultante de phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage pour aboutir à une destruction progressive de ce tissu. Cette pathologie articulaire dégénérative se manifeste cliniquement par un handicap fonctionnel des articulations atteintes accompagné parfois de douleur. La prévalence de l'arthrose s'accroît avec l'âge et les coûts médicaux liés à cette maladie sont donc amenés à s'accroître dans nos sociétés où la population de la tranche d'âge à risque évolue chaque année.

Malgré le pourcentage élevé de la population atteinte, nous disposons de peu de traitements efficaces, et les processus de destruction du cartilage articulaire sont encore mal connus. L'arthrose semble être principalement liée à l'âge mais de nombreux facteurs contribuent à l'usure prématurée du cartilage. Il existe ainsi une relation positive entre l'obésité et l'arthrose. Si la surcharge pondérale induit des contraintes mécaniques excessives sur les articulations portantes en particulier le genou, cet effet mécanique ne permet pas d'expliquer la forte prévalence chez les individus obèses de l'arthrose au niveau d'articulations non portantes comme celles de la main. Par conséquent, des facteurs métaboliques liés à l'obésité pourraient contribuer à la dégradation du cartilage.

Parmi les protéines sécrétées par le tissu adipeux, les adipokines comme la leptine pourraient être impliquées dans l'arthrose. Produite par le tissu adipeux blanc, elle ajuste la prise de nourriture à la dépense énergétique. Les taux plasmatiques de leptine sont ainsi fortement liés à l'indice de masse corporelle (IMC). Cette adipokine est retrouvée dans le liquide synovial de patients atteints d'arthrose et son expression dans le cartilage varie en fonction de la sévérité des lésions cartilagineuses. Outre son action centrale sur la satiété, la leptine est capable d'agir sur des tissus périphériques. Le récepteur fonctionnel à la leptine a ainsi été identifié sur les chondrocytes et la leptine est capable de modifier les fonctions chondrocytaires.

Une autre adipokine, l'adiponectine, pourrait également jouer un rôle dans l'homéostasie articulaire. Elle est exclusivement produite par le tissu adipeux mais contrairement à la leptine, ses taux plasmatiques sont diminués chez les individus obèses. Bien que ses mécanismes d'action ne soient pas totalement élucidés, elle est clairement

impliquée dans l'augmentation de la sensibilité à l'insuline. Tout comme la leptine, l'adiponectine est présente dans le liquide synovial de patients atteints d'arthrose mais des données contradictoires concernant l'expression de ses récepteurs et ses effets dans les chondrocytes ne permettent pas aujourd'hui de lui attribuer un rôle précis dans l'arthrose.

Afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la destruction du cartilage, nous nous proposons de préciser dans le présent travail le rôle de la leptine et de l'adiponectine dans la physiopathologie de l'arthrose. Ce rapport débute par une description des mots-clés de l'étude (cartilage, arthrose, adipokines), puis nous expliquerons notre hypothèse de travail. Après avoir décrit le matériel et les méthodes utilisés, nous présenterons les résultats et exposerons les conclusions et les perspectives de cette recherche.

B. Etude bibliographique

Chapitre 1 Le cartilage articulaire

Le tissu cartilagineux est un tissu conjonctif d'origine mésenchymateuse à la fois solide et élastique qui recouvre les extrémités osseuses (Figure I.1). Il est constitué d'un seul type cellulaire, le chondrocyte, ainsi que de fibres et de substance fondamentale qui forment par définition la matrice extracellulaire (Hayes *et al.* 2001). Le cartilage présente la particularité d'être non innervé et non vascularisé. L'articulation est, quant à elle, délimitée par une membrane synoviale et un manchon fibreux appelé capsule qui renforce à l'extérieur la membrane synoviale (Figure I.1). Des ligaments latéraux et parfois intra-articulaires, notamment dans le cas du genou, viennent stabiliser l'articulation. Le cartilage se trouve donc enfermé dans une cavité close et stérile, et baigne dans un liquide visco-élastique sécrété par la membrane synoviale, le liquide synovial. Le cartilage articulaire permet de transmettre, d'amortir et de distribuer des charges tout en assurant un glissement harmonieux des pièces articulaires avec un coefficient de friction très bas. Sa capacité à subir des déformations réversibles est directement liée à son organisation structurale, c'est-à-dire à l'arrangement des macromolécules qui le composent.

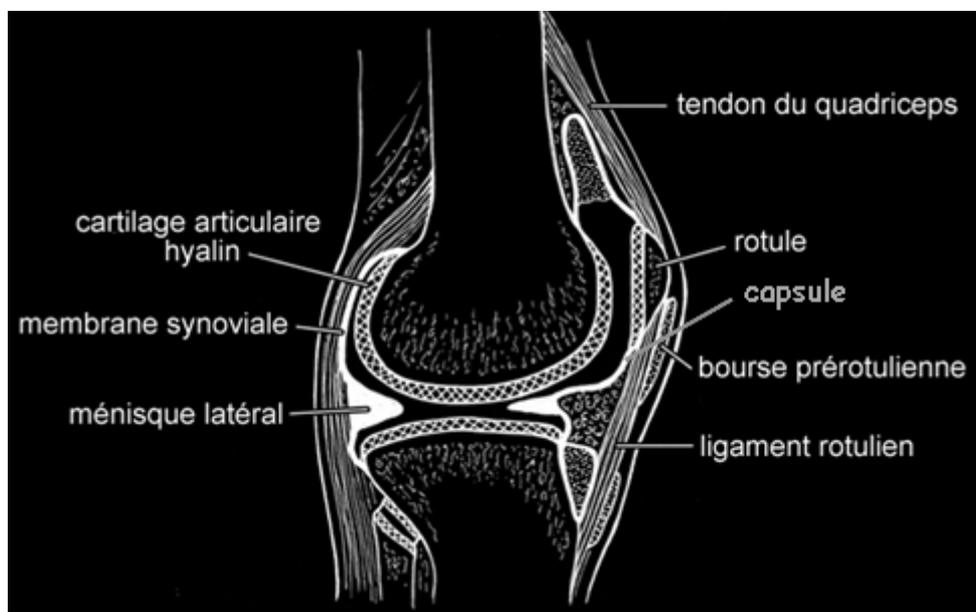


Figure I.1 Schéma d'une coupe sagittale d'une articulation du genou

1. La structure du cartilage hyalin

Le cartilage articulaire possède des propriétés essentielles qui permettent aux mouvements de se dérouler sans contrainte grâce à sa structure et à sa surface lisse ainsi qu'à

la présence d'un film visqueux, le liquide synovial. Le cartilage articulaire joue également un rôle essentiel dans la répartition des contraintes mécaniques sur une surface maximale de l'os sous-chondral (Radin et Rose 1986). Il est ainsi capable de résister aux forces de compression, tout en étant capable de se déformer pour supporter au mieux les contraintes mécaniques. Ces propriétés d'amortissement sont conférées par l'eau qu'il contient et qui constitue plus de 80% du poids du tissu hydraté, ainsi que par les protéoglycanes (PG) auxquels cette eau est associée et qui sont eux-mêmes piégés dans une trame de collagènes. La résistance aux compressions est d'autant mieux supportée que l'os sous-chondral présente une organisation en travées espacées les unes des autres par la moelle osseuse, et perpendiculaires à la surface articulaire. En réponse à l'application d'une contrainte, cette structure de l'os sous-chondral permettrait au cartilage de s'affaisser entre les travées.

Ainsi, il est essentiel que l'intégrité biochimique et structurale du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral soit conservée pour préserver la fonction articulaire. Les propriétés rhéologiques et de résistance à la pression du cartilage articulaire sont en effet directement liées à la présence de ses deux principaux constituants : les collagènes forment un véritable réseau nécessaire au maintien de l'agrécane au sein de la Matrice Extra-Cellulaire (MEC).

D'autres molécules protéiques plus petites participent à l'architecture du tissu en assurant des interactions entre les principaux constituants, renforçant ainsi sa structure, ou établissent des interactions entre la matrice et les chondrocytes, leur permettant d'obtenir des informations quant à l'état de la MEC (Buckwalter et Mankin 1998).

1) Organisation du cartilage hyalin

Sur le plan histologique, le cartilage normal est constitué de 4 couches établies selon des critères de morphologie et de densité cellulaires et selon la nature et la distribution des différents constituants cartilagineux (Johnston 1997) (Figure I.2) :

- dans la couche superficielle, la plus sollicitée par les contraintes mécaniques, les fibres de collagènes sont orientées tangentiellement à la surface articulaire. Sa faible teneur en PGs lui confère une plus grande aptitude à résister aux forces de compression et de cisaillement. Elle résiste également mieux à la pression de gonflement générée par les PG dans les couches plus profondes du cartilage. Les chondrocytes situés dans cette zone sont aplatis et parallèles à la surface articulaire.

- La couche intermédiaire ou de transition est constituée de fibres de collagènes entrecroisées non orientées et de chondrocytes dispersés plus volumineux et sphériques.
- Dans la couche profonde, la forte teneur en PGs assure une meilleure capacité à supporter les forces de pression. Les fibres de collagènes s'orientent progressivement perpendiculairement à la surface. Les chondrocytes de cette couche sont moins volumineux et disposés en colonnes verticales.
- La couche calcifiée est séparée de la couche profonde par une ligne irrégulière correspondant à un front de minéralisation, la tide-mark. Elle est constituée de fibres serrées de collagène perpendiculaires à la surface et ancrées à la matrice calcifiée de l'os sous-chondral. Cette couche est dépourvue de PGs. Les chondrocytes sont arrondis voire hypertrophiques et distribués de manière éparses dans des lacunes non calcifiées.

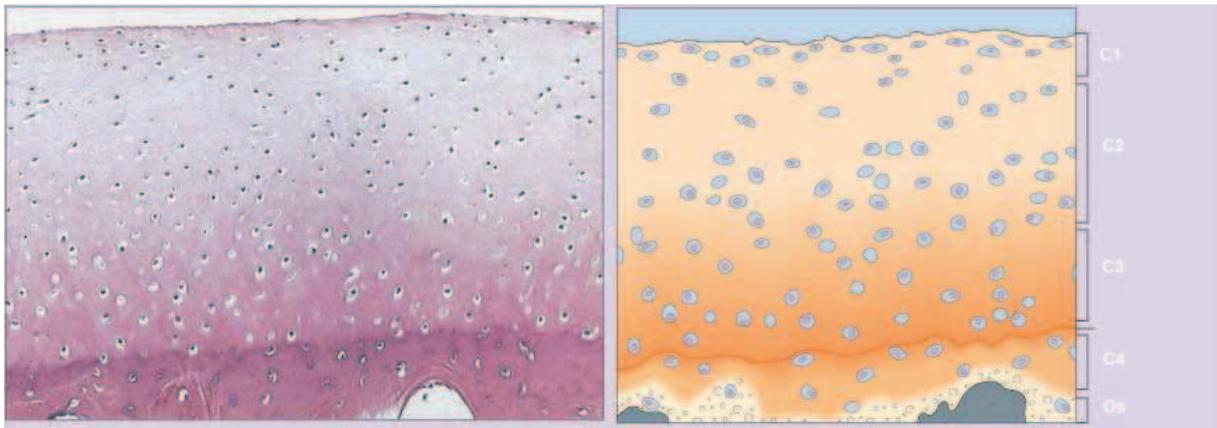


Figure I.2. Coupe histologique et schéma d'un cartilage articulaire montrant les 4 couches. La couche profonde (C3) est séparée de la couche calcifiée (C4) par une fine ligne irrégulière (« tide-mark »).

2) Les collagènes

Parmi les nombreux types de collagènes recensés, les collagènes fibrillaires, dont le nom décrit leur capacité à s'organiser en fibres, confèrent aux tissus leurs propriétés de résistance à la tension ou à la pression. Cette classe regroupe les collagènes de type I, II, III, V et XI. Les fibrilles de ces collagènes organisées en triple hélice sont sécrétées sous une forme soluble possédant des régions N- et C-terminales non collagéniques qui participent au contrôle de la fibrillogenèse (Figure I.3). Les fibres se forment ensuite dans l'espace

extracellulaire après l'action d'une protéase spécifique qui laisse libre des télopeptides non organisés en triple hélice (Chapman 1989). Des résidus lysine localisés dans ces télopeptides permettent ensuite la formation de cross-links entre les molécules de collagène pour constituer des fibres plus ou moins grosses. Des résidus hydroxyproline stabilisent également les molécules de collagène qui s'associent parallèlement mais décalées les unes par rapport aux autres donnant un aspect strié aux fibres de collagène. Les fibres de collagène constituent ainsi une véritable trame dans laquelle d'autres macromolécules sont retenues et qui confère au cartilage ses propriétés de résistance aux forces de tension.

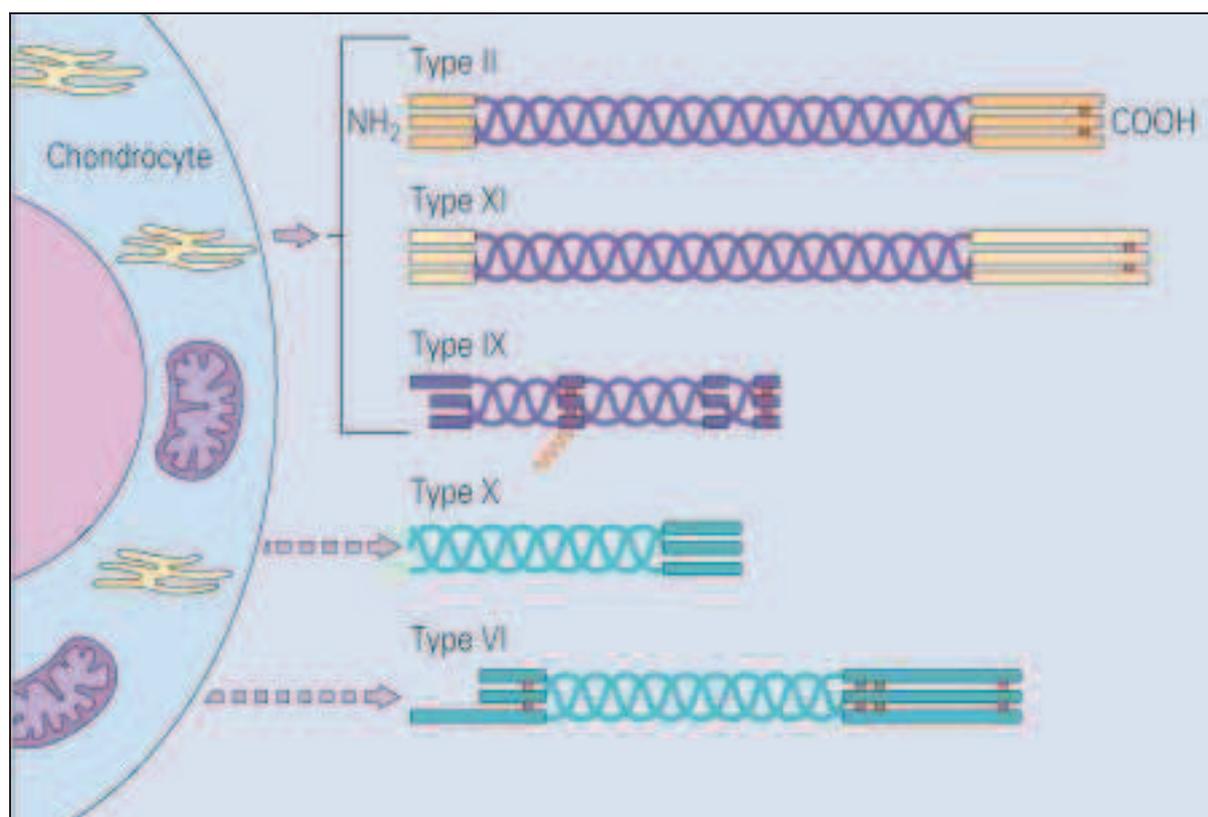


Figure I.3. Représentation des différents types de collagènes rencontrés au niveau de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire (<http://www.medecine.ups-tlse.fr>).

Différents types de collagènes sont retrouvés au niveau de la MEC du cartilage articulaire. Le collagène de type II est le collagène majoritaire du cartilage hyalin (80 à 90% des collagènes) (Cremer *et al.* 1998). Il forme, avec le collagène de type XI, des fibres mixtes de collagènes. La copolymérisation de quelques molécules de collagènes de type XI avec le collagène de type II jouerait un rôle dans le contrôle du diamètre des fibres par encombrement stérique (Olsen 1995). En effet, une délétion nucléotidique dans la chaîne $\alpha 1$ du collagène XI chez la souris conduit à la formation de fibres de collagènes de type II de diamètre

anormalement élevé. Cette mutation est à l'origine d'une chondroplasie caractérisée par une fragilité importante du cartilage vis-à-vis des contraintes mécaniques (Li *et al.* 1995).

Les fines fibrilles de collagène de type XI forment en fait le centre des fibres de collagène de type II (Mendler *et al.* 1989). Un troisième type de collagène participe à la formation de ces fibres : le collagène de type IX (Bruckner et van der Rest 1994). Il interviendrait lui aussi dans le contrôle de la croissance latérale des fibres en se glissant dans les interstices entre deux chaînes de collagène de type II empêchant ainsi l'apposition de nouvelles molécules de collagène de type II. Le collagène de type IX est également impliqué dans les interactions entre les fibres de collagène de type II et les PGs qui jouent un rôle essentiel dans le maintien des propriétés biomécaniques du cartilage (Olsen 1997). Ainsi, des souris mutantes homozygotes n'exprimant pas un des domaines non collagénique du collagène de type IX impliqué dans la liaison avec des PGs développent de façon précoce une pathologie dégénérative non inflammatoire du cartilage dont les caractéristiques sont très proches de celles d'une arthrose chez l'homme (Fassler *et al.* 1994).

Le collagène de type VI préférentiellement localisé au niveau péricellulaire se lie aux autres collagènes et stabilise les interactions entre collagène et PGs. Il intervient également dans les relations cellules/matrice en se liant à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules. Il est ainsi capable de se lier à l'Acide Hyaluronique (AH) (Laurent *et al.* 1996) et possède une séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD) qui lui permet d'établir des interactions avec des protéines de la membrane chondrocytaire (Thomas *et al.* 1994). Ces interactions permettraient de rendre compte du degré de sollicitation du cartilage dans l'environnement du chondrocyte qui répondrait en modulant le renouvellement des constituants.

Le collagène de type X est uniquement produit par les chondrocytes hypertrophiques présents dans la zone calcifiée du cartilage. Il participerait au processus de minéralisation en séquestrant le calcium.

Dans le cartilage hyalin, la tension des fibres mixtes de collagène permet de contenir la pression de gonflement générée par les PGs (Bruckner et van der Rest 1994). L'agrécan est ainsi comprimé dans un volume représentant seulement 10 à 20% de son volume en solution libre (Johnston 1997).

3) Les protéoglycane

En plus des collagènes, la MEC est également riche en GlycosAminoGlycane (GAGs) isolés ou liés à des protéines pour former des PGs. On distingue ceux de haut poids moléculaire de ceux de bas poids moléculaire.

a L'agrécan

Les protéoglycane sont constitués d'une protéine porteuse sur laquelle sont fixées une ou plusieurs chaînes latérales de GAGs (Figure I.4). L'agrécan est une macromolécule de 1 à 5.10^6 Da spécifique du cartilage. Il est l'un des PGs les plus étudiés et pour lequel il existe une relation claire entre la structure et la fonction (Muir 1995).

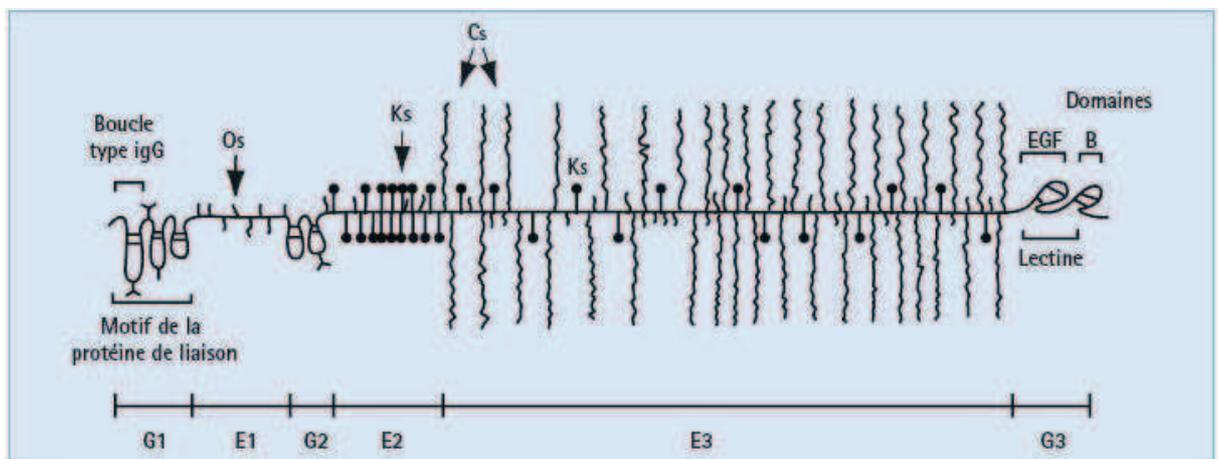


Figure I.4. Structure d'un protéoglycane (Chevalier et al. 2005).

La particularité de l'agrécan est de concentrer les charges négatives au sein de la MEC du cartilage : 90% de sa masse est constituée par environ 130 chaînes de GAGs sulfatés et une centaine d'oligosaccharides liés soit par un atome d'oxygène soit par un atome d'azote aux résidus lysine de la protéine porteuse. Les chaînes de GAGs sulfatés sont constituées d'homopolymères de 40 à 50 unités disaccharidiques sulfatées de type chondroïtine sulfate (CS) et de type kératane sulfate (KS). Leurs groupements carboxyles et surtout leurs groupements sulfates confèrent à l'agrécan sa forte densité en charges négatives (Vertel 1995). Ces chaînes polysaccharidiques sont réparties entre deux domaines globulaires de la protéine porteuse de l'agrécan, G2 et G3, situés côté N- et C- terminal respectivement. Un troisième domaine globulaire (G1) à l'extrémité N-ter interagit avec l'AH, un GAG non sulfaté dont la structure est linéaire. La liaison ionique entre l'agrécan et l'AH est stabilisée par une protéine de liaison qui présente une forte affinité pour chacun de ces deux

constituants. Elle met en jeu un segment d'une vingtaine d'unités disaccharidiques de l'AH qui adoptent une conformation telle que la molécule apparaît repliée (Morgelin *et al.* 1995). La protéine de liaison et le domaine G1 présentent une structure très similaire en double épingle à cheveux et une région « immunoglobulin-like ». Cette structure met en jeu 4 ponts disulfures qui sont déterminants pour la fixation de l'agrécane à l'AH. Ces ponts seraient produits après libération de l'agrécane dans la MEC permettant ainsi au PG nouvellement synthétisé de diffuser hors de l'environnement périchondrocytaire avant de se lier à l'AH (Hardingham et Muir 1974).

Le domaine globulaire G2, qui présente une structure très proche de celle de G1 (deux séquences en tandem organisées en double-épingle à cheveux) n'établit aucune interaction avec l'AH mais a un rôle structural : en séparant le domaine G1 et la région E2 portant les chaînes de GAGs sulfatés, il créerait un espace suffisant permettant l'association de l'agrécane avec l'AH (Fosang et Hardingham 1989).

Le domaine G3 de la protéine porteuse de l'agrécane joue un rôle essentiel lors de la synthèse de l'agrécane dont les différentes étapes sont celles de la synthèse de toute glycoprotéine : après la traduction, la protéine porteuse est transportée dans le réticulum endoplasmique (RE) grâce à la présence d'un peptide signal. La protéine est ensuite glycosylée dans le RE granuleux (oligosaccharides liés à un atome d'oxygène) puis dans l'appareil de Golgi (oligosaccharides liés à un atome d'azote, polymérisation des CS et des KS, sulfatation) avant d'être sécrétée. La synthèse d'une protéine porteuse tronquée ne présentant pas le domaine G3 serait à l'origine de certaines chondrodystrophies nanométriques (Luo *et al.* 1996) : le transit de la protéine depuis le RE granuleux vers l'appareil de Golgi serait bloqué et la synthèse de l'agrécane serait soit inhibée (mutation homozygote létale) soit fortement diminuée (hétérozygote, chondrodystrophie nanométrique). La matrice cartilagineuse présente alors une structure très dense et la croissance des os longs est très diminuée (Vertel 1995).

Une multitude de monomères d'agrécane peuvent se fixer à une molécule d'AH. Les agrégats supramoléculaires ainsi formés sont immobilisés dans le réseau collagénique et augmentent la densité de charges négatives dans la MEC du cartilage. En constituant des pôles d'attraction pour les cations, l'agrécane est à l'origine d'une pression osmotique importante qui permet de maintenir un taux d'hydratation très élevé. L'agrécane serait également capable d'interagir avec d'autres constituants matriciels via le domaine G3 (Brissett et Perkins 1998). Cette extrémité C-ter est constituée d'un domaine de reconnaissance des lectines qui est capable d'établir des interactions avec des substrats

anioniques. Dans le cas du versicane, un PG présent dans le système nerveux dont la structure est comparable à celle de l'agrécan, le domaine C-ter G3 constitue un site de liaison pour une glycoprotéine impliquée dans l'adhésion cellulaire, la ténascine R (Aspberg *et al.* 1995).

Les PGs confèrent l'élasticité nécessaire aux propriétés mécaniques du tissu cartilagineux. Quand les forces de compression s'exercent sur le cartilage, il se comporte comme un matériau visco-élastique : en charge, le cartilage se déforme instantanément. Cette capacité à se déformer est directement liée à la teneur en PGs. En effet, les charges négatives des groupements sulfatés attirent des ions de charges opposés, principalement du sodium, rendant le tissu très hydrophile. L'eau attirée dans le tissu crée alors une forte pression osmotique et augmente le volume des fibres de collagène (Figure I.5, 1). Lors d'une déformation, l'eau est expulsée et un équilibre s'établit entre la charge appliquée et la pression osmotique (Figure I.5, 2). Une fois la charge supprimée, les PGs se réhydratent et le réseau reprend son volume initial (Figure I.5, 3).

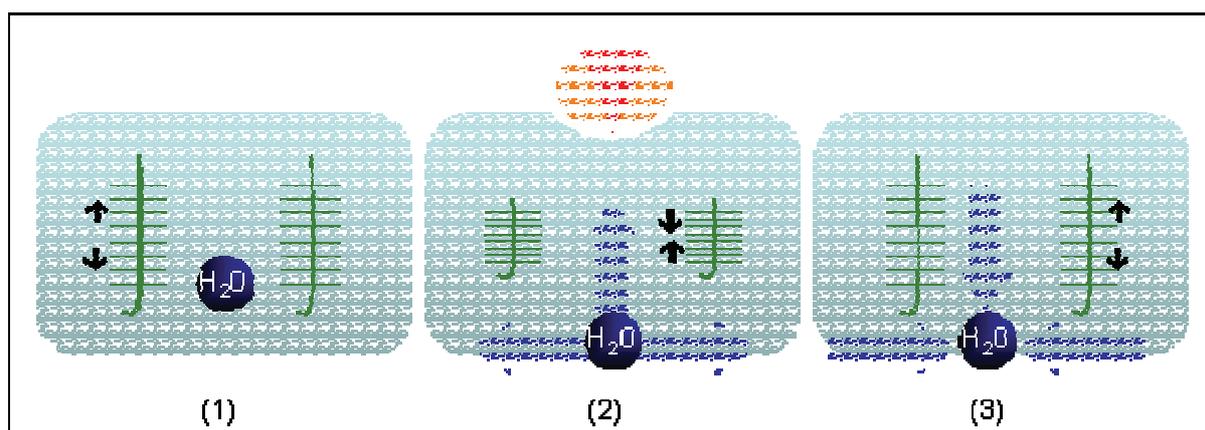


Figure I.5. Effet de la compression sur les mouvements d'eau dans le cartilage (<http://www.medecine.ups-tlse.fr>).

b Les petits protéoglycanes

Cette classe représente la décorine, le biglycane et la fibromoduline qui sont respectivement formés de chaînes de sulfate de chondroïtine, de deux chaînes de sulfate de dermatane et de chaînes de sulfate de kératane. Ces petits PGs contribuent faiblement à la masse totale des PGs (3%) (Huber *et al.* 2000). Ils participent au contrôle de la fibrillogenèse et influenceraient l'espacement entre les fibres de collagènes et donc les propriétés de la MEC, en établissant des interactions ioniques grâce à leurs chaînes latérales de GAGs sulfatés (Scott et Stockwell 2006).

4) Les protéines non collagéniques

Diverses protéines non collagéniques sont présentes au sein du cartilage articulaire. Leur nature ainsi que leur concentration varient selon leur localisation dans le tissu. Elles sont responsables des interactions entre les éléments matriciels et entre les chondrocytes et la MEC.

Les principales protéines non collagéniques ont des propriétés distinctes :

- la glycoprotéine de liaison participe à la formation des agrégats de PG en stabilisant la fixation de l'agrécane à l'AH,
- la thrombospondine joue un rôle dans l'adhérence cellulaire,
- l'anchorine agit comme un mécanorécepteur : en se liant aux chondrocytes et au collagène de type II, elle transmet les variations de pressions aux cellules (Mollenhauer et al., 1984),
- la ténascine et la fibronectine contrôlent les interactions entre les chondrocytes et la MEC (Huber *et al.* 2000),
- la chondrocalcine participe à la minéralisation du cartilage en se fixant aux cristaux d'hydroxyapatite (Poole *et al.* 1984),
- la thrombospondine contient des domaines de liaison avec les GAGs et la fibronectine est une glycoprotéine ubiquitaire capable de se fixer sur les chondrocytes, l'AH, les GAGs, les PGs et les collagènes. Elles possèdent toutes les deux une séquence RGD (Arg-Gly-Asp) nécessaire à leur fixation sur les intégrines chondrocytaires et participent ainsi aux interactions entre cellules et matrice.

II. Les chondrocytes

Le chondrocyte, unique type cellulaire du cartilage hyalin, est une cellule spécialisée et hautement différenciée. Généralement de forme sphérique ou ovoïde, sa taille atteint 30 à 40 µm de diamètre. Il est séparé de la MEC par un espace péricellulaire. Dans cette logette, un grand nombre de molécules d'attache membranaire (collagène de type VI, protéines d'adhésion, héparanes sulfates) relie la cellule à sa matrice environnante, l'ensemble portant le nom de chondron ou chondroplaste (Poole *et al.* 1992) (Figure I.6).

Cette structure a été mise en évidence au début de ce siècle par Benninghoff (1925) au cours d'une observation d'une coupe de cartilage en lumière polarisée. Il a suggéré que le chondron formé par un chondrocyte sur la membrane duquel est lié un fin glycocalyx, et par une capsule fibrillaire péricellulaire, constituait l'unité fonctionnelle et métabolique primaire

responsable de l'homéostasie du cartilage hyalin. Par sa structure dense, le chondron assure un rôle de protection du chondrocyte vis-à-vis des contraintes mécaniques. Il serait également impliqué dans la rétention, la maturation et le renouvellement de l'agrécane (Poole 1997). De plus, la forme allongée du pôle basal du chondron assure une continuité entre deux chondrons adjacents.

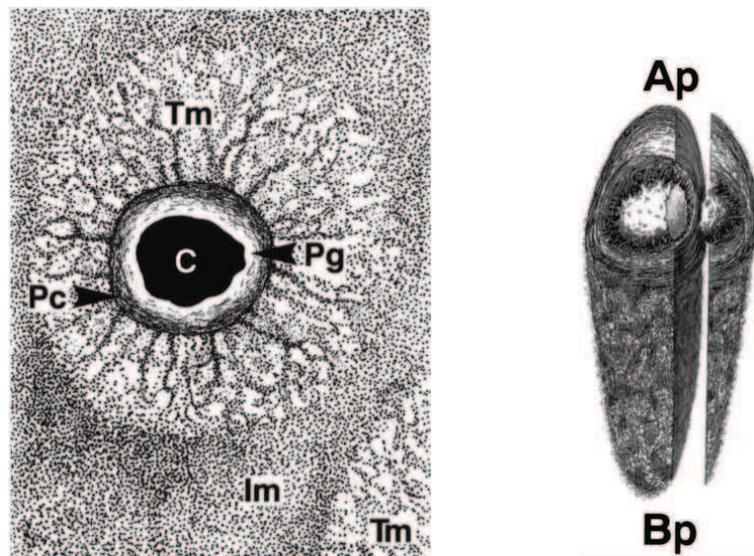


Figure I.6.Représentations bi- (à gauche) et tri- dimensionnelles (à droite) d'un chondron. Le réseau collagénique est organisé de manière circonférentielle autour du chondrocyte (C). L'espace péri-cellulaire est constitué du glycocalyx (Pg) et de la capsule (Pc), l'ensemble étant lié à la matrice extracellulaire territoriale (Tm) puis inter-territoriale (Im). (Ap = pôle apical ; Bp = pôle basal) (Poole et al. 1997).

Les chondrocytes occupent 10 % du volume cartilagineux total mais leur nombre, leur taille et leur forme ainsi que leur activité métabolique varient considérablement selon le type d'articulation, la localisation topographique et surtout l'âge de l'individu. Les chondrocytes ne migrent pas et se multiplient peu ou pas dans un cartilage sain. La densité cellulaire tend même à décroître avec l'âge.

En raison du caractère avasculaire du cartilage, le chondrocyte utilise essentiellement le glucose et privilégie la voie de la glycolyse anaérobie. Le cartilage est en effet un des rares tissus à fonctionner en hypoxie. Il existe ainsi un gradient hypoxique qui varie de 10 % de teneur en oxygène en surface à 1 % en profondeur. Les chondrocytes de la couche superficielle peuvent alors utiliser partiellement un fonctionnement aérobie par diffusion de l'oxygène présent dans le liquide synovial.

L'apport en nutriments provient presque exclusivement du liquide synovial. Celui-ci correspond à un dialysat sélectif du plasma auquel manquent les protéines de poids moléculaire élevé. Le liquide synovial sert également de lubrifiant pour l'articulation, amortit les chocs et évite le contact direct des cartilages articulaires entre eux. Ce pouvoir lubrifiant du liquide synovial est lié à l'abondance en AH à l'origine de sa viscosité. Il permet aussi l'évacuation des débris issus du cartilage articulaire en les dirigeant jusqu'au tissu synovial, siège de leur phagocytose. Chaque nutriment diffuse des capillaires synoviaux vers le liquide synovial avant d'atteindre la MEC du cartilage. Seuls les composants de bas poids moléculaire peuvent pénétrer le cartilage par simple diffusion ou imbibition favorisée par la mobilité de l'articulation. Les plus encombrants ne peuvent pénétrer que sous l'effet de la compression intermittente qui s'exerce au cours des mouvements. Les macromolécules ne peuvent pas pénétrer les mailles serrées de la surface articulaire. La charge ionique des molécules conditionne également leurs accès aux chondrocytes.

Chaque cellule possède l'ensemble des organites nécessaires à la synthèse et à la maturation des protéines à destinée intra- et extracellulaire. L'analyse ultrastructurale du chondrocyte révèle un noyau central volumineux, des ribosomes, un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, des mitochondries ainsi que des vacuoles lipidiques, glycogéniques et lysosomiales. Cependant, le métabolisme chondrocytaire tout comme l'aspect cellulaire et le nombre de cellules, est très variable selon la zone cartilagineuse considérée (Aydelotte *et al.* 1992). En situation physiologique, le chondrocyte maintient un équilibre dynamique entre la synthèse et la dégradation des protéines structurales de la matrice cartilagineuse (collagènes, PGs, glycoprotéines). Sur le versant catabolique, les métalloprotéases, les hyaluronidases, les agrécanases et les cathepsines sont impliquées dans la destruction matricielle.

1) Biosynthèse des protéoglycanes

La biosynthèse des chaînes de GAGs revêt une importance biologique considérable en raison de leur rôle dans l'organisation structurale de la matrice des tissus conjonctifs et de leurs propriétés régulatrices liées à leur capacité d'interactions avec les facteurs de croissance (Wegrowski et Maquart 2004). Cette voie de synthèse des GAGs met en jeu l'action séquentielle de glycosyltransférases. Les réactions enzymatiques sont initiées par l'assemblage d'une séquence tétrasaccharidique d'ancrage commune fixée sur un squelette peptidique pour former une amorce glycopeptidique à partir de laquelle s'effectue la

polymérisation des deux principaux types de chaînes de GAGs (héparine/héparane-sulfates, chondroïtine/dermatane sulfates) (Figure I.7). La formation de cette séquence constituée par l'ajout successif de résidus glucidiques est catalysée par les enzymes suivantes : la O-xylosyltransférase I (Xyl-T), la β 1,4-galactosyltransférase 7 (GalT-I), la β 1,3-galactosyltransférase 6 (GalT-II) et la β 1,3-glucuronosyltransférase 1 (GlcAT-I) (Gulberti *et al.* 2005).

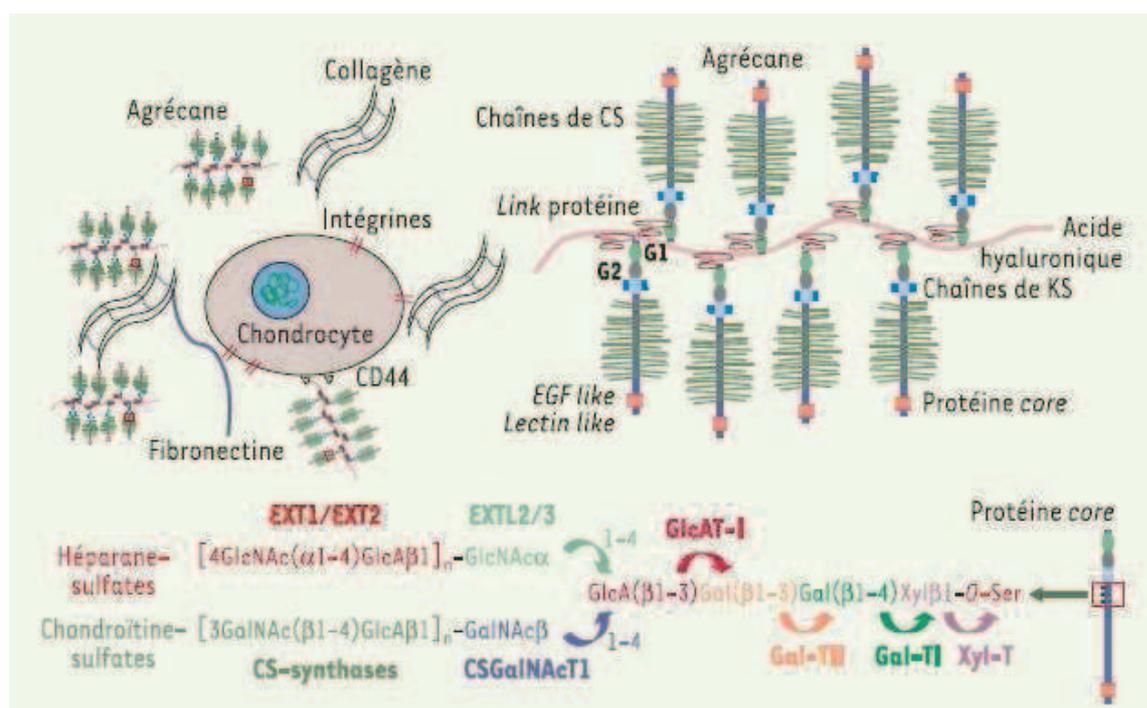


Figure I.7 Biosynthèse des protéoglycanes (www.edk.fr/reserve/print/e-docs/00/00/07/4C/document-article-md)

Le transfert d'un résidu α GlcNAc ou β GalNAc sur l'acide glucuronique terminal initie la polymérisation, respectivement, des chaînes d'héparane-sulfates ou de chondroïtine-sulfates. Ces hétéropolysaccharides subissent des modifications par l'action conjointe d'épimérasés et de sulfotransférasés, ce qui confère à la chaîne des GAGs une complexité considérable et des fonctions variées. La GlcAT-I, en catalysant l'étape finale de la biosynthèse de l'amorce tétrasaccharidique des PGs, conditionne la polymérisation ultérieure des chaînes et jouerait ainsi un rôle limitant dans la biosynthèse des GAGs (Wei *et al.* 1999).

2) Les enzymes protéolytiques

a Les Métalloprotéases

Le renouvellement des constituants matriciels fait intervenir 4 familles d'enzymes protéolytiques déterminées par les acides aminés ou les métaux responsables de la catalyse. Les cystéine protéases et les aspartate protéases exercent leur activité enzymatique à pH acide dans le compartiment intracellulaire alors que les sérines protéases et les métalloprotéases (MMPs) agissent à pH neutre dans la MEC.

Les MMPs sont des éléments prépondérants dans le renouvellement du cartilage articulaire. Elles partagent un certain nombre de points communs (Shingleton *et al.* 1996) :

- leur site catalytique contient un atome de zinc ;
- elles sont sécrétées sous la forme d'un précurseur inactif qui est activé après hydrolyse ;
- un ion calcium est indispensable à leur activité.

Les principales familles de MMPs se distinguent par leur spécificité de substrat (Table I.1) :

Les collagénases

Les MMP-1 et -13 (MMP spécifique du cartilage) sont capables de dégrader les trois chaînes des collagènes en un même site conduisant à la production de deux fragments dont les longueurs respectives représentent les trois-quarts et le quart de la longueur de la molécule intacte. A température physiologique, ces fragments devenus instables, perdent leur structure en triple hélice. Les chaînes polypeptidiques sont alors dégradées par d'autres protéases (Aimes et Quigley 1995).

Les gélatinases

Les gélatinases (MMP-2 et -9) dégradent les collagènes dénaturés. L'une d'entre elles, la MMP-2 est sécrétée par les chondrocytes et est associée à un inhibiteur de métalloprotéase, le TIMP-2 (« Tissue inhibitor of metalloproteinase ») (Murphy *et al.* 1992). L'activation de la MMP-2 met en jeu un complexe trimoléculaire membranaire constitué d'une métalloprotéase membranaire (MT-MMP), du TIMP-2 et de la MMP-2 (Strongin *et al.* 1995).

Les stromélysines

Elles constituent la troisième classe de MMP, la MMP-3 et la MMP-10 étant exprimées par les chondrocytes. Ces enzymes se caractérisent par leur large spécificité vis-à-vis de leur substrat. Les stromélysines une fois activées, peuvent à leur tour activer les formes latentes des collagénases (Matrisian 1992).

Les agrécanases

On définit comme agrécanases les ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs)-1, -4, -5, -8, -9 et -15 par référence à leur substrat majeur l'agrécane. Les ADAMTS-4 et -5, définies comme les agrécanases 1 et 2 hydrolysent l'agrécane en 5 sites (Tortorella *et al.* 2002) qui se situent dans une région riche en chondroïtine sulfates entre les domaines globulaires G1 et G2 (Malfait *et al.* 2002).

Enzymes	Nomenclature	Autres dénominations	Principaux substrats matriciels
<u>Collagénases</u> Collagénase 1 Collagénase 2 Collagénase 3 Collagénase 4	MMP-1 MMP-8 MMP-13 MMP-18	Collagénase interstitielle Collagénase des neutrophiles	Collagènes 1, 2, 3, 7, 8, 10 Collagènes 1, 2, 3 Collagènes 1, 2, 3, Gélatines
<u>Gélatinases</u> Gélatinase A Gélatinase B	MMP-2 MMP-9	Collagénase de type IV Collagénase de type IV	Gélatines, Collagène 4, 5, 7, 10, Elastine, Fibronectine Gélatines, Collagènes 4, 5, 7, 11, Elastine
<u>Stromélysine</u> Stromélysine 1 Stromélysine 2 Stromélysine 3	MMP-3 MMP-10 MMP-11	Transine Transine 2	PGs, Laminines, Fibronectine, Collagènes 2, 3, 4, 9, Gélatines PGs, Fibronectine, Collagènes 3, 4, 5, Gélatines
<u>Type membranaire</u> MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT4-MMP	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17		Progélatinase A, Procollagénase Progélatinase A

Table I.1 Classification des MétalloProtéases Matricielles selon leur spécificité de substrat.

b Régulation de l'activité des MMPs

L'activité des MMPs est régulée à 2 niveaux (Figure I.8) :

- Activation du précurseur inactif

Le propeptide clivé possède une séquence conservée entre les différentes MMPs (Proline-Arginine-Cystéine-Glycine-Valine-Proline-Acide aspartique), le résidu cystéine se liant avec l'atome de zinc du site catalytique. La rupture de cette liaison conduit à l'activation de l'enzyme.

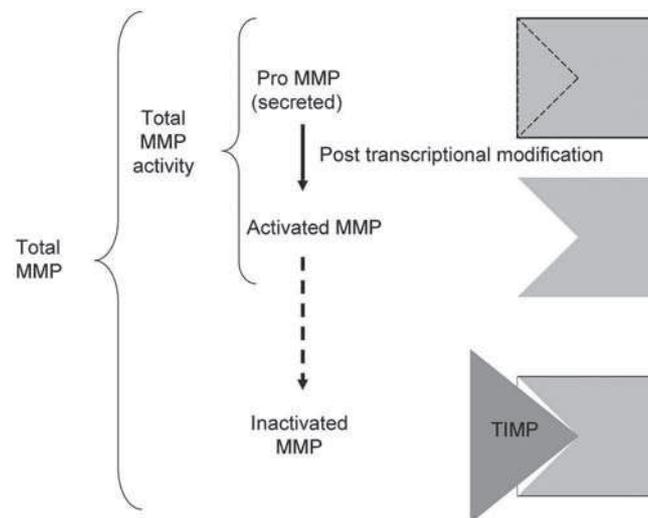


Figure I.8 Système de contrôle de l'activité des MMPs (Genevay et al. 2009).

Le système plasminogène-plasmine (sérine protéase) est indispensable à l'activation des pro-MMPs et est également capable de dégrader les constituants de la matrice. Ce système enzymatique est activé par des enzymes spécifiques, les activateurs du plasminogène de type tissulaire ou de type urokinase (tPA et uPA respectivement) qui possèdent un récepteur membranaire. Ce dernier conduit à une augmentation des taux d'activation de la forme inactive de l'uPA (Martel-Pelletier *et al.* 1991). La plasmine, qui possède la capacité de dégrader les constituants matriciels, contribue également à l'activation de plusieurs MMPs, dont les collagénases.

Les Membrane Type-MMPs (MT-MMPs) et les stromélysines sont également impliquées dans l'activation des pro-MMPs.

- Les inhibiteurs de protéases

les MMPs sont inhibées par des inhibiteurs endogènes non spécifiques (TIMPs). Quatre types différents ont été identifiés. TIMP-1 est une glycoprotéine de 28 kDa

particulièrement stable en fonction de la température et du pH (Hodges *et al.* 1994). Cet inhibiteur est très similaire au TIMP-2. Ces deux protéines se lient à la forme active des MMPs dans un rapport 1 : 1. Leur activité inhibitrice se situe dans le domaine N-ter. Un troisième membre de cette famille d'inhibiteurs de protéases existe, le TIMP-3 (Silbiger *et al.* 1994). Il est exprimé dans les chondrocytes et les fibroblastes synoviaux humains et bovins, et est un puissant inhibiteur des agrécanases-1 et 2 (Su *et al.* 1999).

Chapitre 2 La physiopathologie de l'arthrose

Le terme arthrose vient du grec «arthrosis» qui signifie articulation. Elle fait sans doute partie des plus anciennes pathologies connues puisque certaines momies datant de l'Égypte antique révèlent un squelette portant les stigmates de stades avancés de cette maladie. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'arthrose est la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage pour conduire finalement à la destruction du cartilage articulaire.

L'arthrose est une maladie très fréquente (en France, 5 millions de personnes sont concernées par cette pathologie) et le pourcentage de la population touchée par cette maladie dégénérative (prévalence) augmente avec l'âge (Hamerman 1993). Différentes articulations peuvent être atteintes parmi lesquelles le genou (gonarthrose = 35 %), la hanche (coxarthrose = 20 %) ou encore les doigts. L'arthrose constitue la seconde cause d'invalidité après les maladies cardio-vasculaires et représente ainsi un véritable enjeu en terme de santé publique. Avant l'âge de 50 ans, la pathologie est également répartie entre homme et femme. Puis, elle prédomine chez la femme en raison d'une prévalence élevée de la gonarthrose : 35 % des femmes de plus de 65 ans présentent des atteintes arthrosiques au niveau du genou (Kean *et al.* 2009).

I. Facteurs étiologiques

Communément, une distinction est faite entre les arthroses primitives dites idiopathiques et les arthroses secondaires en lien avec une anomalie structurale, mécanique ou séquellaire des articulations. L'arthrose secondaire concerne généralement une population jeune. Elle peut survenir chez une personne ayant subi des traumatismes tels qu'une sollicitation excessive des articulations dans le cadre professionnel et/ou sportif, des fractures, des lésions osseuses et articulaires diverses, des pathologies prédisposant à l'arthrose (dysplasie de la hanche...) ou encore un mauvais alignement articulaire.

Divers facteurs de risques sont classiquement incriminés dans la genèse de l'arthrose (Peyron 1987). Les trois principaux groupes de facteurs sont :

- les facteurs acquis : âge, indice de masse corporelle (IMC), statut hormonal, maladies acquises des articulations/os (ostéoporose), actes chirurgicaux (ménisectomie),
- les facteurs génétiques : sexe, ethnie, rhumatismes inflammatoires,

- les facteurs environnementaux : activités physiques intenses, traumatismes ostéoarticulaires, sollicitations excessives.

Parmi les facteurs de risques environnementaux, les traumatismes articulaires directs (fissure, fracture) ou indirects (lésion des ligaments croisés du genou) peuvent être différenciés d'une activité professionnelle comportant le port de charges, des gestes répétés ou l'activité sportive de haut niveau (course à pied, sauts...). Si l'excès d'activité physique favorise le développement de l'arthrose, des études épidémiologiques ont montré qu'à l'inverse un niveau d'activité trop faible (allant jusqu'à l'immobilisation) est délétère pour le cartilage articulaire (Eckstein *et al.* 2006).

II. Description

Au cours du processus arthrosique, le cartilage s'assombrit, se ramollit, ce qui a pour conséquences de modifier ses propriétés d'amortissement des chocs (Figure I.9). Il se fissure, s'érode et s'amincit pour ensuite disparaître totalement laissant l'os sous-chondral à nu. Ces changements provoquent des altérations osseuses avec une sclérose de l'os sous-chondral, la formation d'ostéophytes en marge des zones érodées et de géodes sous-chondrales.

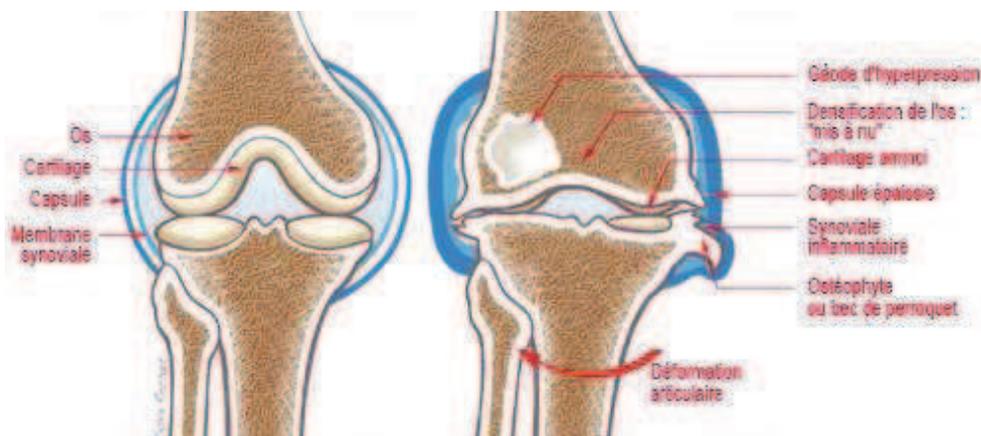


Figure I.9 Représentations d'un genou sain (gauche) et d'un genou atteint d'arthrose (droite) (<http://www.lecosp.fr/genou/arthrose-genou.htm>).

En se désagréant, le cartilage libère des fragments qui peuvent déclencher des réactions inflammatoires au niveau de la membrane synoviale. Les médiateurs inflammatoires alors libérés dans la cavité articulaire entretiennent le processus dégénératif en activant les enzymes protéolytiques et en diminuant la synthèse de la MEC (Figure I.10).

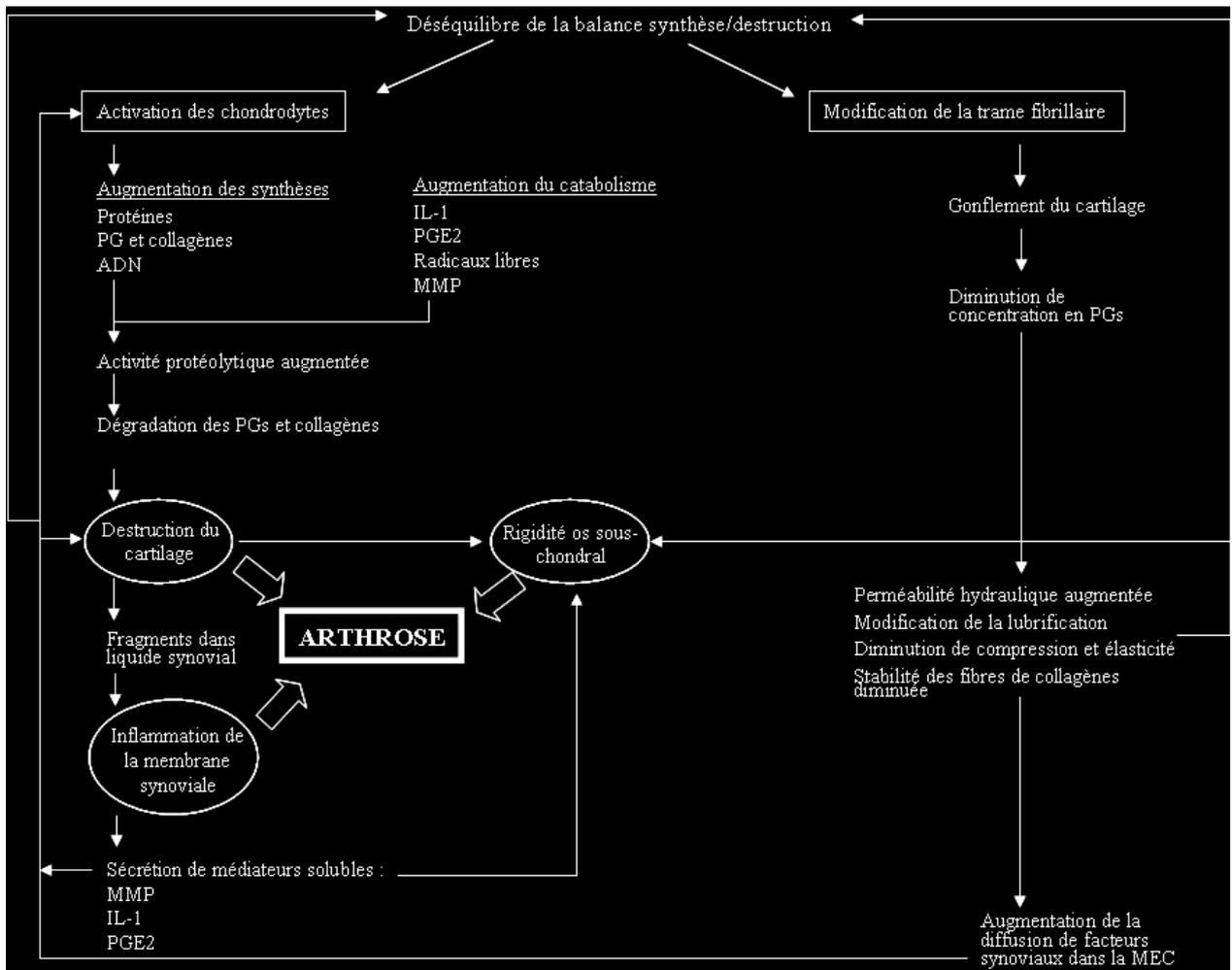


Figure I.10. Schéma général de la physiopathologie de l'arthrose

a Evolution du processus

Du point de vue anatomique, les lésions du cartilage articulaire peuvent être classées en 5 stades (Figure I.11), selon la classification arthroscopique de Beguin et al. qui considère le degré d'atteinte arthrosique (Peyron 1967); (Beguin *et al.* 1982).



Figure I.11 Classification des lésions du cartilage articulaire selon Beguin et al. (1982).

Dans les stades I et II, les lésions sont dites chondrales car elles ne concernent que le cartilage articulaire sans atteindre la couche calcifiée ni l'os sous-chondral. Un cartilage mature est incapable de produire un néo-tissu de qualité permettant une réparation stable au niveau des lésions superficielles. Dans le meilleur des cas, le tissu normal situé en périphérie de la lésion tente de fournir des composants matriciels destinés à la réparation. Les lésions profondes de stade III et IV atteignent l'os sous-chondral au-delà de la tide-mark et de la zone calcifiée, d'où la dénomination de lésions ostéochondrales. L'espace médullaire s'ouvrant au fond d'une lésion ostéochondrale, la moelle osseuse renfermant des cellules précurseurs ainsi que des facteurs de croissance et des vaisseaux manquant au cartilage, participe à sa réparation (Caplan *et al.* 1997) ; (Hunziker 1999). Un caillot sanguin vient alors combler la lésion (Shapiro *et al.* 1993), les cellules mésenchymateuses présentes dans ce caillot étant capables de se différencier en chondrocytes. A un stade ultérieur, le tissu de réparation qui présente un aspect cartilagineux mais reste de nature fibrocartilagineuse atteint la surface articulaire. Sa tenue mécanique est réduite et tend à se dégrader à long terme (Hangody *et al.* 1998).

b Dégradation des constituants du cartilage

Au cours de l'arthrose, l'expression des protéases est augmentée alors que celle de leurs inhibiteurs est diminuée sous l'effet des cytokines pro-inflammatoires (Belcher *et al.* 1996) ; (Martel-Pelletier *et al.* 1994). Les MMPs les plus exprimées sont la MMP-1 (collagénase 1), la MMP-13 (collagénase 3), la MMP-3 (stromélysine 1) et la MMP-9 (gélatinase B). La localisation de la MMP-1 dans la couche superficielle du cartilage laisse supposer qu'elle est davantage impliquée dans les phases précoces de l'arthrose (Nguyen *et al.* 1992). La présence de la MMP-13 dans toutes les couches du cartilage traduit le caractère irréversible de l'atteinte articulaire (Moldovan *et al.* 1997). La MMP-8 a également été mise en évidence dans le cartilage articulaire au cours de l'arthrose alors qu'elle n'est pas décelée dans un cartilage sain (Shlopov *et al.* 1997). La particularité de cette MMP est de cliver l'agrécane en un site particulier entre les domaines G1 et G2 (Fosang *et al.* 1994) qui est également celui de l'agrécanease (Lark *et al.* 1995) ; (Tortorella *et al.* 1999). Certains fragments générés sous l'action des protéases peuvent être reconnus par des récepteurs présents à la surface des chondrocytes qui ainsi stimulés produisent à leur tour des protéases et des médiateurs inflammatoires.

A la suite de leur dégradation par les MMP-1, -8 et -13, les collagènes de la matrice cartilagineuse perdent leur structure en triple hélice (Billinghurst *et al.* 1997) et deviennent

beaucoup plus sensibles à l'action des protéases. Un nouvel équilibre s'installe alors entre la pression osmotique générée par les PGs et la tension des fibres de collagènes qui ne peuvent plus restreindre l'entrée d'eau dans le cartilage. Le turn-over des collagènes étant très lent, une atteinte du réseau fibrillaire rend irréversible une atteinte du cartilage (Hasty *et al.* 1990).

Bien que le renouvellement de l'agrécan soit plus rapide que celui des collagènes, sa dégradation conduit à une diminution des propriétés rhéologiques du cartilage. L'agrécan clivé entre les domaines globulaires G1 et G2 perd sa capacité à s'agréger sur l'AH, ce qui facilite sa fuite hors de la matrice cartilagineuse. Le domaine G3, qui possède un site de reconnaissance des lectines, est également la cible de protéases. L'hydrolyse de la protéine dans les régions E1 et E2 portant les chaînes de chondroïtines sulfates est moins fréquente et caractéristique d'une destruction du cartilage déjà avancée (Ilic *et al.* 1992).

c Modifications chondrocytaires

Les phases précoces de l'arthrose se caractérisent par une prolifération cellulaire et une hypertrophie chondrocytaire qui sont interprétées comme des tentatives de réparation : la synthèse de l'agrécan (Gaffen *et al.* 1997), des petits PGs (biglycane, décorine et fibromoduline) (Cs-Szabo *et al.* 1997), ainsi que celles des collagènes de type II et de type VI (Aigner *et al.* 1997) ; (Ronziere *et al.* 1990) est accrue. Une modification du phénotype chondrocytaire survient cependant à un stade plus avancé de la maladie. Elle aboutit à la production de collagène de type I, III et X qui altèrent les propriétés biomécaniques du cartilage articulaire (Matyas *et al.* 1999), ceci contribuant certainement à l'entretien des phénomènes dégénératifs.

d Rôle de l'os sous-chondral

L'arthrose peut être considérée comme une maladie du cartilage mais celui-ci n'est pas la seule cible puisque l'os sous-chondral est aussi atteint (Lajeunesse et Reboul 2003). Ainsi, ces changements de l'os accompagnant l'arthrose apparaissent assez tôt au cours du processus pathologique (Buckland-Wright *et al.* 2000). L'étude des paramètres histomorphométriques a mis en évidence une relation étroite entre la dégradation du cartilage et les modifications de l'os sous-chondral (Botter *et al.* 2009), les changements structuraux de l'os sous-chondral précédant la diminution de l'épaisseur du cartilage et du pincement articulaire (Buckland-Wright 2004). Pour certains auteurs, le remodelage osseux anormal serait à l'origine de l'arthrose alors que pour d'autres, la perte de cartilage serait l'évènement primaire devant les différents changements de l'os sous-chondral. La condensation de l'os sous-chondral est due à

une activité métabolique élevée des ostéoblastes qui résulte d'une déminéralisation de la matrice osseuse (Lajeunesse et Reboul 2003).

III. Facteurs impliqués

Au cours de l'arthrose, il y a rupture de l'homéostasie du cartilage sous l'effet de nombreux médiateurs inflammatoires qui sont capables de diminuer les processus de synthèse et d'augmenter la dégradation des éléments matriciels (figure I.12).

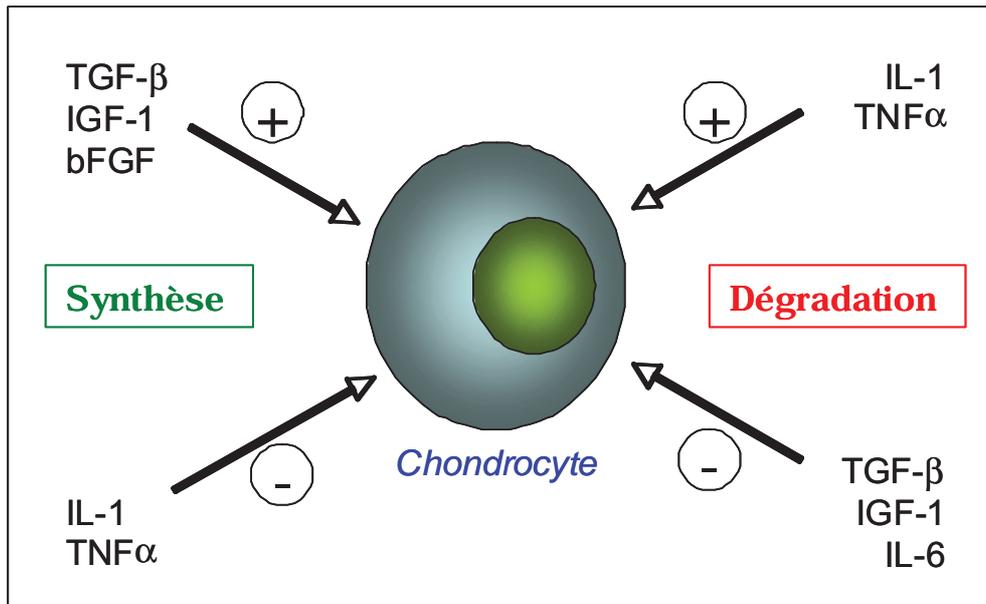


Figure I.12 Rôle des différents médiateurs dans la balance synthèse/dégradation

Les propriétés stimulatrices des facteurs de croissance ne sont plus suffisantes pour lutter contre la dégradation progressive du cartilage articulaire. Une fois le processus dégénératif enclenché, un phénomène irréversible et auto-entretenu se met en place, dans lequel le déséquilibre du métabolisme chondrocytaire en faveur d'une augmentation du catabolisme et d'une diminution de l'anabolisme est maintenu et amplifié (Figure I.12). Cette rupture de l'homéostasie entraîne une perte des constituants matriciels à l'origine d'une altération des propriétés mécaniques et biochimiques du cartilage, et permet ainsi une plus grande diffusion dans le cartilage des facteurs solubles tels que les cytokines.

a L'interleukine 1

Deux isoformes de l'IL-1 existent, l'IL-1 α et l'IL-1 β , codées par deux gènes distincts. Les précurseurs de l'IL-1 ont un poids moléculaire de 31 kDa. La pro-IL-1 α et la forme mature sont toutes deux biologiquement actives. A l'inverse, la pro-IL-1 β nécessite un clivage

par une enzyme spécifique, l'enzyme de conversion de l'IL-1 β (ICE, « IL-1 β converting enzyme » ou caspase-1) pour être biologiquement active (Thornberry *et al.* 1992). L'IL-1 α est un messager autocrine intracellulaire dont le précurseur peut être transporté à la surface de la cellule (Brody et Durum 1989).

L'activité de l'IL-1 est régulée à différents niveaux :

- Deux types de récepteurs membranaires à l'IL-1 β ont été identifiés (IL-1RI et IL-1RII), mais seul IL-1RI induit la transduction du signal. Elle met en jeu un co-récepteur, la protéine accessoire du récepteur de l'IL-1 (IL-1RAcP) (Lang *et al.* 1998). L'activation du complexe IL-RI/IL-1RAcP par une protéine kinase initie la transduction du signal. IL-1RII constitue quant à lui un récepteur leurre qui capte l'IL-1 mais bloque son activité.
- Il existe également un antagoniste du récepteur à l'IL-1 β (IL-1Ra) (Dinarello 1994).
- Les récepteurs solubles de type I et II (IL-1sRI et IL-1sRII) constitués respectivement du domaine extracellulaire des récepteurs de type I et II de l'IL-1 β , agissent eux aussi en tant qu'inhibiteurs de l'IL-1 β . L'IL-1sRI est également capable de fixer l'IL-1Ra.

Au cours de l'arthrose, il existe une production accrue d'IL-1 qui diminue la synthèse des PGs, des collagènes, des TIMPs et augmente la synthèse des protéases (Gouze *et al.* 2004). Une augmentation du nombre des IL-1R de type I a été décelée au cours de l'arthrose (Martel-Pelletier *et al.* 1992) : les chondrocytes d'un cartilage arthrosique sont ainsi beaucoup plus sensibles aux effets de l'IL-1 β que ceux d'un cartilage sain (Warnock et Beale 2004). L'injection intra-articulaire d'IL-1 β chez la souris (van Beuningen *et al.* 1991) ou chez le rat (Gegout *et al.* 1994), ou encore l'ajout de cette cytokine à un milieu de culture de chondrocytes ou d'explants de cartilage (Cipolletta *et al.* 1998) conduit à une diminution de la synthèse des GAGs sulfatés. Cette inhibition de la synthèse des éléments matriciels par l'IL-1 β met en jeu une régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle (Dodge *et al.* 1998) ; (Lum *et al.* 1996). Cette cytokine augmente aussi la production par le chondrocyte des médiateurs de l'inflammation comme les prostaglandines E2 ou le monoxyde d'azote (Gosset *et al.* 2008).

b L'interleukine 6

La synthèse d'IL-6 par les chondrocytes peut être induite à la fois par l'IL-1 β et le TNF α (Nietfeld *et al.* 1994). Son expression dans le cartilage arthrosique est connue (Middleton *et al.* 1996) ; (Dodds *et al.* 1994) mais le rôle de l'IL-6 dans l'arthrose n'est pas clair puisque pour 57 % des patients arthrosiques, son taux d'expression est augmenté dans les chondrocytes alors que pour 43 % d'entre eux, le niveau d'IL-6 dans le cartilage est diminué (Moktar *et al.* 2010). Des sujets âgés ayant une très faible production spontanée d'IL-6 ne présentent aucun signe d'arthrose confirmant en fait la contribution de l'IL-6 dans la dégradation du cartilage (Goekoop *et al.* 2010). Elle induit l'expression des récepteurs membranaires de l'IL-1 β et du TNF α par les chondrocytes (Nietfeld *et al.* 1994), mais stimule également l'expression de l'IL-1Ra (Jordan *et al.* 1995). Elle inhibe la production de radicaux libres induite par l'IL-1 β et la dégradation des constituants matriciels en diminuant la production de collagénase et en stimulant celle des TIMPs. Il semblerait que les effets de l'IL-6 dépendent de la présence conjointe de son récepteur soluble (Silacci *et al.* 1998).

c Les facteurs de croissance

- **L'IGF-I** : Plusieurs auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'expression de l'IGF-I dans des échantillons de cartilage humain atteints d'arthrose (Middleton et Tyler 1992) ; (Olney *et al.* 1996). Elle a été assimilée à une réponse des chondrocytes pour compenser l'atteinte du cartilage. La surexpression de l'IGF-I et de son récepteur membranaire (IGF-R-I) est en effet reliée à une atteinte articulaire plus sévère (Middleton *et al.* 1996). Cependant une surexpression conjointe des IGF-Binding Proteins (IGF-BP) est également observée au cours de l'arthrose conduisant finalement à une baisse de réponse des cellules à l'IGF-I (Olney *et al.* 1996) ; (Tardif *et al.* 1996).

- **Le TGF- β** : Les chondrocytes d'un cartilage arthrosique expriment davantage le TGF- β (Chambers *et al.* 1997) et sont également plus sensibles à ses effets (Jahng *et al.* 1997). La propriété la plus connue du TGF- β est sa capacité à induire fortement la synthèse des constituants matriciels. Il augmente la synthèse des petits PGs tels que la fibromoduline, le biglycane et la décorine, et de l'AH, mais n'a aucun effet sur le collagène de type II. Cependant, ce facteur induit une diminution de la sulfatation des GAGs en modulant l'activité ou la synthèse des sulfotransférases (Zanni *et al.* 1995). Il augmente aussi la production des TIMPs et s'oppose à l'induction des MMPs. La synthèse de la fibronectine est également

stimulée par le TGF- β ainsi que l'expression des intégrines β 1. Le TGF- β conduit alors à une modification des interactions entre les chondrocytes et les constituants matriciels, et pourrait par conséquent moduler le phénotype chondrocytaire. Lafeber et al. suggèrent ainsi que la surexpression du TGF- β dans un cartilage arthrosique pourrait contribuer à un processus de redifférenciation des cellules dont le phénotype serait altéré (Lafeber *et al.* 1997). Outre ses effets bénéfiques, le TGF- β pourrait jouer un rôle délétère dans l'arthrose. Une triple injection de TGF- β dans le genou d'une souris saine provoque en effet la formation d'ostéophytes et l'apparition de lésions semblables à celles observées dans l'arthrose (van den Berg 1995).

IV. Les traitements de l'arthrose

1) Evolution de la maladie

L'arthrose est une maladie lentement évolutive. Son rythme de progression diffère d'une personne à l'autre et n'est pas uniforme au cours du temps (Meachim *et al.* 1977) ; (Cicuttini *et al.* 1999) ; (Raynauld *et al.* 2004). Dans la plupart des cas, l'arthrose est marquée par des épisodes évolutifs par intermittence avec des poussées congestives aiguës caractérisées par des modifications du rythme de la douleur suivies de périodes d'accalmie. Ces poussées surviennent à une fréquence variable selon les patients et l'ancienneté de la maladie. Durant ces poussées, une accélération de la dégradation cartilagineuse est observée (Wluka *et al.* 2004).

2) Contribution médicale

Sans prise en charge adaptée, la douleur et la raideur articulaires aboutissent à une réduction de l'amplitude des mouvements et, à terme, à un véritable handicap fonctionnel. L'arthrose sévère rend les gestes de la vie quotidienne difficiles voire impossibles et altère par conséquent la qualité de vie. Actuellement, aucun médicament n'est en mesure d'induire une réparation du cartilage lésé. Le seul but du traitement pharmacologique de l'arthrose est donc de soulager la douleur. Il fait appel aux médicaments et traitements locaux, à la rééducation pour entretenir la musculature et à la chirurgie, notamment dans le cas d'actions correctrices (ostéotomies) ou de la mise en place de prothèses articulaires.

Les traitements médicaux non chirurgicaux de l'arthrose comportent :

- Les antalgiques simples
- Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

- Les gestes locaux :
 - injections intra-articulaires de corticoïdes,
 - viscosupplémentation par acide hyaluronique,
 - lavage articulaire per-arthroscopique.
- La médecine complémentaire et alternative :
 - compléments alimentaires (glucosamine, chondroïtine sulfate, vitamines)
 - acupuncture, yoga, taï chi.

Les traitements chirurgicaux de l'arthrose consistent à remplacer l'articulation atteinte par les différentes prothèses. Dans les cas de lésions focales, les traitements chirurgicaux comprennent :

- l'ostéotomie de variation
- la réalisation de microfractures (faisant suite aux anciennes techniques de Pridie ou d'abrasion)
- les techniques de mosaïcoplastie (principe de transfert d'unités fonctionnelles ostéocartilagineuses sous forme de plots)
- l'ingénierie articulaire par transfert autologue ostéochondrale ou méthode de Brittberg.

Les indications respectives des différents types de prothèse sont fonction de la nature, de la localisation et de l'importance des lésions qui motivent cette intervention. Le principe directeur de base est celui de l'économie osseuse : mettre en place la prothèse nécessitant le moins de résection osseuse permet une intervention plus simple et surtout ménage l'avenir en laissant une possibilité de reprise chirurgicale éventuelle dans des conditions techniques satisfaisantes. La part du traitement chirurgical dans le traitement des arthroses évoluées reste donc importante puisqu'environ 100000 prothèses de la hanche et 50000 prothèses du genou sont posées par an en France (Ziza JM 2006).

V. Les modèles d'arthrose expérimentale

Nos connaissances actuelles sur la physiopathologie de l'arthrose ainsi que la nécessité d'éprouver l'efficacité de nouvelles molécules à en moduler la progression justifient le besoin de disposer de modèles d'arthrose. L'arthrose, qui définit à la fois des érosions et une ostéophytose ne peut se résumer à un modèle simplifié in vitro et nécessitent le recours aux modèles expérimentaux chez l'animal.

En 1974, Bentley proposait différents critères pour définir un modèle d'arthrose expérimentale « idéal » :

- Les lésions précoces et le mécanisme initiateur doivent être comparables à ceux décrits au cours de la pathologie humaine ;
- Une déplétion de la matrice cartilagineuse en PGs précède la fibrillation de la couche superficielle et l'atteinte des couches plus profondes ;
- Une sclérose de l'os sous-chondral, une ostéophytose et une inflammation de la membrane synoviale caractérisent un stade avancé de la maladie ;
- Ces modifications du cartilage doivent être facilement reproductibles et ne doivent pas être liées à un effet systémique ;
- La méthode peut être appliquée à différentes articulations et à différentes espèces animales.

Un très grand nombre de modèles d'arthrose a été développé. Leur classification utilise en général la comparaison à l'étiologie de l'arthrose chez l'homme pour ce qu'il en est connu, à savoir une origine mécanique ou structurale, qui regroupe à la fois une atteinte des constituants du cartilage et une dérégulation du métabolisme chondrocytaire. L'existence de ces modèles d'arthrose expérimentale chez l'animal rend compte du grand nombre de facteurs étiologiques susceptibles de conduire au développement d'une atteinte dégénérative du cartilage articulaire :

- Les modèles d'instabilité articulaire confirment les observations cliniques qui ont montré l'importance des facteurs mécaniques : les malformations congénitales, l'obésité, les traumatismes répétés chez les sportifs ou encore la rupture des ligaments sont autant de manifestations qui ont été associées au développement précoce d'une arthrose. Le modèle d'arthrose expérimentale par section du ligament croisé antérieur est ainsi devenu le modèle de référence pour l'étude de la physiopathologie de l'arthrose ou des effets des traitements.

L'injection intra-articulaire de collagénase bactérienne développée chez la souris permet d'obtenir un modèle d'arthrose par instabilité articulaire, sans la nécessité d'un geste opératoire (van der Kraan *et al.* 1990), l'action de la collagénase portant sur les structures constituées de collagène de type I, telles que les tendons, les ligaments et les ménisques. Elle conduit au développement de lésions dégénératives sévères du cartilage des plateaux tibiaux et des condyles fémoraux, associées à une dislocation de la rotule, une sclérose de l'os sous-chondral et à la formation d'ostéophytes.

- Le modèle d'injection intra-articulaire d'une enzyme protéolytique, la papaïne, permet la dégradation directe du cartilage. En modifiant les propriétés mécaniques et les

relations cellule/matrice, la dérégulation du métabolisme chondrocytaire aboutit au développement de l'arthrose.

- L'injection intra-articulaire de mono-iodo-acétate (MIA), qui induit une modification du métabolisme chondrocytaire et donc une altération des capacités de synthèse de la MEC, est un autre modèle d'arthrose expérimentale. Cet agent a la capacité d'inhiber certaines enzymes de la glycolyse (Kalbhen 1985). Les chondrocytes étant dépendant d'un métabolisme anaérobie, l'injection intra-articulaire de MIA provoque une diminution des taux d'ATP intracellulaires et une souffrance des cellules, aboutissant au développement d'une arthrose.

Chapitre 3 Les adipokines

I. Le tissu adipeux

Le tissu adipeux peut être divisé en deux grandes parties : la graisse blanche et la graisse brune. La graisse blanche représente la majorité du tissu adipeux dans l'organisme et correspond au site de stockage énergétique. La graisse brune intervient dans la thermogénèse comme un isolant thermique principalement chez les petits mammifères et chez les nouveau-nés (Fantuzzi 2005).

La graisse blanche est composée de plusieurs types cellulaires dont les adipocytes représentent la plus grande part. Les autres cellules appartiennent au stroma vasculaire. Dix pour cent de ces autres cellules sont des macrophages CD14⁺ et CD31⁺. Le nombre de macrophages présents dans la graisse blanche est directement corrélé à l'adiposité et à la taille des adipocytes chez l'homme et chez la souris (Fantuzzi 2005). Par ailleurs, ces macrophages semblent activés d'un point de vue morphologique (cellules géantes) et fonctionnel (production de cytokines) (Fantuzzi 2005).

Le tissu adipeux, et notamment la graisse blanche, a longtemps été considéré uniquement comme un tissu de réserve énergétique. Il a été clairement démontré qu'il constitue en fait une véritable glande endocrine impliquée dans la sécrétion de plus d'une centaine de composés parmi lesquels la leptine, l'adiponectine, la résistine, la visfatine, certaines cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10), le Chemocyte chemoattractant protein 1 (CCP1), le Nerve Growth Factor, le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Otero *et al.* 2005). Ces adipokines agissent dans de nombreux processus physiologiques tels que la régulation de la balance énergétique, l'immunité, la sensibilité à l'insuline, l'angiogenèse, l'inflammation ou encore le métabolisme lipidique. Le tissu graisseux est donc actif sur le plan métabolique avec des implications endocriniennes mais aussi dans la réaction inflammatoire. Le tissu adipeux par sa répartition ubiquitaire et sa capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires est ainsi responsable de l'apparition chez le sujet obèse d'un état inflammatoire chronique de bas niveau impliqué notamment dans le développement de l'athérome et du diabète de type 2.

II. La leptine

1) Aspects biochimiques et structuraux

La leptine, du terme grec "leptus" qui signifie maigre, est une protéine capable de diminuer le poids corporel et la masse de tissu adipeux. Elle est codée par le gène Ob chez la souris et possède un poids moléculaire de 16 kDa. La leptine initialement synthétisée sous forme d'un propeptide de 167 acides aminés, est clivée pour donner une forme mature de 146 acides aminés. Elle appartient à la famille des cytokines hélicoïdales et à ce titre comporte 4 hélices α et 2 feuillets β (Zhang *et al.* 1997)(Figure I.13). Elle est produite majoritairement par le tissu adipeux blanc sous-cutané et ses taux plasmatiques, directement reliés à l'indice de masse corporel (IMC), varient de 10 à 20 ng/ml chez les individus de poids normal (Maffei *et al.* 1995). Cette hormone est aussi produite secondairement par l'estomac (Bado *et al.* 1998), le placenta (Hoggard *et al.* 1997), les glandes mammaires (Smith-Kirwin *et al.* 1998), les glandes surrénales (Glasow et Bornstein 2000), les muscles squelettiques (Wang *et al.* 1998) et enfin par l'hypothalamus, le cervelet, le cortex et l'hypophyse (Jimerson *et al.* 2000) ; (Morash *et al.* 1999). Des variations des taux circulants de leptine sont observées selon le genre puisque pour un même IMC, la production de leptine est 75% plus élevée chez les femmes que chez les hommes probablement en raison de la présence de graisse sous-cutanée plus abondante chez les femmes (Maffei *et al.* 1995).

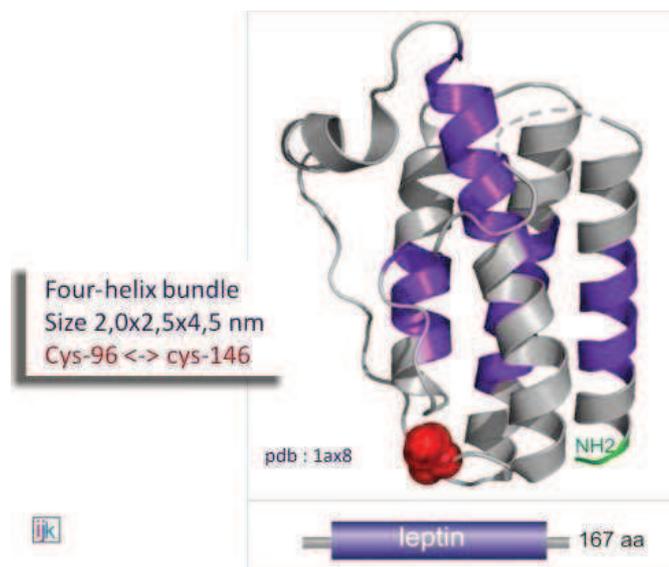


Figure I.13 Structure tertiaire de la leptine (<http://www.cellbiol.net/ste/alpobesity2.php>).

a Le système récepteuriel

Le système récepteuriel de la leptine comporte 6 isoformes de récepteur issues de l'épissage alternatif d'un seul et même transcrit : 5 d'entre elles sont membranaires et ont en commun leur domaine extracellulaire, leur domaine intracellulaire étant de longueur variable. Seul Ob-Rb possède les sites de phosphorylation dans le domaine intracellulaire nécessaires à la transmission du signal induit par la leptine. Il est exprimé dans le système nerveux central notamment au niveau des noyaux hypothalamiques tels que le noyau arqué, l'hypothalamus dorsomédian (Mercer *et al.* 1996) ; (Fei *et al.* 1997). Dans les tissus périphériques, Ob-Rb est retrouvé dans le tissu adipeux (Kielar *et al.* 1998), le muscle squelettique (Liu *et al.* 1997), le foie et les glandes surrénales (Glasow et Bornstein 2000). Le récepteur Ob-Ra est retrouvé dans tout l'organisme mais celui-ci jouerait un rôle particulier dans le passage de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique. La dernière isoforme (Ob-Re) est une forme soluble du récepteur du fait de l'absence de domaine transmembranaire (Zabeau *et al.* 2003). L'isoforme Ob-Re est exprimée dans le plexus choroïde (Lynn *et al.* 1996), le foie, les poumons, le cœur, la rate, les reins et les testicules (Lollmann *et al.* 1997). Ce récepteur soluble permet de stabiliser la leptine dans le compartiment sanguin et de réguler la fraction libre de la leptine.

b Mécanismes de transduction du signal

- La voie JAK-STAT

La liaison de la leptine à Ob-Rb induit un changement conformationnel à l'origine de l'activation de JAK2 (Janus Kinase) qui est constitutivement associée à Ob-Rb, entraînant la phosphorylation de plusieurs résidus tyrosine du domaine intracellulaire du récepteur à savoir Y⁹⁸⁵, Y¹⁰⁷⁷ et Y¹¹³⁸ (Figure I.14). La tyrosine phosphorylée située en position 1138 permet le recrutement de protéines adaptatrices possédant un domaine SH2 (Src Homology 2), en particulier les facteurs de transcription STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription) (Li et Friedman 1999). Dans le cas de la leptine, la protéine STAT3 est recrutée et se fixe sur Y¹¹³⁸ pour être à son tour phosphorylée par JAK2, ce qui entraîne leur dissociation et leur dimérisation. Les dimères de STAT3 ainsi activés sont transloqués dans le noyau où ils se lient à des séquences d'ADN spécifiques pour permettre la transcription de nombreux gènes cibles impliqués dans le contrôle de processus biologiques variés tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose et le métabolisme. La protéine STAT1 est également activée par la leptine, principalement au niveau du tissu adipeux (Bendinelli *et al.* 2000), et

STAT5 au niveau de l'intestin (Morton *et al.* 1998). Cependant, ces formes de STATs ne sont pas activées par la leptine au niveau de l'hypothalamus (McCowen *et al.* 1998).

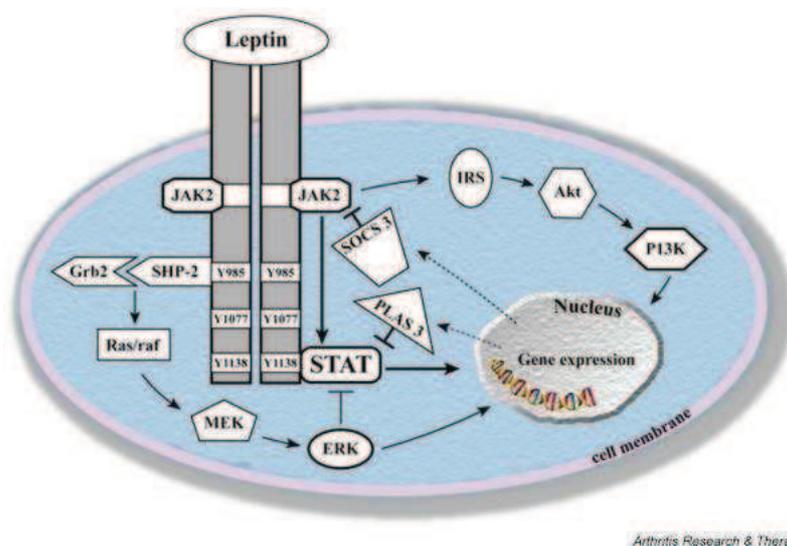


Figure I.14 Voie de signalisation de la leptine (Bernotiene *et al.* 2006).

- Les autres voies de signalisation

La leptine active également la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) au niveau des cellules périphériques et de l'hypothalamus (Takahashi *et al.* 1997) ; (Benomar *et al.* 2005). Cette voie est fortement impliquée dans la prolifération cellulaire (Takahashi *et al.* 1997) ; (Tanabe *et al.* 1997). La voie de signalisation IRS/PI3-Kinase (Insulin Receptor Substrate/Phosphoinositide 3-kinase) joue également un rôle capital dans la signalisation de la leptine. L'adipokine est capable d'activer la PI3-Kinase dans les cellules dérivées de neuroblastome humain par l'intermédiaire de la protéine IRS2. De plus, un prétraitement de 16 heures avec de la leptine ou de l'insuline augmente l'activité basale de la PI3-Kinase ainsi que l'association de la sous-unité régulatrice de la PI3-Kinase (p85) avec IRS1 ou IRS2 (Benomar *et al.* 2005).

Dans les cellules périphériques, la leptine peut également activer l'AMPK (5'AMP Activated Protein Kinase) qui est une enzyme clé dans le contrôle du métabolisme cellulaire, notamment l'oxydation des acides gras ainsi que l'entrée du glucose dans la cellule (Minokoshi *et al.* 2002) ; (Hardie 2003). Cependant, au niveau hypothalamique, la leptine inhibe l'AMPK qui joue ainsi un rôle important dans le contrôle de la prise alimentaire (Andersson *et al.* 2004) ; (Minokoshi *et al.* 2002).

- Les régulateurs négatifs des voies de signalisation de la leptine

Le signal induit par la leptine peut être inhibé par 2 systèmes de rétrocontrôle négatif impliquant SOCS-3 (Suppressor Of Cytokine Signaling) et PTP-1B (Protein Tyrosin Phosphatase-1B).

* SOCS-3

Le gène codant SOCS-3 est transcript sous l'action de STAT3. *In vitro*, la leptine via ObRb, induit l'expression de SOCS-3 environ 2 à 3 heures après la stimulation, et les niveaux restent élevés jusqu'à 20 heures (Bjorbaek *et al.* 1999), et chez la souris, la leptine induit l'expression de l'ARNm codant SOCS-3 dans l'hypothalamus (Bjorbaek *et al.* 1998). L'expression de SOCS-3 dans ces neurones est modulée par le jeûn et la prise alimentaire (Baskin *et al.* 2000). SOCS-3 exerce son action inhibitrice en se liant directement sur les Y⁹⁸⁵ et Y¹⁰⁷⁷ du récepteur à la leptine empêchant ainsi le recrutement des JAKs ou des STATs (Eyckerman *et al.* 2000). Une fois synthétisée, SOCS-3 peut également inhiber la protéine JAK2 en interagissant directement avec elle (Bjorbaek *et al.* 1999).

* PTP-1B

PTP-1B est également un régulateur négatif de la voie de signalisation de la leptine. C'est une protéine cytosolique exprimée dans la majorité des tissus. La surexpression de cette phosphatase diminue la phosphorylation de JAK2 et STAT3 (Kaszubska *et al.* 2002), aussi bien sur la voie centrale que périphérique (Zabolotny *et al.* 2002).

2) Les fonctions physiologiques de la leptine

Le récepteur fonctionnel à la leptine est majoritairement exprimé au niveau de l'hypothalamus, mais il est également détecté dans des cellules présentes dans les tissus périphériques, notamment dans les ostéoblastes, les cellules hématopoïétiques ou les cellules impliquées dans le système immunitaire, suggérant des effets périphériques.

a Effets centraux

La relation entre la quantité de réserves adipeuses et la prise alimentaire est connue depuis longtemps, mais le moyen par lequel les animaux sont capables d'estimer leur propre contenu en lipides corporels n'est connu que depuis peu. La leptine joue en grande partie ce rôle d'adipostat en ajustant l'apport et la dépense énergétiques à la quantité d'énergie stockée dans l'organisme sous forme de graisses (Elmqvist *et al.* 2005). Elle est ainsi produite par les adipocytes en réponse à une augmentation des réserves adipeuses et permet l'arrêt de la prise

de nourriture et l'élévation des dépenses énergétiques. Pour atteindre son site d'action, la leptine traverse la barrière hémato-encéphalique par un système de transport saturable (Banks 2006). Au niveau de l'hypothalamus, elle réprime l'expression de neuropeptides orexigènes (NPY, AgRP) et à l'inverse, stimule la synthèse de peptides anorexigènes (α -MSH). Des modèles animaux caractérisés par un phénotype d'obésité sévère liée à la mutation du gène codant la leptine (souris *ob/ob*) ou son récepteur fonctionnel (souris *db/db*, rats Zucker) confirment le rôle de la leptine comme hormone de la satiété (Pellemounter *et al.* 1995). Ces mutations sont rares chez l'homme et la majorité des individus obèses présente paradoxalement un fort taux de leptine circulante, suggérant un état de résistance à la leptine. Les causes et les mécanismes à l'origine de cette résistance sont encore mal connus. Plusieurs hypothèses ont été proposées :

- Un défaut du passage de la leptine à travers la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) : En raison du caractère saturable du système de transport de la leptine à travers la BHE, l'élévation du niveau plasmatique chez les obèses peut induire une diminution du passage de la leptine vers l'hypothalamus, réduisant ainsi son effet anorexigène (Nishii *et al.* 2006) ; Banks *et al.*, 2006). Une étude réalisée chez des souris rendues obèses par un régime hypercalorique montre ainsi que l'injection intracérébroventriculaire de leptine induit bien l'activation hypothalamique de STAT3 alors que l'injection par voie péritonéale reste inefficace (El-Haschimi *et al.* 2000).

- Une anomalie de l'expression de la forme longue du récepteur à la leptine (Ob-Rb) et de l'isoforme soluble (Ob-Re) : La résistance à la leptine peut en effet être la conséquence d'une diminution de l'expression du récepteur à la leptine, et plus particulièrement de l'isoforme Ob-Rb (Widdowson *et al.* 1997). Une relation négative entre les taux plasmatiques de leptine et l'expression hypothalamique de Ob-Rb, notamment au niveau du noyau arqué a ainsi été mise en évidence dans les modèles animaux d'obésité (Lin *et al.* 2000) ; (Wilsey *et al.* 2003). Par ailleurs, des études menées chez l'homme ont montré que l'obésité est associée à une baisse des taux circulants du récepteur soluble à la leptine, tandis qu'une perte de poids est corrélée avec une élévation de Ob-Re (Van Dielen FM. 2002) ; (Ogier *et al.* 2002). Une étude récente a montré chez la souris que la forme soluble du récepteur à la leptine pouvait affecter le passage de l'adipokine à travers la BHE en diminuant la liaison de la leptine aux cellules endothéliales ainsi que son endocytose (Tu *et al.* 2007).

- Modifications du système de transduction du signal induit par la leptine : L'absence d'effet de la leptine peut être liée à des anomalies du signal qu'elle induit, en particulier de l'activation de STAT-3 ou du système de rétrocontrôle négatif. Des souris exprimant Ob-Rb muté sur la Y¹¹³⁸, caractérisé par une incapacité à recruter STAT3, présentent ainsi une augmentation de la prise alimentaire et une diminution de la dépense énergétique à l'origine d'une obésité précoce (Bates *et al.* 2003). Une augmentation prolongée de l'expression de SOCS3 consécutive à une hyperleptinémie est également associée au phénomène de résistance à la leptine caractéristique de l'obésité (Bjorbaek *et al.* 1999; Ding *et al.* 2007). Des souris KO pour SOCS-3 et PTP-1B soumises à un régime riche en graisses sont ainsi résistantes à une prise de poids contrairement aux souris contrôles (Elchebly *et al.* 1999). Une étude récente a montré que les souris présentant un déficit en PTP-1B spécifiquement au niveau central perdent du poids et sont hypersensibles à la leptine, alors que sa suppression au niveau périphérique (muscle et foie) n'induit pas de modification du poids total de l'animal (Bence *et al.* 2006). Ces auteurs suggèrent donc un rôle important de PTP-1B dans l'établissement de la résistance à la leptine au niveau central.

b Effets périphériques

Il existe divers effets de la leptine sur l'axe neuroendocrinien qui s'additionnent à ceux qui s'exercent sur l'appétit et sur la régulation du poids corporel. La leptine accélère ainsi la puberté chez les souris sauvages et facilite le comportement reproducteur chez les rongeurs (Chehab *et al.* 1997). Au niveau périphérique, la leptine module également la sécrétion et les effets de l'insuline en stimulant la gluconéogenèse et le métabolisme du glucose (Pellemounter *et al.* 1995). Une autre caractéristique est son action sur la régulation de l'angiogenèse (effet stimulant sur l'expression du VEGF) et les processus de cicatrisation (Sierra-Honigmann MR. 1998).

L'os constitue un tissu cible prépondérant pour la leptine. L'obésité, et en particulier l'augmentation de la masse grasse, est associée à des effets protecteurs sur le squelette (Afghani et Goran 2009). Plusieurs auteurs ont ainsi mis en évidence une relation positive entre la masse grasse et la Densité Minérale Osseuse chez la femme, et un IMC élevé est aussi apparu lié à une perte osseuse moins importante après la ménopause (Revilla *et al.* 1997). Dans la population masculine, aucune relation n'a été notée entre leptine et DMO (Thomas 2003). Les raisons de ce dimorphisme sexuel restent obscures et pourraient être liées, au moins en partie, aux taux de leptine 2 à 3 fois plus élevés chez la femme comparés à ceux chez l'homme. Chez la personne âgée, il a été montré qu'une diminution de la masse grasse

s'accompagnait d'une augmentation de 30% du risque de fracture de la hanche sur 2 ans (Schott *et al.* 1998). Si l'aromatization des androgènes par le tissu adipeux explique en partie ce phénomène, la leptine constitue un médiateur potentiel des effets de la masse grasse sur le tissu osseux (Thomas 2003) :

- La leptine peut stimuler directement la formation osseuse par le biais de son récepteur fonctionnel exprimé à la surface des ostéoblastes (Cirmanova *et al.* 2008). Plusieurs études appuient cette hypothèse avec notamment une augmentation de la prolifération des cellules précurseurs des ostéoblastes (Gordeladze *et al.*, 2002) et de la différenciation ostéoblastique (Xu *et al.* 2009). La leptine paraît aussi capable d'inhiber l'activité des ostéoclastes en modulant le rapport ostéoprotégérine (OPG) / RANK-L par une augmentation des taux d'OPG, et d'induire l'expression par les monocytes du récepteur soluble de l'IL-1 qui constitue lui-même un médiateur clé dans la régulation de la perte osseuse (Thomas, 2003).

- Une autre hypothèse en faveur d'un effet inhibiteur de la masse grasse sur le tissu osseux suppose une action centrale de la leptine. Cette hypothèse s'appuie sur les travaux de Ducy *et al.* qui ont mis en évidence une augmentation de la masse osseuse chez des souris déficientes en leptine (ob/ob) ou en son récepteur fonctionnel (db/db) malgré l'hypogonadisme et l'hypercorticisme secondaire au déficit en leptine (Ducy *et al.* 2000). La normalisation de la masse osseuse consécutive à une diminution de la formation du tissu osseux observée après une administration intra-cérébrale de leptine à des souris ob/ob confirme un effet central inhibiteur de la leptine sur l'activité de synthèse des ostéoblastes.

Il paraît difficile de tirer des conclusions réconciliant les différentes études. La leptine semble exercer des effets doubles sur l'os en fonction de l'âge et du sexe ainsi que du site osseux examiné. Dans les premières années de la vie, la leptine pourrait stimuler la croissance osseuse grâce à ses propriétés angiogéniques et son activité ostéogénique sur l'os cortical. Plus tard, elle pourrait réduire le niveau de remodelage osseux et améliorer l'équilibre entre résorption et formation osseuses, notamment lorsque le renouvellement de l'os trabéculaire est élevé. Les effets négatifs exercés sur le tissu osseux *via* le SNC viendraient contrebalancer les effets périphériques bénéfiques, jusqu'à ce que les taux sériques de leptine atteignent un seuil au-delà duquel la barrière hémato-méningée soit saturée (Thomas, 2003).

Plus récemment, des études électrophysiologiques et neuroanatomiques sur la souris ont permis de montrer que la leptine pouvait inhiber l'appétit et la formation osseuse en agissant sur des neurones sérotoninergiques (Yadav *et al.* 2009).

3) La leptine dans l'inflammation

La leptine joue un rôle dans la réaction inflammatoire. En effet, ses taux plasmatiques augmentent lors d'un processus inflammatoire, et il existe un état inflammatoire chronique de bas niveau chez les individus obèses (Bokarewa *et al.* 2003). En fait, d'après les études expérimentales, la leptine présente à la fois un rôle pro-inflammatoire et un effet protecteur contre les infections. En effet, l'administration de leptine recombinante chez des souris déficientes en leptine (ob/ob) permet de corriger la mortalité induite par le LPS probablement en induisant la production de cytokines anti-inflammatoires (De Marchi et Ferraccioli 2002). Par ailleurs, cette adipokine régule la prolifération et l'activation des lymphocytes T et les protège de l'apoptose. Elle influence également la production de cytokines par les cellules T en orientant leur phénotype vers une réponse de type Th1 (Palmer et Gabay 2003). En plus de ces effets sur les lymphocytes T, la leptine module l'activation des monocytes, la phagocytose, la production de cytokines notamment celles du TNF α , de l'IL-1 et de son antagoniste, l'IL-1Ra (Bernotiene *et al.* 2006).

4) La leptine dans l'articulation

Différentes études ont caractérisé le rôle de la leptine dans les pathologies articulaires. Les travaux de Bokarewa *et al.* (2003) ont mis en évidence des concentrations plasmatiques de leptine plus élevées chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde comparativement à des sujets sains. Ces auteurs ont également observé une concentration de leptine plasmatique sensiblement plus élevée que celle du liquide synovial, différence qui est prononcée dans les formes non érosives d'arthrite, suggérant que la leptine intra-articulaire pourrait exercer un effet protecteur contre les phénomènes dégénératifs observés au cours de la polyarthrite rhumatoïde. En fait, il semble que la leptine exerce au niveau articulaire des activités pro- ou anti-inflammatoires selon la nature de la réponse immunitaire. Dans des modèles expérimentaux d'arthrite impliquant les cellules T et B, elle contribue à la réaction inflammatoire (Busso *et al.* 2002), alors qu'elle protège l'articulation des lésions induites par l'administration d'un stimulus non immunologique comme le zymosan (Bernotiene *et al.* 2004).

D'autres travaux ont cherché à caractériser le rôle de la leptine dans l'arthrose. Cette adipokine est présente dans le liquide synovial de patients atteints d'arthrose avec des concentrations équivalentes voire supérieures à celles mesurées dans le sérum (Presle *et al.* 2006), et une étude récente a mis en évidence une relation entre les taux synoviaux de leptine et la sévérité de l'arthrose (Ku *et al.* 2009). Chez les mêmes patients, les chondrocytes expriment la leptine et son récepteur fonctionnel, et leurs niveaux d'expression apparaissent directement reliés à la sévérité des lésions cartilagineuses (Dumond *et al.* 2003); (Simopoulou *et al.* 2007). Une forte expression de cette protéine est également retrouvée dans les ostéophytes (Dumond *et al.* 2003). La leptine exerce sur les chondrocytes une activité biologique puisqu'elle possède un récepteur fonctionnel à la surface des cellules cartilagineuses et est capable d'augmenter la prolifération cellulaire et la synthèse de la MEC par des chondrocytes humains en culture (Figenschau *et al.* 2001). Cet effet stimulant est retrouvé chez le rat : une injection intra-articulaire de leptine induit une augmentation de la synthèse des protéoglycanes accompagnée d'une surexpression de facteurs de croissance comme l'IGF-1 ou le TGF- β . La leptine est aussi capable de réguler la différenciation chondrogénique de cellules ATDC5 via la voie des JAK/STAT (Ben-Eliezer *et al.* 2007) et d'amener les cellules vers un phénotype chondrocytaire lors du processus d'ossification endochondrale (Kishida *et al.* 2005). Outre ses effets bénéfiques, la leptine a des effets délétères sur le cartilage. Les travaux d'Otero et al. (2006) indiquent en effet l'existence d'une synergie entre la leptine et l'IL-1 sur la production de NO, conférant à la leptine un rôle potentiel dans la destruction cartilagineuse. *In vitro*, elle augmente la production de l'IL-1 β et des MMP-9 et -13 (Simopoulou *et al.* 2007) ; (Iliopoulos *et al.* 2007), et celle de médiateurs pro-inflammatoires comme le NO qui induit à son tour la production de l'IL-6, de l'IL-8 et de PGE2 (Vuolteenaho *et al.* 2009). L'injection intra-articulaire de leptine chez le rat confirme *in vivo* les données observées *in vitro*, à savoir que l'adipokine stimule l'expression des MMP-2 et -9, de la cathepsine D et des ADAMTS-4 et -5 (Bao *et al.* 2009). Elle favorise également la synthèse du collagène de type 2 mais induit une perte matricielle en PGs. Si la leptine présente des effets ambivalents sur l'activité chondrocytaire, une étude récente a confirmé son rôle prépondérant dans l'arthrose. Le risque d'arthrose spontanée lié à une obésité sévère n'est en effet pas augmenté chez des souris déficientes en leptine (Griffin *et al.* 2009).

III. L'adiponectine

1) Aspects biochimiques et structuraux

Identifiée par plusieurs équipes, l'adiponectine est connue sous différents noms en relation avec sa structure ou ses propriétés. Elle est appelée Acrp30 ("adipocyte complement-related protein of 30 kDa") ou adipoQ chez la souris et GBP28 ("gelatin-binding protein 28") ou APM1 ("adipose most abundant gene transcript 1") chez l'homme. Cette protéine de 247 acides aminés chez la souris et 244 chez l'homme est composée d'un peptide signal destiné à être clivé, d'un domaine N-terminal de type collagène et d'un domaine C-terminal globulaire, avec une structure en triple hélice (Figure I.15). Son domaine globulaire présente des homologues de structure avec certaines formes de collagène mais aussi avec la fraction C1q du complément et les cytokines de la famille du $TNF\alpha$ (Kim 2006).

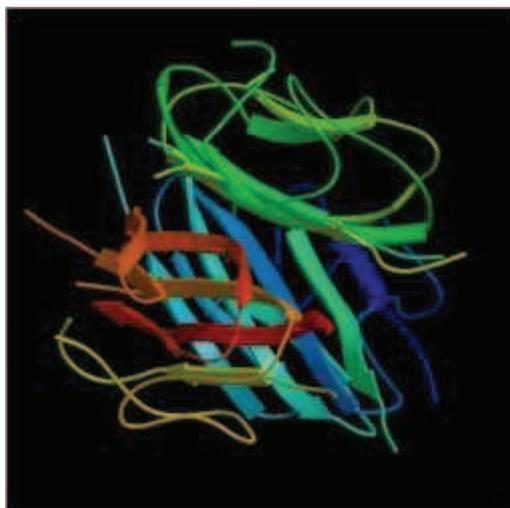


Figure I.15 Structure tertiaire de l'adiponectine (<http://chem.tufts.edu/faculty/lee/adiponectin-ribbon.jpg>).

Comme toutes les protéines possédant un domaine collagène, la protéine native s'assemble pour former des trimères qui s'associent ensuite entre eux via la formation des ponts di-sulfures pour former des hexamères et des complexes de haut poids moléculaire pouvant compter jusqu'à 6 trimères (Figure I.16). En plus de ces formes multimériques, le groupe de Fruebis a détecté dans le plasma humain une forme globulaire issue d'une protéolyse (Fruebis *et al.* 2001).

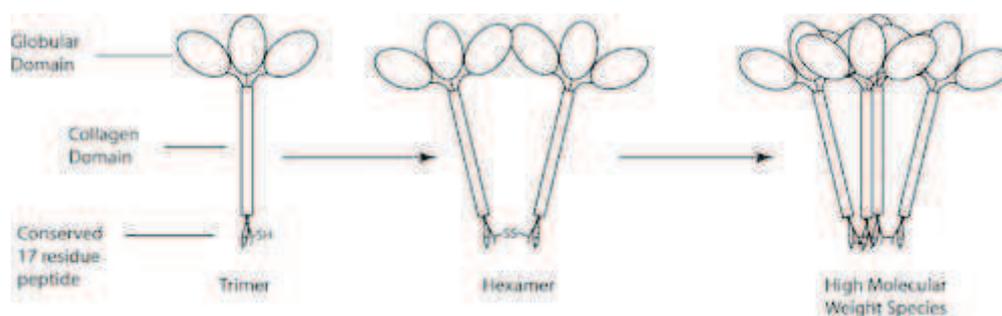


Figure I.16 Structure des différentes formes circulantes de l'adiponectine (<http://chem.tufts.edu/faculty/lee/research.html>).

Le profil de variation circadien de l'adiponectinémie a été établi et montre très peu d'évolution au cours du nyctémère avec des courbes de variation similaires entre les sujets minces et obèses, malgré une différence en ce qui concerne le niveau de sécrétion (Kim, 2006). Ceci suggère plutôt une régulation métabolique à long terme. Abondamment produite par le tissu adipeux blanc, les concentrations circulantes de l'adiponectine sont de l'ordre de 5 à 30 mg/L, ce qui représente 0,01 % des protéines plasmatiques totales (Kim, 2006). Contrairement à la leptine, les concentrations plasmatiques d'adiponectine diminuent avec l'IMC (Kim, 2006). Le niveau d'expression des ARNm est différent selon la topographie du tissu gras étudié puisqu'il est 30% plus faible dans le tissu adipeux viscéral que dans le tissu adipeux sous-cutané.

a Le système récepteuriel.

Les ADNs complémentaires pour les récepteurs à l'adiponectine ont été isolés en 2003 par Yamauchi (Yamauchi *et al.* 2003). Ils ont permis de distinguer deux protéines, AdipoR1 et AdipoR2 (Figure I.17). AdipoR1 est exprimé de manière ubiquitaire et plus abondamment dans le muscle squelettique alors que AdipoR2 est majoritairement exprimé dans le foie. Ces récepteurs sont également exprimés dans les cellules β pancréatiques (Kharroubi *et al.* 2003). Récemment, les récepteurs à l'adiponectine ont aussi été identifiés dans l'hypothalamus humain (Kos *et al.* 2007) et au niveau des cardiomyocytes (Ding *et al.* 2007). AdipoR1 et AdipoR2 sont des protéines à 7 domaines transmembranaires fonctionnels mais distincts des récepteurs couplés aux protéines G par une particularité : leur extrémité N-terminale est intracellulaire alors que leur extrémité C-terminale est extracellulaire (Yamauchi *et al.* 2003).

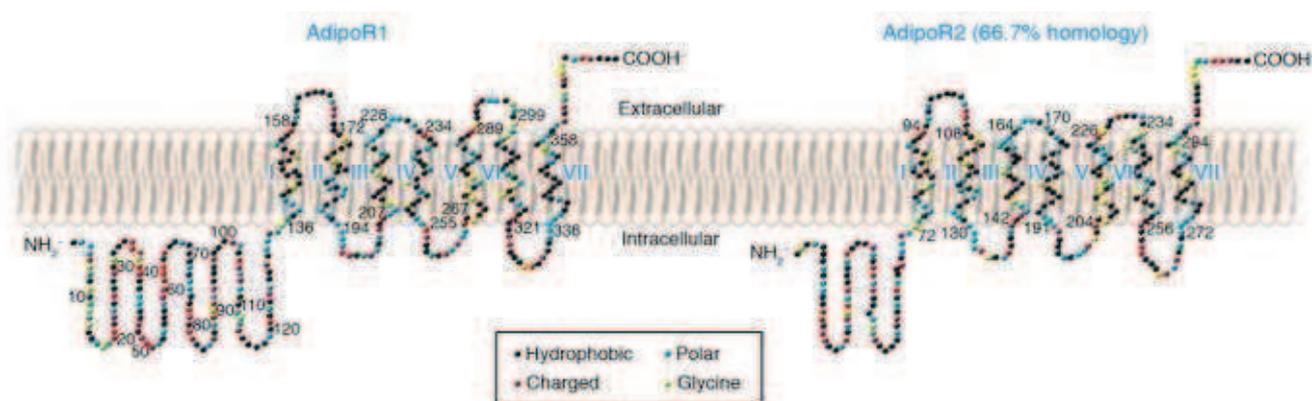


Figure I.17 Structure des récepteurs de l'adiponectine, AdipoR1 et AdipoR2 (Kadowaki et al. 2006).

Les récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 peuvent former des homodimères ou des hétérodimères. Des analyses par Scatchard révèlent que l'adiponectine globulaire et la forme longue se fixent à AdipoR1 alors que seule la forme longue de l'adiponectine se fixerait à AdipoR2. Les souris KO pour le gène codant AdipoR1 présentent un phénotype particulier se décrivant par une augmentation de l'adiposité avec une diminution de la tolérance au glucose, de l'activité locomotrice spontanée et de la dépense énergétique (Bjursell *et al.* 2007). A l'inverse, les souris KO AdipoR2 sont maigres et résistantes à l'obésité induite par un régime hypercalorique avec une tolérance au glucose améliorée, une augmentation de l'activité locomotrice et de la dépense énergétique ainsi qu'une réduction des niveaux plasmatiques de cholestérol (Bjursell *et al.* 2007). Des expériences de surexpression ou au contraire de suppression des récepteurs à l'adiponectine indiquent que l'activation d'AdipoR1 provoque une augmentation de l'activité de l'AMPkinase (AMPK) alors que celle d'AdipoR2 induit l'activation de PPAR α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha) un facteur de transcription impliqué dans la régulation du métabolisme lipidique. Lorsque l'on supprime l'expression des deux récepteurs, il y a une diminution du stockage des triglycérides, apparition d'un stress oxydatif, d'une inflammation, d'une résistance à l'insuline et d'une intolérance au glucose (Yamauchi *et al.* 2007).

b Les voies de signalisation induites par l'adiponectine

Pour des cellules du système périphérique, le modèle de transmission du signal induit par l'adiponectine actuellement retenu implique l'AMPK comme la cible principale de l'adiponectine. La liaison de l'adiponectine sur son récepteur permet tout d'abord le recrutement de l'APPL1 (adaptator protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosin binding domain and leucine zipper motif). L'APPL1 se fixe au récepteur

grâce à son domaine de liaison phosphotyrosine (Mao *et al.* 2006). Elle se lie ensuite directement à une kinase, la LKB1 (sérine/thréonine kinase) (Imai K 2006) qui induit la phosphorylation de l'AMPK sur un résidu thréonine. L'AMPK ainsi activée phosphoryle l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) (Kahn *et al.* 2005), ce qui a pour conséquence d'inhiber la formation de malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA. La diminution de cet inhibiteur du transporteur de la carnitine palmitoyl transférase-1 (CPT-1) stimule alors l'entrée des acides gras dans les mitochondries et leur β -oxydation avec un accroissement de la production d'ATP (Figure I.18).

En 2006, un travail de Yoon *et al.* montre que l'adiponectine peut également augmenter l'oxydation des acides gras en induisant l'expression du facteur de transcription PPAR α via la phosphorylation de l'AMPK qui active la MAP kinase p38. L'activation de PPAR α permet de diminuer le contenu en triglycérides du foie et du muscle squelettique (Kadowaki *et Yamauchi* 2005) et l'activation de la protéine p38 favorise la translocation du transporteur du glucose GLUT4 (Glucose Transporter 4) et ainsi l'entrée du glucose (Figure I.18) (Somwar R 2001).

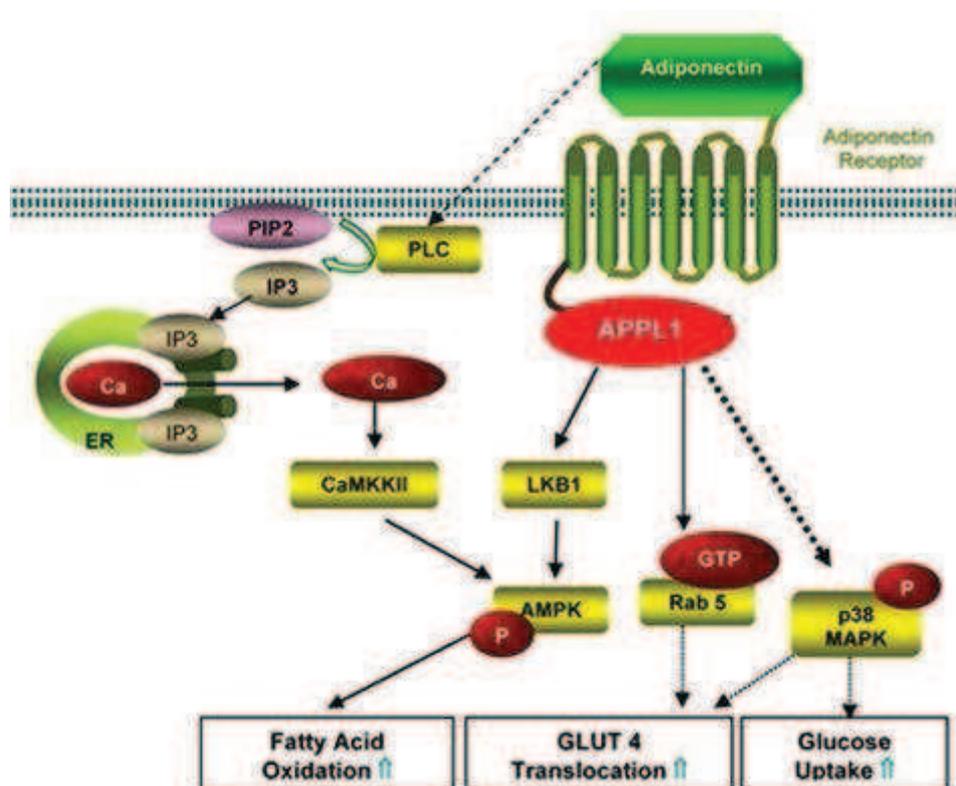


Figure I.18 Voies de signalisation de l'adiponectine

(<http://www.uthscsa.edu/csb/faculty/pictures/DongRES1-fig1.jpg>).

2) Les effets de l'adiponectine

a Fonction physiologique

L'adiponectine limite la prise de poids chez des animaux recevant un régime riche en graisses et en sucres, et il existe une relation inverse entre la résistance à l'insuline et les concentrations plasmatiques en adiponectine (Milan *et al.* 2002). La suppression de l'expression d'AdipoR1 et d'AdipoR2 s'accompagne d'une diminution de l'activité de PPAR α , de l'oxydation des acides gras et de l'utilisation du glucose. De plus, Civitarese et al. ont observé que tout comme l'adiponectine, l'expression des 2 récepteurs est diminuée chez les sujets ayant des antécédents familiaux de diabète de type 2 (Civitarese *et al.* 2004). Ces données confèrent ainsi à l'adiponectine un rôle protecteur dans le développement du diabète de type 2.

En fait, l'adiponectine peut être considérée comme un agent anti-diabétique qui augmente la sensibilité à l'insuline en activant l'AMPK. C'est ainsi que l'administration de médicaments anti-diabétiques comme les thiazolidinediones s'accompagne d'une élévation des taux plasmatiques d'adiponectine. Dans le foie, l'adiponectine augmente la phosphorylation du récepteur à l'insuline et l'oxydation des acides gras, et diminue la néoglucogénèse. Dans le muscle, l'activation de l'AMPK par l'adiponectine conduit à la phosphorylation et donc à l'inactivation de l'acétylCoA carboxylase stimulant ainsi l'oxydation des acides gras. Dans ce tissu, l'adiponectine favorise également l'utilisation du glucose en favorisant la translocation des transporteurs GLUT4.

b L'adiponectine dans l'inflammation

Il est généralement admis que l'adiponectine possède des propriétés anti-inflammatoires. Il existe en effet une relation inverse entre les taux d'adiponectine et ceux des marqueurs de l'inflammation comme l'IL-6 ou la protéine C-réactive. In vitro, cette adipokine diminue les fonctions phagocytaires des macrophages et l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales (Karastergiou et Mohamed-Ali 2010). L'adiponectine est également capable de s'opposer à l'expression du TNF α et de l'IL-6 induite par le LPS dans les macrophages et les adipocytes (Ajuwon et Spurlock 2005), et à l'inverse induit l'expression de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou l'IL-1Ra (Wolf *et al.* 2004). De plus, les souris génétiquement invalidées pour l'adiponectine présentent une augmentation du TNF α dans le tissu adipeux et le plasma (Maeda *et al.* 2002). Cependant, aucune étude n'a confirmé ces données chez l'homme (Fernandez *et al.* 2008).

Les effets des agents pro-inflammatoires sur l'expression de l'adiponectine sont en revanche plus variables et dépendent du type cellulaire. Ainsi, l'administration de LPS réduit la sécrétion d'adiponectine dans le tissu adipeux mais l'induit dans le muscle squelettique (Jacobi *et al.* 2004). De même, *in vitro*, le TNF α ou l'IL-6 diminue l'expression de l'adiponectine dans les adipocytes, mais l'IFN associé au TNF α stimule l'expression de l'adiponectine par les cellules musculaires (Lago F 2007).

c L'adiponectine dans l'articulation

Par rapport à la leptine, peu de données concernant la contribution de l'adiponectine dans les pathologies articulaires sont disponibles. Chez des patients atteints d'arthrose ou d'arthrite, l'adiponectine est détectée dans la membrane synoviale et dans le liquide synovial avec un taux très inférieur à celui du sang (Ehling *et al.* 2006) ; (Presle *et al.* 2006). Les 2 formes de récepteur, AdipoR1 et AdipoR2, sont exprimées dans les fibroblastes synoviaux des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Ehling *et al.* 2006). En revanche une incertitude demeure quant à l'expression des récepteurs à l'adiponectine dans le cartilage. Seul AdipoR1 est retrouvé dans des échantillons cartilagineux provenant de patients arthrosiques (Chen *et al.* 2006) alors que les 2 formes de récepteurs sont mises en évidence dans les chondrocytes en culture (Lago *et al.* 2008). Sur le plan fonctionnel, l'adiponectine augmente l'expression du gène TIMP-2 et s'oppose aux effets de l'IL-1 sur l'induction de la MMP-13 par les chondrocytes (Chen *et al.*, 2006). Tout comme la leptine, l'adiponectine favorise la prolifération et la différenciation de cellules ATDC5 (Challa *et al.* 2010). Ces effets bénéfiques de l'adiponectine n'ont cependant pas été confirmés dans d'autres études. Cette adipokine est ainsi capable de stimuler la production d'IL-6, de MMPs et de VEGF dans les synoviocytes issus de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Ehling *et al.*, 2006) ; (Choi *et al.* 2009) et d'induire l'expression de iNOS et la production d'IL-6 et de MMPs dans les chondrocytes (Lago *et al.*, 2008). La relation positive entre les taux synoviaux d'adiponectine et de VEGF suppose que cette adipokine jouerait un rôle dans l'inflammation au cours de la polyarthrite rhumatoïde (Choi *et al.*, 2009).

C. Objectifs et stratégie de l'étude

Malgré la forte prévalence de l'arthrose et les progrès accomplis dans la connaissance des mécanismes fondamentaux à l'origine de cette pathologie dégénérative, il n'existe pas actuellement de prise en charge globalement satisfaisante de cette affection articulaire. Un des objectifs majeurs dans le domaine de la rhumatologie est donc d'identifier de nouvelles cibles pharmacologiques qui pourraient conduire au développement de thérapeutiques capables de traiter efficacement la maladie à un stade précoce.

Récemment, une nouvelle approche de la maladie arthrosique a été proposée en se basant sur les liens qui existent entre l'obésité et l'arthrose. L'obésité constitue un facteur de risque très important, en particulier par les contraintes biomécaniques excessives exercées sur les articulations portantes. Cependant, cet effet mécanique lié à la surcharge pondérale ne permet pas d'expliquer la relation entre l'obésité et l'arthrose retrouvée également pour des articulations non portantes comme celles de la main (Cicutini *et al.* 1996). Plus précisément, une baisse de la masse grasse chez des patients arthrosiques est davantage associée à une amélioration de la fonction articulaire qu'une perte de poids absolue (Toda *et al.* 1998), et une étude récente indique que le risque d'arthroplastie du genou ou de la hanche est non seulement lié à l'IMC, mais également à la masse adipeuse et à l'adiposité viscérale connue aujourd'hui pour son implication dans le syndrome métabolique (Wang *et al.* 2009). Par conséquent, des facteurs systémiques semblent se superposer aux contraintes mécaniques, et en particulier des facteurs métaboliques produits par le tissu adipeux pourraient expliquer l'augmentation de la prévalence de l'arthrose digitale observée chez les sujets obèses.

Les adipokines produites par le tissu adipeux constituent de bons candidats pour relier les changements métaboliques liés à l'obésité à la physiopathologie de l'arthrose. Nos travaux antérieurs indiquent que la leptine est présente dans le liquide synovial de patients arthrosiques à des taux supérieurs à ceux mesurés dans le sérum (Presle *et al.* 2006), et son expression dans les chondrocytes augmente avec la sévérité des lésions cartilagineuses (Dumond *et al.* 2003). Si plusieurs études suggèrent que la leptine peut être un acteur essentiel dans le développement de l'arthrose, aucune d'entre elles ne permet d'établir précisément son rôle dans le chondrocyte. Cette adipokine induit en effet l'expression de facteurs de croissance et stimule la synthèse des protéoglycanes chez le rat, mais accroît la production de NO induite par l'IL-1 et augmente l'expression des MMPs. La leptine peut également intervenir dans l'arthrose en perturbant le remodelage de l'os sous-chondral puisqu'elle est considérée aujourd'hui comme un facteur endocrine à l'origine de l'effet protecteur de la masse grasse sur le tissu osseux et elle est davantage produite par les ostéoblastes issus de patients arthrosiques (Lajeunesse *et al.* 2005).

L'adiponectine est une autre adipokine qui pourrait contribuer à l'apparition et/ou au développement de l'arthrose. Cependant, le rôle de l'adiponectine dans la dégénérescence cartilagineuse reste très controversé puisque certains auteurs lui trouvent un effet protecteur alors que d'autres lui attribuent des propriétés délétères. A l'inverse de ce qui est observé avec la leptine, les concentrations d'adiponectine dans la cavité articulaire sont inférieures à celles mesurées dans le sérum. Un tel déséquilibre entre ces deux adipokines est également retrouvé chez les individus obèses puisque les taux sériques de leptine augmentent avec l'IMC alors que ceux de l'adiponectine diminuent.

Pour mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques à l'origine de l'arthrose, nous nous sommes appuyés sur ces données pour émettre l'hypothèse selon laquelle la leptine et l'adiponectine pourraient participer au processus arthrosique (Figure II.1).

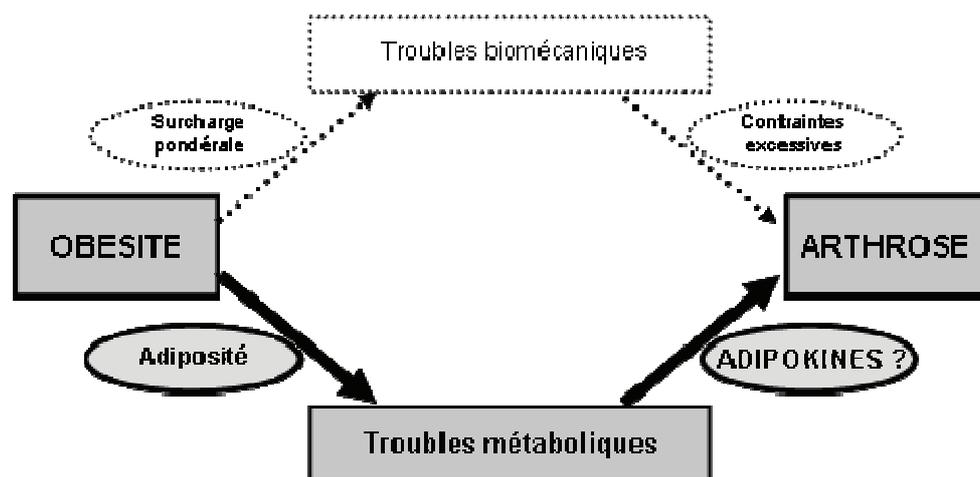


Figure II 1 : Hypothèses expliquant les relations entre l'obésité et l'arthrose

Afin de valider la pertinence de notre hypothèse, nous avons mis en place un travail expérimental qui s'est déroulé en plusieurs étapes. Il s'agissait notamment de :

- caractériser l'expression de la leptine, de l'adiponectine et de leurs récepteurs dans les chondrocytes issus de patients arthrosiques et d'étudier l'influence du système de culture sur leur expression,
- définir le rôle du ligament adipeux de Hoffa dans la production des adipokines et sur le maintien et/ou la rupture de l'homéostasie du cartilage,
- mettre en évidence le rôle de l'adiponectine dans l'arthrose et d'évaluer l'influence de cette adipokine sur les fonctions chondrocytaires,

- préciser les effets de la leptine sur la balance entre les processus de synthèse et de dégradation du cartilage en considérant plus particulièrement l'IMC des patients atteints d'arthrose,
- valider la contribution de la leptine dans l'arthrose en étudiant son expression au décours d'un modèle expérimentale et les conséquences de l'absence de récepteur fonctionnel à la leptine sur le développement et/ou la progression de la maladie.

D. Matériel et méthodes

Chapitre 1 Etude chez l'homme

I. Recueil des prélèvements

Les plateaux tibiaux, les condyles, la rotule, le ligament adipeux de Hoffa et la graisse sous-cutanée sont prélevés chez des patients arthrosiques lors de la mise en place de prothèses de genou avec le consentement éclairé des patients.

II. Culture des chondrocytes

1) Préparation des cellules

Les chondrocytes sont obtenus par digestion enzymatique séquentielle de pièces cartilagineuses. Après un rinçage dans une solution de NaCl à 0,9% contenant des antibiotiques (pénicilline et streptomycine 1%), les prélèvements sont placés pendant 2 heures dans une solution de pronase (2 mg/ml) (Sigma), puis une nuit dans une solution de collagénase B (1 mg/ml) (Roche Molecular). Les culots cellulaires sont recueillis par centrifugation à 1200 tours/min pendant 6 minutes.

2) Culture en monocouche

Les chondrocytes obtenus après digestion enzymatique d'échantillons de cartilage sont mis en culture dans du milieu complet DMEM/NUT MIX F12 supplémenté en glutamine (2 mM), en pénicilline (0,1 U/ml), en streptomycine (100 ng/ml), en amphotéricine B (250 ng/ml) et en sérum de veau fœtal (SVF) (10%, v/v) (Invitrogen). Ils sont placés à 37°C et en atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Lorsque la confluence est atteinte, le passage des cellules s'effectue après utilisation d'une solution de trypsine-EDTA (0,02%) (Invitrogen). Le tapis cellulaire est préalablement rincé au PBS (sans Ca²⁺ ni Mg²⁺) et mis en présence de trypsine pendant 10 minutes. L'action enzymatique est ensuite neutralisée à l'aide du milieu complet. Les cellules sont récupérées après centrifugation à 1200 tours/min pendant 6 min etensemencées à raison de 1,5 millions de cellules par flacon de 75 cm² ou dans des plaques six puits à raison de 200000 cellules par puits.

3) Système tridimensionnel

Un système de culture tridimensionnel est réalisé après encapsulation des chondrocytes dans un gel d'alginate. Le culot cellulaire obtenu après action de la trypsine est repris à raison de 4 millions de cellules/ml dans une solution d'alginate (moyenne viscosité,

Sigma) à 1,2% préalablement stérilisé par autoclavage à sec et dissous dans du NaCl 0,9% pendant une nuit. La suspension cellulaire est alors versée goutte à goutte à l'aide d'une seringue dans une solution stérile de CaCl₂ (10 mM). Les billes formées après 10 min d'incubation dans la solution calcique sont rincées à 3 reprises avec du NaCl 0,9% avant d'être réparties dans des boîtes de Pétri ou des plaques 24 puits. Elles sont maintenues dans du milieu complet à 10% de SVF pendant 3 ou 4 semaines.

III. Protocoles d'étude

1) Influence des conditions de culture sur l'expression des adipokines et de leurs récepteurs

Le travail a été réalisé à partir d'échantillons de cartilage provenant de 9 patients atteints d'arthrose. Après digestion enzymatique des tissus cartilagineux, une partie des chondrocytes fraîchement isolés (2 millions de cellules) est conservée à -80°C en vue d'une extraction d'ARN et le reste des cellules est mis en culture en monocouche pendant 10 à 12 jours (stade P0). Une fois la confluence atteinte, une partie du culot cellulaire obtenu après action de la trypsine est stockée à -80°C, une autre est remise en culture en monocouche (stade P1), et une troisième est encapsulée en gel d'alginate et maintenue pendant 3 à 4 semaines en culture (billes P0). Une seconde série de billes (billes P1) est réalisée à partir des cellules en monocouche au stade P1. Pendant le maintien en culture en monocouche ou en billes d'alginate, le milieu est renouvelé tous les 3 jours. A l'issue des différentes cultures ; les ARNs sont extraits.

Le rôle des adipokines dans le maintien du phénotype chondrocytaire a été étudié en traitant pendant 48 heures des chondrocytes en primoculture avec un anticorps (Ac) neutralisant la leptine (Ac chimérique, 100 ng/ml, R&D Systems, Abingdon Science Park, Royaume-Uni) ou l'adiponectine (100 ng/ml, R&D Systems, Abingdon Science Park, Royaume-Uni). L'anticorps anti-adiponectine ayant été préparé chez la chèvre, des cellules traitées avec une solution d'IgG (100 ng/ml, R&D Systems, Abingdon Science Park, Royaume-Uni) obtenues chez la même espèce ont servi de groupe contrôle pour évaluer l'effet de l'anticorps anti-adiponectine. A l'issue du traitement, le tapis cellulaire est recueilli et stocké à -80°C en vue de l'extraction des ARNs.

2) Etude du ligament adipeux de Hoffa : comparaison avec la graisse sous-cutanée

a Production des adipokines

Immédiatement après le recueil des tissus, les échantillons de ligament adipeux de Hoffa et de graisse sous-cutanée sont rincés au sérum physiologique, puis découpés avant d'être placés dans des plaques 24 puits avec 2 ml de milieu DMEM/F12 supplémenté en glutamine (2 mM), en pénicilline (0,1 U/ml), en streptomycine (100 ng/ml) et en amphotéricine B (250 ng/ml) (Invitrogen). Après 24 heures d'incubation à 37°C et en atmosphère humide à 5% de CO₂, les surnageants sont récupérés et conservés à -80°C.

b Effet du ligament adipeux de Hoffa sur le métabolisme chondrocytaire

Les échantillons de ligament adipeux de Hoffa sont d'abord rincés puis placés pendant 24 heures à 37°C dans du sérum physiologique. Ils sont ensuite maintenus pendant 48 heures dans du milieu DMEM/F12 supplémenté en glutamine (2 mM), en pénicilline (0,1 U/ml), en streptomycine (100 ng/ml) et en amphotéricine B (250 ng/ml) (Invitrogen). Le milieu ainsi obtenu est ensuite mis au contact de biopsies de cartilage de 5 mm de diamètre prélevées au niveau des plateaux tibiaux de patients atteints d'arthrose. Un autre groupe de biopsies servant de groupe contrôle a été placé dans du milieu de culture. Après 24 heures d'incubation, les échantillons de cartilage sont inclus en paraffine pour des études immunohistochimiques.

3) Rôle de l'adiponectine dans l'arthrose : comparaison avec la leptine

a Production des adipokines par le cartilage

Des biopsies de cartilage de 5 mm de diamètre sont prélevées sur les plateaux tibiaux de patients atteints d'arthrose puis placées dans du milieu DMEM/F12 supplémenté en glutamine (2 mM), en pénicilline (0,1 U/ml), en streptomycine (100 ng/ml) et en amphotéricine B (250 ng/ml) (Invitrogen). Après 48 heures d'incubation à 37°C et en atmosphère humide à 5% de CO₂, le surnageant est prélevé et stocké à -80°C. Les biopsies de cartilage sont pesées puis fixées dans du paraformaldéhyde (4% p/v).

b Relation avec l'expression des constituants matriciels et des facteurs régulateurs des fonctions chondrocytaires

Après digestion enzymatique d'échantillons de cartilage provenant des plateaux tibiaux, les chondrocytes fraîchement isolés (2 millions de cellules) sont directement stockés à -80°C pour la mesure de l'expression des ARNm.

c Réponse des chondrocytes à l'adiponectine

Les expériences ont été réalisées avec des chondrocytes issus de patients arthrosiques et cultivés en monocouche jusqu'au passage 1. Après privation des cellules en sérum pendant une nuit, les chondrocytes sont traités pendant 24 heures par de l'adiponectine humaine recombinante (1 et 5 µg/ml) (R&D Systems, Abingdon Science Park, Royaume-Uni) en présence ou non de polymixine B (10 µg/ml) (Sigma). Les cellules sont ensuite recueillies après action de la trypsine et conservées à -80°C pour la mesure du niveau d'expression des ARNm.

4) Influence de l'obésité sur la réponse des chondrocytes à la leptine

a Conditions de traitement à la leptine

Les expériences ont été réalisées sur des chondrocytes cultivés en monocouche jusqu'au passage 1. Après privation des cellules en sérum pendant une nuit et renouvellement du milieu 2 heures avant la stimulation, les cellules sont incubées pendant 24 heures en présence de leptine humaine recombinante (20, 100 et 500 ng/ml) (R&D Systems, Abingdon Science Park, Royaume-Uni). Les cellules sont ensuite recueillies après action de la trypsine et conservées à -80°C pour la mesure du niveau d'expression des ARNm.

b Etude de la voie des JAK/STATs

Les expériences ont été réalisées avec des chondrocytes cultivés en monocouche au passage 1. Après privation des cellules en sérum pendant une nuit et renouvellement du milieu 2 heures avant la stimulation, les cellules sont incubées pendant 10 minutes en présence de leptine humaine recombinante (100 et 500 ng/ml). Les protéines nucléaires sont ensuite extraites à l'aide d'un kit (Nuclear Extract Kit, Active Motif, Belgique). Brièvement, les

cellules sont d'abord rincées avec un tampon phosphate contenant des inhibiteurs de phosphatases puis suspendues dans un tampon hypotonique. Après ajout de détergent, centrifugation et élimination des protéines cytoplasmiques présentes dans le surnageant, les noyaux sont repris dans un tampon de lyse contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases. Les protéines nucléaires sont ensuite recueillies après centrifugation et conservées à -80°C.

Chapitre 2 Etude chez l'animal

I. Animaux

Les études ont été réalisées chez le rat Wistar mâle (150-225 g, Charles River, Saint-Aubin-lès-Elboeuf, France) et chez le rat Zucker qui se caractérise par un phénotype d'obésité sévère liée à une mutation du récepteur fonctionnel à la leptine. Des rats hétérozygotes pour le gène codant Ob-R (Fa/fa) ainsi que des rats non mutés (Brown Norway) ont également été utilisés pour les groupes contrôles. Ils sont gardés dans une animalerie thermorégulée (24°C) dont l'air est renouvelé et dans laquelle des cycles diurnes (6h-18h) et nocturnes (18h-6h) alternent régulièrement. Les rats sont placés par 5 dans des cages, avec un accès à une nourriture standardisée et à de l'eau *ad libitum*. Les expérimentations débutent après une période d'acclimatation des animaux d'une durée de 7 jours.

Deux procédures de sacrifice ont été utilisées selon le poids des rats : après une anesthésie par injection intra-péritonéale d'un mélange d'hydrochlorure de kétamine (50mg/kg) et d'acépromazine (1,25 mg/kg), ils subissent soit une élongation cervicale soit une injection d'air intracardiaque.

II. Modèle d'arthrose expérimentale au MIA

Le genou constitue une articulation de choix pour l'étude des pathologies articulaires expérimentales chez le rat car c'est une des articulations les plus volumineuses et la plus facilement accessible. Le choix du modèle d'arthrose s'est tourné vers l'injection intra-articulaire unilatérale d'une solution de mono-iodo acétate (0,1 et 0,3 mg) (Lerck-Clévenot, Nogent sur Marne, France) préparée dans du sérum physiologique et préalablement filtrée. Le genou témoin (contro-latéral) a reçu une solution de 50 µl d'excipient (sérum physiologique). Selon les études, les rats ont été sacrifiés entre 5 jours (J5) et 65 jours (J65) après l'injection de MIA et les genoux ont été prélevés pour être fixés dans une solution de paraformaldéhyde à 4% (p/v).

Chapitre 3 Paramètres d'évaluation

I. Analyse de l'expression des gènes

1) Extraction des ARNs totaux

L'extraction des ARNs est réalisée au moyen de colonnes fournies dans le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Après lyse des cellules dans un tampon spécifique et lavage dans une solution d'éthanol à 70%, les échantillons sont déposés sur les colonnes. Plusieurs lavages successifs sont effectués avec différents tampons et les ARNs totaux sont finalement élués avec 30 µl d'eau RNase/DNase free. La quantité et la pureté des ARNs sont déterminées par des mesures de DO à 260 nm et à 280 nm (Nanodrop), et l'intégrité des ARNs est vérifiée par migration dans un gel d'agarose à 0,8%.

2) Transcription inverse

La transcription inverse est réalisée immédiatement après extraction des ARNs dans un milieu réactionnel d'un volume final de 20µl comprenant les ARN totaux (300 ng) préalablement chauffés 5 minutes à 65°C, 200 U de transcriptase inverse M-MLV (Invitrogen), un tampon de réaction, un mélange de dNTP (0,5mM), du DTT (10mM) et des amorces aléatoires en polydT (0,4 µM). Cette étape se fait pendant 1 h30 à 37°C, puis les ARNs sont dégradés par un chauffage de 5 minutes à 95°C. Les ADNc sont stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

3) PCR en temps réel

La PCR implique tout d'abord le développement d'amorces sens et anti-sens spécifiques des gènes cibles à étudier. Pour cela, les séquences nucléotidiques codant les différents éléments sont trouvées dans la base de données GenBank. La séquence des amorces est ensuite déterminée à l'aide du logiciel informatique Primer 3. L'utilisation de ce logiciel permet de fixer des critères particuliers : une température de fusion (T_m) ; une taille d'amorces comprise entre 18 et 22 nucléotides permettant d'amplifier un produit de PCR compris entre 70 et 200 pb et une richesse en G/C d'environ 50%. Seules les amorces spécifiques de la leptine et de son récepteur n'ont pas été conçues selon cette méthode, mais proviennent de chez SuperArray Biosciences Corporation.

La réaction de PCR est réalisée dans un mélange réactionnel d'un volume final de 20µl composé d'ADNc (1/5 des produits de RT), de 10µl de Master mix2 (SYBR Green PCR

Buffer, Qiagen) contenant du KCl, du NH₂SO₄, du MgCl₂ (2,5mM), le mélange de dNTP, la HotStar Taq ADN polymérase et le SYBR Green, et de chacune des 2 amorces spécifiques du gène (0,5 µM) (Tableau III.1).

Gènes	Séquences (Direct/Reverse)	Tm (°C)	Taille (pb)
RP29	Dr AAGATGGGTCACCAGCAGCTCTACTG Rv AGACGCGGCAAGAGCGAGAA	60	156
Adiponectine	Dr CCTAAGGGAGACATCGGTGA Rv GTAAAGCGAATGGGCATGTT	57	173
AdipoR1	Dr CTTCTACTGCTCCCCACAGC Rv GACAAAGCCCTCAGCGATAG	63	196
AdipoR2	Dr TCGCCCAAATATCTCCTTTG Rv CCAAGGAACAAAACCTTCCCATA	60	199
Leptine	RT-PCR Primer Set	55	181
Ob-R	RT-PCR Primer Set	60	190
Collagène de type 1	Dr GGCAACAGCAGGTTCACTTA Rv GGC GTGATGGCTTATTTGTT	59	105
Collagène de type 2	Dr ACACTGGGACTGTCCTCTGC Rv GGCAGTCTTTCACGTCTTCA	62	53
Agrécane	Dr TCGAGGACAGCGAGGCC Rv TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA	63	84
Sox9	Dr AGCGAACGCACATCAAGAC Rv TGGTGGTCGGTGTAGTCGTAs	60	160
TIMP-2	Dr CTTCTTTCTCCAACGTC Rv AAAGCGGTCAGTGAGAAGGA	57	183
TGF-β	Dr TGCGGCAGCTGTACATTGA Rv TGGTTGTACAGGGCCAGGA	59	186
MMP-13	Dr TGGTGGTGTATGAAGATGATTTG Rv TCTAAGCCGAAGAAAGACTGC	57	125

IGF-1	Dr GTATTGCGCACCCCTCAA Rv TTGTTTCCTGCACTCCCTCT	57	126
COX2	Dr GCTGGAACATGGAATTACCCA Rv CTTTCTGTACTGCGGGTCGAA	58	98
IL-1 β	Dr GGACAAGCTGAGGAAGATGC Rv TCGTTATCCCATGTGTCGAA	57	120
iNOS	Dr ACAAGCCTACCCCTCCAGAT Rv TCCCGTCAGTTGGTAGGTTC	59	157

Tableau III.1 : Séquence des amorces nécessaires à l'amplification des gènes.

La quantification est obtenue après réalisation d'une gamme étalon pour chaque gène étudié. Des produits d'amplification de gènes sont récupérés et purifiés à l'aide d'un kit Qiagen (Mini Eluer PCR Purification kit). Après détermination des quantités obtenues et préparation d'une solution à 1 ng/ml, une gamme étalon est réalisée par des dilutions en cascade au 1/10^e des échantillons. L'expression des gènes d'intérêt est rapportée à celle d'un gène domestique codant la protéine ribosomale RP 29.

II. Analyses histologiques

Les biopsies de cartilage provenant des plateaux tibiaux de patients arthrosiques ou les genoux de rats sont fixés dans du paraformaldéhyde (4% p/v) pendant 24 heures. Les échantillons sont ensuite décalcifiés dans du Rapide Décalcifiant Osseux (Eurobio, Les Ulis, France) pendant 1h pour les biopsies et 15h pour les genoux de rats. Après d'abondants rinçages dans l'eau, ils sont à nouveau placés pendant au moins 24 heures dans du paraformaldéhyde (4%) avant d'être déshydratés et inclus en paraffine. Les colorations histologiques (HES et Safranine-O-Fast Green) sont ensuite réalisées sur des coupes de 5 μ m d'épaisseur. Les scores de sévérité des atteintes ont été établis selon le score de Mankin en considérant la surface du cartilage, l'aspect des cellules, l'épaisseur de la couche profonde contenant les chondrocytes hypertrophiques et l'intensité des colorations (Tableau III.2).

<u>Structure (surface)</u>		<u>Coloration à la Safranine-O-Fast Green</u>	
Normale	0	Homogène et intense	0
Surface irrégulière	1	Décoloration de la couche superficielle	1
Fissures	2	Décoloration de la zone moyenne	2
<u>Cellules</u>		<u>Épaisseur de la couche profonde</u>	
Normale	0	Normale	0
Hypocellularité	1	Modérée	1
Hypercellularité	2	Réduite	2

Tableau III.2 : Score histologique utilisé pour établir les grades de sévérité des atteintes cartilagineuses.

III. Etudes immunohistochimiques

Des coupes de 5 µm sont déparaffinées dans du Tissue Clear (Bayer Diagnostics, Puteaux) et réhydratées dans des bains d'éthanol suivant un gradient croissant. Les différentes coupes sont ensuite perméabilisées à l'aide de tampon citrate (10 mM, pH=6) pendant 30 min. Après des rinçages dans du PBS, les peroxydases endogènes sont neutralisées avec du peroxyde d'hydrogène (0,3%) et les sites non spécifiques sont bloqués pendant au moins 1h30 avec de l'albumine sérique bovine (4%) préparée dans du PBS. Les coupes sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire [anti-MMP-13 (mab 511, 4 µg/ml, R&D Systems) ; anti-leptine (sc-842, 2 µg/ml, Santa Cruz), anti-Sox9 (sc-20095, 4 µg/ml, Santa Cruz), anti-TGF-β (sc-146, 0,8 µg/ml, Santa Cruz)]. Après 2 rinçages dans le PBS et incubation pendant 30 min à température ambiante avec l'anticorps secondaire biotinylé (1 µg/ml) (DakoCytomation), les coupes sont mises en présence d'un complexe avidine-biotine couplé à une peroxydase de Raifort (DAKO). La révélation est effectuée après incubation avec la DAB (3,3'-diaminobenzidine) et la réaction est stoppée avec de l'eau. La contre-coloration se fait avec de l'hématoxyline pendant 10 secondes. Cette étape est suivie de 3 bains d'alcools à 100° et de 3 bains de toluène de 5 min. Enfin, le montage est réalisé à l'aide d'une résine synthétique [Eukitt (CML)].

IV. Dosages des adipokines

Les adipokines libérées dans les surnageants de culture des biopsies de cartilage ou des échantillons de ligament de Hoffa et de graisse sous-cutanée sont dosées par technique ELISA (Quantikine Human Leptin ou Quantikine Human Adiponectin, R&D Systems, Abingdon Science Park, Royaume-Uni). Les échantillons sont déposés dans des puits dont la

surface est recouverte par un anticorps spécifique de la protéine dosée. Après 2 heures d'incubation, les puits sont rincés abondamment avec du tampon de lavage. Une solution contenant le conjugué est ajoutée dans chaque puits pendant 1h. Les puits sont à nouveau rincés et le substrat est ajouté pendant 30 minutes. Après arrêt de la réaction colorimétrique par une solution acide la lecture est réalisée sur un lecteur de plaques à une longueur d'onde de 450 nm. La gamme étalon de la leptine varie de 15,6 et 1000 pg/ml et celle de l'adiponectine de 3,9 et 250 ng/ml. La précision inter-essai est inférieure à 5% pour la leptine et à 7% pour l'adiponectine. Les seuils de détection pour la leptine et l'adiponectine sont respectivement de 7,8 pg/ml et 79 pg/ml.

V. Détermination de l'activité des STATs

La phosphorylation des STATs est déterminée par une technique immuno-enzymatique en microplaques à l'aide d'un coffret commercialisé par Active Motif (Rixensart, Belgique) et qui permet à la fois de détecter et de quantifier l'activation des facteurs de transcription. Le principe repose sur l'utilisation de plaques 96 puits au fond desquels sont immobilisés des oligonucléotides contenant une séquence consensus spécifique de chaque isoforme. Les STATs présents dans les extraits nucléaires se lient à ces séquences et sont ensuite détectés à l'aide d'anticorps spécifiques de STAT1, 3, 5A et 5B. L'ajout d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort permet ensuite une révélation colorimétrique facilement quantifiable. Dans cette étude, l'activation des STATs est mesurée à partir de 5 µg de protéines nucléaires totales.

VI. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne \pm SD ou moyenne \pm SEM, chaque valeur individuelle étant la moyenne d'au moins 3 essais. Pour la caractérisation des voies de signalisation de la leptine et les traitements à la leptine et à l'adiponectine, les résultats sont exprimés par rapport aux cellules contrôles non stimulées. Les corrélations sont définies selon la méthode de Spearman. L'analyse statistique qui inclut un test de variance (ANOVA) suivi d'un test de Fischer (PLSD) est réalisée à l'aide du logiciel StatviewTM version 5.0 (SAS, Cary) pour Windows. Une valeur de p inférieure à 0,05 est considérée comme significative.

E. Résultats et discussions

Chapitre 1 : Influence des conditions de culture sur l'expression des adipokines et de leurs récepteurs dans les chondrocytes humains

Ce premier travail a été entrepris afin de comprendre les résultats discordants obtenus dans les différentes études consacrées à l'expression des adipokines et de leurs récepteurs (Lago et al., 2008) ; (Kwan Tat *et al.* 2009) ; (Chen *et al.*, 2006). De plus, nous voulions définir le système de culture le plus adapté pour évaluer les effets des adipokines sur les fonctions chondrocytaires.

Le travail expérimental a été réalisé à partir d'échantillons de cartilage provenant de 9 patients atteints d'arthrose. Après digestion enzymatique des tissus cartilagineux, une partie des chondrocytes est conservée à -80°C en vue d'une extraction d'ARN et le reste des cellules est mis en culture pendant 10 à 12 jours (stade P0). Une fois la confluence atteinte, une partie de ces cellules est stockée à -80°C, une autre est remise en culture en monocouche (stade P1) et une troisième est encapsulée en gel d'alginate et maintenue pendant 3 à 4 semaines en culture (billes P0). Une seconde série de billes (billes P1) est réalisée à partir des cellules en monocouche au stade P1 (Figure IV.1).

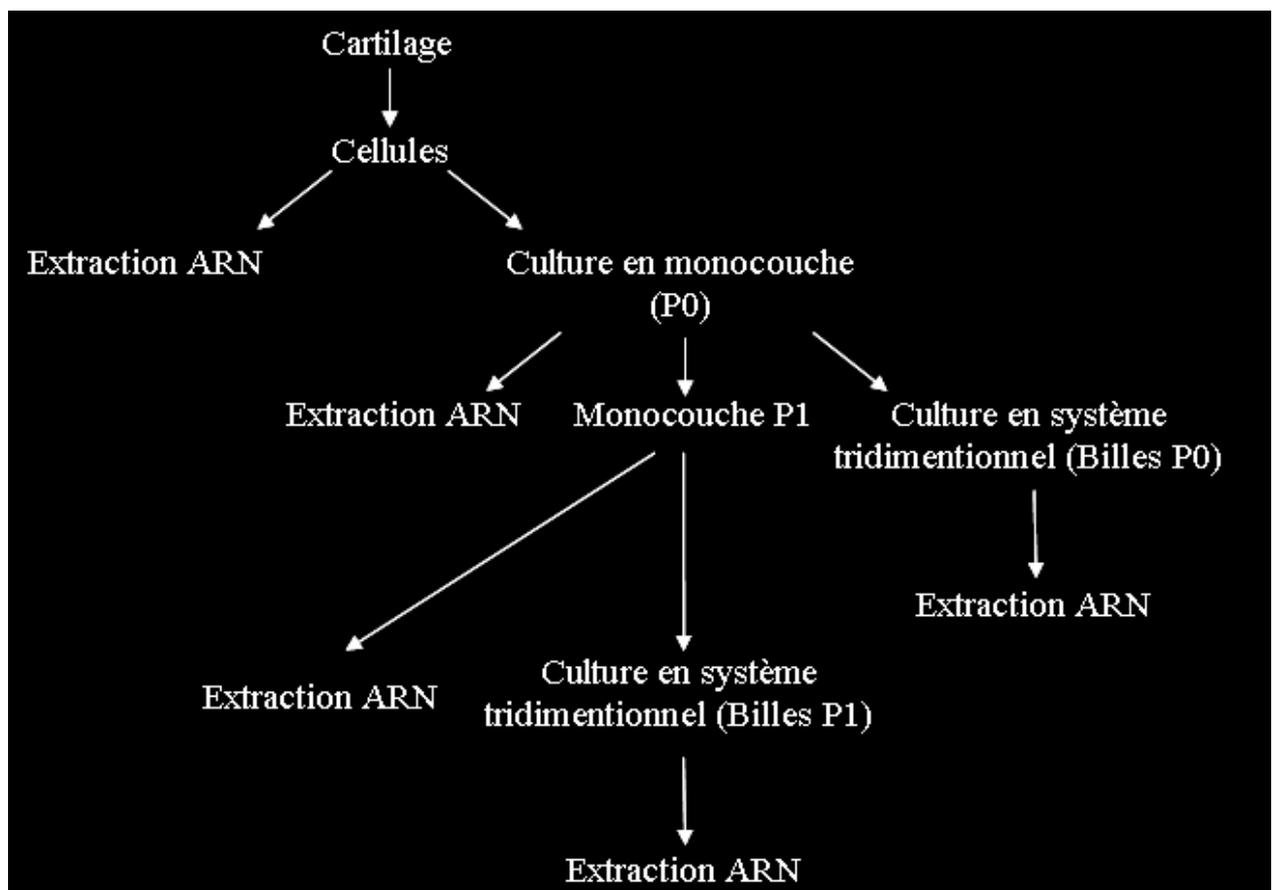


Figure IV.1 : Schéma méthodologique des conditions de culture utilisées pour cette étude

Les analyses par PCR en temps réel montrent que les ARNm codant la leptine et l'adiponectine sont exprimés dans les chondrocytes fraîchement isolés (Figures IV.2A et

IV.2D). Le récepteur AdipoR1 est également retrouvé alors que AdipoR2 est peu voire pas détecté dans les chondrocytes arthrosiques (Figures IV.2B et IV.2C). L'ARNm codant Ob-R est également exprimé dans les chondrocytes sauf pour 3 patients (Figure IV.2E). Pour tous ces gènes, une très grande variabilité inter-individuelle est observée.

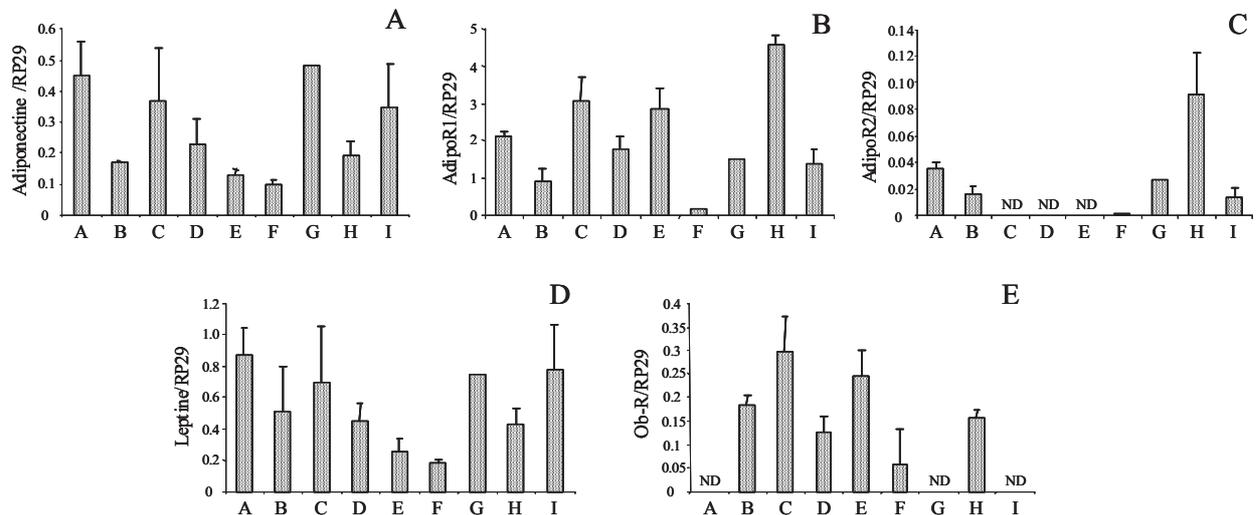


Figure IV.2 : Expression des gènes codant l'adiponectine (A), AdipoR1 (B), AdipoR2 (C), la leptine (D) et Ob-R (E) dans des chondrocytes issus de patients arthrosiques.

L'expression des ARNs est déterminée par PCR en temps réel pour des chondrocytes fraîchement isolés du cartilage et normalisée avec un contrôle interne (RP29). Les données obtenues à partir de 9 patients (A à I) sont représentées sous la forme de moyenne \pm écart-type d'au moins 3 échantillons par patient. ND = non détecté

L'expression de la leptine et de l'adiponectine diminue fortement lorsque les cellules sont mises en culture en monocouche (Figures IV.3A et IV.3D). Cette diminution de l'expression des adipokines s'accompagne d'une élévation de l'expression de leurs récepteurs (Figures IV.3B, IV.3C et IV.3E).

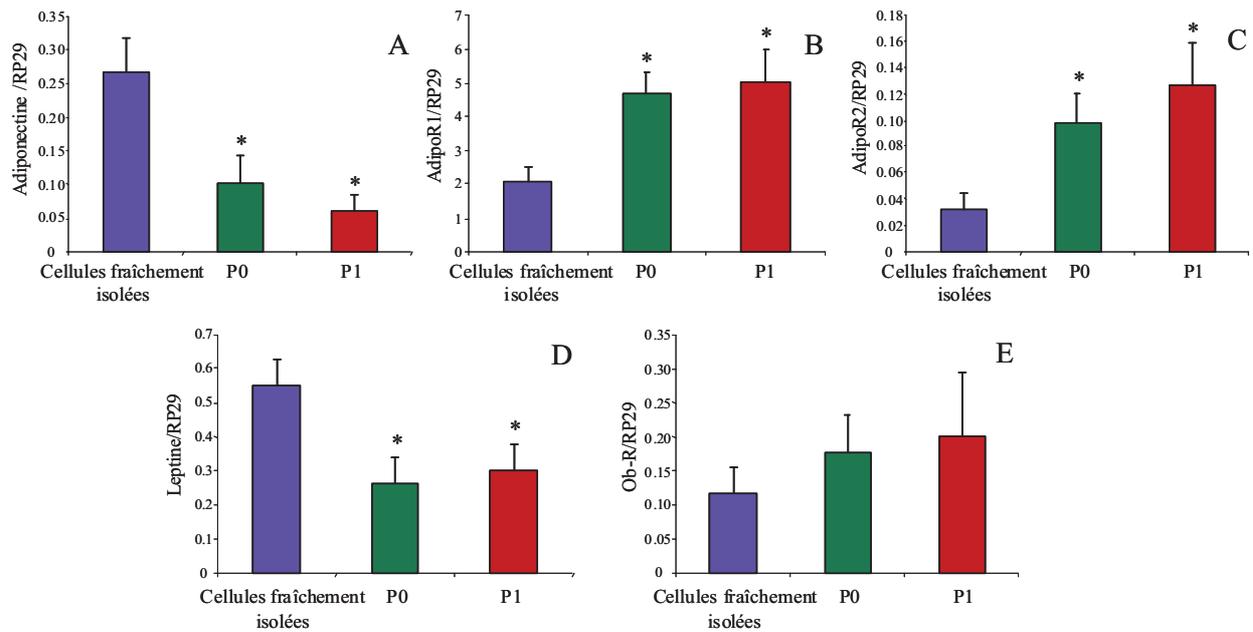


Figure IV.3 : Effet de la culture en monocouche sur l'expression des gènes codant l'adiponectine (A), AdipoR1 (B), AdipoR2 (C), la leptine (D) et Ob-R (E).

L'expression des ARNs est déterminée par PCR en temps réel pour des chondrocytes fraîchement isolés du cartilage et pour des cellules cultivées en monocouche aux passages P0 et P1. L'expression des gènes est normalisée avec un contrôle interne (RP29). Les données sont représentées sous la forme de moyenne \pm écart-type de 9 patients avec au moins 3 échantillons par patient. * = $p < 0.05$ entre cellules fraîchement isolées et cellules en culture.

La mise en culture en monocouche des chondrocytes et leur passage modifient aussi l'expression des collagènes. En effet, l'expression du collagène de type 2 diminue alors que celle du collagène de type 1 augmente considérablement (Figures IV.4A et IV.4B). Comme pour le collagène de type 2, le niveau d'expression de Sox9 diminue lors de la mise en culture (Figure IV.4C).

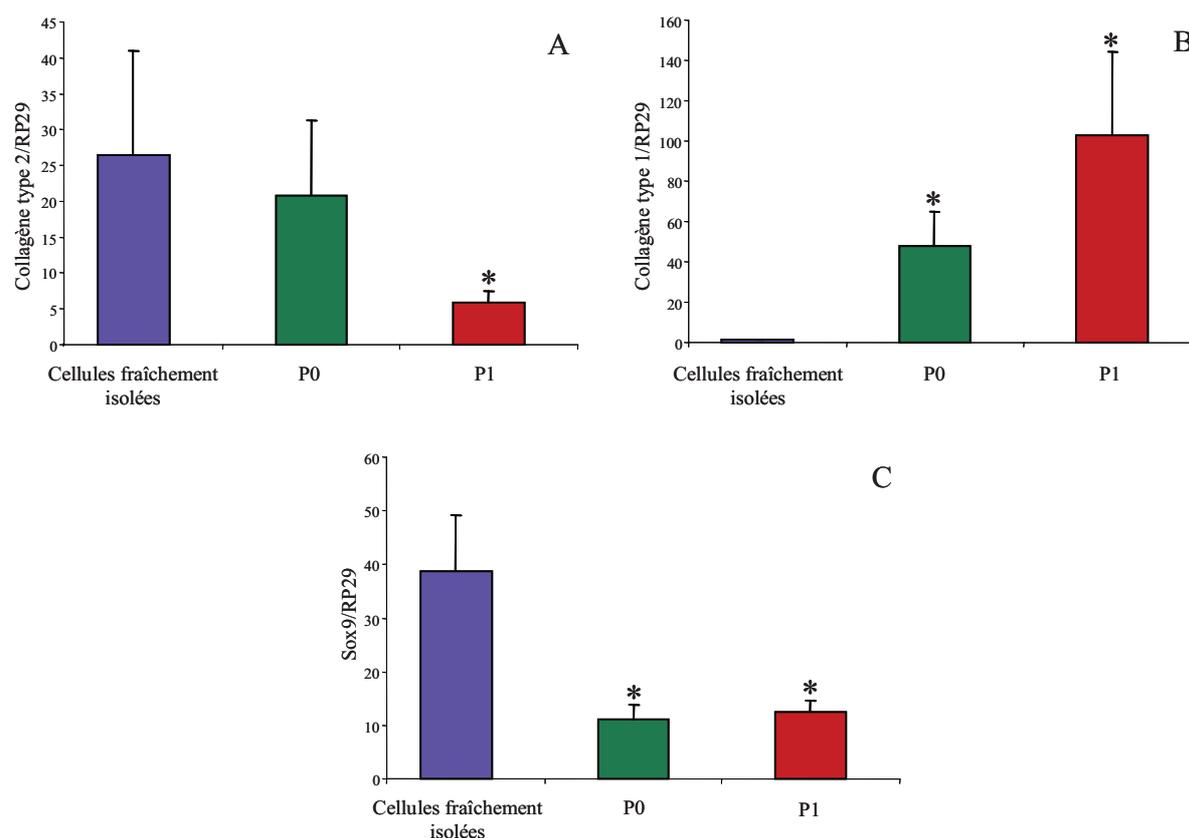


Figure IV.4 : Effet de la culture en monocouche sur l'expression des gènes codant les collagènes de type 2 (A) et 1 (B) et Sox9 (C).

L'expression des ARNs est déterminée par PCR en temps réel pour des chondrocytes fraîchement isolés du cartilage et pour des cellules cultivées en monocouche aux passages P0 et P1. L'expression des gènes est normalisée avec un contrôle interne (RP29). Les données sont représentées sous la forme de moyenne \pm écart-type de 9 patients avec au moins 3 échantillons par patients. * = $p < 0.05$ entre cellules fraîchement isolées et cellules en culture.

Afin d'étudier l'influence du phénotype chondrocytaire sur l'expression des adipokines et de leurs récepteurs, les chondrocytes cultivés en monocouche sont, une fois la confluence atteinte, intégrés dans un système tridimensionnel. Les cellules sont ensuite maintenues dans des billes d'alginate pendant 3 ou 4 semaines avant le recueil des ARNs.

Comme l'illustre la figure IV.5, l'expression de la leptine et de l'adiponectine est restaurée lorsque les cellules sont incluses dans un système tridimensionnel. Le niveau d'expression de l'adiponectine est augmenté d'un facteur 20 par rapport à la culture en monocouche (Figure IV.5A). La leptine, elle, est 10 fois plus exprimée dans les cellules cultivées en bille d'alginate qu'en monocouche (Figure IV.5B). Les cellules maintenues dans un tel environnement montrent ainsi une expression plus importante des adipokines comparée à celle observée avec les chondrocytes fraîchement isolés du cartilage. A l'inverse de ce qui

est observé avec les adipokines, les ARNs codant les récepteurs ne sont pas détectés dans les chondrocytes encapsulés dans l'alginate. De manière intéressante, l'inclusion en gel d'alginate provoque une baisse du niveau d'expression du collagène de type 2 et de Sox9, et aucun signal n'est obtenu pour le collagène de type 1 (Figures IV.5C et IV.5D).

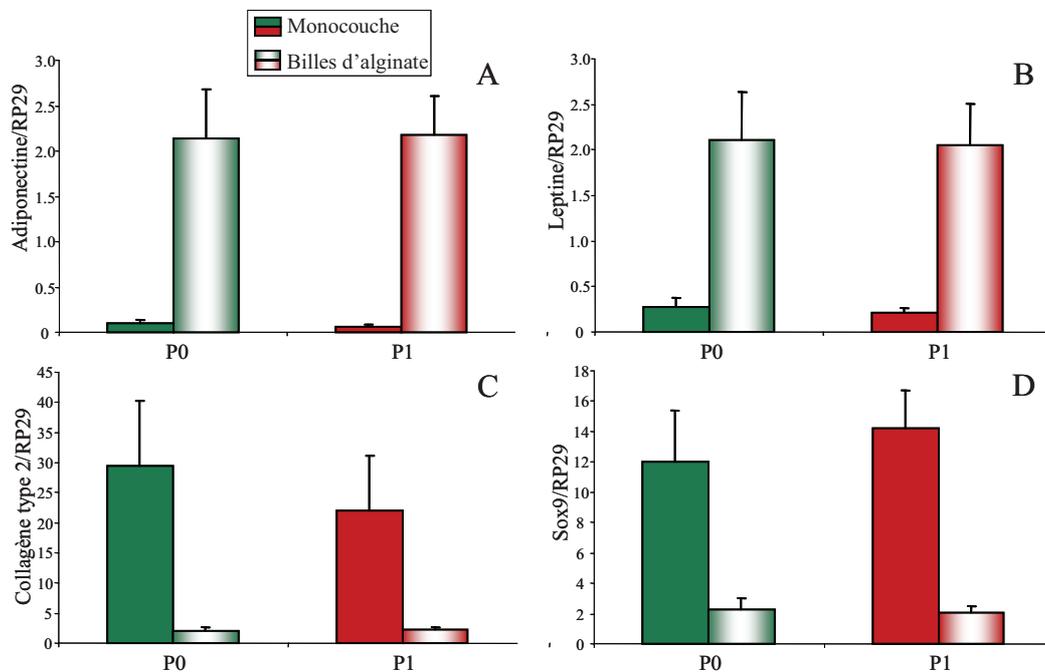


Figure IV.5 : Effet de la culture en système tridimensionnel sur l'expression des gènes codant l'adiponectine (A), la leptine (B), le collagène de type 2 (C) et Sox9 (D).

Des chondrocytes cultivés en monocouche jusqu'au passage P0 ou P1 sont encapsulés dans un gel d'alginate et maintenus en culture pendant 3 à 4 semaines. L'expression des ARNs est ensuite déterminée par PCR en temps réel et normalisée par rapport à celle de RP29. Les données sont représentées sous la forme de moyenne \pm écart-type de 9 patients avec au moins 3 échantillons par patient.

L'influence des adipokines sur le maintien du phénotype chondrocytaire a été évaluée en analysant l'expression spontanée du collagène de type 2 et de Sox9 dans des chondrocytes cultivés en monocouche au passage P0 et mis en présence d'anticorps neutralisant la leptine ou l'adiponectine. L'anticorps anti-adiponectine ayant été préparé chez la chèvre, des cellules traitées avec une solution d'IgG obtenues chez la même espèce ont servi de groupe contrôle pour évaluer l'effet de l'anticorps anti-adiponectine. La neutralisation de l'adiponectine par un anticorps ne modifie pas significativement l'expression des gènes étudiés (Figure IV.6). En revanche, l'anticorps anti-leptine induit une chute de 70 % de l'expression du collagène de

type 2 et une baisse d'environ 30 % de celle de Sox9 (Figure IV.6). En raison des effets connus de la leptine sur la stimulation des facteurs de croissance, l'expression du TGF- β et de l'IGF-1 a également été examinée. Une diminution de l'expression du TGF- β est notée alors que celle de l'IGF-1 augmente quand la leptine est neutralisée (Figure IV.6). L'effet de l'anticorps anti-leptine n'est pas modifié par l'anticorps anti-adiponectine ou l'IgG (Figure IV.6).

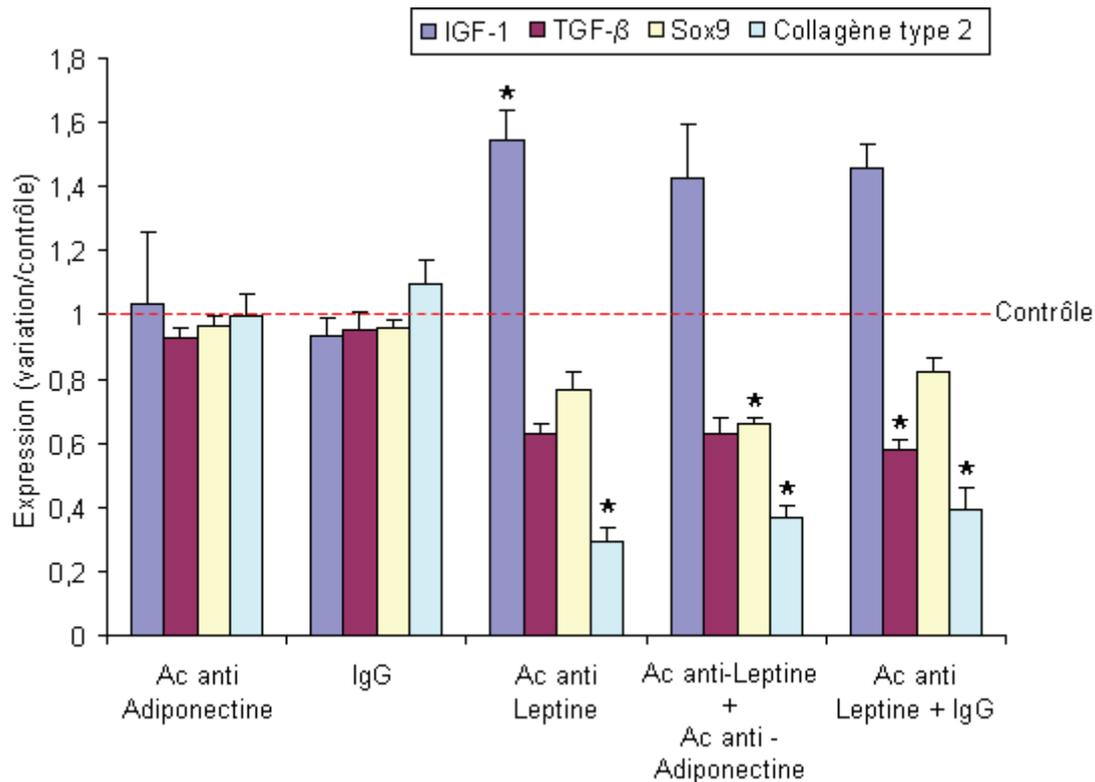


Figure IV.6 : Rôle de l'adiponectine et de la leptine sur l'expression des facteurs de croissance (TGF- β et IGF-1), de Sox9 et du collagène de type 2.

Après 48 heures de traitement des chondrocytes avec des anticorps (Ac) neutralisant la leptine et l'adiponectine, l'expression des ARNs est déterminée par PCR en temps réel. L'expression des gènes est normalisée avec un contrôle interne (RP29). Les données sont exprimées sous la forme de moyenne \pm SEM de 4 patients avec au moins 3 échantillons par patients, et représentent la variation d'expression observée dans les cellules traitées par rapport aux cellules contrôles non traitées.

* = $p < 0.05$ entre chondrocytes témoins et chondrocytes traités.

Faits marquants

La culture en monocouche de chondrocytes humains provoque une diminution importante de l'expression de la leptine et de l'adiponectine alors que le maintien en système tridimensionnel la restaure voire l'augmente par rapport à celle mesurée dans les cellules fraîchement isolées du cartilage. Le profil d'expression des récepteurs à l'adiponectine et à la leptine évolue de manière inverse par rapport à leur ligand. De manière intéressante, le profil d'expression de marqueurs phénotypiques est identique à celui des adipokines, mais seule la leptine contribue à leur expression.

Discussion

Nos résultats démontrent pour la première fois que les chondrocytes obtenus à partir de patients arthrosiques expriment l'adiponectine. Des travaux récents indiquent que la production d'adiponectine n'est pas réservée au seul tissu adipeux. Elle est retrouvée dans les ostéoblastes (Berner *et al.* 2004), et les synoviocytes de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde sont aussi une source d'adiponectine (Ehling *et al.* 2006).

Pour compléter l'étude, nous avons analysé par PCR en temps réel l'expression des récepteurs à l'adiponectine et à la leptine. L'ARNm codant Ob-R est exprimé chez la plupart des patients arthrosiques avec une grande variabilité inter-individuelle, et nous n'avons pas décelé de transcript pour 3 patients. Cette variabilité dans l'expression de Ob-R dans les chondrocytes fraîchement isolés de patients arthrosiques peut expliquer l'absence de différence statistiquement significatives par rapport aux chondrocytes en culture. En fait, l'ARNm codant Ob-R est principalement trouvé dans les zones dégradées du cartilage arthrosique mais est absent ou en très faible quantité dans les zones adjacentes intactes (Simopoulou *et al.*, 2007). Cette expression locale du récepteur à la leptine dans le cartilage endommagé peut expliquer l'absence de détection de Ob-R dans les cellules fraîchement isolées qui proviennent le plus souvent des zones les moins abîmées du cartilage. En revanche, des niveaux d'expression élevés d'AdipoR1 sont mesurés dans les chondrocytes fraîchement isolés du cartilage de patients arthrosiques alors que AdipoR2 est très faiblement exprimé. AdipoR1 et AdipoR2 sont les récepteurs majeurs de l'adiponectine qui médient la plupart des effets de cette adipokine. AdipoR1 est très exprimé dans les muscles squelettiques alors que AdipoR2 prédomine dans le foie (Yamauchi *et al.* 2003). Nos données sont en accord avec celles de Chen (Chen *et al.* 2006) mais en opposition avec l'étude de Lago qui a mis en évidence les 2 isoformes d'AdipoR dans les chondrocytes (Lago *et al.* 2008). Cette

divergence est sans doute due aux conditions expérimentales utilisées dans les 2 études. Les analyses par PCR en temps réel ont été pratiquées sur des échantillons de cartilage pour Chen et sur des chondrocytes fraîchement isolés pour notre étude, alors que Lago et al. ont réalisés leurs travaux à partir de chondrocytes humains cultivés en monocouche. Nos résultats obtenus avec les cellules en monocouche confirment cette hypothèse puisque l'expression d'AdipoR2 augmente considérablement quand les cellules sont mises en culture.

L'instabilité phénotypique du chondrocyte est constamment observée en monocouche. Les cellules adoptent une morphologie proche de celle du fibroblaste et arrêtent de produire les molécules spécifiques du cartilage. Dans ce travail, nous avons effectivement remarqué une chute de l'expression du collagène de type 2. L'ARNm codant Sox9, le facteur de transcription qui joue un rôle majeur dans la formation du cartilage (Bi *et al.* 1999), baisse également fortement. Cette association entre la régulation négative de l'expression des adipokines dans les chondrocytes en monocouche et la chute de l'expression de Sox9 et du collagène de type 2 suggère que la leptine et l'adiponectine pourraient stimuler l'activité métabolique des chondrocytes. De plus, l'expression du collagène de type 1 est fortement accrue dès le premier passage indiquant que la dédifférenciation des chondrocytes commence avec une forte réduction de l'expression de la leptine et de l'adiponectine. Le rôle du phénotype chondrocytaire dans l'expression des adipokines pourrait expliquer pourquoi certains auteurs n'ont pas mis en évidence l'expression des ARNm codant la leptine dans les chondrocytes humains en culture (Lajeunesse *et al.* 2005). Cet effet est peut être dû aussi à la perte de la matrice tridimensionnelle ou à l'absence de stimulus mécanique ou des composants du liquide synovial.

Suite à ces constats, un système tridimensionnel a été utilisé afin de maintenir un phénotype chondrocytaire. La culture de chondrocytes dans un système tridimensionnel préserve en effet la morphologie cellulaire et permet de garder un phénotype de chondrocyte différencié (Hauselmann *et al.* 1994) ; (Liu *et al.* 1998). Les changements d'expression des collagènes induits par la culture en monocouche, avec notamment l'augmentation du collagène de type 1, disparaissent ainsi lorsque les cellules sont transférées dans le gel d'alginate. La réduction de l'expression du collagène de type 2 et de Sox9 dans les chondrocytes encapsulés dans des billes d'alginate pourrait refléter une baisse de l'activité de synthèse des chondrocytes probablement en réponse à une accumulation d'éléments matriciels dans le réseau tridimensionnel au cours des 3 à 4 semaines de culture (Almqvist *et al.* 2001). Le fait que l'alginate soit capable de restaurer un niveau d'expression des adipokines identique à celui du cartilage confirme le rôle prépondérant de l'état de différenciation. La

synthèse d'adiponectine dans les ostéoblastes est aussi reliée à l'état de différenciation des cellules suggérant que cette adipokine peut contribuer au processus de régulation de la maturation des cellules mésenchymateuses (Berner *et al.* 2004). Kanazawa *et al.* ont ainsi montré que l'adiponectine stimule la prolifération, la différenciation et la minéralisation des ostéoblastes (Kanazawa *et al.* 2007). La leptine est par ailleurs capable de moduler de nombreux événements associés avec la différenciation terminale des chondrocytes et de jouer un rôle essentiel dans l'ossification du cartilage de conjugaison (Kishida *et al.* 2005). Les résultats obtenus après neutralisation des adipokines produites spontanément par les chondrocytes indiquent en fait que la leptine mais pas l'adiponectine est indispensable à l'expression du collagène de type 2, et dans une moindre mesure à celle de Sox9. Ils montrent ainsi le rôle essentiel de la leptine dans l'expression de marqueurs phénotypiques du chondrocyte. Cet effet inhibiteur de l'anticorps anti-leptine est également observé pour le TGF- β mais pas pour l'IGF-1 suggérant un effet spécifique de la leptine plutôt qu'une action générale sur la régulation des gènes.

De manière intéressante, nos résultats indiquent que les adipokines et leurs récepteurs montrent une expression mutuellement exclusive dans les chondrocytes en culture. La leptine et l'adiponectine sont exprimées dans les chondrocytes maintenus dans des billes d'alginate alors que leurs récepteurs ne sont pas détectés. En revanche, des niveaux élevés des ARNm codant AdipoR1, AdipoR2 et Ob-R sont trouvés dans les cellules cultivées en monocouche mais pas les adipokines, suggérant que l'augmentation d'expression des récepteurs peut être la conséquence de la perte de leurs ligands. Ces données sont d'autant plus importantes qu'elles identifient la culture en monocouche comme étant l'unique système d'étude des adipokines, le gel d'alginate entravant toute expression des récepteurs à l'adiponectine et à la leptine.

***Chapitre 2 : Rôle du ligament adipeux de Hoffa
dans la production des adipokines***

En raison du rôle potentiel des adipokines dans l'arthrose et de la nature adipeuse du ligament de Hoffa, nous avons tenté de mieux comprendre la contribution de ce tissu présent dans l'articulation du genou. Nous avons pour cela caractérisé ce tissu en terme de production d'adipokines en le comparant au tissu gras sous-cutané. Les échantillons tissulaires ont été prélevés chez 31 patients (9 hommes et 22 femmes) atteints d'arthrose du genou et ont été placés pendant 48 heures dans du milieu de culture ne contenant pas de SVF. La production d'adiponectine et de leptine a ensuite été déterminée par ELISA dans les surnageants de culture.

I. Production d'adipokines dans le ligament de Hoffa et la graisse sous-cutanée

Quel que soit le tissu adipeux considéré, la production d'adiponectine reste toujours supérieure à celle de la leptine. Par ailleurs, le ligament adipeux de Hoffa est une source plus importante d'adiponectine que la graisse sous-cutanée alors que l'inverse est observé pour la leptine (Figure IV.7).

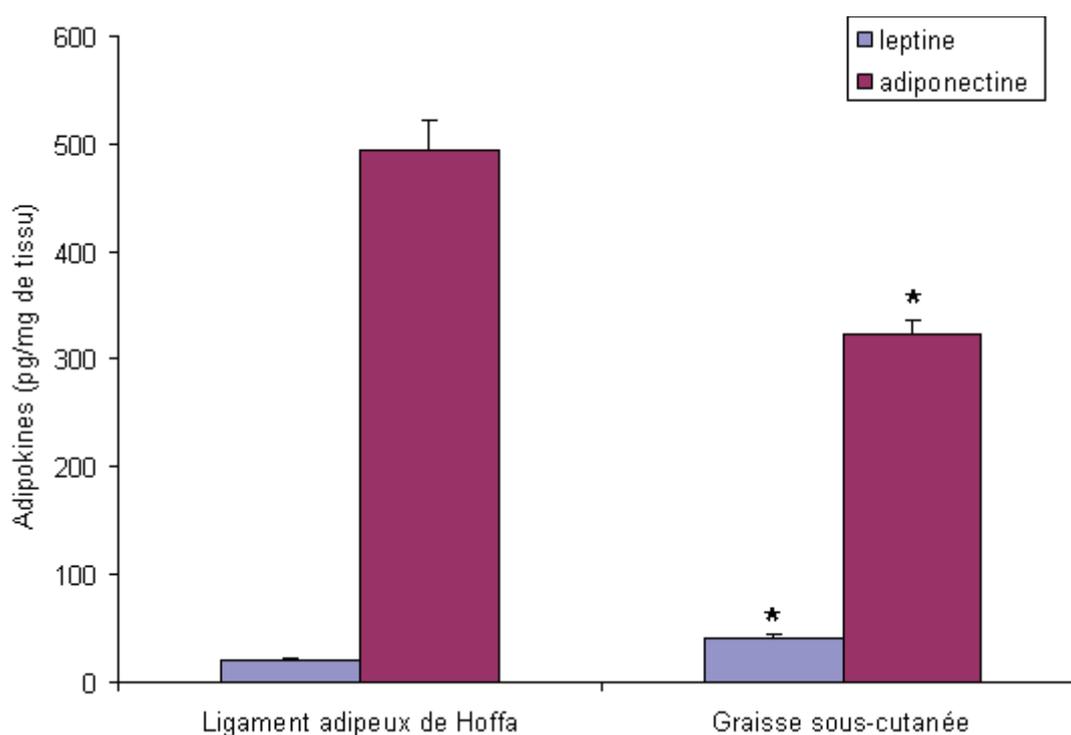


Figure IV.7 : Production des adipokines par le ligament de Hoffa et la graisse sous-cutanée.

Les adipokines ont été dosées par ELISA dans le surnageant des tissus graisseux placés dans du milieu de culture pendant 48 heures. Les données sont représentées sous la forme de moyenne \pm SEM de 31 patients avec 5 échantillons par patient. * = $p < 0.05$ entre ligament adipeux de Hoffa et graisse sous-cutanée.

II. Influence du sexe sur la production des adipokines

Il est aujourd'hui bien établi qu'un dimorphisme sexuel existe quant à la production de la plupart des adipokines. C'est pourquoi, nous avons comparé la production des 2 hormones chez les hommes et chez les femmes.

Quel que soit le sexe des patients, le ligament adipeux de Hoffa reste toujours une importante source d'adiponectine comparée à la graisse sous-cutanée (Tableau IV.1). Pour la production de leptine, une différence significative est notée seulement pour les femmes entre les 2 tissus gras.

	Ligament de Hoffa		Graisse sous-cutanée	
	Adiponectine (pg/mg de tissu)	Leptine (pg/mg de tissu)	Adiponectine (pg/mg de tissu)	Leptine (pg/mg de tissu)
Homme	470,3±61,1	21,8±6,6	359,8±23,4 #	25,4±5,1
Femme	502,6±29,4	18,6±2,1	311±15,7 #	46,6±6,6 * #

Tableau IV.1 : Influence du genre sur la production d'adipokines dans le ligament adipeux de Hoffa et la graisse sous-cutanée.

Les adipokines ont été dosées par ELISA dans le surnageant des tissus graisseux placés dans du milieu de culture pendant 48h. Les données sont représentées sous la forme de moyenne \pm SEM de 31 patients avec 5 échantillons par patient. * = $p < 0.05$ entre hommes et femmes. # = $p < 0.05$ entre ligament de Hoffa et graisse sous-cutanée.

Les résultats figurant tableau IV.1 montrent que seule la production de leptine dans la graisse sous-cutanée chez les femmes est supérieure à celle observée avec les échantillons provenant des hommes. Aucune différence significative n'a été observée entre les 2 groupes pour la leptine dans le ligament adipeux de Hoffa et l'adiponectine dans les 2 tissus adipeux (Tableau IV.1).

En raison des différences observées entre les hommes et les femmes en terme de production de leptine, les analyses ultérieures ont été effectuées en considérant chaque genre séparément.

III. Influence de l'IMC sur la production des adipokines par le ligament adipeux de Hoffa et la graisse sous-cutanée

L'IMC apparaît comme un facteur déterminant pour la production de leptine par la graisse sous-cutanée chez les femmes. Mais de manière surprenante, nous avons mis en évidence une association négative entre les taux de leptine mesurés dans les surnageants de culture des échantillons de graisse sous-cutanée et l'IMC des patientes (Figure IV.8). Aucune relation significative n'a été trouvée chez les femmes pour la leptine produite par le ligament adipeux de Hoffa, ni pour l'adiponectine dans les 2 tissus gras.

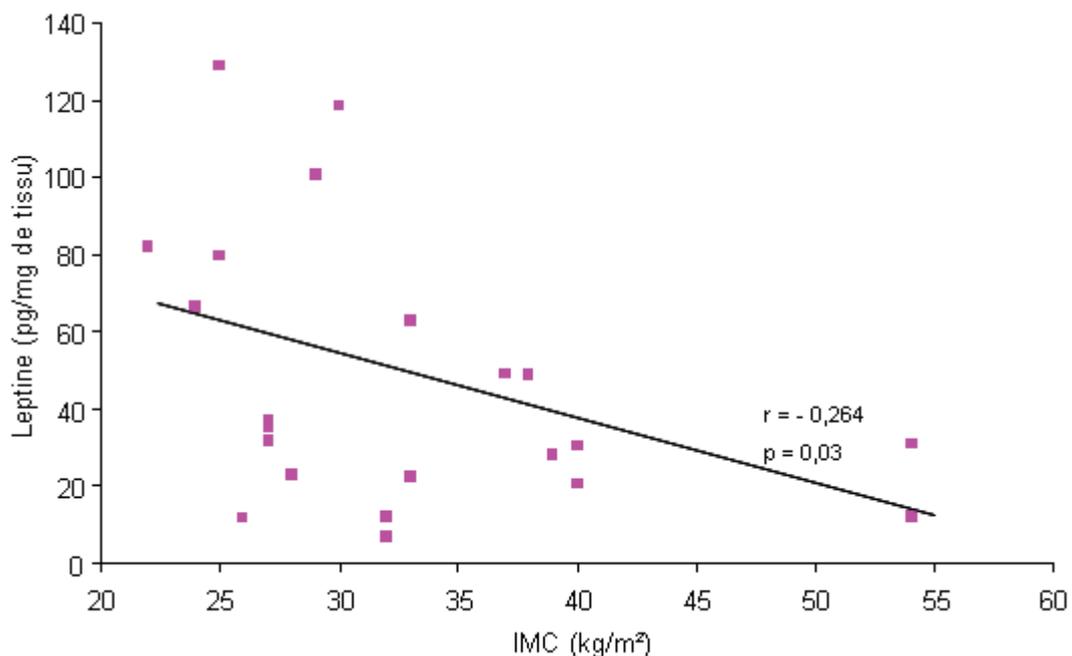


Figure IV.8 : Relation entre la production de leptine et l'IMC dans la graisse sous-cutanée chez les femmes.

La leptine a été dosée par ELISA dans le surnageant des tissus graisseux placés dans du milieu de culture pendant 48 heures. Les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne de 3 échantillons par patiente. La corrélation est calculée selon la méthode de Spearman (r , coefficient de corrélation). $p < 0,05$ considéré comme significatif.

Les analyses de corrélation montrent à l'inverse que pour le groupe des hommes, la production d'adiponectine par le ligament adipeux de Hoffa est directement reliée à l'IMC (Figure IV.9). Aucune association significative n'a été notée chez les hommes pour cette adipokine dans la graisse sous-cutanée et pour la leptine dans les 2 tissus adipeux.

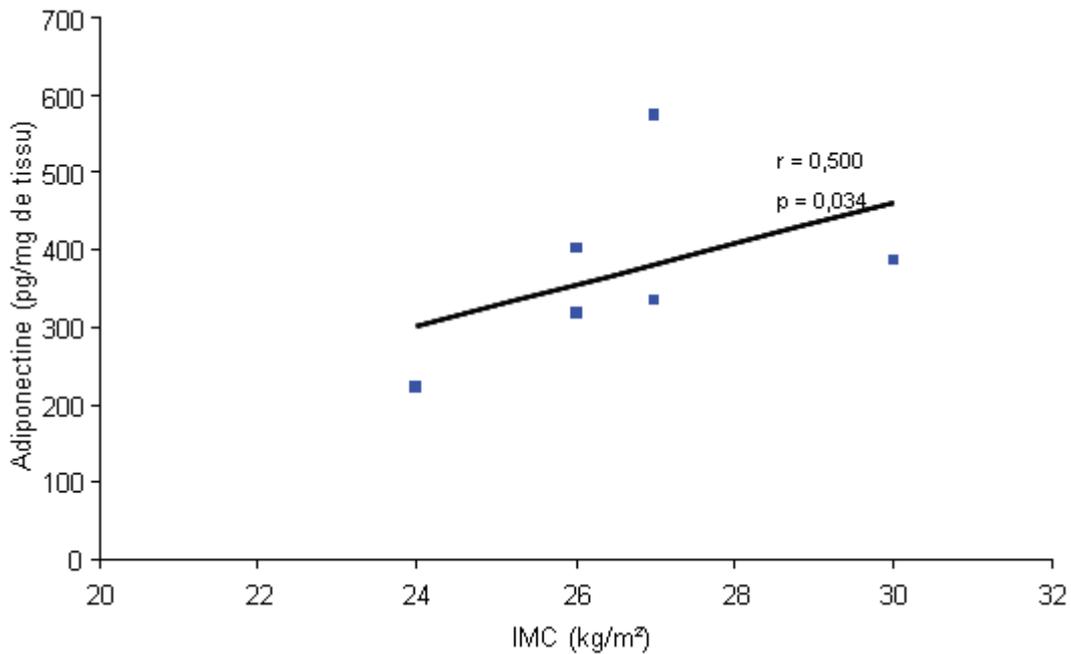


Figure IV.9 : Influence de l'IMC sur la production d'adiponectine dans le ligament de Hoffa chez les hommes.

L'adiponectine a été dosée par ELISA dans le surnageant des tissus graisseux placés dans du milieu de culture pendant 48 heures. Les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne de 3 échantillons par patient. La corrélation est calculée selon la méthode de Spearman (r , coefficient de corrélation). $p < 0.05$ considéré comme significatif.

IV. Relation entre le ligament adipeux de Hoffa et la graisse sous-cutanée

Lorsque la production de chaque adipokine est comparée dans les 2 tissus gras, seule la production d'adiponectine par le ligament adipeux de Hoffa est reliée à celle mesurée dans la graisse sous-cutanée quel que soit le genre (Figure IV.10). Aucune corrélation n'a été mise en évidence pour la leptine chez les femmes ($r = 0.098$, $p = 0.429$) ou chez les hommes ($r = -0.259$, $p = 0.174$).

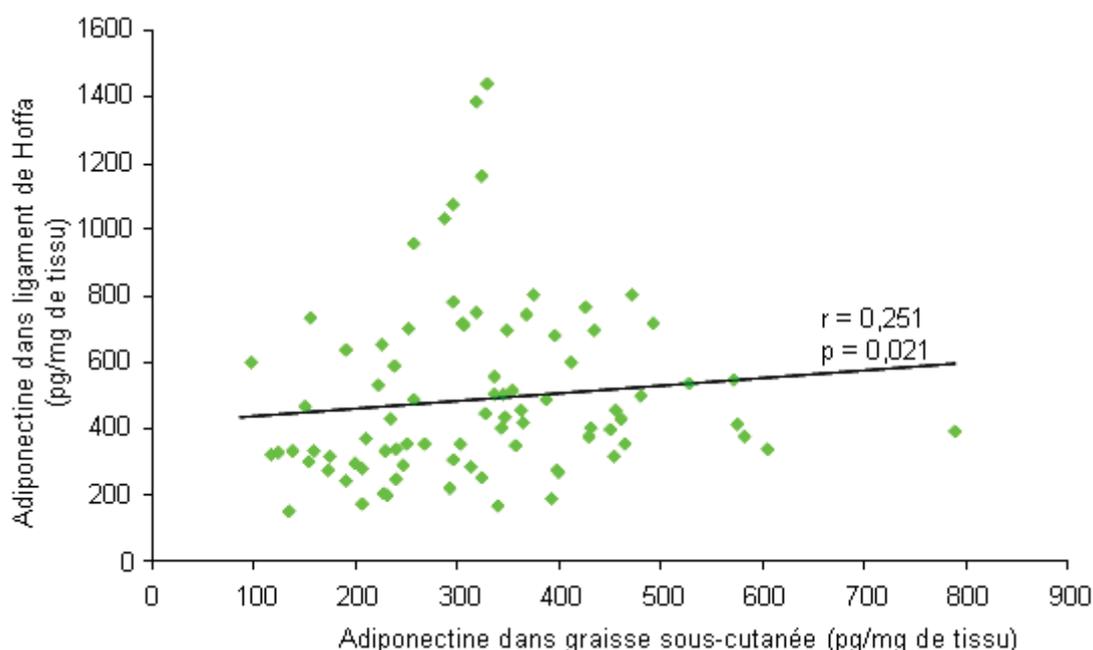


Figure IV.10 : Relation entre la production d'adiponectine dans le ligament adipeux de Hoffa et la production d'adiponectine dans la graisse sous-cutanée.

L'adiponectine a été dosée par ELISA dans le surnageant des tissus graisseux placés dans du milieu de culture pendant 48 heures. La corrélation est calculée selon la méthode de Spearman (r , coefficient de corrélation). $p < 0.05$ considéré comme significatif.

V. Relation entre la production de leptine et celle d'adiponectine

Le test de rang de Wilcoxon montre que les échantillons de ligament adipeux de Hoffa issus des femmes ayant les taux de leptine les plus élevés sécrètent également de grandes quantités d'adiponectine. La production des 2 adipokines par le ligament adipeux de Hoffa apparaît ainsi associée pour le groupe des femmes (Figure IV.11).

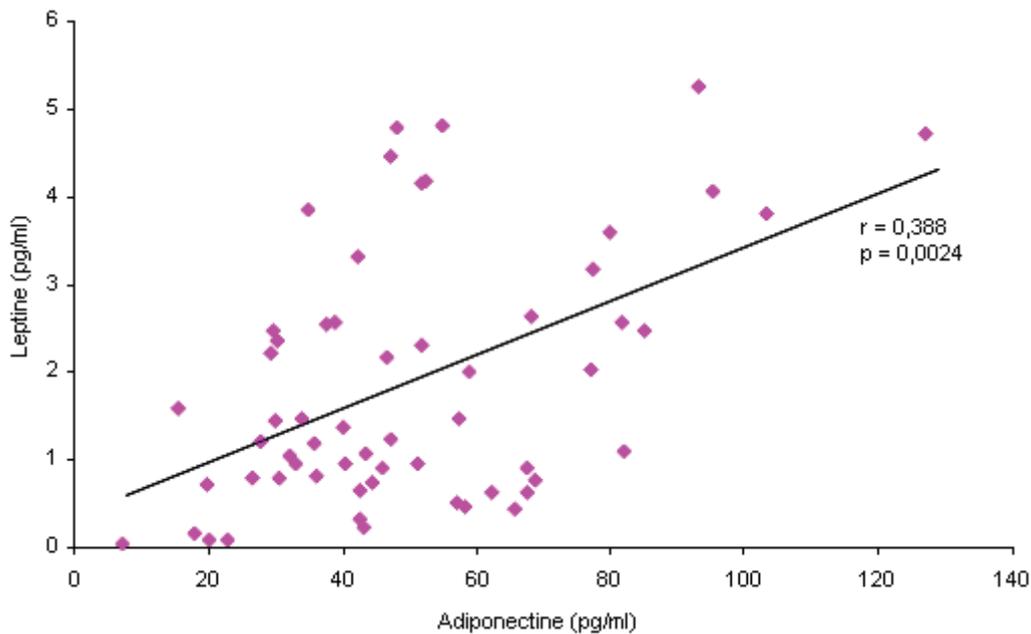


Figure IV.11 : Relation entre la production d'adiponectine et la production de leptine dans le ligament de Hoffa chez les femmes.

Les adipokines ont été dosées par ELISA dans le surnageant des tissus graisseux placés dans du milieu de culture pendant 48 heures. La corrélation est calculée selon la méthode de Spearman (r , coefficient de corrélation). $p < 0.05$ considéré comme significatif.

En revanche, aucune corrélation entre la production de leptine et celle d'adiponectine n'a été trouvée pour le groupe des femmes dans la graisse sous-cutanée ($r = 0.138$; $p = 0.283$). De même, la production d'adiponectine chez les hommes s'effectue indépendamment de celle de la leptine quel que soit le tissu adipeux considéré ($r = -0.0017$ et $p = 0.94$ pour le ligament adipeux de Hoffa ; $r = 0.033$ et $p = 0.889$ pour la graisse sous-cutanée).

VI. Effet du ligament de Hoffa sur le métabolisme chondrocytaire

Des pièces de ligament de Hoffa ont été maintenues en culture dans du milieu sans SVF pendant 48 heures. Le surnageant de culture ainsi obtenu, appelé milieu conditionné, a été mis au contact de biopsies de cartilage, des échantillons contrôles ayant été placés dans du milieu de culture.

Comme l'illustre la figure IV.12, le surnageant de culture du ligament adipeux de Hoffa augmente l'expression de la protéine du facteur de transcription Sox9 et ceci quelle que soit la sévérité des atteintes cartilagineuses (Figures IV.12 et IV.13).

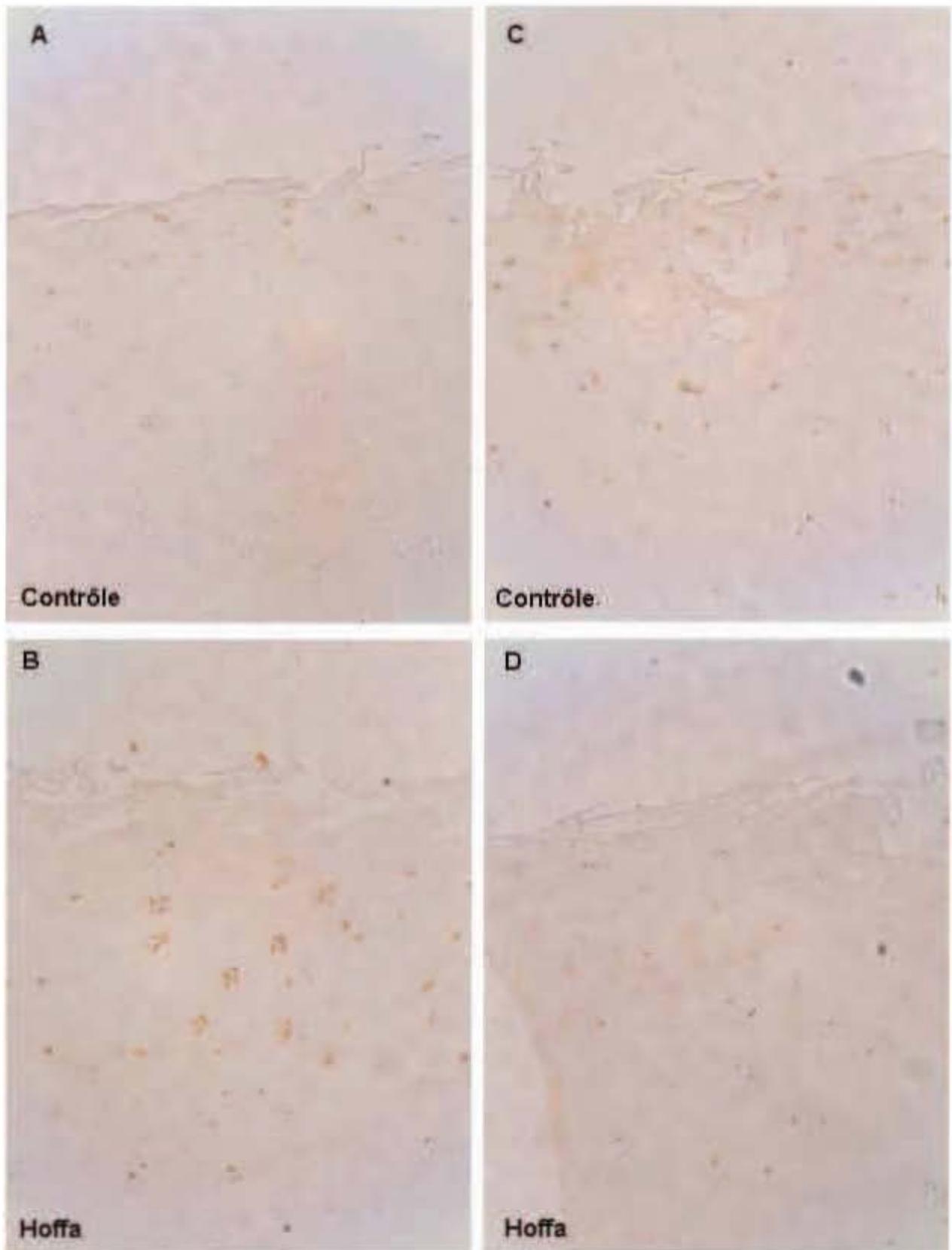


Figure IV.12 : Expression de Sox9 (A,B) et de MMP-13 (C,D) dans les biopsies de cartilage issues de patients arthrosiques.

Les biopsies sont mises au contact du milieu conditionné pendant 48 heures. Elles sont ensuite fixées dans du paraformaldéhyde 4% puis déshydratées et incluses dans la paraffine. Grossissement x 100

A l'inverse, la protéine responsable de la dégradation cartilagineuse, la MMP-13, semble elle voir sa production diminuée lorsque le cartilage est mis en contact avec le milieu conditionné (Figure IV.12). De manière intéressante, l'effet du milieu conditionné sur l'expression de la MMP-13 s'atténue fortement voire disparaît quand le cartilage est très dégradé (Figure IV.13).

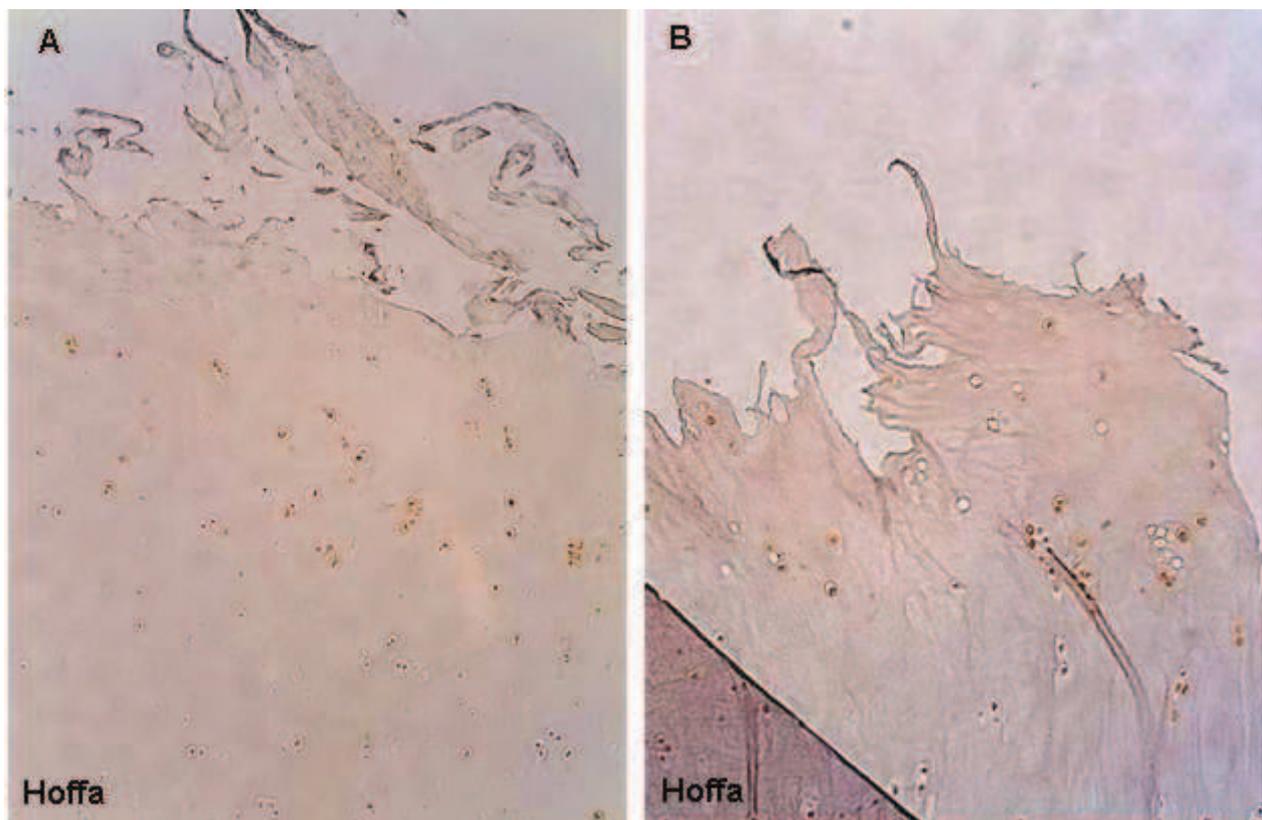


Figure IV.13 : Expression de Sox9 (A) et de la MMP-13 (B) dans les biopsies de cartilage ayant des atteintes sévères.

Les biopsies sont mises au contact du milieu conditionné pendant 48 heures. Elles sont ensuite fixées dans du paraformaldéhyde 4% puis déshydratées et incluses dans la paraffine. Grossissement x 100

Faits marquants

Quel que soit le tissu adipeux, la production d'adiponectine reste supérieure à celle de la leptine. Le ligament de Hoffa est la source majoritaire d'adiponectine alors que la leptine est davantage produite par la graisse sous-cutanée. Un dimorphisme sexuel en faveur des femmes est seulement observé pour la leptine dans la graisse sous-cutanée. Paradoxalement, la production de leptine par la graisse sous-cutanée est négativement reliée avec l'IMC chez les femmes et la production d'adiponectine dans le ligament de Hoffa évolue avec l'IMC des hommes.

La production d'adiponectine par le tissu adipeux infrapatellaire est associée à celle dans la graisse sous-cutanée et à la production de leptine.

De manière intéressante, le ligament adipeux de Hoffa augmente l'expression de Sox9 et diminue celle de la MMP-13.

Discussion

Le cartilage articulaire constitue le principal tissu cible de l'arthrose, mais d'autres structures anatomiques comme la membrane synoviale, les ligaments, la capsule ou les ménisques peuvent contribuer aux phénomènes dégénératifs en sécrétant des facteurs capables de modifier le métabolisme chondrocytaire. L'articulation du genou contient plus particulièrement le ligament de Hoffa qui comme tout tissu adipeux libère de nombreuses protéines. Il se situe sous la rotule entre le tendon rotulien, les condyles fémoraux et les plateaux tibiaux. Il remplit totalement les espaces entre ces structures et est en contact direct avec la membrane synoviale et le cartilage (Clockaerts *et al.* 2010). Ce tissu adipeux infrapatellaire a pour principale fonction de faciliter la diffusion du liquide synovial dans la cavité articulaire et d'absorber les chocs. Il est constitué d'un réseau fibreux dans lequel le tissu gras est retenu, et est richement vascularisé. Il contient également de nombreuses fibres nerveuses qui font de ce tissu une source de douleur importante. La résection du ligament de Hoffa lors d'une arthroplastie du genou permet en effet de réduire considérablement la douleur durant les six mois qui suivent l'intervention (Macule *et al.* 2005). Au cours de l'arthrose, les propriétés de sécrétion du ligament de Hoffa peuvent être accrues par les éventuelles interactions entre adipocytes et cellules inflammatoires puisqu'un infiltrat est retrouvé dans le tissu adipeux infrapatellaire de patients atteints d'arthrose (Jedrzejczyk *et al.* 1996).

Comme on pouvait s'y attendre, les deux tissus gras étudiés produisent de l'adiponectine et de la leptine. Toutefois, les deux adipokines se distinguent par les quantités produites, l'adiponectine étant la plus abondante. De manière intéressante, nous avons montré la production d'adiponectine dans le tissu gras infrapatellaire est directement reliée à celle de la leptine. Cette association positive est d'autant plus inattendue que les concentrations sériques de ces deux adipokines évoluent généralement de manière opposée : des taux élevés de leptine sont mesurés chez les individus obèses alors que ceux de l'adiponectine diminuent avec l'obésité. La relation mise en évidence chez l'homme entre l'expression de l'adiponectine dans le tissu adipeux et les concentrations circulantes de leptine (Zamboni *et al.* 2007) suggère en fait que la leptine pourrait moduler la sécrétion d'adiponectine dans les adipocytes. Il faut cependant noter que ces mécanismes de régulation doivent disparaître ou être perturbés dans la graisse sous-cutanée puisqu'aucune corrélation n'a été trouvée pour ce tissu adipeux.

Le ligament adipeux de Hoffa et la graisse sous-cutanée présentent des propriétés de sécrétion différentes pour les deux adipokines. Comme il avait été démontré par Distel *et al.* (2009), nos travaux ont identifié la graisse sous-cutanée comme la source majeure de leptine. Des études antérieures ont effectivement montré que les adipocytes provenant de ce tissu gras produisent davantage de leptine que ceux issus de la graisse viscérale (Dusserre *et al.* 2000) ; (Zha *et al.* 2009), ce qui suggère que le tissu gras infrapatellaire est plus proche de la graisse viscérale en terme de sécrétion de leptine. Toutefois, cette variation entre les deux types de graisse est seulement observée pour les femmes (Williams *et al.* 2000), ce qui explique l'absence de différence significative entre la graisse sous-cutanée et le ligament de Hoffa pour la sécrétion de leptine dans le groupe des hommes. De plus, la forte production de leptine observée dans les surnageants de culture des échantillons de graisse sous-cutanée est sans doute liée à la grande part de femmes incluses dans notre étude. A l'inverse, le ligament de Hoffa est une source importante d'adiponectine comparé à la graisse sous-cutanée. Ce tissu adipeux pourrait ainsi être à l'origine des taux élevés mesurés dans le liquide synovial de patients arthrosiques (Presle 2006) car s'il est vrai que les concentrations synoviales d'adiponectine sont inférieures aux taux circulants, il n'en demeure pas moins qu'elles sont de l'ordre du $\mu\text{g/ml}$ alors que celles des autres adipokines analysées sont de l'ordre du ng/ml . Bien que les taux plasmatiques d'adiponectine sont généralement plus importants chez les femmes du fait notamment de l'effet inhibiteur de la testostérone sur la synthèse de cette adipokine (Xu *et al.* 2005) ; (Nishizawa *et al.* 2002), aucune différence significative entre les

hommes et les femmes n'a été observée dans notre étude pour la production d'adiponectine par le ligament adipeux de Hoffa et la graisse sous-cutanée.

Les adipocytes constituent le principal type cellulaire impliqué dans la synthèse de l'adiponectine et de la leptine. Malgré la présence conjointe des adipocytes dans le ligament de Hoffa et la graisse sous-cutanée, il semble que la production de leptine dans les deux tissus adipeux soit régulée par des mécanismes différents. En effet, la sécrétion de leptine par le ligament de Hoffa s'effectue indépendamment de celle observée dans la graisse, et le dimorphisme sexuel mis en évidence dans la graisse sous-cutanée n'est pas retrouvé dans le ligament de Hoffa. De même, l'influence de l'IMC sur la production de leptine par la graisse sous-cutanée chez les femmes n'est pas retrouvée pour le tissu gras infrapatellaire. Cette relation négative mise en évidence entre l'IMC et la production de leptine par la graisse sous-cutanée est très surprenante puisqu'il est bien établi que les taux circulants de leptine augmentent avec l'IMC. Une étude réalisée chez la souris a montré en fait que l'expression du gène codant la leptine diminue chez les animaux obèses lorsqu'elle est rapportée à la masse de tissu gras (Guo *et al.* 2004). En revanche, il semble que des mécanismes de contrôle semblables régulent la sécrétion d'adiponectine dans le ligament de Hoffa et la graisse sous-cutanée puisque les productions dans les deux tissus adipeux apparaissent directement reliées. Contrairement à la leptine, l'IMC ne semble pas être un facteur déterminant pour la sécrétion d'adiponectine par le tissu gras infrapatellaire ou la graisse sous-cutanée. En fait, il semble que la production d'adiponectine soit davantage reliée aux acides gras libres ou à la sensibilité à l'insuline qu'à l'IMC (Weyer *et al.* 2001) ; (Plaisance *et al.* 2009) ; (Baratta *et al.* 2004).

Le rôle du ligament de Hoffa reste aujourd'hui méconnu mais plusieurs études antérieures indiquent qu'il constitue une source potentielle de nombreux facteurs susceptibles de moduler les fonctions chondrocytaires parmi lesquels l'IL-6, l'IL-8, la MCP-1, le VEGF, le bFGF et le TNF α (Ushiyama *et al.* 2003) ; (Distel *et al.* 2009) Nous avons montré que ce tissu adipeux se distingue notamment de la graisse sous-cutanée par sa capacité à sécréter de plus grandes quantités d'adiponectine. Ces données pourraient expliquer les taux de production élevés de ces facteurs, en particulier pour l'IL-6 et son récepteur soluble qui sont davantage produits par le ligament de Hoffa par rapport à la graisse sous-cutanée (Distel *et al.*, 2009). En effet, l'adiponectine induit la production d'IL-6 et de MCP-1 dans les chondrocytes de la lignée murine ATDC5 (Lago *et al.*, 2008) et celle du VEGF, de l'IL-6 et de l'IL-8 dans les fibroblastes synoviaux humains (Choi *et al.*, 2009). Dans ce contexte, nous avons cherché à déterminer l'influence du ligament de Hoffa sur les fonctions des chondrocytes. L'incubation de biopsies de cartilage prélevées sur des plateaux tibiaux de patients arthrosiques avec du

surageant de culture de ligament de Hoffa augmente l'expression de Sox9, un facteur de transcription impliqué dans la synthèse d'éléments spécifiques du cartilage, et diminue celle de la MMP-13 pour les échantillons de cartilage les moins dégradés. Ces résultats préliminaires obtenus avec quatre patients demandent à être confirmés, mais ils suggèrent déjà que le tissu gras infrapatellaire est capable de modifier le métabolisme chondrocytaire.

Chapitre 3 : Rôle de l'adiponectine dans l'arthrose : comparaison avec la leptine

La contribution de l'adiponectine au processus dégénératif a été examinée selon une stratégie qui a consisté à :

- déterminer la production d'adiponectine par les chondrocytes en fonction du genre et de l'IMC,
- établir une relation entre la production d'adiponectine et la sévérité des atteintes cartilagineuses,
- étudier les effets de l'adiponectine sur le métabolisme chondrocytaire.

Tout au long de ces travaux, l'adiponectine a été comparée à la leptine, une autre adipokine pour laquelle les effets sur le cartilage commencent aujourd'hui à être mieux connus.

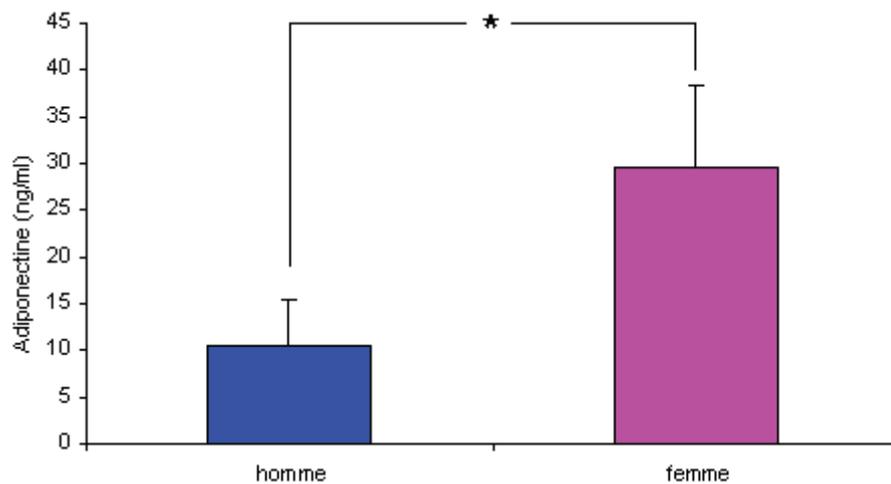
Les biopsies standardisées de cartilage prélevées dans différentes zones des plateaux tibiaux de 25 patients atteints d'arthrose du genou ont été placées dans du milieu de culture pendant 48 heures. Le surnageant a ensuite été conservé à -80°C en vue d'une mesure des taux d'adiponectine et de leptine. Pour 10 patients, les biopsies ont été incluses en paraffine. Un score histologique a été ensuite établi après une coloration à l'Hématoxyline-Eosine-Safran et à la safranine-O-Fast Green afin de classer les différentes biopsies selon 4 grades de sévérité.

I. Production d'adiponectine par les chondrocytes arthrosiques : influence du sexe

Une quantité importante d'adiponectine est retrouvée dans le surnageant de culture des biopsies de cartilage. Les concentrations mesurées sont ainsi de l'ordre du ng/ml, et de ce fait elle est beaucoup plus produite que la leptine dont les taux détectés sont de l'ordre du pg/ml.

Le cartilage provenant des femmes libère davantage d'adipokines que celui des hommes (Figure IV.14), la différence entre les groupes étant plus importante pour la leptine que pour l'adiponectine. Les chondrocytes présents dans les échantillons de cartilage issus des femmes produisent en effet 6 fois plus de leptine que ceux des hommes, contre une différence d'un facteur 3 pour l'adiponectine.

A



B:

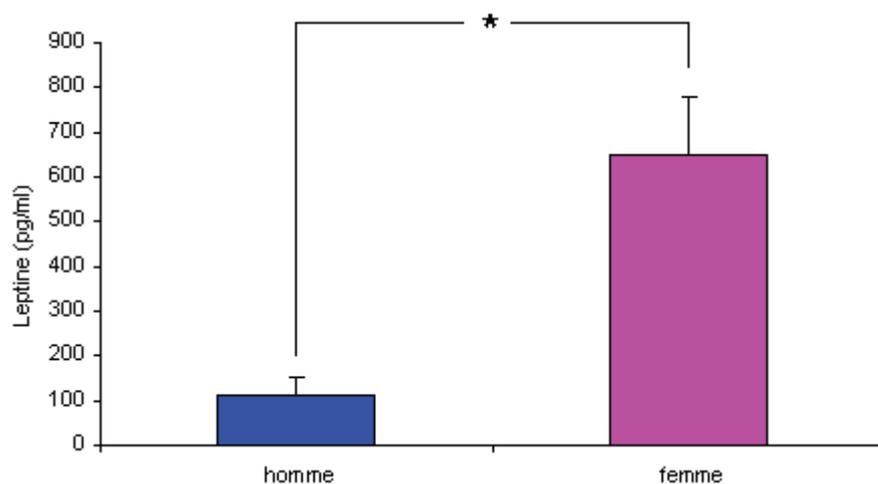


Figure IV.14 : Influence du sexe sur la production d'adiponectine (A) et de leptine (B) par des biopsies de cartilage.

Les adipokines ont été dosées par ELISA dans le surnageant des biopsies de cartilage placées dans du milieu de culture pendant 48 heures. Les données sont représentées sous la forme de moyenne \pm SEM de 25 patients avec au moins 8 échantillons par patient. * = $p < 0.05$ entre hommes et femmes

II. Influence de la sévérité des lésions cartilagineuses et de l'IMC sur la production d'adiponectine

Les biopsies ont été classées en 4 grades selon la sévérité des atteintes dégénératives, le grade 1 étant représentatif d'un état quasi-normal du cartilage et le grade 4 correspondant aux atteintes les plus sévères (Figure IV.15). Cependant, les biopsies de stade 4 ont été exclues de l'étude car il existe une indétermination importante des mesures par ELISA sans

doute liée à une grande variabilité de la hauteur des échantillons. Le score histologique utilisé est le score de Mankin qui considère à la fois l'état de la MEC et l'aspect cellulaire du tissu.

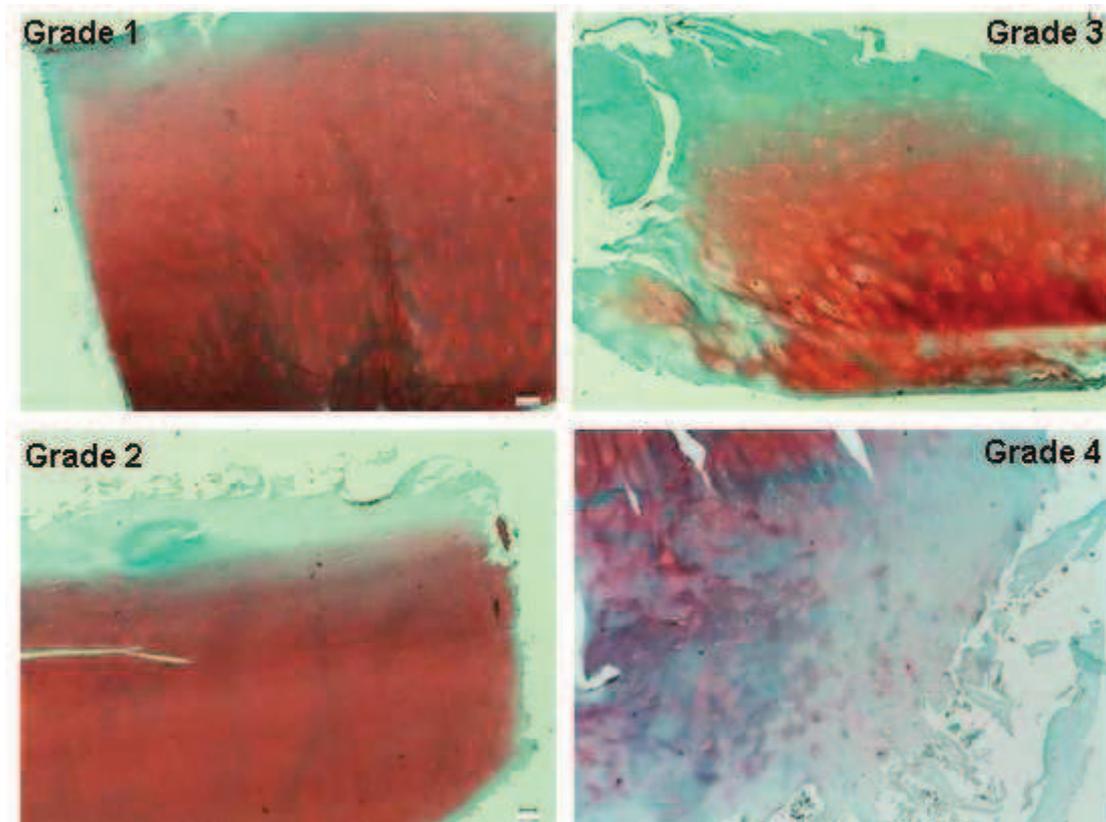


Figure IV.15 : Représentations des différents degrés d'atteintes cartilagineuses.

Une étude histologique (coloration à la Safranine-O-Fast Green) a été réalisée sur des coupes transversales de biopsies de cartilage, la classification allant du grade 1 (cartilage peu abîmé) au grade 4 (lésions sévères) Grossissement x 40.

Les résultats indiquent que la production d'adiponectine tend à s'accroître avec la sévérité des atteintes cartilagineuses (Figure IV.16). Cependant, le degré de sévérité à partir duquel la différence de production devient significative varie selon l'IMC des patients. Une hausse est ainsi observée entre les stades 1 et 2 pour les échantillons de cartilage issus de patients obèses alors qu'il faut atteindre le stade 3 pour voir la production d'adiponectine augmenter significativement pour ceux provenant de patients de poids normal ou en surcharge (Figure IV.16). La sécrétion d'adiponectine par les chondrocytes reste en revanche inchangée entre les stades 2 et 3 quel que soit l'IMC considéré. La figure IV.16 montre également que pour chaque stade de sévérité, la production d'adiponectine dans le cartilage n'est pas influencée par l'IMC puisqu'aucune différence significative n'est notée entre les deux groupes de patients.

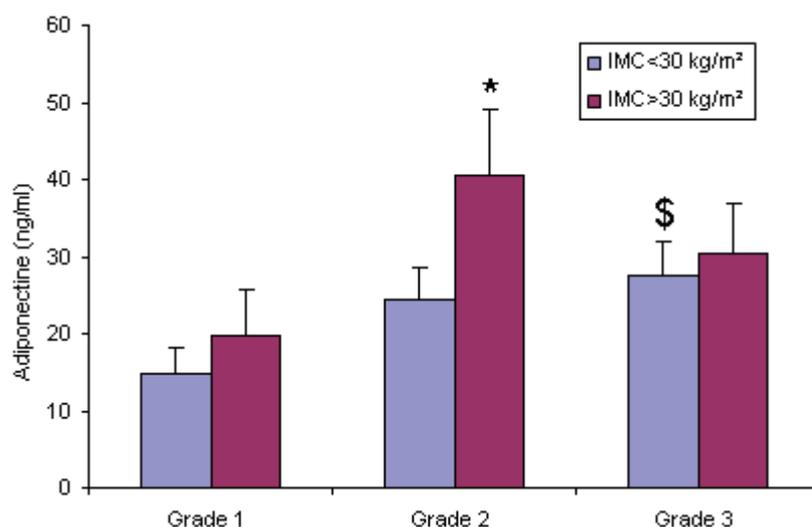


Figure IV.16 : Relation entre la sévérité des atteintes cartilagineuse et la production d'adiponectine en fonction de l'IMC.

Les taux d'adiponectine ont été mesurés dans le surnageant de culture de biopsies de cartilage prélevées dans différentes zones des plateaux tibiaux de patients arthrosiques (n = 10). Les scores histologiques ont été définis après une coloration à l'HES et à la Safranine-O-Fast Green. Les données sont représentées sous la forme de moyenne \pm SEM de 10 patients avec au moins 6 échantillons par patient. * = $p < 0.05$ entre les grades 1 et 2. \$ = $p < 0.05$ entre les grades 1 et 3

A l'inverse de ce qui a été observé avec l'adiponectine, la production de leptine apparaît davantage liée à la sévérité des lésions cartilagineuses. En effet, une évolution parallèle entre les taux de leptine et les grades a été mise en évidence pour les biopsies prélevées chez les patients de poids normal ou en surcharge (Figure IV.17). Il faut cependant noter que la différence entre les grades 1 et 2 n'est pas significative. En revanche, l'apparition des premières atteintes mais pas leur aggravation modifie la production de leptine pour les patients obèses (Figure IV.17). Les biopsies de grade 1 produisent effectivement de plus faibles quantités de leptine par rapport à celles de grade 2 et 3, mais la production de leptine ne s'accroît pas davantage entre les grades 2 et 3 pour ce groupe de patients (Figure IV.17). L'IMC est également un facteur déterminant pour la production de leptine. Les taux mesurés dans les surnageants de culture des échantillons de cartilage provenant de patients obèses sont ainsi 2 à 3 fois plus élevés que ceux des patients non obèses, et ceci quel que soit le grade de sévérité des atteintes (Figure IV.17).

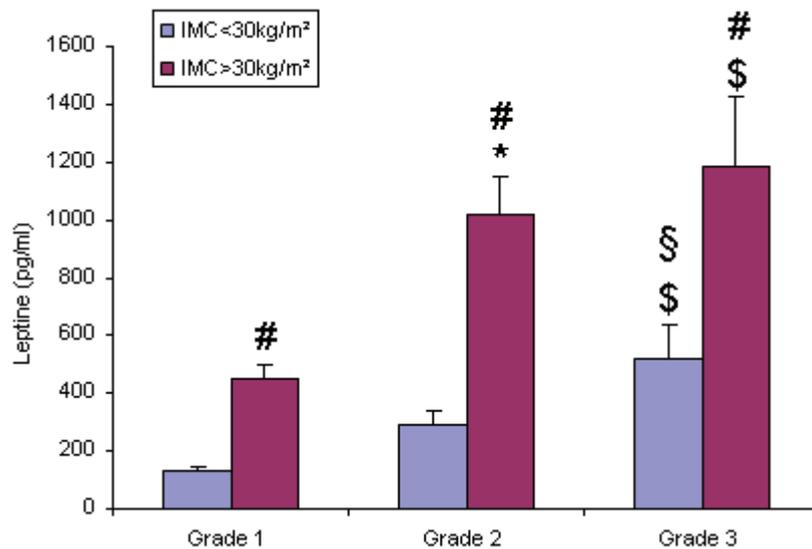


Figure IV.17 : Relation entre la sévérité des atteintes cartilagineuses et la production de leptine en fonction de l'IMC.

Les taux de leptine ont été mesurés dans le surnageant de culture de biopsies de cartilage prélevées dans différentes zones des plateaux tibiaux de patients arthrosiques (n = 10). Les scores histologiques ont été définis après une coloration à l'HES et à la Safran-O-Fast Green. Les données sont représentées sous la forme de moyenne \pm SEM de 10 patients avec au moins 6 échantillons par patient. * = $p < 0.05$ entre les grades 1 et 2. \$ = $p < 0.05$ entre les grades 1 et 3. § = $p < 0.05$ entre les grades 2 et 3. # = $p < 0.05$ entre IMC < 30 kg/m² et IMC > 30 kg/m².

Des analyses plus précises de la relation entre la production de leptine et l'IMC indiquent que la sécrétion de leptine par les chondrocytes est associée positivement avec l'IMC et ce de manière significative pour les 3 grades (Figures IV.18A, IV.18B et IV.18C).

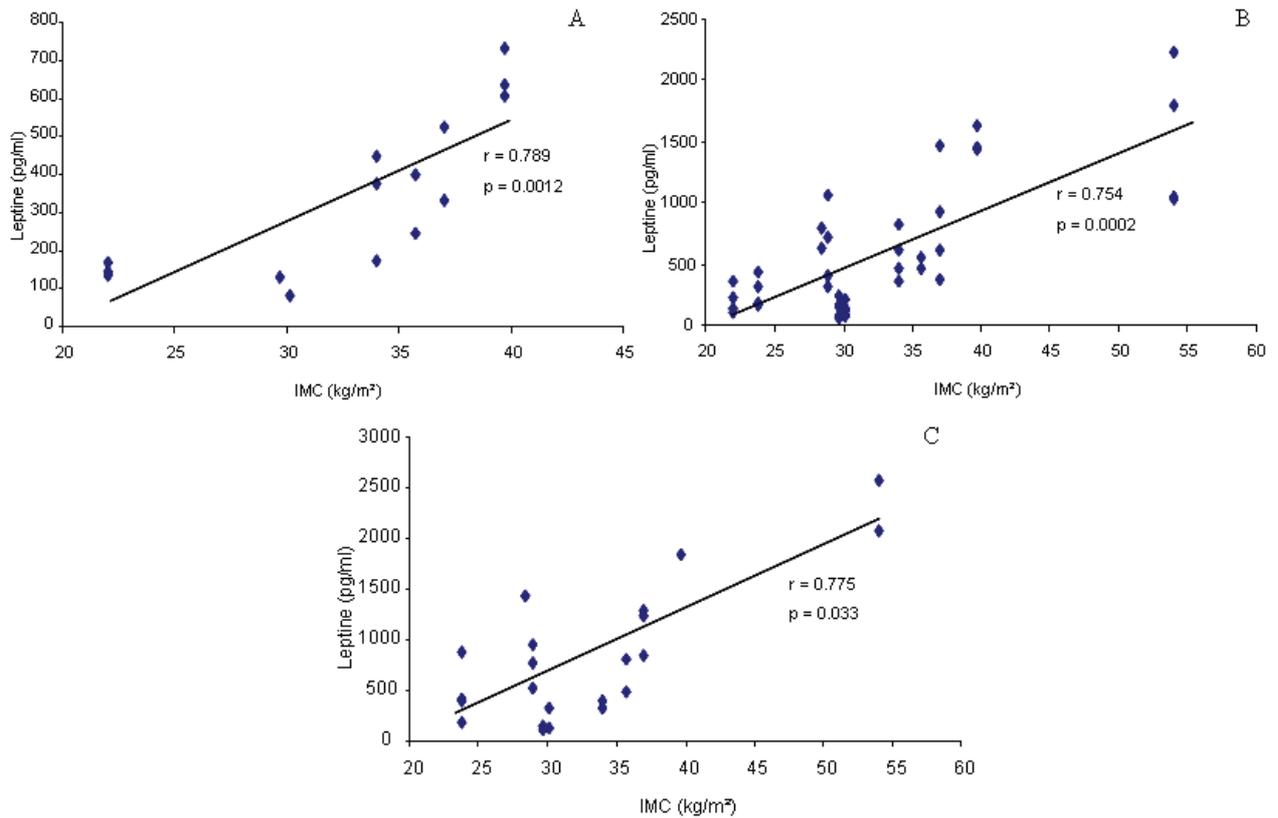


Figure IV.18 : Relation entre la production de leptine et l'IMC pour des biopsies de cartilage de grade 1(A), de grade 2 (B) et de grade 3 (C).

La leptine a été dosée par ELISA dans le surnageant des biopsies de cartilage placées dans du milieu de culture pendant 48 heures. Les corrélations sont calculées selon la méthode de Spearman (r, coefficient de corrélation). $p < 0.05$ considéré comme significatif.

III. Relation entre l'adiponectine et la leptine dans le cartilage

La relation entre l'adiponectine et la leptine a tout d'abord été étudiée au niveau des ARNs extraits à partir de chondrocytes fraîchement isolés du cartilage. Une association positive a ainsi été mise en évidence entre l'expression de l'adiponectine et celle de la leptine (Figure IV.19).

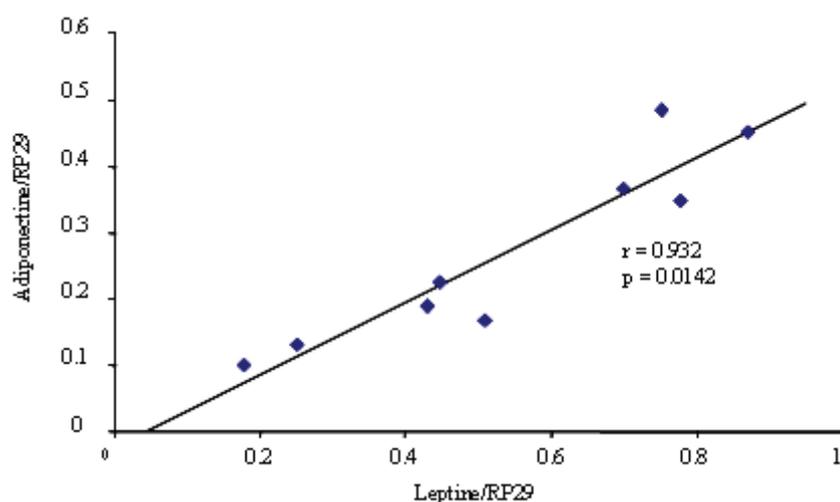


Figure IV.19 : Relations entre l'expression de l'adiponectine et celle de la leptine dans les chondrocytes.

L'expression de la leptine et de l'adiponectine a été évaluée par PCR en temps réel à partir d'ARNs extraits de chondrocytes fraîchement isolés du cartilage. Pour chaque patient, les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne de 3 échantillons. La corrélation est calculée selon la méthode de Spearman (r , coefficient de corrélation). $p < 0.05$ considéré comme significatif.

Afin de confirmer cette relation au niveau protéique, nous avons tenté d'établir des relations entre les 2 adipokines pour chaque grade de sévérité des atteintes cartilagineuses. Une relation positive lie les 2 adipokines lorsque le cartilage est peu abîmé (Figure IV.20). Cette association disparaît dès que les lésions cartilagineuses atteignent le grade 2 ($r = 0.241$, $p = 0.234$) et aucune relation n'a pu être trouvée entre la leptine et l'adiponectine pour des biopsies de cartilage très altérées.

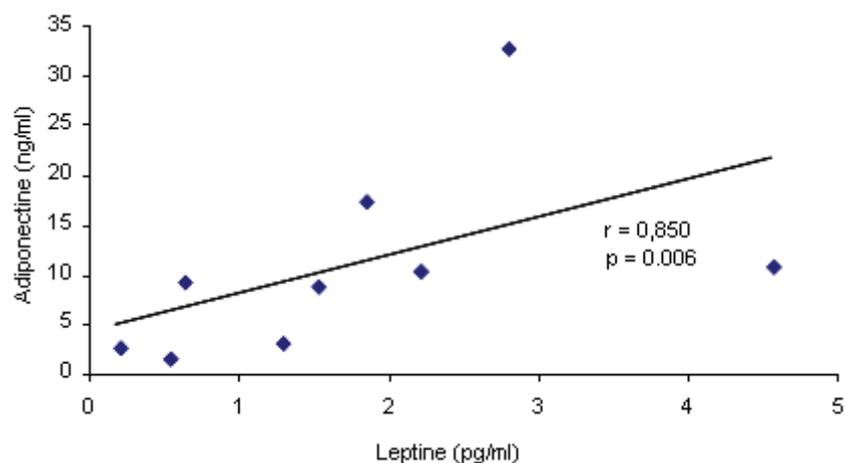


Figure IV.20 : Relation entre les productions d'adiponectine et de leptine pour les biopsies de cartilage de grade 1.

Les concentrations d'adipokines ont été déterminées dans le surnageant de culture des biopsies de cartilage de grade 1. La corrélation est calculées selon la méthode de Spearman (r , coefficient de corrélation). $p < 0.05$ considéré comme significatif.

IV. Relations entre l'expression de l'adiponectine et de ses récepteurs et celle d'éléments matriciels et de facteurs régulateurs du métabolisme chondrocytaire

Afin de préciser le rôle de l'adiponectine dans l'arthrose, l'expression de l'adiponectine et de ses récepteurs a été comparée à celle de différents gènes codant des constituants matriciels (collagène de type 2, agrécane) ou des facteurs régulateurs du métabolisme chondrocytaire (Sox9, MMP-13, TGF- β). Les ARNs ont été extraits à partir de chondrocytes fraîchement isolés de cartilage provenant de patients arthrosiques et ont été analysés par PCR en temps réel.

Aucune relation significative n'a été mise en évidence entre l'expression de l'adiponectine et celle de Sox9, de l'agrécane et du collagène de type 2. En revanche, l'expression de ses éléments apparaît directement associée à celle du récepteur AdipoR1 (Figure IV.21).

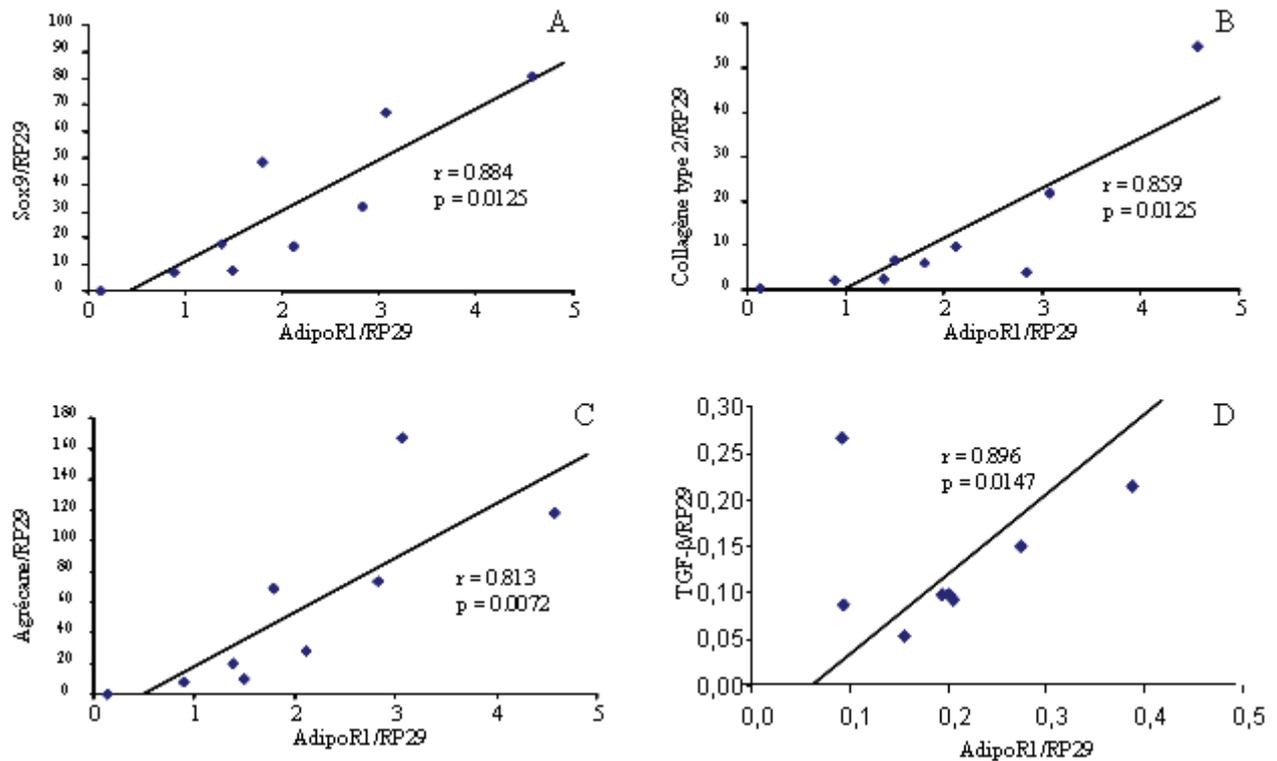


Figure IV.21 : Relations entre l'expression du récepteur à l'adiponectine AdipoR1 et celle de Sox9 (A), du collagène de type 2 (B), de l'agrécane (C) et du TGF- β (D).

L'expression des gènes est déterminée par PCR en temps réel à partir d'ARNs extraits de chondrocytes fraîchement isolés du cartilage. L'expression des gènes est normalisée avec un contrôle interne (RP29) et les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne de 3 échantillons par patient. Les corrélations sont calculées selon la méthode de Spearman (r , coefficient de corrélation). $p < 0.05$ considéré comme significatif.

A l'inverse, la MMP-13 et le TGF- β voient leur expression augmenter avec celle de l'adiponectine mais pas avec AdipoR1 (Figure IV.22).

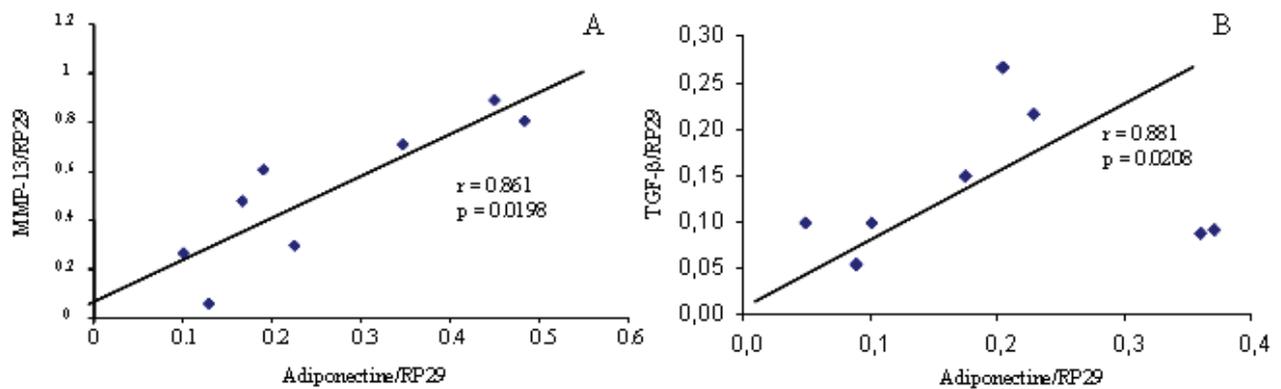


Figure IV.22 : Relations entre l'expression de l'adiponectine et celle de la MMP-13 (A) et du TGF- β (B).

L'expression des gènes est déterminée par PCR en temps réel à partir d'ARNs extraits de chondrocytes fraîchement isolés du cartilage. L'expression des gènes est normalisée avec un contrôle interne (RP29) et les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne de 3 échantillons par patient. Les corrélations sont calculées selon la méthode de Spearman (r , coefficient de corrélation). $p < 0.05$ considéré comme significatif.

Des analyses immunohistochimiques montrant l'expression du TGF- β , de la MMP-13 et de Sox9 ont été réalisées afin de confirmer au niveau protéique les données précédentes obtenues à partir d'ARNs. Les résultats indiquent que les biopsies de cartilage ayant les taux de production d'adiponectine les plus élevés expriment fortement le TGF- β et la MMP-13 (Figure IV.23).

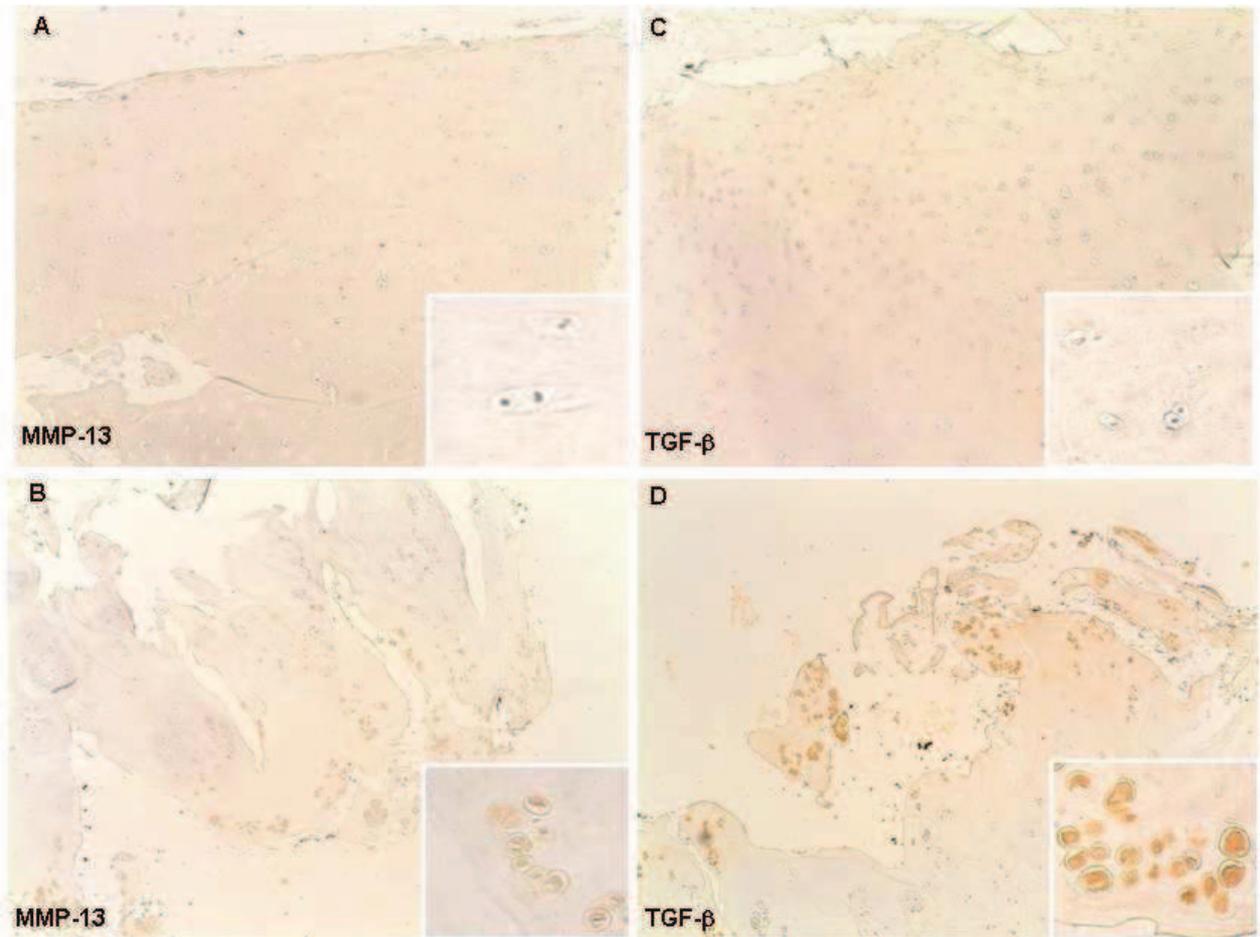


Figure IV.23 : Expression de la MMP-13 (A,B) et du TGF- β (C,D) dans les biopsies de cartilage issues de patients arthrosiques.

Les biopsies sont fixées dans du paraformaldéhyde 4% puis déshydratées et incluses dans la paraffine. Grossissement x 40 et x 200.

Aucune variation d'expression de Sox9 n'a été mise en évidence en fonction du degré de production de l'adiponectine par les différentes biopsies de cartilage (Figure IV.24).

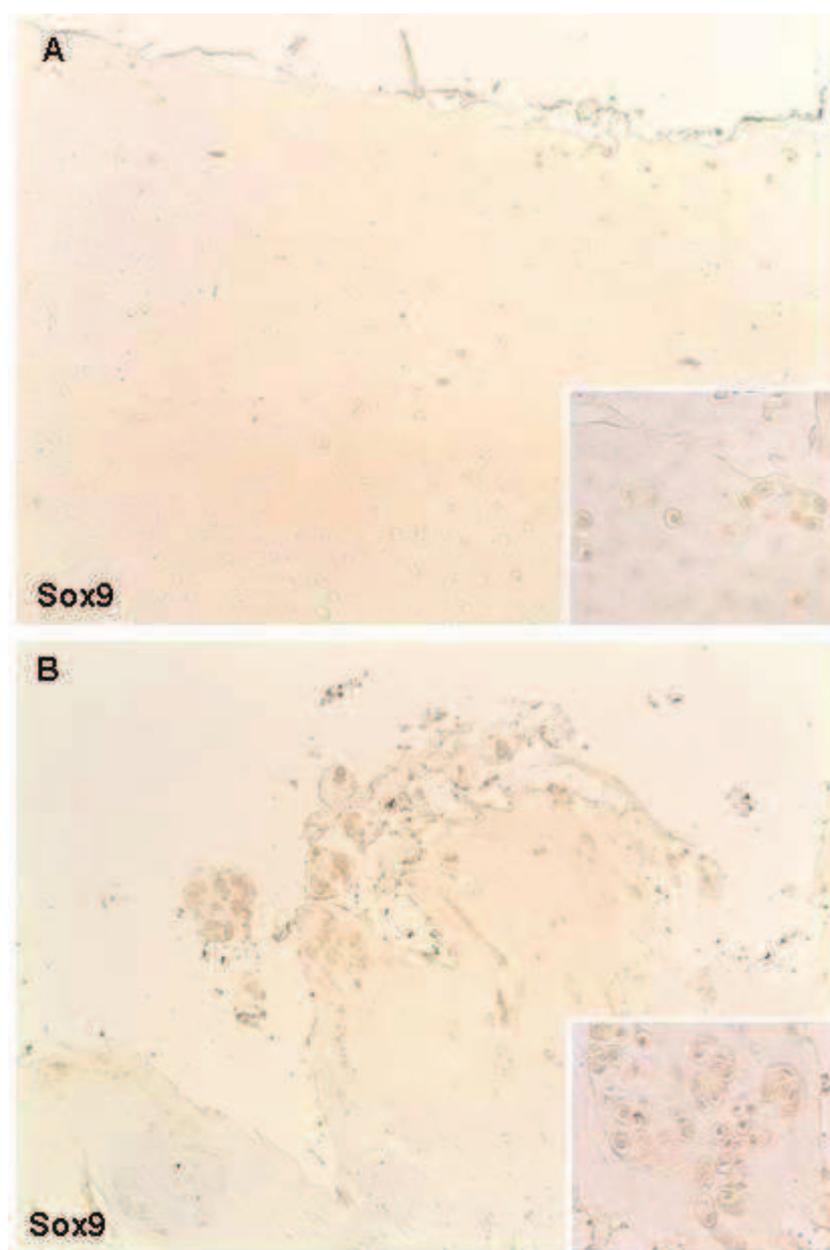


Figure IV.24 : Expression de Sox9 dans les biopsies de cartilage issues de patients arthrosiques.

Les biopsies sont fixées dans du paraformaldéhyde 4% puis déshydratées et incluses dans la paraffine. Grossissement x 40 et x 200.

V. Effet d'un traitement à l'adiponectine

Des chondrocytes issus de patients arthrosiques ont été traités par de l'adiponectine pendant 24 heures. Les doses de 1 et 5 $\mu\text{g/ml}$ ont été établies selon les concentrations physiologiques retrouvées dans le liquide synovial de patients atteints d'arthrose. Pour éviter tout effet secondaire lié à la présence d'endotoxines dans la solution de protéine recombinante, la stimulation à l'adiponectine a été réalisée en présence de polymixine B. Une

étude utilisant un gène cible connu de l'adiponectine (PPAR α) a été préalablement entreprise afin de vérifier l'absence d'effet de la polymixine B sur la réponse chondrocytaire à l'adiponectine.

L'adiponectine induit bien une réponse dans le chondrocyte puisque l'expression de PPAR α augmente par rapport à des cellules non stimulées (Figure IV.25). Aucune différence significative n'a été mise en évidence suite à l'ajout de polymixine B dans le milieu de traitement (Figure IV.25). Cette étude indique également qu'une concentration de 5 μ g/ml est nécessaire pour induire une réponse significative des chondrocytes à l'adiponectine car seule une tendance à la hausse est observée à 1 μ g/ml (Figure IV.25).

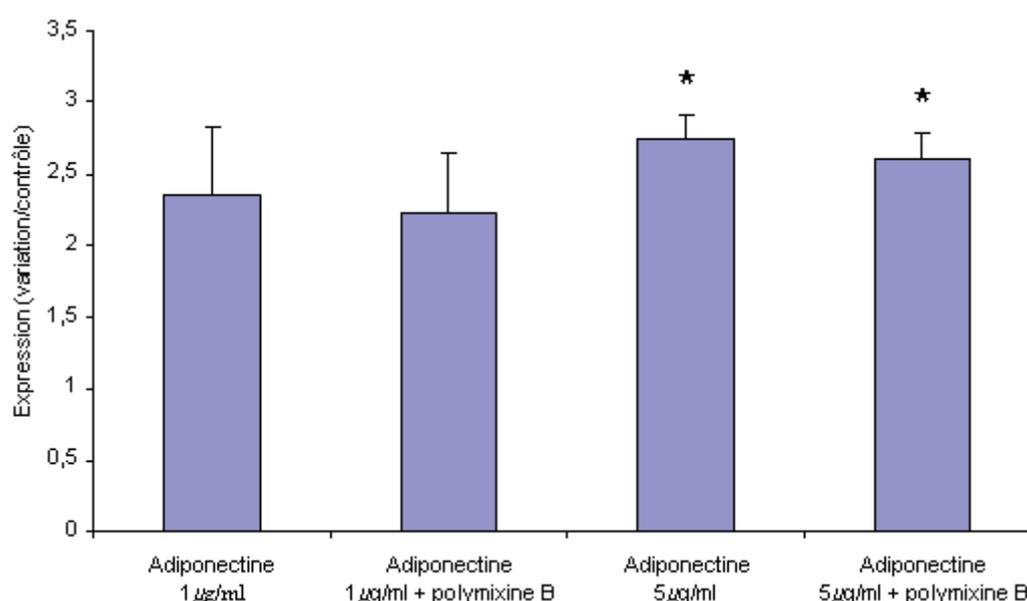


Figure IV.25 : Effet de la polymixine B sur la réponse des chondrocytes à l'adiponectine.

Des chondrocytes cultivés en monocouche au passage P1 ont été stimulés par de l'adiponectine (1 et 5 μ g/ml) en présence ou non de polymixine B (10 μ g/ml). L'expression de PPAR α est analysée par PCR en temps réel après 24 heures de traitement.

Les expériences ont été faites en triplicate avec 3 patients. Les résultats représentent la variation d'expression observée par les chondrocytes traités à l'adiponectine par rapport aux cellules non traitées et sont exprimés sous la forme de moyenne \pm SEM. * = $p < 0.05$ entre chondrocytes témoins et traités.

L'expression des différents gènes a été étudiée avec des chondrocytes cultivés en monocouche au passage P1 avec une concentration d'adiponectine de 5 μ g/ml. Aucun changement significatif de l'expression des gènes codant Sox9, l'agrécane ou le collagène de type 2 n'a été remarqué. Les analyses de RT-PCR en temps réel montrent à l'inverse un effet significatif de l'adiponectine sur l'expression du TGF- β et de la MMP-13 (Figure IV.26).

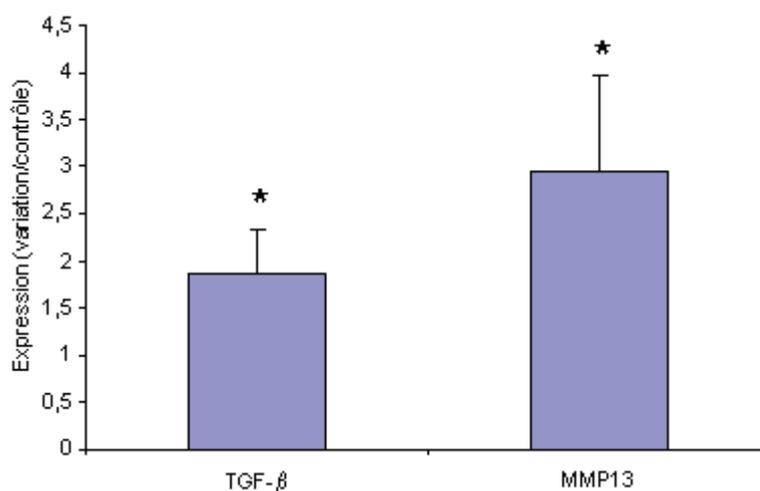


Figure IV.26 : Effet de l'adiponectine sur l'expression du TGFβ et de la MMP-13 sur des chondrocytes obtenus à partir de patients arthrosiques.

Après 24 heures de traitement avec 5 µg/ml d'adiponectine, les ARNs sont extraits et l'expression des gènes est analysée par PCR en temps réel. Pour chaque patient (n=4), les expériences ont été réalisées en triplicate. Les résultats représentent la variation d'expression observée pour les chondrocytes traités par rapport aux cellules non traitées et sont exprimés sous la forme moyenne ± SEM. * = p<0.05 entre chondrocytes témoins et traités.

Faits marquants

Les travaux réalisés au cours de cette étude suggèrent un effet de l'adiponectine dans l'arthrose :

- De grandes quantités d'adiponectine sont mesurées dans le surnageant de culture d'échantillons de cartilage, en particulier chez les femmes.
- La production d'adiponectine varie selon l'état de la MEC mais est indépendante de l'IMC.
- L'expression du récepteur AdipoR1 est associée à celle de Sox9, du TGF-β, de l'agrécane et du collagène de type 2 alors que l'expression de l'adiponectine est directement reliée à celle du TGF-β et de la MMP-13.
- Un traitement des chondrocytes par l'adiponectine induit l'expression du TGF-β et de la MMP-13 mais pas celle de Sox9.
- Une synthèse élevée de la MMP-13 et du TGF-β est observée dans les biopsies de cartilage produisant de grandes quantités d'adiponectine.

Discussion

Suite à la mise en évidence de l'adiponectine dans le liquide synovial de patients arthrosiques (Schaffler *et al.* 2003), (Presle *et al.*, 2006), plusieurs études ont tenté de caractériser le rôle de cette adipokine dans la physiopathologie de l'arthrose. S'il est aujourd'hui bien établi que les chondrocytes expriment le récepteur à l'adiponectine, les effets de cette adipokine sur les fonctions chondrocytaires restent encore controversés. Les premiers travaux réalisés par Chen *et al.* ont suggéré un effet protecteur de l'adiponectine puisqu'elle augmente l'expression du TIMP-2 et s'oppose à celle de la MMP-13 induite par l'IL-1. A l'inverse, Lago *et al.* ont montré plus récemment que l'adiponectine stimule l'expression de iNOS, de l'IL-6, de la MCP-1 et des MMP-3 et -9 dans les chondrocytes (Lago *et al.* 2008). Des études attribuent en fait à cette adipokine des propriétés délétères pour l'articulation car en plus des effets observés sur les chondrocytes, elle favorise la production d'IL-6, d'IL-8, de PGE₂, du VEGF et des MMP-1 et -13 dans les synoviocytes de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Ehling *et al.*, 2006) ; (Choi *et al.*, 2009) ; (Tan *et al.* 2009). Les résultats établis par Filkova *et al.* (Filkova *et al.* 2009) confirment la contribution de l'adiponectine dans le processus dégénératif puisqu'ils mettent en évidence des taux sériques d'adiponectine plus élevés chez les femmes atteintes d'une forme érosive d'arthrose de la main comparé à des patientes ayant une forme non érosive.

Dans ce contexte, nous avons cherché à mieux comprendre le rôle de l'adiponectine dans l'arthrose. Nous avons tout d'abord mis en évidence une production élevée d'adiponectine par le cartilage, supérieure à celle de la leptine, corroborant ainsi les résultats précédemment trouvés avec le ligament adipeux de Hoffa. Plusieurs tissus articulaires constituent alors des sources importantes d'adiponectine sans doute à l'origine des taux élevés mesurés dans le liquide synovial de patients arthrosiques (Presle *et al.* 2006).

De manière intéressante, le dimorphisme sexuel qui caractérise la plupart des adipokines se retrouve également pour le cartilage. Les échantillons cartilagineux issus des femmes sécrètent en effet davantage de leptine et d'adiponectine comparé à ceux provenant des hommes. Ces résultats suggèrent que les mécanismes de régulation de l'expression de ces deux adipokines dans les chondrocytes sont semblables à ceux qui existent dans d'autres tissus. Ainsi, la testostérone et les acides gras sont capables de réduire la production d'adiponectine par les adipocytes (Xu *et al.* 2005), (Bueno *et al.* 2008), et la sécrétion de leptine par les adipocytes est stimulée par les oestrogènes (Machinal-Quelin *et al.* 2002).

En plus du genre, l'IMC est un facteur déterminant pour la production des adipokines. Il est aujourd'hui bien établi que les concentrations sériques de leptine et d'adiponectine évoluent de manière opposée avec l'IMC : la leptine augmente chez les individus obèses alors que les taux circulants d'adiponectine sont les plus élevés chez les personnes de faible IMC. Une tendance équivalente est retrouvée dans le cas de la leptine pour le cartilage. Quelle que soit la sévérité des atteintes, la quantité de leptine produite est toujours plus importante pour les échantillons de cartilage provenant de patients obèses, et une association positive entre l'IMC et la production de leptine par les chondrocytes a pu être mise en évidence, confirmant ainsi au niveau protéique les données de Simopoulou obtenues avec les ARNs (Simopoulou *et al.* 2007). En revanche, la production d'adiponectine n'est pas significativement modifiée par l'IMC des patients. En fait, la relation entre l'adiponectine et l'IMC n'est pas aussi clairement définie que celle qui existe pour la leptine, et il semble même que les taux circulants d'adiponectine soient davantage reliés aux lipides sériques ou à la sensibilité à l'insuline (Baratta *et al.*, 2004) ; (Heliovaara *et al.* 2006) ; (Vozarova *et al.* 2002). L'ensemble de ces résultats suggère une nouvelle fois que la production de leptine et d'adiponectine dans le cartilage est régulée par des mécanismes proches de ceux rencontrés dans d'autres tissus de l'organisme.

Le point fort de nos travaux a été de définir la relation potentielle entre la production d'adiponectine et la sévérité des atteintes cartilagineuses. La validité de l'approche expérimentale a pu être établie en reproduisant cette étude avec la leptine. Conformément aux travaux antérieurs qui ont mis en évidence une plus forte expression de la leptine dans les zones de cartilage les plus abîmées (Dumond *et al.* 2003) ; (Simopoulou *et al.* 2007), la production de leptine mesurée par ELISA dans les surnageants de culture de biopsies de cartilage apparaît directement reliée à la sévérité des lésions. Cette étude apporte un élément supplémentaire par rapport aux études antérieures puisqu'elle montre que cette relation varie avec l'IMC des patients. En effet, pour les patients de poids normal ou en surcharge, la production de leptine évolue bien progressivement avec la sévérité des atteintes. En revanche, chez les patients obèses, la quantité de leptine produite par les chondrocytes augmente entre les grades 1 et 2, mais pas entre les grades 2 et 3. Comme l'avaient démontré précédemment Simopoulou *et al.* au niveau des ARN, la production de leptine dans les chondrocytes est très importante chez les patients obèses y compris pour les biopsies de cartilage peu dégradées. Il en résulte que les taux mesurés dans le surnageant de culture des échantillons de grade 1 des patients obèses sont équivalents à ceux détectés dans le surnageant des biopsies de grade 3 des

patients non obèses. Ces données suggèrent que l'IMC est un paramètre déterminant pour établir une relation entre la production de leptine et la sévérité des lésions.

La production d'adiponectine est également modifiée par l'état de la matrice cartilagineuse selon l'IMC des patients, mais elle n'évolue pas directement en fonction de la sévérité des lésions. La quantité d'adiponectine mesurée dans les surnageants de culture des échantillons de cartilage augmente ainsi de manière significative entre les grades 1 et 2 pour les patients obèses et entre les grades 1 et 3 pour les patients de poids normal ou en surcharge. Elle reste cependant inchangée entre les grades 2 et 3 quel que soit l'IMC. Ces résultats indiquent que cette adipokine ne peut pas être considérée comme un marqueur de sévérité, mais elle atteste de l'apparition des lésions, la hausse d'adiponectine survenant à un stade de dégradation moins avancé pour les patients obèses.

Suite à ce constat, nous avons cherché à déterminer si l'adiponectine est capable de moduler le métabolisme chondrocytaire. Nous avons ainsi montré par PCR en temps réel que l'expression du collagène de type 2, de l'agrécane et du facteur de transcription responsable de leur synthèse, Sox9, dans les chondrocytes fraîchement isolés du cartilage est directement associée à celle d'AdipoR1, mais pas à l'adiponectine elle-même. Un résultat inverse a été obtenu avec la MMP-13 qui est reliée à l'adiponectine mais pas à son récepteur. Seul le TGF- β voit son expression évoluer avec celle de l'adiponectine et de son récepteur. Il semble donc que l'adiponectine soit bien un agent impliqué dans la régulation du métabolisme chondrocytaire, mais selon les facteurs considérés, l'adipokine elle-même et/ou son récepteur constituent des éléments clés du processus de contrôle. Nous avons souhaité confirmer au niveau protéique les données obtenues avec les ARNs par PCR en temps réel. En raison de l'absence d'anticorps spécifiques de l'adiponectine validés pour des analyses immunohistochimiques en coupe paraffine, nous avons tenté de relier les taux de production mesurés dans les surnageants de culture des biopsies à l'expression du TGF- β et de la MMP-13 évaluée par immunohistochimie. Aucune relation entre la synthèse de Sox9 dans les échantillons de cartilage et la production d'adiponectine n'a été mise en évidence, ce qui confirme que AdipoR1 et non son ligand, est le facteur déterminant pour la synthèse de ce facteur de transcription. En revanche, les relations établies dans cette étude entre l'expression de l'adiponectine et celle du TGF- β et de la MMP-13 mettent en évidence les propriétés régulatrices de l'adipokine sur le métabolisme chondrocytaire. La réponse des chondrocytes à l'adiponectine conforte le rôle prépondérant de l'adipokine pour l'expression de la MMP-13 et du TGF- β , celle de Sox9 devant être davantage reliée à AdipoR1.

En validant *in vitro* les relations observées *in vivo* à partir d'échantillons de cartilage provenant de patients atteints d'arthrose, nous avons pu préciser au cours de ce travail expérimental, la contribution de cette adipokine dans l'arthrose. Tout comme la leptine, l'adiponectine pourrait avoir un rôle ambivalent en favorisant d'une part l'expression de facteurs de croissance, de constituants matriciels et d'inhibiteurs de MMPs (Chen *et al.*, 2006), et d'autre part, celle de MMPs, de iNOS et d'IL-6 (Lago *et al.*, 2008). Cette ambivalence peut en fait être liée au degré d'oligomérisation de l'adiponectine qui est déterminant pour son activité biologique. Les effets de l'adiponectine sur la sensibilité à l'insuline sont ainsi davantage conditionnés par le rapport entre les différentes formes plutôt que par la concentration absolue de l'adiponectine dans le sérum (Pajvani *et al.* 2004). De plus, les formes de haut poids moléculaires semblent avoir des propriétés pro-inflammatoires (Haugen et Drevon 2007) ; (Song *et al.* 2009) alors que celles de bas poids moléculaires semblent plutôt anti-inflammatoires (Wolf *et al.* 2004) ; (Neumeier *et al.* 2006). Des trimères, des hexamères et des complexes de haut poids moléculaires sont retrouvés au niveau circulant, mais d'après Chen *et al.* (2006), le liquide synovial de patients arthrosiques est plus riche en trimères et à l'inverse contient moins de complexes de haut poids moléculaire par rapport au sérum. Une variation de la répartition entre les différentes formes d'adiponectine ainsi que de l'expression des récepteurs peut apparaître au cours du développement de l'arthrose et être à l'origine d'une variabilité de réponse des chondrocytes à cette adipokine. Par ailleurs, plusieurs formes d'adiponectine sont disponibles sur le marché selon la taille du monomère et le système de production qui peut influencer les modifications post-traductionnelles de la protéine. Les différences d'activité biologique de l'adiponectine selon son origine, et les variations d'expression des récepteurs selon le mode culture et le passage des cellules rendent plus difficiles les interprétations des données obtenues *in vitro* et limitent l'extrapolation des résultats aux situations physiologiques. Ainsi, l'absence de précisions sur la nature de la protéine recombinante utilisée par Lago *et al.* (2008) empêche toute comparaison avec d'autres études.

Chapitre 4 : Influence de l'obésité sur la réponse des chondrocytes à la leptine

L'obésité est caractérisée par une hyperleptinémie circulante qui se retrouve également dans les articulations des patients arthrosiques obèses. Ces derniers ont en effet des niveaux de leptine élevés dans le liquide synovial (Dumond *et al.* 2003) et une expression importante de la leptine dans le cartilage par rapport aux patients de poids normal (Simopoulou *et al.*, 2007). L'absence d'effet de la leptine sur la satiété et la dépense énergétique chez les individus obèses malgré des taux sériques très élevés, suggère un état de résistance. De nombreux travaux ayant mis en évidence le rôle de la leptine sur les fonctions chondrocytaires, cette étude a été entreprise pour déterminer si une perte d'activité liée à l'hyperleptinémie intra-articulaire existe aussi pour le cartilage.

L'influence de l'obésité sur la réponse des chondrocytes à la leptine a ainsi été étudiée en évaluant l'expression de composants spécifiques du cartilage (agrécan, collagène de type 2) et de facteurs régulateurs du métabolisme chondrocytaire (IGF-1, TGF- β , MMPs, TIMPs) ou de l'inflammation (iNOS, COX2, IL-1 β) après traitement des cellules par différentes doses de leptine (20, 100 et 500 ng/ml). Deux groupes ont ainsi été définis selon l'IMC des patients à partir desquels ont été isolés les chondrocytes. Le premier groupe représente les patients de poids normaux ou en surcharge, c'est-à-dire ayant un IMC < 30 kg/m² (n=12, 4 hommes et 8 femmes ; âge moyen = 70,1 \pm 10,7 ans ; IMC moyen = 26,5 \pm 2,3 kg/m²). Le deuxième groupe représente les patients obèses avec un IMC > 30 kg/m² (n=13, 5 hommes et 8 femmes ; âge moyen = 67,8 \pm 8,5 ans ; IMC moyen = 35,1 \pm 3,7 kg/m²). Aucune différence significative de l'âge ou du genre n'a été observée entre les 2 groupes.

I. Expression basale des gènes dans les chondrocytes non stimulés

L'expression des différents gènes étudiés a d'abord été évaluée dans les chondrocytes non stimulés. Les résultats indiquent que les cellules obtenues à partir de patients obèses expriment de façon plus importante tous les gènes analysés à l'exception du collagène de type 2 et de COX-2 par rapport aux cellules provenant de patients non obèses (Figure IV.27). En ce qui concerne iNOS et l'IL-1 β , aucun ARNm n'est détecté dans les chondrocytes non stimulés.

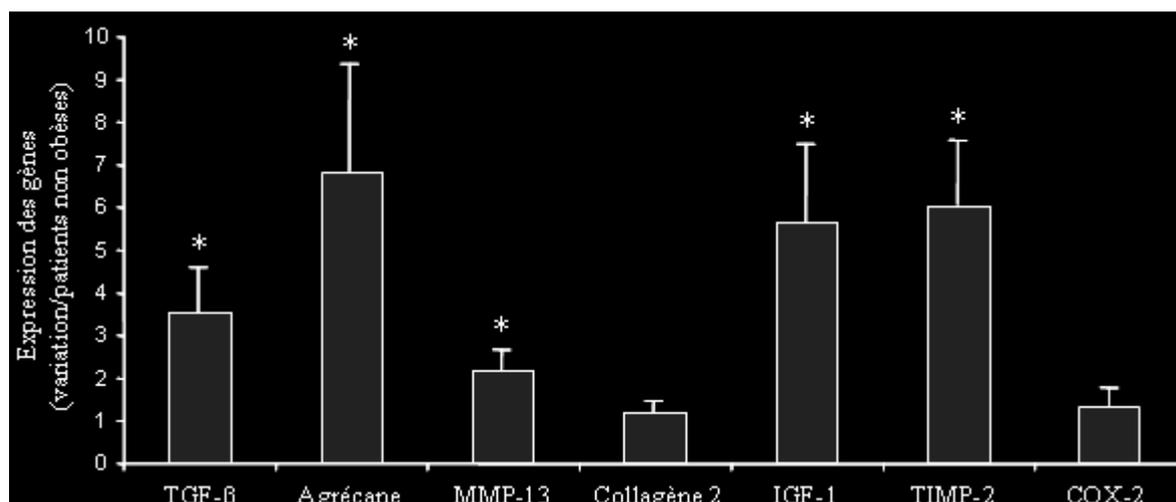


Figure IV.27 : Effet de l'IMC sur l'expression du TGF-β, de l'agrécan, de la MMP-13, du collagène de type 2, de l'IGF-1, du TIMP-2 et de COX-2 dans des chondrocytes issus de patients atteints d'arthrose.

L'expression des ARNs est déterminée par PCR en temps réel avec 3 échantillons par patient. Les données sont représentées sous la forme de la moyenne \pm SEM. Les résultats représentent la variation d'expression observée chez les patients obèses (n = 13) par rapport aux patients non obèses (n = 12).

* = $p < 0.05$ entre patients obèses et non obèses.

II. Influence de la concentration de leptine et de l'IMC sur la réponse chondrocytaire à la leptine

Comme le montre la figure IV.28, la leptine induit des changements d'expression des gènes codant les éléments spécifiques du cartilage et les facteurs régulateurs de l'homéostasie. Ses effets sont cependant variables selon la concentration en leptine et l'IMC des patients.

La concentration de 20 ng/ml n'induit aucun changement significatif de l'expression des gènes dans les chondrocytes, sauf pour le gène de la MMP-13 chez les patients obèses (Figure IV.28).

Les analyses de RT-PCR montrent un effet dose-dépendant de la leptine sur l'expression du gène codant le collagène de type 2. Il est surexprimé après traitement des chondrocytes issus des patients de poids normal ou en surcharge avec la concentration de 100 ng/ml de leptine. Cependant, cet effet stimulateur disparaît avec la dose de 500 ng/ml. A l'inverse, la concentration la plus élevée est nécessaire pour stimuler l'expression du collagène de type 2 dans les chondrocytes issus de patients obèses, la dose de 100 ng/ml étant inefficace pour ce groupe de patients (Figure IV.28).

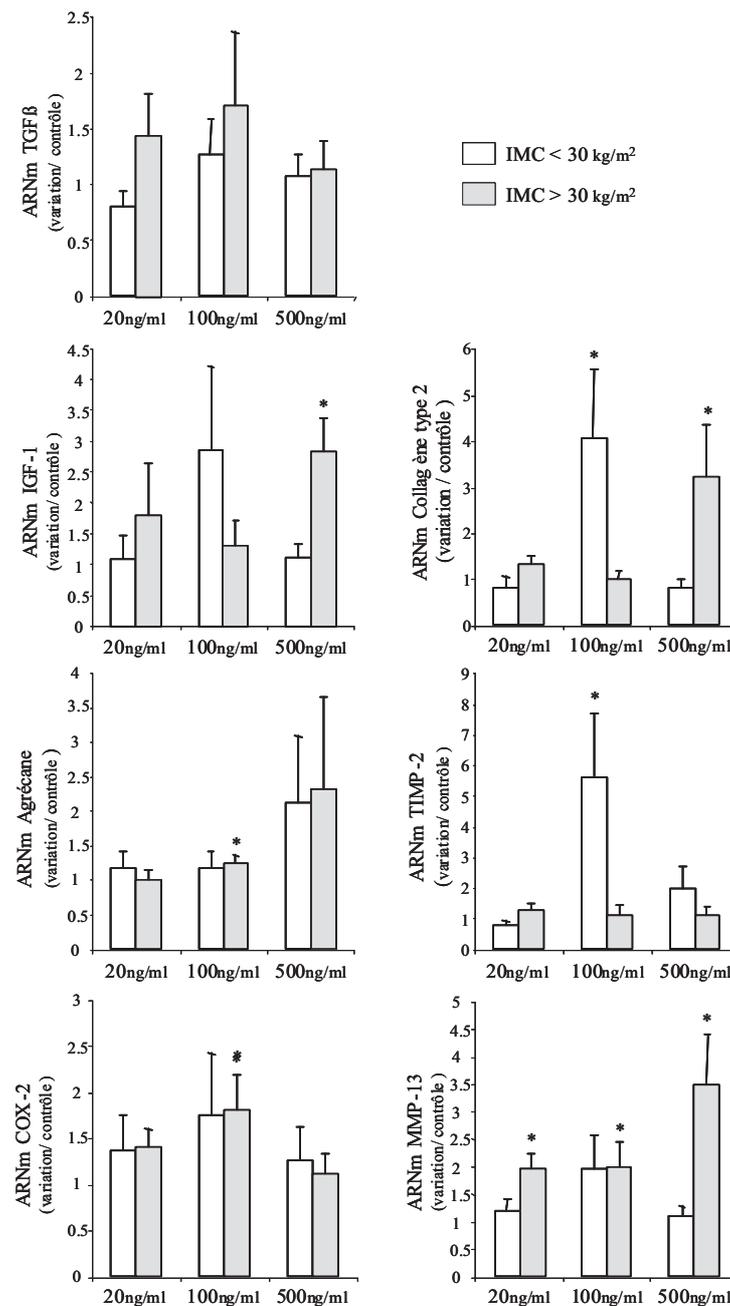


Figure IV.28 : Effet de la leptine sur l'expression du TGF-β, de l'IGF-1, du collagène de type 2, de l'agrécan, du TIMP-2, de COX-2 et de la MMP-13 sur des chondrocytes obtenus à partir de patients de poids normal ou en surcharge (IMC<30 kg/m², n=5 pour 20 ng/ml et n=8 pour 100 et 500 ng/ml) et de patients obèses (IMC>30 kg/m²) (n=5 pour 20 ng/ml, n=11 pour 100 ng/ml et n=9 pour 500 ng/ml).

Après 24 heures de traitement avec 20, 100 ou 500 ng/ml de leptine, les ARNs sont extraits et l'expression des ARNm est analysée par RT-PCR en temps réel. Pour chaque patient, les expériences ont été réalisées en triplicate. Les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne ± SEM et

représentent la variation d'expression observée dans les cellules traitées par rapport aux cellules contrôles non traitées à la leptine. * = $p < 0.05$ entre chondrocytes témoins et traités.

Le traitement avec 100 ng/ml de leptine de chondrocytes issus de patients dont l'IMC est supérieur à 30 kg/m² augmente faiblement mais significativement l'expression de l'agrécan (Figure IV.28). L'ARNm codant l'agrécan a aussi un niveau d'expression élevé avec 500 ng/ml de leptine pour chaque groupe de patients mais aucune différence significative avec les cellules non traitées n'est remarquée.

L'effet de la leptine sur les facteurs de croissance diffère entre l'IGF-1 et le TGF- β . L'adipokine n'a aucun effet significatif sur l'expression du TGF- β , et ceci quel que soit la concentration de leptine ou l'IMC des patients. En revanche, la leptine induit l'expression de l'IGF-1 de façon similaire à celle du collagène de type 2 (Figure IV.28). Cet effet stimulant de la leptine est observé pour la dose de 100 ng/ml seulement avec les cellules provenant de patients non obèses alors que 500 ng/ml sont nécessaires à l'augmentation de l'expression de l'IGF-1 dans les chondrocytes de patients obèses

Le gène codant la MMP-13 n'est pas une cible de la leptine pour les chondrocytes issus de patients non obèses. En revanche, la leptine induit de façon dose-dépendante l'expression de l'enzyme dans les chondrocytes issus de patients obèses (Figure IV.28).

A l'inverse de ce qui est observé avec la MMP-13, le TIMP-2 constitue une cible de la leptine seulement pour les cellules provenant des patients de poids normal ou en surcharge. Son expression est ainsi augmentée d'un facteur 5 après traitement des chondrocytes avec 100ng/ml de leptine. Cet effet inducteur disparaît cependant à la dose la plus élevée. Aucun changement n'est détecté pour l'expression du TIMP-2 dans les cellules issues de patients obèses (Figure IV.28).

Les médiateurs de l'inflammation étudiés n'ont montré aucune modification notable de leur expression après traitement à la leptine quels que soient la dose d'adipokine et l'IMC des patients. Seule COX-2 est faiblement mais statistiquement induite dans les chondrocytes collectés à partir de patients obèses et traités avec 100 ng/ml de leptine.

Afin d'approfondir l'effet IMC-dépendant de la leptine, nous avons tenté d'établir des relations entre l'IMC des patients et la réponse des chondrocytes à la leptine. Des associations négatives ont ainsi été mises en évidence pour la dose de 100 ng/ml entre l'IMC et l'expression des gènes les plus induits par cette concentration de leptine, à savoir l'IGF-1, le collagène de type 2 et le TIMP-2 (Figure IV.29A). Aucune relation significative n'a été

trouvée pour les autres gènes. A l'inverse, la réponse des chondrocytes à la plus forte dose de leptine apparaît directement liée à l'IMC (Figure IV.29B). Aucune relation n'est observée pour la dose de 20 ng/ml probablement en raison d'un effet trop faible voire inexistant de l'adipokine à cette concentration.

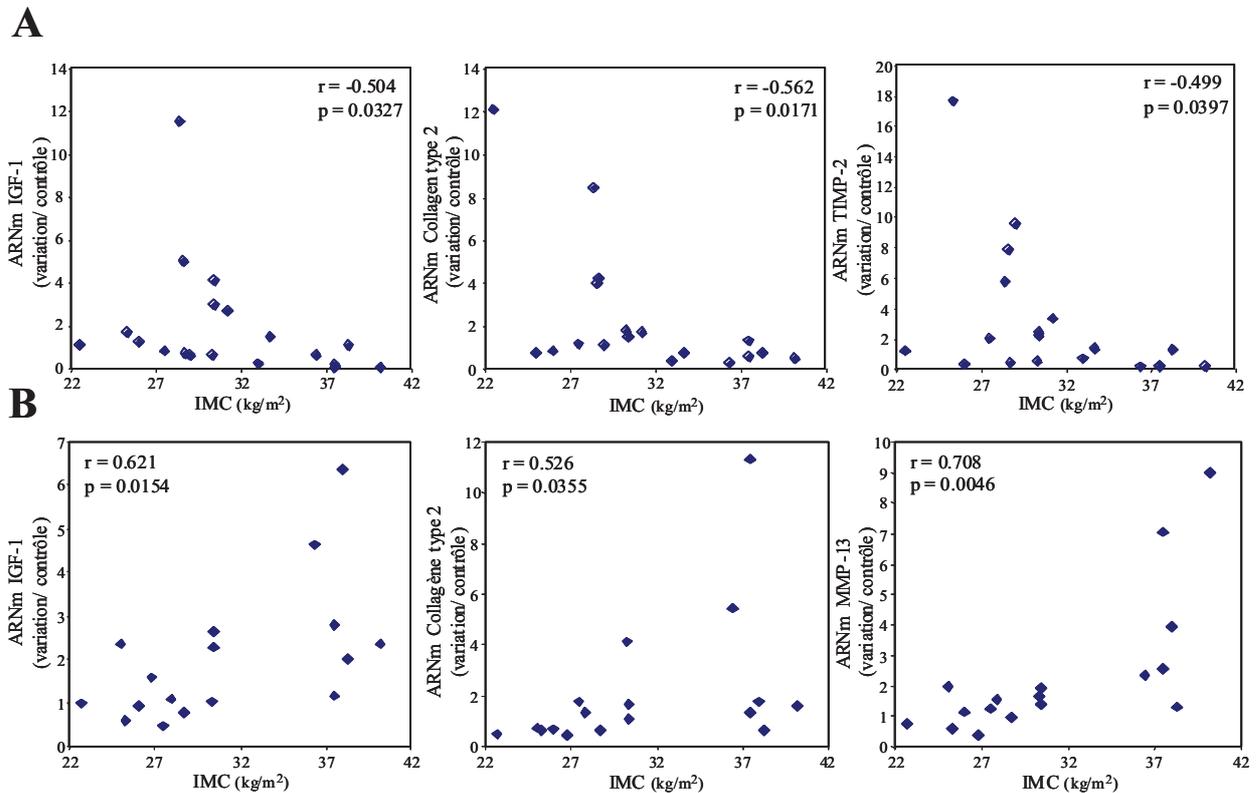


Figure IV.29 : Relations entre la réponse des chondrocytes à la leptine et l'IMC des patients atteints d'arthrose.

Les chondrocytes sont traités avec 100 ng/ml (A) ou 500 ng/ml (B) de leptine et l'expression des ARNs codant le collagène de type 2, l'IGF-1, le TIMP-2 et la MMP-13 est déterminée par RT-PCR en temps réel. Pour chaque patient, les expériences sont faites en triplicate. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne et représentent la variation d'expression des gènes entre les cellules traitées et non traitées. Les corrélations sont calculées selon la méthode de Spearman (r , coefficient de corrélation). $p < 0.05$ considéré comme significatif.

III. Effet de l'IMC et de la concentration de leptine sur la voie JAK/STATs

L'activation des STATs a été étudiée afin de déterminer si l'IMC et/ou la dose de leptine peuvent affecter la voie de signalisation de la leptine. La plus forte concentration de leptine induit une activation rapide de STAT-1 α et de STAT-3 (Figure IV.30). Aucune phosphorylation de STAT-5A et 5B n'a été détectée après traitement des chondrocytes à la leptine. La leptine à 100 ng/ml n'est pas capable d'activer de manière significative la voie des STATs, excepté pour STAT-1 α dans les chondrocytes issus de patients obèses. Le niveau d'activation des STATs tend à être augmenter avec l'IMC mais aucune différence significative n'est remarquée entre les groupes.

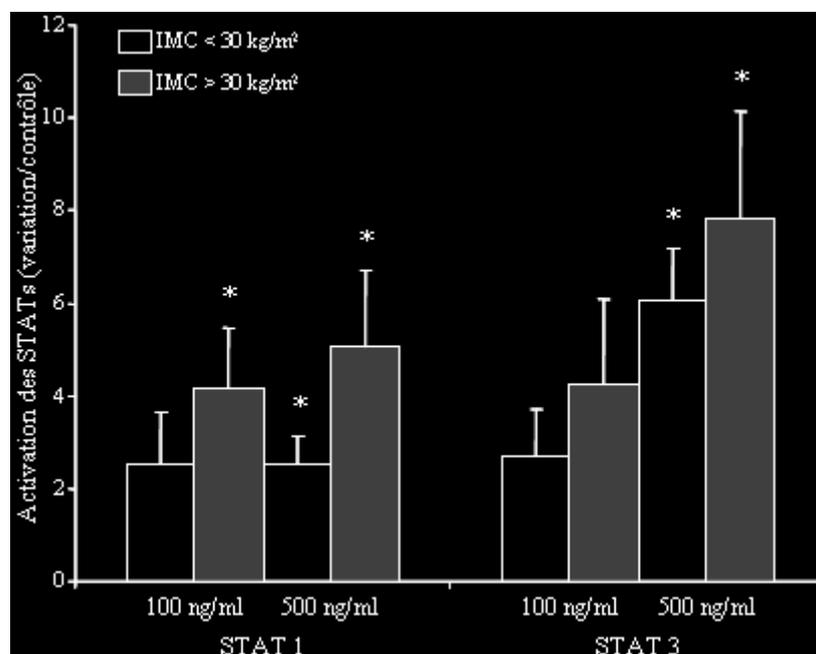


Figure IV.30 : Effet de la leptine sur l'activation de la voie des STATs dans des chondrocytes issus de patients de poids normal ou en surcharge (IMC<30 kg/m²) et obèses (IMC>30 kg/m²).

La phosphorylation de STAT 1 α , 3, 5A et 5B a été déterminée à partir de protéines nucléaires extraites de chondrocytes traités avec 100 ng/ml ou 500 ng/ml de leptine pendant 10 minutes. Pour chaque patient, les expériences sont réalisées en triplicate. Les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne \pm SEM et représentent le niveau d'activation observé avec les cellules traitées par rapport aux cellules témoins non traitées. * = p<0.05 entre chondrocytes témoins et chondrocytes traités.

Faits marquants

Nos résultats indiquent que :

- *L'expression basale de la plupart des gènes étudiés est plus importante pour les chondrocytes issus de patients obèses.*
 - *Les cellules provenant de patients de poids normal ou en surcharge répondent à la dose de 100 ng/ml mais sont insensibles à 500 ng/ml de leptine.*
 - *Les cellules isolées à partir de cartilage de patients obèses répondent à la concentration de 100 ng/ml pour COX2 et MMP-13 seulement, et demandent une dose de leptine plus élevée pour accroître l'expression de l'IGF-1 et du collagène de type 2.*
 - *TIMP-2 est un gène cible de la leptine pour les patients non obèses alors que la MMP-13 est induite par la leptine seulement chez les patients obèses.*
 - *STAT-3 est activée par 500 ng/ml de leptine, mais seul STAT-1 α est phosphorylée après traitement des cellules issues de patients obèses par 100 ng/ml de leptine.*
-

Discussion

Avant d'examiner l'effet de l'IMC sur la réponse chondrocytaire à la leptine, nous avons comparé l'expression de certains gènes dans les chondrocytes provenant de patients obèses à celle observée chez des patients de poids normal ou en surcharge. Les PCR en temps réel montrent des modifications importantes entre les 2 groupes pour les facteurs de croissance, l'agrécane et le TIMP-2, ce qui suggère que le métabolisme chondrocytaire est plus important chez des individus obèses. Des résultats semblables avaient été remarqués dans la graisse sous-cutanée puisque dans ce tissu, le TGF- β , l'IGF-1 et le TIMP-2 sont surexprimés chez les individus obèses (Fain JN 2005) ; (Skopkova *et al.* 2007). Ces résultats indiquent qu'un état pathologique peut induire l'expression de ces facteurs dans les chondrocytes ou les adipocytes. Puisque l'obésité et l'arthrose sont toutes deux liées à l'inflammation, la surexpression des facteurs de croissance et des inhibiteurs de MMPs pourrait être une tentative de réponse à l'environnement inflammatoire.

Les cibles de la leptine identifiées dans cette étude telles que l'IGF-1, le collagène de type 2 et la MMP-13 sont identiques à celles mises en évidence dans des travaux antérieurs (Simopoulou *et al.*, 2007) ; (Dumond *et al.*, 2003) ; (Figenschau *et al.*, 2001) ; (Iliopoulos *et al.*, 2007). Cependant, des résultats différents ont été trouvés pour les médiateurs de l'inflammation. Contrairement à ce que nous avons observé, Vuolteenaho *et al.*, ont montré que la leptine augmente l'expression de iNOS dans le cartilage humain (Vuolteenaho *et al.*

2009). L'utilisation d'explants de cartilage à la place de cellules fraîchement isolées du cartilage peut expliquer cette différence, la réponse des chondrocytes pouvant être modifiée par la présence de la matrice extracellulaire. L'absence d'effet de la leptine sur l'expression de iNOS dans les chondrocytes de la lignée murine ATDC5 confirme cette hypothèse (Otero *et al.* 2005). De plus, il faut noter qu'une dose très élevée de leptine (10 µg/ml) a permis d'induire iNOS dans les échantillons cartilagineux. De la même manière, nous n'avons pas remarqué de changement de l'expression de l'IL-1 alors que Simopoulou *et al.* ont trouvé un effet stimulant de la leptine sur la production de cette cytokine (Simopoulou *et al.* 2007). Cette réponse est cependant observée après une période de culture des chondrocytes de 7 jours suggérant un effet indirect de la leptine sur cette voie.

L'un des résultats les plus marquants de ce travail est l'effet IMC-dépendant de la leptine sur l'expression des gènes codant le TIMP-2 et la MMP-13. Nos résultats apportent en effet des avancées sur le rôle de la leptine dans le renouvellement matriciel en régulant la balance entre les MMPs et les TIMPs. Bien que TIMP-1 soit fortement exprimé dans le cartilage sain et diminué dans l'arthrose, nous n'avons pas trouvé d'effet de la leptine sur son expression. En revanche, le taux d'ARNm codant TIMP-2 est augmenté dans les cellules traitées à la leptine mais seulement pour les patients de poids normal ou en surcharge. Si TIMP-2 n'est pas un gène cible de la leptine chez les patients obèses, la MMP-13 est par contre induite par l'adipokine et ceci dès la faible dose. A l'inverse, cette MMP n'est pas une cible de la leptine chez les patients non obèses. Ces effets IMC-dépendant de la leptine pourraient modifier le processus dégénératif de l'arthrose. L'expression de TIMP-2 induite par la leptine pourrait ralentir la destruction du cartilage chez les patients arthrosiques de poids normal ou en surcharge alors que l'expression de la MMP-13 pourrait contribuer au processus dégénératif chez les patients obèses.

L'autre résultat intéressant de cette étude est l'influence de la concentration de leptine. Comme le montre les associations entre l'IMC et la réponse chondrocytaire, les cellules issues de patients de faible IMC sont plus sensibles à 100 ng/ml de leptine alors que la dose de 500ng/ml induit une réponse cellulaire pour les patients ayant un IMC élevé. Les chondrocytes de patients obèses sont sans doute exposés à des concentrations élevées de leptine dans l'articulation de sorte qu'ils perdent leur sensibilité à la leptine. La réduction de la réponse peut également être liée à une moindre expression du récepteur ou à des modifications de la transmission du signal. En accord avec les données obtenues par Simopoulou *et al.* (Simopoulou *et al.* 2007), nous n'avons pas détecté de changement de l'expression de Ob-R quels que soient l'IMC des patients et la dose de leptine. L'activation de

la voie JAK/STAT a donc été étudiée afin de mettre en évidence toute altération dans le processus de transduction du signal (Fruhbeck 2006). Nous avons ainsi montré que la leptine à 500 ng/ml induit la phosphorylation des STAT-1 α et -3 dans les chondrocytes. Cette activation des STATs induit bien l'expression de gènes cibles dans les chondrocytes issus de patients obèses mais pas dans les cellules provenant de patients de poids normal ou en surcharge probablement en raison d'un rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation de la leptine. Il semble par ailleurs que la leptine à 100 ng/ml agit par une voie indépendante des STATs car à cette concentration, l'adipokine n'a pas montré d'effet sur la phosphorylation de STAT-3. L'absence d'effet de la leptine à 100 ng/ml chez les patients obèses suggère que cette voie indépendante des STATs peut être perturbée dans ces conditions, en particulier par STAT-1 qui est effectivement activé par 100 ng/ml de leptine. STAT-1 peut en fait agir comme un régulateur transcriptionnel négatif (Hogan et Stephens 2001) ; (Osaki M 2003) et interférer avec la machinerie transcriptionnelle pour conduire à une perte de sensibilité à la leptine. La réponse à l'adipokine peut ensuite être restaurée dans les chondrocytes issus de patients obèses après activation de STAT-3 par une forte concentration de leptine. L'hypothèse selon laquelle les voies de signalisation activées par la leptine diffèrent selon la dose et l'IMC est confortée par les associations entre l'IMC et l'expression des gènes induite par la leptine puisqu'elles sont négatives pour 100 ng/ml de leptine et positives pour la forte concentration de leptine.

Chapitre 5 : Rôle de la leptine dans le développement d'une arthrose expérimentale

Afin de valider notre hypothèse selon laquelle la leptine contribue aux phénomènes arthrosiques, nous avons étudié chez le rat l'effet de l'inactivation de la leptine dans le développement de la maladie. Le modèle d'arthrose au MIA a d'abord été étudié chez le rat Wistar dans le but de déterminer les temps clés des différentes phases de développement de l'arthrose, puis chez le rat Zucker qui se caractérise par un phénotype d'obésité sévère lié à l'absence de récepteur fonctionnel à la leptine.

I. Modèle d'arthrose au MIA chez le rat Wistar

Le développement et la progression de la maladie ont été évalués chez le rat Wistar âgé de 5 à 6 semaines après une injection unilatérale de 0,1 mg de MIA. Les analyses histologiques montrent une déplétion matricielle à peine 5 jours après induction de l'arthrose qui semble plus importante au niveau des plateaux tibiaux (Figure IV.31). Cette perte en PGs s'accroît à J10 et s'accompagne d'une hypertrophie chondrocytaire en marge des zones lésées (Figure IV.31). Elle semble cependant ralentir à J20 et une tentative de réparation apparaît même dès J32 pour se poursuivre jusqu'à J45 (Figure IV.32). Des modifications de l'os sous-chondral, avec en particulier une condensation du tissu osseux, apparaissent néanmoins à J45. Au temps le plus tardif, soit 2 mois après l'injection de MIA, le cartilage et l'os sous-chondral sont totalement destructurés au niveau des plateaux tibiaux et une perte importante en protéoglycanes est observée.

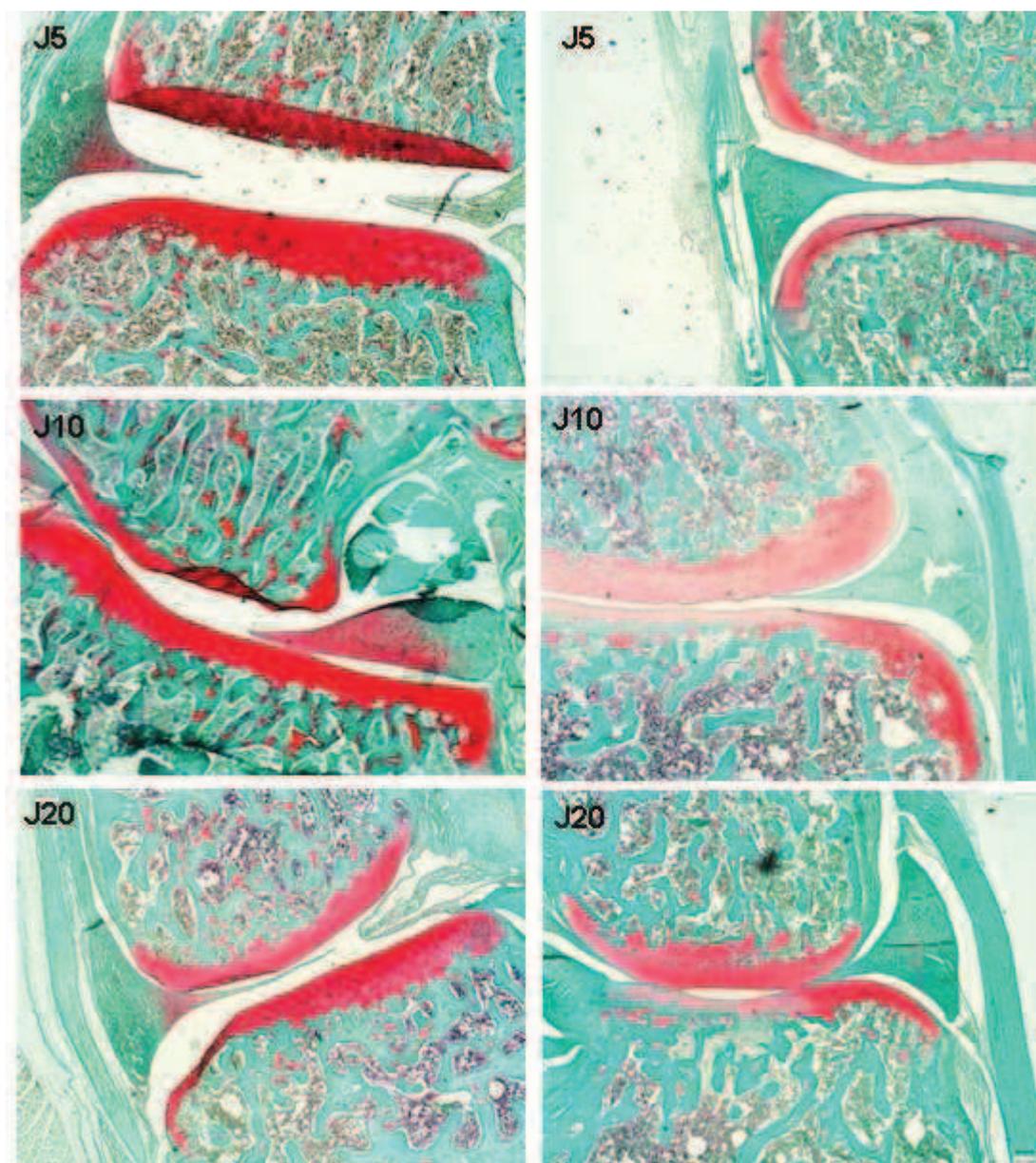


Figure IV.31 : Effet du MIA sur la matrice cartilagineuse et l'os sous-chondral chez le rat Wistar.

L'analyse histologique (coloration à la Safranine-O-Fast Green) a été réalisée sur des coupes transversales de genoux de rats Wistar sacrifiés 5, 10 ou 20 jours après injection intra-articulaire de 0,1mg de MIA. Les genoux contro-latéraux ayant reçu une injection de sérum physiologique servent de contrôle. Grossissement x 40

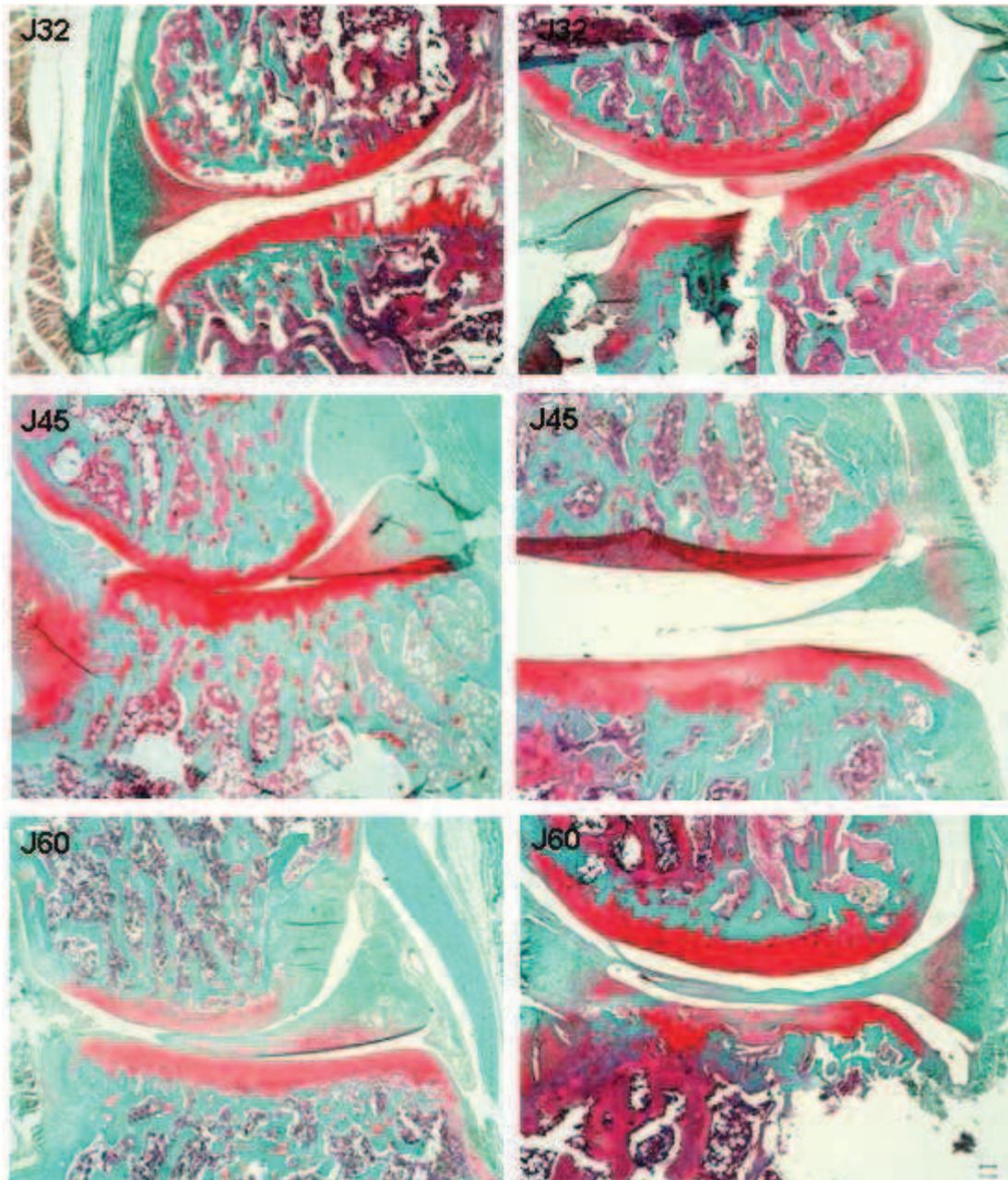


Figure IV.32 : Effet du MIA sur la matrice cartilagineuse et l'os sous-chondral chez le rat Wistar.

L'analyse histologique (coloration à la Safranine-O-Fast Green) a été réalisée sur des coupes transversales de genoux de rats Wistar sacrifiés 32, 45 ou 60 jours après injection intra-articulaire de 0,1 mg de MIA. Les genoux contro-latéraux ayant reçu une injection de sérum physiologique servent de contrôle. Grossissement x 40

Une étude immunohistochimique de l'expression de la leptine a par ailleurs été réalisée chez ces mêmes rats. Aucun marquage n'a été détecté au cours des 3 semaines qui ont suivi l'injection de MIA (Figure IV.33). Une faible expression de leptine est observée à J32

dans les chondrocytes de surface et en marge des lésions, et se confirme à J45 (Figure IV.34). La leptine semble en revanche davantage exprimée dans la couche profonde du cartilage à J60, juste à la jonction entre le tissu cartilagineux et l'os sous-chondral (Figure IV.34).

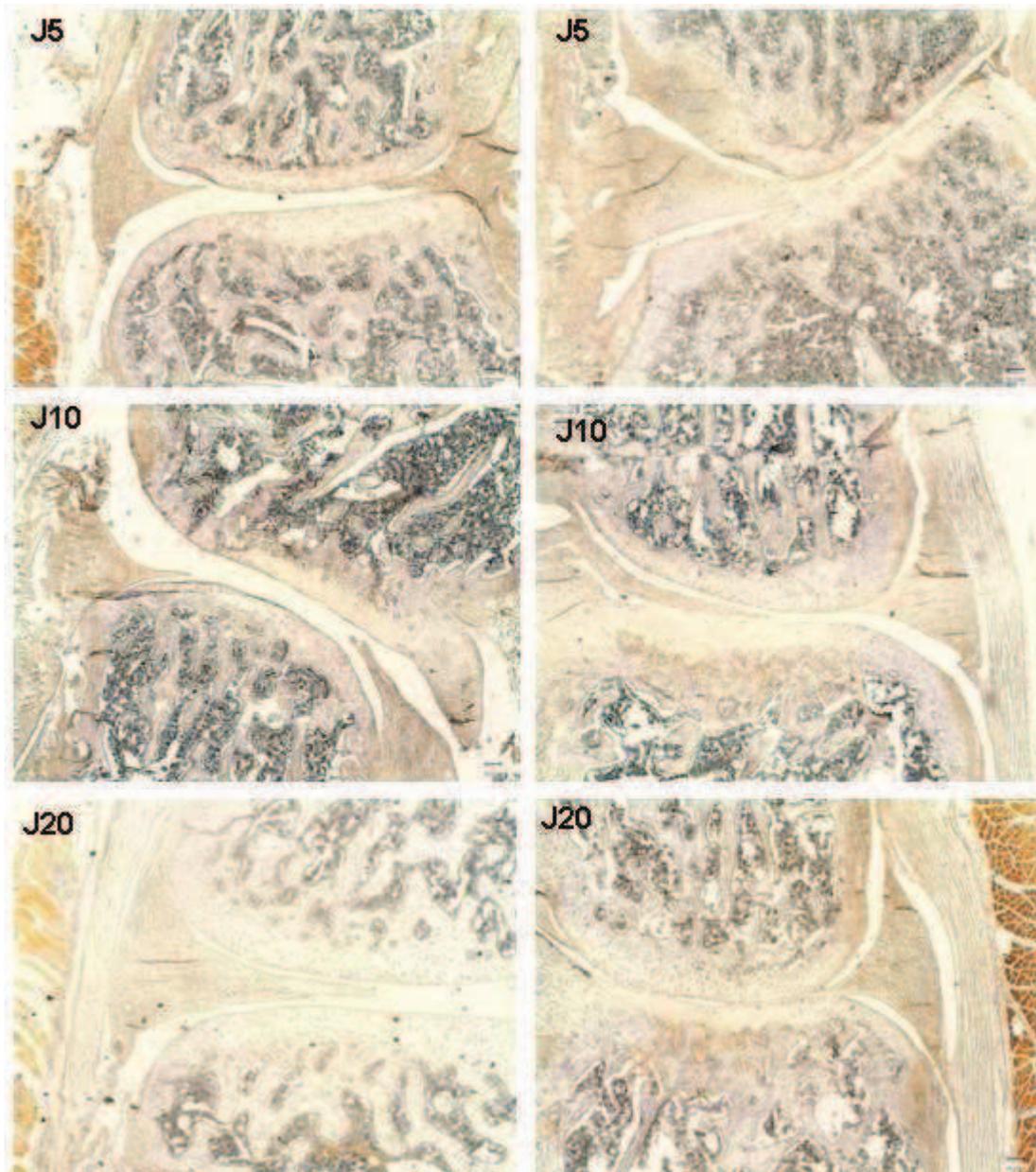


Figure IV.33 : Expression de la leptine au cours du modèle d'arthrose expérimentale au MIA. L'étude immunohistochimique a été réalisée sur des coupes transversales de genoux de rats Wistar sacrifiés 5, 10 ou 20 jours après injection intra-articulaire de 0,1 mg de MIA. Les genoux contralatéraux ayant reçu une injection de sérum physiologique servent de contrôle. Grossissement x 40

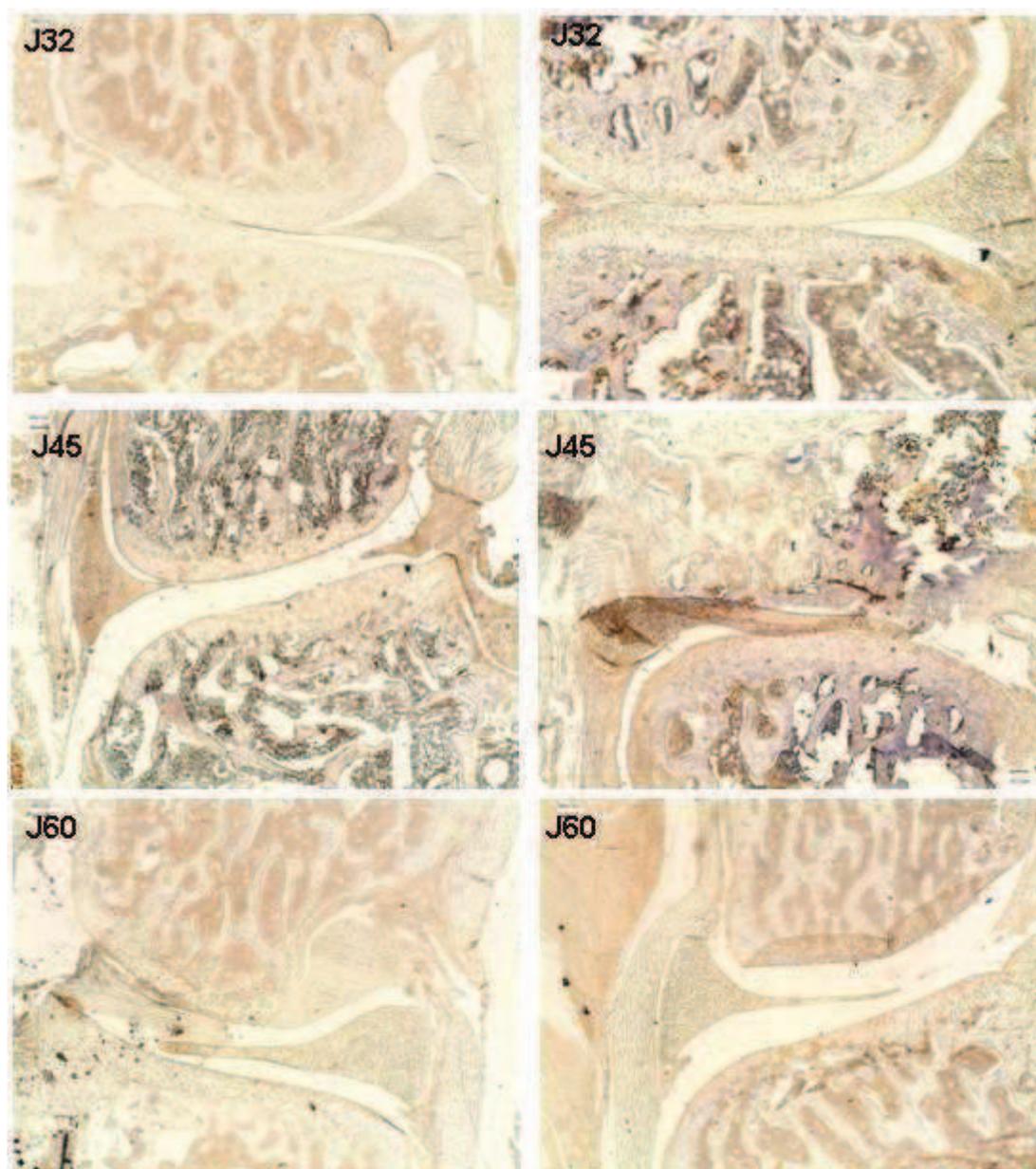


Figure IV.34 : Expression de la leptine au cours du modèle d'arthrose expérimentale au MIA. Une étude immunohistochimique a été réalisée sur des coupes transversales de genoux de rats Wistar sacrifiés 32, 45 ou 60 jours après injection intra-articulaire de 0,1 mg de MIA. Les genoux contrôlatéraux ayant reçu une injection de sérum physiologique servent de contrôle. Grossissement x 40

II. Modèle d'arthrose chez le rat Zucker (Fa/Fa)

Le rôle potentiel de la leptine dans la physiopathologie de l'arthrose a été validé après induction d'une arthrose expérimentale chez le rat Zucker qui est obèse en raison de l'absence de récepteur fonctionnel à la leptine. Des animaux plus âgés ayant un cartilage mature ont été utilisés pour cette étude. Des rats Zucker femelles âgées de 4 mois ont ainsi reçu une dose de MIA plus élevée (0.3 mg) par rapport aux rats Wistar précédents afin de prendre en compte

l'augmentation du poids liée à l'âge. Les animaux ont été sacrifiés 20, 40 et 60 jours après l'injection du MIA, c'est-à-dire aux temps correspondant à une première phase de dégradation suivie d'une tentative réparation puis d'une nouvelle phase de destruction du cartilage accompagnée de modifications de l'os sous-chondral. Des rats hétérozygotes (Fa/fa) et des rats non mutés (fa/fa) ont servi de groupes contrôles.

La figure IV.35 ne révèle pas de modifications majeures des structures cartilagineuses et osseuses entre les animaux témoins des différents groupes. Aucun changement n'a été observé non plus pendant les 60 jours chez ces animaux témoins.

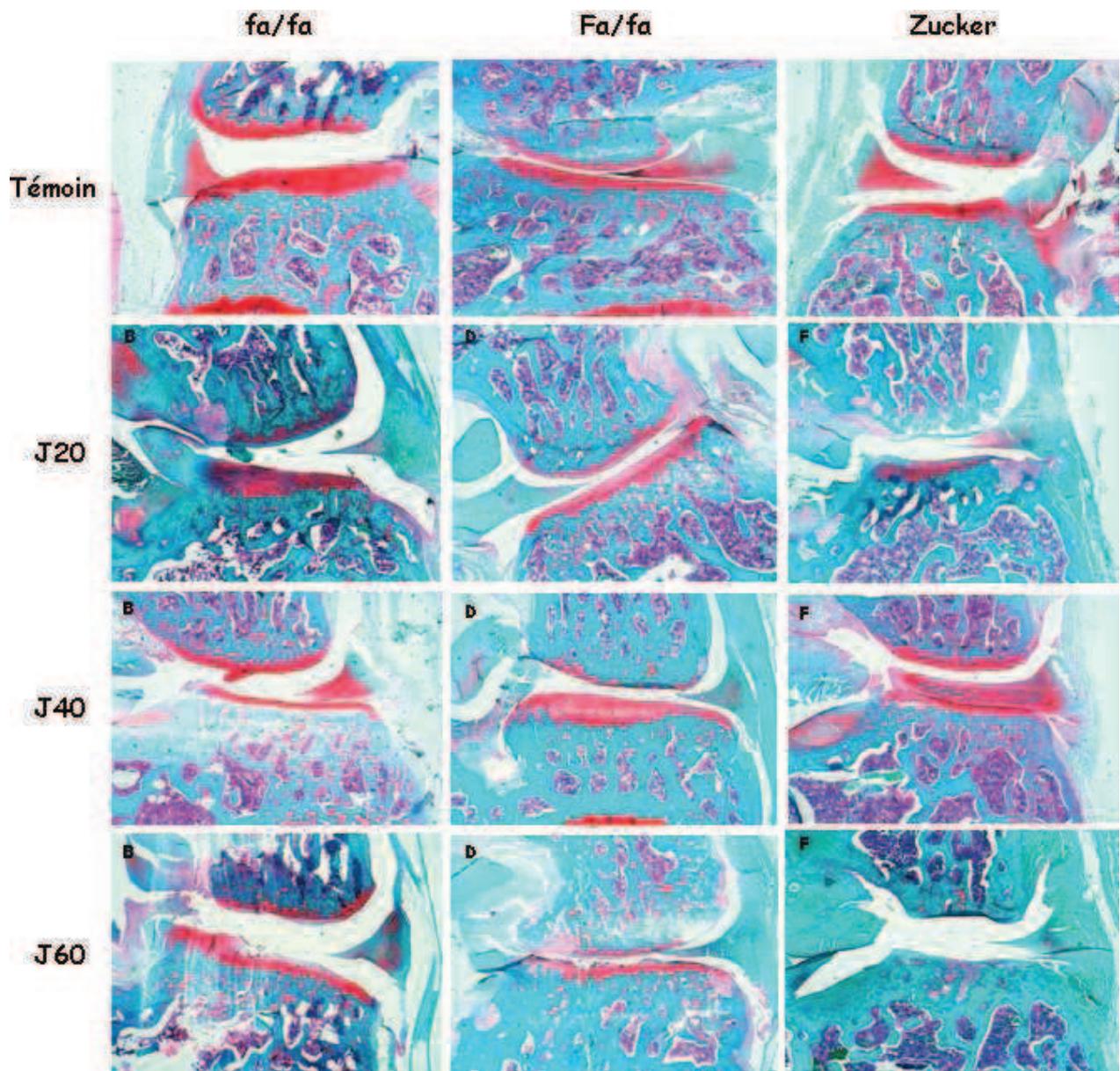


Figure IV.35 : Effet du MIA sur la matrice cartilagineuse et sur l'os sous-chondral chez le rat Zucker.

L'étude histologique (coloration à la Safranine-O-Fast Green) a été réalisée sur des coupes transversales de genoux de rats contrôles Brown Norway (B), de rats hétérozygotes (D) et de rats Zucker (F) sacrifiés 20, 40 ou 60 jours après injection intra-articulaire de 0,3 mg de MIA. Les genoux contro-latéraux ayant reçu une injection de sérum physiologique servent de témoins. Grossissement x 40

Les modifications induites par le MIA chez les rats fa/fa et Fa/fa sont semblables à celles des rats Wistar précédemment analysés. La perte en protéoglycanes visible à J20, apparaît moins prononcée à J40, mais est à nouveau retrouvée à J60. Il faut cependant noter qu'à J60, le cartilage et surtout l'os sous-chondral des rats Fa/fa ont subi des modifications plus importantes que chez les rats fa/fa. Le processus arthrosique est cependant altéré chez les rats Zucker. Si la déplétion matricielle est plus marquée à J20, la tentative de réparation semble aussi efficace que chez les rats fa/fa ou Fa/fa. Néanmoins, le cartilage finit par disparaître totalement et de profonds changements de l'os sous-chondral, en particulier un épaissement et une condensation, sont notés.

Faits marquants

Le modèle au MIA se caractérise par 3 phases : une première phase de déplétion matricielle, une seconde qui traduit une tentative de réparation et une troisième qui semble marquer l'irréversibilité de la destruction cartilagineuse. La leptine est d'abord induite dans les chondrocytes de surface pendant la phase de réparation, puis dans les couches profondes à la jonction entre le cartilage et l'os sous-chondral pour les temps les plus tardifs. Le point le plus marquant de cette étude est l'aggravation du processus dégénératif chez les rats Zucker.

Discussion

L'étude d'un modèle d'arthrose expérimentale chez des animaux déficients en leptine ou en son récepteur fonctionnel constitue une des approches les plus pertinentes pour valider le rôle potentiel de cette adipokine dans cette arthropathie.

Parmi les nombreux modèles d'arthrose expérimentale, l'arthrose spontanée chez l'animal reproduit certainement avec la plus grande pertinence la physiopathologie de l'arthrose chez l'homme. Néanmoins, ce modèle d'arthrose est plus rarement exploité, notamment en raison de l'impossibilité de déterminer à quel moment la pathologie s'initie. A l'inverse, l'induction d'une arthrose chez l'animal constitue un point de repère temporel essentiel par rapport à la progression de la pathologie expérimentale, et la connaissance de son évolution permet d'étudier les phases précoces. Notre choix de modèle d'arthrose expérimentale s'est porté sur le modèle au MIA qui résulte d'anomalies du métabolisme chondrocytaire. En effet, cet agent chimique inhibe la glyceraldéhyde-3 phosphate deshydrogénase et induit par conséquent une rupture de la glycolyse. Ce modèle d'arthrose expérimentale mime la pathologie humaine puisqu'une dégénérescence du cartilage, un remodelage et une sclérose de l'os sous-chondral avec une perte de la fonction articulaire sont rapidement observés en réponse à une injection unique de MIA (van der Kraan *et al.* 1989) ; (Guingamp *et al.* 1997) ; (Guzman *et al.* 2003). Le modèle au MIA a ainsi été utilisé pour évaluer l'efficacité de nouveaux traitements thérapeutiques ou encore pour étudier les phénomènes de douleur associée à l'arthrose (Guingamp *et al.* 1997) ; (McDougall *et al.* 2006) ; (Chandran *et al.* 2009).

L'un des avantages du modèle au MIA est de pouvoir moduler la sévérité des atteintes et du handicap locomoteur selon la dose injectée (Guingamp *et al.* 1997). Pour la première étude réalisée chez le rat Wistar âgé de 5 à 6 semaines, nous avons choisi une dose peu agressive (0,1 mg) qui permet une dégénérescence progressive du cartilage. Le principal critère retenu pour rendre compte du développement de la maladie a été l'apparition de modifications histologiques du cartilage et de l'os sous-chondral. Les données obtenues corroborent celles décrites dans la littérature, à savoir que le MIA provoque une nécrose cellulaire dans les zones abîmées, une prolifération des chondrocytes en marge des lésions et une perte matricielle en protéoglycanes. Cette phase dégénérative est suivie d'une tentative de réparation qui, à notre connaissance, est décrite pour la première fois dans le modèle au MIA. En effet, la plupart des travaux publiés dans la littérature utilisent des doses plus élevées de MIA à l'origine de lésions irréversibles, et établissent des cinétiques d'étude trop brèves pour

mettre en évidence cette phase de réparation transitoire. Une augmentation de la synthèse matricielle est observée dans les phases précoces de l'arthrose chez l'homme (Collins et Mc 1960) ; (Lippiello *et al.* 1977) ; (Ryu *et al.* 1984). Des facteurs de croissance comme le TGF- β sont produits en réponse à la dégradation du cartilage pour stimuler les fonctions anaboliques des chondrocytes (van der Kraan *et al.* 1997). Néanmoins, la perte de coloration à la Safranine-O-fast green observée aux temps tardifs indique que cette tentative de réparation reste insuffisante et n'empêche pas la destruction ultime du cartilage qui est sans doute liée à l'expression importante de facteurs inflammatoires et de MMPs lors du développement de l'arthrose dans le modèle au MIA (Dumond *et al.* 2004).

Le cartilage n'est pas la seule structure anatomique à subir des modifications. Une condensation de l'os sous-chondral est en effet notée aux temps les plus tardifs chez les rats Wistar ayant reçu une injection de 0,1 mg de MIA. Ce remodelage osseux anormal situé juste en dessous des zones cartilagineuses lésées, a également été mis en évidence par Guzman *et al.* (Guzman *et al.* 2003) sept jours après induction d'une arthrose par 1 mg de MIA. Les auteurs ont montré que ces changements résultent d'une augmentation de l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes. Un remodelage de l'os sous-chondral très intense est ainsi observé chez les patients arthrosiques avec une augmentation de la résorption dans les phases précoces de la maladie suivie par une formation osseuse plus importante dans les stades plus avancés liée à une production élevée de facteurs de croissance par les ostéoblastes (Pastoureau *et al.* 1999). En effet, les ostéoblastes issus de patients arthrosiques produisent de grandes quantités de TGF- β et d'IGF-1 comparé au sujet sain et deviennent ainsi très actifs sur le plan métabolique (Lajeunesse *et al.* 2005). Ils synthétisent cependant un collagène anormal qui empêche la minéralisation du tissu osseux. De plus, les patients atteints d'arthrose voient leurs cellules de moelle osseuse s'orienter vers un phénotype ostéoblastique au détriment d'une activité chondrogénique (Murphy *et al.* 2002). Le rôle de l'os sous-chondral dans l'arthrose est encore très largement discuté : pour certains auteurs, le remodelage correspond à une réponse du tissu osseux à la perte de fonctionnalité du cartilage à amortir les chocs. Pour d'autres, les modifications de l'os sous-chondral qui conduisent à un tissu anormal, seraient un événement primaire dans le processus dégénératif : en se durcissant, l'os sous-chondral perd ses propriétés d'amortisseur, laissant au seul cartilage la tâche d'absorber les chocs. C'est ainsi que des inhibiteurs de la résorption osseuse ont permis de réduire les atteintes du cartilage dans un modèle d'arthrose expérimentale (Hayami *et al.* 2004).

L'étude réalisée chez le rat Zucker indique que l'absence du récepteur fonctionnel à la leptine accentue les phénomènes arthrosiques. Les lésions cartilagineuses et les changements de

l'os sous-chondral notés aux temps les plus tardifs apparaissent en effet plus marqués que ceux des rats non mutés. Ces résultats, qui suggèrent un effet protecteur de la leptine dans l'arthrose s'opposent aux conclusions des travaux réalisés par le groupe de F. Guilak (2009). Ces auteurs qui ont étudié le développement d'une arthrose spontanée chez des souris ob/ob déficientes en leptine et chez des souris db/db équivalentes aux rats Zucker, n'ont pas observé de différence significative de l'incidence de l'arthrose entre ces souris obèses et des souris non mutées. Evaluer une arthrose spontanée chez des animaux KO n'est peut-être pas le modèle le plus adapté car ces animaux peuvent mettre en place des processus de compensation qui peuvent entraver le développement lent de la pathologie. A l'inverse, une arthrose induite qui est certes plus agressive, permet d'accentuer les phénomènes et ainsi de s'affranchir des adaptations éventuelles. Un manque de cohérences des résultats est également à noter. Les auteurs annoncent ainsi une diminution des atteintes cartilagineuses chez les souris hétérozygotes ob/+ par rapport aux souris ob/ob alors qu'ils n'ont pas mis en évidence de différence entre les souris non mutées et les souris ob/+ ni entre les souris non mutées et les souris ob/ob. Cette étude manque par ailleurs de certains contrôles qui permettraient en particulier d'estimer le degré de sévérité de la maladie : aucune donnée sur les changements biochimiques et structuraux du cartilage et de l'os sous-chondral entre les souris saines et celles spontanément arthrosiques n'est fournie. La différence de résultats entre notre étude et celle de Griffin et al. (Griffin *et al.* 2009) peut en effet être liée à la gravité de l'arthrose : la leptine ne serait pas impliquée dans l'initiation de la maladie mais plutôt dans sa progression au cours des phases qui succèdent à la tentative de réparation et lorsque le processus dégénératif devient irréversible. En effet, si cette adipokine peut avoir des effets délétères sur le cartilage en induisant des MMPs, elle est également capable d'augmenter l'expression des facteurs de croissance et des éléments de la matrice cartilagineuse.

La leptine peut également intervenir dans l'arthrose en perturbant le remodelage de l'os sous-chondral. Cette adipokine, dont le récepteur a été mis en évidence dans les ostéoblastes, est davantage produite par les ostéoblastes obtenus chez des patients arthrosiques et serait responsable des anomalies phénotypiques observées pour ces cellules (Mutabaruka *et al.* 2010). Il semblerait néanmoins que la réponse des ostéoblastes à la leptine soit altérée après la survenue d'une arthrose (Mutabaruka *et al.* 2010). Comme il a été noté pour le cartilage, les modifications de l'os sous-chondral induites par l'arthrose expérimentale sont plus importantes chez le rat Zucker 60 jours après l'injection de MIA, suggérant un effet protecteur de la leptine. Ces changements profonds du tissu osseux peuvent aussi être la conséquence des atteintes très sévères du cartilage : avec la mise à nu totale de l'os sous-chondral, le tissu sous jacent réagit à

son tour pour devenir plus dense et permettre l'amortissement des chocs. Une nouvelle étude avec davantage de temps de sacrifice entre J30 et J60, c'est-à-dire pendant la période où les modifications de l'os sous-chondral apparaissent, et avec une analyse plus précise de la microarchitecture osseuse devrait permettre de déterminer si les atteintes du cartilage précèdent ou non celles de l'os sous-chondral. L'aggravation du processus arthrosique chez le rat Zucker n'est peut-être pas le seul fait de l'absence de récepteur fonctionnel à la leptine. En effet, cette étude présente l'inconvénient de comparer des animaux obèses à des animaux de poids normal. Ainsi, les éventuelles différences entre les deux groupes pourraient être également liées à l'excès d'autres protéines d'origine adipeuse.

F. Conclusion et perspectives

Sur la base des relations aujourd'hui bien connues entre l'obésité et l'arthrose, nous avons émis l'hypothèse que des protéines d'origine adipeuse comme les adipokines pouvaient être impliquées dans la physiopathologie de l'arthrose. Nous avons ainsi entrepris des recherches dans le but de mieux comprendre le rôle de la leptine et de l'adiponectine dans cette arthropathie dégénérative.

Nous avons montré que le cartilage et surtout le ligament adipeux de Hoffa constituent deux sources intra-articulaires d'adipokines. Les productions de leptine et d'adiponectine dans ces deux tissus sont directement associées, mais les quantités d'adiponectine mesurées dans les surnageants de culture sont nettement supérieures à celles de la leptine. La capacité de production du ligament de Hoffa pour l'adiponectine apparaît d'ailleurs bien plus élevée que celle de la graisse sous-cutanée. Les caractéristiques des patients arthrosiques tels que l'IMC et le sexe peuvent être des paramètres déterminants pour la synthèse des adipokines. Ainsi, l'IMC influence la sécrétion de leptine par le cartilage mais pas par le tissu gras infrapatellaire alors que la production d'adiponectine n'est pas modifiée par l'IMC. De plus, un dimorphisme sexuel est observé pour le cartilage seulement, les deux adipokines étant davantage produites par les échantillons provenant des femmes. Le rôle prépondérant de l'IMC et du sexe pour la production des adipokines conforte notre hypothèse selon laquelle ces protéines d'origine adipeuse pourraient contribuer à l'arthrose puisque l'obésité et le sexe féminin sont deux facteurs de risque pour le développement de cette arthropathie dégénérative (Teichtahl *et al.* 2005).

Dans ce contexte, nous avons envisagé d'évaluer les effets des adipokines sur les fonctions chondrocytaires. Une étude préalable a été réalisée afin de définir les conditions expérimentales optimales permettant de déterminer la réponse des chondrocytes aux adipokines. Si le système tridimensionnel permet de conserver le phénotype chondrocytaire, seule la culture en monocouche est adaptée à l'étude de la leptine et de l'adiponectine sur le chondrocyte. Dans ces conditions, l'expression des récepteurs est maximale, et à l'inverse celle des ligands est fortement réduite. Ce travail indique également que l'expression des adipokines et de leurs récepteurs dépend de l'état de différenciation des chondrocytes, ce qui peut expliquer les divergences de résultats décrits dans la littérature. Il semble d'ailleurs que la leptine, mais pas l'adiponectine, joue un rôle majeur dans l'expression de marqueurs phénotypiques. Des travaux complémentaires utilisant des outils pharmacologiques spécifiques de certaines voies de signalisation devraient permettre d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine des effets de la leptine sur l'expression de ces marqueurs.

Le nombre croissant de données décrites dans la littérature ne permet pas encore aujourd'hui de préciser la contribution de la leptine dans l'arthrose : elle est capable de stimuler l'expression d'enzymes protéolytiques et la production de médiateurs inflammatoires tout en favorisant la synthèse d'éléments matriciels. Nos résultats indiquent en fait que les effets de cette adipokine dans les chondrocytes dépendent très clairement de sa concentration et de l'IMC des patients. La leptine favorise les fonctions de synthèse au détriment de la dégradation pour les patients non obèses alors qu'elle présente des effets délétères pour le cartilage chez les patients obèses en stimulant l'expression de COX-2 et de la MMP-13. Des doses élevées de leptine sont en fait nécessaires pour induire les gènes codant l'IGF-1 ou le collagène de type 2 chez les patients ayant un fort IMC. L'étude d'un modèle d'arthrose chez le rat Zucker déficient en récepteur fonctionnel à la leptine indique en fait que cette adipokine semble avoir un effet protecteur sur le cartilage : des atteintes plus sévères sont observées chez les rats Zucker tant au niveau du cartilage que de l'os sous-chondral. Des analyses immunohistochimiques montrant l'expression de protéines impliquées dans le processus dégénératif ou dans la phase de réparation, permettraient d'expliquer les différences entre les rats non mutés et les rats Zucker. Par ailleurs, comme nous l'avons déjà évoqué dans la discussion, l'augmentation de la masse grasse chez le rat Zucker peut être à l'origine d'une telle aggravation de l'arthrose, indépendamment de la leptine. C'est pourquoi, il paraît indispensable de comparer les résultats obtenus avec le rat Zucker à ceux observés chez des rats ayant une leptine active et rendus obèses par un régime hypercalorique. Afin de mieux comprendre le rôle éventuel de la leptine dans le remodelage osseux anormal qui survient au cours de l'arthrose, ces nouvelles études devront également comporter une analyse plus précise des modifications de l'os sous-chondral avec en particulier un examen complet de la microarchitecture osseuse par imagerie.

D'après nos recherches, l'adiponectine est une autre adipokine susceptible de modifier le métabolisme chondrocytaire. Nos travaux ont montré qu'elle est abondamment produite par le ligament de Hoffa et sa synthèse dans le cartilage augmente lorsque la MEC est dégradée. Tout comme la leptine, l'adiponectine présente des effets ambivalents puisqu'elle induit l'expression à la fois du TGF- β et de la MMP-13 dans les chondrocytes. Ces résultats observés *in vitro* sont confirmés *in vivo* par les relations établies chez les patients arthrosiques entre d'une part l'expression du gène codant l'adiponectine et celle des gènes codant le TGF- β et la MMP-13, et d'autre part entre la production d'adiponectine par le cartilage et l'expression des protéines correspondant au TGF- β et à la MMP-13. L'adiponectine pourrait

également moduler la synthèse des éléments matriciels, mais son récepteur AdipoR1 semble être davantage le facteur déterminant pour cette régulation. Des analyses histologiques réalisées sur des échantillons de cartilage préalablement traités par de l'adiponectine pendant une période prolongée permettraient de déterminer si cette adipokine favorise les processus de synthèse ou au contraire provoque une perte matricielle. Par ailleurs, des études complémentaires, consacrées en particulier à l'AMPK, permettraient d'identifier les voies de signalisation activées par l'adiponectine dans les chondrocytes.

La production élevée d'adiponectine par le ligament de Hoffa et les effets potentiels de cette adipokine sur les chondrocytes nous incitent à poursuivre nos recherches sur l'influence de ce tissu adipeux sur le cartilage. Nous envisageons notamment d'étudier les modifications de la MEC et la réponse des chondrocytes éventuellement induites par ce tissu gras infrapatellaire. Nous tenterons ensuite de relier ces changements à la production par le ligament de Hoffa de facteurs tels que les adipokines, les cytokines et médiateurs pro-inflammatoires ou les facteurs de croissance.

G. Références bibliographiques

- Afghani, A. et M. I. Goran (2009). "The interrelationships between abdominal adiposity, leptin and bone mineral content in overweight Latino children." Horm Res **72**(2): 82-7.
- Aigner, T., K. Gluckert et K. von der Mark (1997). "Activation of fibrillar collagen synthesis and phenotypic modulation of chondrocytes in early human osteoarthritic cartilage lesions." Osteoarthritis Cartilage **5**(3): 183-9.
- Aimes, R. T. et J. P. Quigley (1995). "Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments." J Biol Chem **270**(11): 5872-6.
- Ajuwon, K. M. et M. E. Spurlock (2005). "Adiponectin inhibits LPS-induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **288**(5): R1220-5.
- Almqvist, K. F., L. Wang, J. Wang, D. Baeten, M. Cornelissen, R. Verdonk, E. M. Veys et G. Verbruggen (2001). "Culture of chondrocytes in alginate surrounded by fibrin gel: characteristics of the cells over a period of eight weeks." Ann Rheum Dis **60**(8): 781-90.
- Andersson, U., K. Filipsson, C. R. Abbott, A. Woods, K. Smith, S. R. Bloom, D. Carling et C. J. Small (2004). "AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake." J Biol Chem **279**(13): 12005-8.
- Aspberg, A., C. Binkert et E. Ruoslahti (1995). "The versican C-type lectin domain recognizes the adhesion protein tenascin-R." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(23): 10590-4.
- Aydelotte, M. B., R. X. Raiss, B. Caterson et K. E. Kuettner (1992). "Influence of interleukin-1 on the morphology and proteoglycan metabolism of cultured bovine articular chondrocytes." Connect Tissue Res **28**(1-2): 143-59.
- Bado, A., S. Levasseur, S. Attoub, S. Kermorgant, J. P. Laigneau, M. N. Bortoluzzi, L. Moizo, T. Lehy, M. Guerre-Millo, Y. Le Marchand-Brustel et M. J. Lewin (1998). "The stomach is a source of leptin." Nature **394**(6695): 790-3.
- Banks, W. A. (2006). "Blood-brain barrier and energy balance." Obesity (Silver Spring) **14** Suppl 5(234S-7S).
- Bao, J. P., W. P. Chen, J. Feng, P. F. Hu, Z. L. Shi et L. D. Wu (2009). "Leptin plays a catabolic role on articular cartilage." Mol Biol Rep
- Baratta, R., S. Amato, C. Degano, M. G. Farina, G. Patane, R. Vigneri et L. Frittitta (2004). "Adiponectin relationship with lipid metabolism is independent of body fat mass: evidence from both cross-sectional and intervention studies." J Clin Endocrinol Metab **89**(6): 2665-71.

- Baskin, D. G., J. F. Breininger et M. W. Schwartz (2000). "SOCS-3 expression in leptin-sensitive neurons of the hypothalamus of fed and fasted rats." Regul Pept **92**(1-3): 9-15.
- Bates, S. H., W. H. Stearns, T. A. Dundon, M. Schubert, A. W. Tso, Y. Wang, A. S. Banks, H. J. Lavery, A. K. Haq, E. Maratos-Flier, B. G. Neel, M. W. Schwartz et M. G. Myers, Jr. (2003). "STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction." Nature **421**(6925): 856-9.
- Beguin, J. A., J. F. Heron, J. P. Sabatier, B. Locker et G. Souquieres (1982). "[Arthroscopy of the knee. Diagnostic value. 1005 cases]." Nouv Presse Med **11**(49): 3619-21.
- Belcher, C., F. Fawthrop, R. Bunning et M. Doherty (1996). "Plasminogen activators and their inhibitors in synovial fluids from normal, osteoarthritis, and rheumatoid arthritis knees." Ann Rheum Dis **55**(4): 230-6.
- Ben-Eliezer, M., M. Phillip et G. Gat-Yablonski (2007). "Leptin regulates chondrogenic differentiation in ATDC5 cell-line through JAK/STAT and MAPK pathways." Endocrine **32**(2): 235-44.
- Bence, K. K., M. Delibegovic, B. Xue, C. Z. Gorgun, G. S. Hotamisligil, B. G. Neel et B. B. Kahn (2006). "Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action." Nat Med **12**(8): 917-24.
- Bendinelli, P., P. Maroni, F. Pecori Giraldi et R. Piccoletti (2000). "Leptin activates Stat3, Stat1 and AP-1 in mouse adipose tissue." Mol Cell Endocrinol **168**(1-2): 11-20.
- Benomar, Y., S. Wetzler, C. Larue-Achagiotis, J. Djiane, D. Tome et M. Taouis (2005). "In vivo leptin infusion impairs insulin and leptin signalling in liver and hypothalamus." Mol Cell Endocrinol **242**(1-2): 59-66.
- Berner, H. S., S. P. Lyngstadaas, A. Spahr, M. Monjo, L. Thommesen, C. A. Drevon, U. Syversen et J. E. Reseland (2004). "Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells." Bone **35**(4): 842-9.
- Bernotiene, E., G. Palmer et C. Gabay (2006). "The role of leptin in innate and adaptive immune responses." Arthritis Res Ther **8**(5): 217.
- Bernotiene, E., G. Palmer, D. Talabot-Ayer, I. Szalay-Quinodoz, M. L. Aubert et C. Gabay (2004). "Delayed resolution of acute inflammation during zymosan-induced arthritis in leptin-deficient mice." Arthritis Res Ther **6**(3): R256-63.
- Bi, W., J. M. Deng, Z. Zhang, R. R. Behringer et B. de Crombrughe (1999). "Sox9 is required for cartilage formation." Nat Genet **22**(1): 85-9.
- Billinghurst, R. C., L. Dahlberg, M. Ionescu, A. Reiner, R. Bourne, C. Rorabeck, P. Mitchell, J. Hambor, O. Diekmann, H. Tschesche, J. Chen, H. Van Wart et A. R. Poole (1997). "Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage." J Clin Invest **99**(7): 1534-45.

- Bjorbaek, C., K. El-Haschimi, J. D. Frantz et J. S. Flier (1999). "The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance." J Biol Chem **274**(42): 30059-65.
- Bjorbaek, C., J. K. Elmquist, J. D. Frantz, S. E. Shoelson et J. S. Flier (1998). "Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance." Mol Cell **1**(4): 619-25.
- Bjursell, M., A. Ahnmark, Y. M. Bohlooly, L. William-Olsson, M. Rhedin, X. R. Peng, K. Ploj, A. K. Gerdin, G. Arnerup, A. Elmgren, A. L. Berg, J. Oscarsson et D. Linden (2007). "Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism." Diabetes **56**(3): 583-93.
- Bokarewa, M., D. Bokarew, O. Hultgren et A. Tarkowski (2003). "Leptin consumption in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **62**(10): 952-6.
- Botter, S. M., S. S. Glasson, B. Hopkins, S. Clockaerts, H. Weinans, J. P. van Leeuwen et G. J. van Osch (2009). "ADAMTS5^{-/-} mice have less subchondral bone changes after induction of osteoarthritis through surgical instability: implications for a link between cartilage and subchondral bone changes." Osteoarthritis Cartilage **17**(5): 636-45.
- Brissett, N. C. et S. J. Perkins (1998). "Conserved basic residues in the C-type lectin and short complement repeat domains of the G3 region of proteoglycans." Biochem J **329** (Pt 2)(415-24).
- Brody, D. T. et S. K. Durum (1989). "Membrane IL-1: IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction." J Immunol **143**(4): 1183-7.
- Bruckner, P. et M. van der Rest (1994). "Structure and function of cartilage collagens." Microsc Res Tech **28**(5): 378-84.
- Buckland-Wright, C. (2004). "Subchondral bone changes in hand and knee osteoarthritis detected by radiography." Osteoarthritis Cartilage **12 Suppl A**(S10-9).
- Buckland-Wright, J. C., J. A. Lynch et B. Dave (2000). "Early radiographic features in patients with anterior cruciate ligament rupture." Ann Rheum Dis **59**(8): 641-6.
- Buckwalter, J. A. et H. J. Mankin (1998). "Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions." Instr Course Lect **47**(477-86).
- Bueno, A. A., L. M. Oyama, C. de Oliveira, L. P. Pisani, E. B. Ribeiro, V. L. Silveira et C. M. Oller do Nascimento (2008). "Effects of different fatty acids and dietary lipids on adiponectin gene expression in 3T3-L1 cells and C57BL/6J mice adipose tissue." Pflugers Arch **455**(4): 701-9.
- Busso, N., A. So, V. Chobaz-Peclat, C. Morard, E. Martinez-Soria, D. Talabot-Ayer et C. Gabay (2002). "Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis." J Immunol **168**(2): 875-82.
- Caplan, A. I., M. Elyaderani, Y. Mochizuki, S. Wakitani et V. M. Goldberg (1997). "Principles of cartilage repair and regeneration." Clin Orthop Relat Res **342**: 254-69.

- Challa, T. D., Y. Rais et E. M. Ornan (2010). "Effect of adiponectin on ATDC5 proliferation, differentiation and signaling pathways." Mol Cell Endocrinol **323**(2): 282-91.
- Chambers, M. G., M. T. Bayliss et R. M. Mason (1997). "Chondrocyte cytokine and growth factor expression in murine osteoarthritis." Osteoarthritis Cartilage **5**(5): 301-8.
- Chandran, P., M. Pai, E. A. Blomme, G. C. Hsieh, M. W. Decker et P. Honore (2009). "Pharmacological modulation of movement-evoked pain in a rat model of osteoarthritis." Eur J Pharmacol **613**(1-3): 39-45.
- Chapman, J. A. (1989). "The regulation of size and form in the assembly of collagen fibrils in vivo." Biopolymers **28**(8): 1367-82.
- Chehab, F. F., K. Mounzih, R. Lu et M. E. Lim (1997). "Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin." Science **275**(5296): 88-90.
- Chen, T. H., L. Chen, M. S. Hsieh, C. P. Chang, D. T. Chou et S. H. Tsai (2006). "Evidence for a protective role for adiponectin in osteoarthritis." Biochim Biophys Acta **1762**(8): 711-8.
- Choi, H. M., Y. A. Lee, S. H. Lee, S. J. Hong, D. H. Hahm, S. Y. Choi, H. I. Yang, M. C. Yoo et K. S. Kim (2009). "Adiponectin may contribute to synovitis and joint destruction in rheumatoid arthritis by stimulating vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-1, and matrix metalloproteinase-13 expression in fibroblast-like synoviocytes more than proinflammatory mediators." Arthritis Res Ther **11**(6): R161.
- Cicuttini, F., A. Forbes, K. Morris, S. Darling, M. Bailey et S. Stuckey (1999). "Gender differences in knee cartilage volume as measured by magnetic resonance imaging." Osteoarthritis Cartilage **7**(3): 265-71.
- Cicuttini, F. M., J. R. Baker et T. D. Spector (1996). "The association of obesity with osteoarthritis of the hand and knee in women: a twin study." J Rheumatol **23**(7): 1221-6.
- Cipolletta, C., J. Y. Jouzeau, P. Gegout-Pottie, N. Presle, K. Bordji, P. Netter et B. Terlain (1998). "Modulation of IL-1-induced cartilage injury by NO synthase inhibitors: a comparative study with rat chondrocytes and cartilage entities." Br J Pharmacol **124**(8): 1719-27.
- Cirmanova, V., M. Bayer, L. Starka et K. Zajickova (2008). "The effect of leptin on bone: an evolving concept of action." Physiol Res **57 Suppl 1**(S143-51).
- Civitaresse, A. E., C. P. Jenkinson, D. Richardson, M. Bajaj, K. Cusi, S. Kashyap, R. Berria, R. Belfort, R. A. DeFronzo, L. J. Mandarino et E. Ravussin (2004). "Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes." Diabetologia **47**(5): 816-20.
- Clockaerts, S., Y. M. Bastiaansen-Jenniskens, J. Runhaar, G. J. Van Osch, J. F. Van Offel, J. A. Verhaar, L. S. De Clerck et J. Somville (2010). "The infrapatellar fat pad should be

considered as an active osteoarthritic joint tissue: a narrative review." Osteoarthritis Cartilage

- Collins, D. H. et E. T. Mc (1960). "Sulphate (35SO₄) uptake by chondrocytes in relation to histological changes in osteoarthritic human articular cartilage." Ann Rheum Dis **19**(318-30).
- Cremer, M. A., E. F. Rosloniec et A. H. Kang (1998). "The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease." J Mol Med **76**(3-4): 275-88.
- Cs-Szabo, G., L. I. Melching, P. J. Roughley et T. T. Glant (1997). "Changes in messenger RNA and protein levels of proteoglycans and link protein in human osteoarthritic cartilage samples." Arthritis Rheum **40**(6): 1037-45.
- De Marchi, G. et G. Ferraccioli (2002). "[Leptin: regulatory role in bone metabolism and in inflammation]." Reumatismo **54**(3): 217-25.
- Dinarello, C. A. (1994). "The biological properties of interleukin-1." Eur Cytokine Netw **5**(6): 517-31.
- Ding, G., Q. Qin, N. He, S. C. Francis-David, J. Hou, J. Liu, E. Ricks et Q. Yang (2007). "Adiponectin and its receptors are expressed in adult ventricular cardiomyocytes and upregulated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma." J Mol Cell Cardiol **43**(1): 73-84.
- Distel, E., T. Cadoudal, S. Durant, A. Poignard, X. Chevalier et C. Benelli (2009). "The infrapatellar fat pad in knee osteoarthritis: an important source of interleukin-6 and its soluble receptor." Arthritis Rheum **60**(11): 3374-7.
- Dodds, R. A., K. Merry, A. Littlewood et M. Gowen (1994). "Expression of mRNA for IL1 beta, IL6 and TGF beta 1 in developing human bone and cartilage." J Histochem Cytochem **42**(6): 733-44.
- Dodge, G. R., A. Diaz, C. Sanz-Rodriguez, A. M. Reginato et S. A. Jimenez (1998). "Effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha on the expression of the genes encoding aggrecan, biglycan, and decorin core proteins in cultured human chondrocytes." Arthritis Rheum **41**(2): 274-83.
- Ducy, P., M. Amling, S. Takeda, M. Priemel, A. F. Schilling, F. T. Beil, J. Shen, C. Vinson, J. M. Rueger et G. Karsenty (2000). "Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass." Cell **100**(2): 197-207.
- Dumond, H., N. Presle, P. Pottie, S. Pacquelet, B. Terlain, P. Netter, A. Gepstein, E. Livne et J. Y. Jouzeau (2004). "Site specific changes in gene expression and cartilage metabolism during early experimental osteoarthritis." Osteoarthritis Cartilage **12**(4): 284-95.
- Dumond, H., N. Presle, B. Terlain, D. Mainard, D. Loeuille, P. Netter et P. Pottie (2003). "Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis." Arthritis Rheum **48**(11): 3118-29.

- Dusserre, E., P. Moulin et H. Vidal (2000). "Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues." Biochim Biophys Acta **1500**(1): 88-96.
- Eckstein, F., M. Hudelmaier et R. Putz (2006). "The effects of exercise on human articular cartilage." J Anat **208**(4): 491-512.
- Ehling, A., A. Schaffler, H. Herfarth, I. H. Tarner, S. Anders, O. Distler, G. Paul, J. Distler, S. Gay, J. Scholmerich, E. Neumann et U. Muller-Ladner (2006). "The potential of adiponectin in driving arthritis." J Immunol **176**(7): 4468-78.
- El-Haschimi, K., D. D. Pierroz, S. M. Hileman, C. Bjorbaek et J. S. Flier (2000). "Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity." J Clin Invest **105**(12): 1827-32.
- Elchebly, M., P. Payette, E. Michaliszyn, W. Cromlish, S. Collins, A. L. Loy, D. Normandin, A. Cheng, J. Himms-Hagen, C. C. Chan, C. Ramachandran, M. J. Gresser, M. L. Tremblay et B. P. Kennedy (1999). "Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene." Science **283**(5407): 1544-8.
- Elmqvist, J. K., R. Coppari, N. Balthasar, M. Ichinose et B. B. Lowell (2005). "Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis." J Comp Neurol **493**(1): 63-71.
- Eyckerman, S., D. Broekaert, A. Verhee, J. Vandekerckhove et J. Tavernier (2000). "Identification of the Y985 and Y1077 motifs as SOCS3 recruitment sites in the murine leptin receptor." FEBS Lett **486**(1): 33-7.
- Fain JN, T. D., Madan AK (2005). "Transforming growth factor beta1 release by human adipose tissue is enhanced in obesity." Metabolism. **54**(11): 1546-51.
- Fantuzzi, G. (2005). "Adipose tissue, adipokines, and inflammation." J Allergy Clin Immunol **115**(5): 911-9; quiz 20.
- Fassler, R., P. N. Schnegelsberg, J. Dausman, T. Shinya, Y. Muragaki, M. T. McCarthy, B. R. Olsen et R. Jaenisch (1994). "Mice lacking alpha 1 (IX) collagen develop noninflammatory degenerative joint disease." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 5070-4.
- Fei, H., H. J. Okano, C. Li, G. H. Lee, C. Zhao, R. Darnell et J. M. Friedman (1997). "Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 7001-5.
- Fernandez, M., C. Triplitt, E. Wajcberg, A. A. Sriwijilkamol, N. Musi, K. Cusi, R. DeFronzo et E. Cersosimo (2008). "Addition of pioglitazone and ramipril to intensive insulin therapy in type 2 diabetic patients improves vascular dysfunction by different mechanisms." Diabetes Care **31**(1): 121-7.

- Figenschau, Y., G. Knutsen, S. Shahazeydi, O. Johansen et B. Sveinbjornsson (2001). "Human articular chondrocytes express functional leptin receptors." Biochem Biophys Res Commun **287**(1): 190-7.
- Filkova, M., M. Liskova, H. Hulejova, M. Haluzik, J. Gatterova, A. Pavelkova, K. Pavelka, S. Gay, U. Muller-Ladner et L. Senolt (2009). "Increased serum adiponectin levels in female patients with erosive compared with non-erosive osteoarthritis." Ann Rheum Dis **68**(2): 295-6.
- Fosang, A. J. et T. E. Hardingham (1989). "Isolation of the N-terminal globular protein domains from cartilage proteoglycans. Identification of G2 domain and its lack of interaction with hyaluronate and link protein." Biochem J **261**(3): 801-9.
- Fosang, A. J., K. Last, P. J. Neame, G. Murphy, V. Knauper, H. Tschesche, C. E. Hughes, B. Caterson et T. E. Hardingham (1994). "Neutrophil collagenase (MMP-8) cleaves at the aggrecanase site E373-A374 in the interglobular domain of cartilage aggrecan." Biochem J **304** (Pt 2)(347-51.
- Fruebis, J., T. S. Tsao, S. Javorschi, D. Ebbets-Reed, M. R. Erickson, F. T. Yen, B. E. Bihain et H. F. Lodish (2001). "Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 2005-10.
- Fruhbeck, G. (2006). "Intracellular signalling pathways activated by leptin." Biochem J **393**(Pt 1): 7-20.
- Gaffen, J. D., M. T. Bayliss et R. M. Mason (1997). "Elevated aggrecan mRNA in early murine osteoarthritis." Osteoarthritis Cartilage **5**(4): 227-33.
- Gegout, P., P. Gillet, D. Chevrier, C. Guingamp, B. Terlain et P. Netter (1994). "Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism." Life Sci **55**(17): PL321-6.
- Glasow, A. et S. R. Bornstein (2000). "Leptin and the adrenal gland." Eur J Clin Invest **30** **Suppl 3**(39-45.
- Goekoop, R. J., M. Kloppenburg, H. M. Kroon, M. Frolich, T. W. Huizinga, R. G. Westendorp et J. Gussekloo (2010). "Low innate production of interleukin-1beta and interleukin-6 is associated with the absence of osteoarthritis in old age." Osteoarthritis Cartilage
- Gosset, M., F. Berenbaum, A. Levy, A. Pigenet, S. Thirion, S. Cavadias et C. Jacques (2008). "Mechanical stress and prostaglandin E2 synthesis in cartilage." Biorheology **45**(3-4): 301-20.
- Gouze, J. N., E. Gouze, G. D. Palmer, H. Kaneto, S. C. Ghivizzani, A. J. Grodzinsky et C. H. Evans (2004). "Adenovirus-mediated gene transfer of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase antagonizes the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes." Osteoarthritis Cartilage **12**(3): 217-24.

- Griffin, T. M., J. L. Huebner, V. B. Kraus et F. Guilak (2009). "Extreme obesity due to impaired leptin signaling in mice does not cause knee osteoarthritis." Arthritis Rheum **60**(10): 2935-44.
- Guingamp, C., P. Gegout-Pottie, L. Philippe, B. Terlain, P. Netter et P. Gillet (1997). "Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry." Arthritis Rheum **40**(9): 1670-9.
- Gulberti, S., V. Lattard, M. Fondeur, J. C. Jacquinet, G. Mulliert, P. Netter, J. Magdalou, M. Ouzzine et S. Fournel-Gigleux (2005). "Phosphorylation and sulfation of oligosaccharide substrates critically influence the activity of human beta1,4-galactosyltransferase 7 (GalT-I) and beta1,3-glucuronosyltransferase I (GlcAT-I) involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans." J Biol Chem **280**(2): 1417-25.
- Guo, K. Y., P. Halo, R. L. Leibel et Y. Zhang (2004). "Effects of obesity on the relationship of leptin mRNA expression and adipocyte size in anatomically distinct fat depots in mice." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **287**(1): R112-9.
- Guzman, R. E., M. G. Evans, S. Bove, B. Morenko et K. Kilgore (2003). "Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis." Toxicol Pathol **31**(6): 619-24.
- Hamerman, D. (1993). "Aging and osteoarthritis: basic mechanisms." J Am Geriatr Soc **41**(7): 760-70.
- Hangody, L., G. Kish, Z. Karpati, I. Udvarhelyi, I. Szigeti et M. Bely (1998). "Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice." Orthopedics **21**(7): 751-6.
- Hardie, D. G. (2003). "Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status." Endocrinology **144**(12): 5179-83.
- Hardingham, T. E. et H. Muir (1974). "Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation." Biochem J **139**(3): 565-81.
- Hasty, K. A., R. A. Reife, A. H. Kang et J. M. Stuart (1990). "The role of stromelysin in the cartilage destruction that accompanies inflammatory arthritis." Arthritis Rheum **33**(3): 388-97.
- Haugen, F. et C. A. Drevon (2007). "Activation of nuclear factor-kappaB by high molecular weight and globular adiponectin." Endocrinology **148**(11): 5478-86.
- Hauselmann, H. J., R. J. Fernandes, S. S. Mok, T. M. Schmid, J. A. Block, M. B. Aydelotte, K. E. Kuettner et E. J. Thonar (1994). "Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads." J Cell Sci **107** (Pt 1)(17-27.
- Hayami, T., M. Pickarski, G. A. Wesolowski, J. McLane, A. Bone, J. Destefano, G. A. Rodan et T. Duong le (2004). "The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by

- alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model." Arthritis Rheum **50**(4): 1193-206.
- Hayes, D. W., Jr., R. L. Brower et K. J. John (2001). "Articular cartilage. Anatomy, injury, and repair." Clin Podiatr Med Surg **18**(1): 35-53.
- Heliövaara, M. K., T. E. Strandberg, S. L. Karonen et P. Ebeling (2006). "Association of serum adiponectin concentration to lipid and glucose metabolism in healthy humans." Horm Metab Res **38**(5): 336-40.
- Hodges, D. J., D. C. Lee, C. J. Salter, D. G. Reid, G. P. Harper et T. E. Cawston (1994). "Purification and secondary structural analysis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1." Biochim Biophys Acta **1208**(1): 94-100.
- Hogan, J. C. et J. M. Stephens (2001). "The identification and characterization of a STAT 1 binding site in the PPARgamma2 promoter." Biochem Biophys Res Commun **287**(2): 484-92.
- Hoggard, N., L. Hunter, J. S. Duncan, L. M. Williams, P. Trayhurn et J. G. Mercer (1997). "Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 11073-8.
- Huber, M., S. Trattnig et F. Lintner (2000). "Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage." Invest Radiol **35**(10): 573-80.
- Hunziker, E. B. (1999). "Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable?" Osteoarthritis Cartilage **7**(1): 15-28.
- Ilic, M. Z., C. J. Handley, H. C. Robinson et M. T. Mok (1992). "Mechanism of catabolism of aggrecan by articular cartilage." Arch Biochem Biophys **294**(1): 115-22.
- Iliopoulos, D., K. N. Malizos et A. Tsezou (2007). "Epigenetic regulation of leptin affects MMP-13 expression in osteoarthritic chondrocytes: possible molecular target for osteoarthritis therapeutic intervention." Ann Rheum Dis **66**(12): 1616-21.
- Imai K, I. K., Ikegami Y, Awata T, Katayama S. (2006). "LKB1, an upstream AMPK kinase, regulates glucose and lipid metabolism in cultured liver and muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **351**(3): 595-601.
- Jacobi, S. K., K. M. Ajuwon, T. E. Weber, J. L. Kuske, C. J. Dyer et M. E. Spurlock (2004). "Cloning and expression of porcine adiponectin, and its relationship to adiposity, lipogenesis and the acute phase response." J Endocrinol **182**(1): 133-44.
- Jahng, J. S., J. W. Lee, C. D. Han, S. J. Kim et N. C. Yoo (1997). "Transforming growth factor-beta 1 responsiveness of human articular chondrocytes in vitro: normal versus osteoarthritis." Yonsei Med J **38**(1): 40-51.
- Jedrzejczyk, T., J. Mikusek, P. Rudnicki et P. Lopata (1996). "The infrapatellar adipose body in humans of various age groups." Folia Morphol (Warsz) **55**(1): 51-5.

- Jimerson, D. C., C. Mantzoros, B. E. Wolfe et E. D. Metzger (2000). "Decreased serum leptin in bulimia nervosa." J Clin Endocrinol Metab **85**(12): 4511-4.
- Johnston, S. A. (1997). "Osteoarthritis. Joint anatomy, physiology, and pathobiology." Vet Clin North Am Small Anim Pract **27**(4): 699-723.
- Jordan, M., I. G. Otterness, R. Ng, A. Gessner, M. Rollinghoff et H. U. Beuscher (1995). "Neutralization of endogenous IL-6 suppresses induction of IL-1 receptor antagonist." J Immunol **154**(8): 4081-90.
- Kadowaki, T. et T. Yamauchi (2005). "Adiponectin and adiponectin receptors." Endocr Rev **26**(3): 439-51.
- Kahn, B. B., T. Alquier, D. Carling et D. G. Hardie (2005). "AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism." Cell Metab **1**(1): 15-25.
- Kalshen, D. A. (1985). "[Orienting animal experiment studies on the effect of fenbufen on healthy and arthrosis-induced articular cartilage tissue in vivo]." Z Rheumatol **44**(4): 167-71.
- Kanazawa, I., T. Yamaguchi, S. Yano, M. Yamauchi, M. Yamamoto et T. Sugimoto (2007). "Adiponectin and AMP kinase activator stimulate proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells." BMC Cell Biol **8**(51).
- Karastergiou, K. et V. Mohamed-Ali (2010). "The autocrine and paracrine roles of adipokines." Mol Cell Endocrinol **318**(1-2): 69-78.
- Kaszubska, W., H. D. Falls, V. G. Schaefer, D. Haasch, L. Frost, P. Hessler, P. E. Kroeger, D. W. White, M. R. Jirousek et J. M. Trevillyan (2002). "Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line." Mol Cell Endocrinol **195**(1-2): 109-18.
- Kean, W. F., S. Bouchard et E. Roderich Gossen (2009). "Women with pain due to osteoarthritis: the efficacy and safety of a once-daily formulation of tramadol." Pain Med **10**(6): 1001-11.
- Kharroubi, I., J. Rasschaert, D. L. Eizirik et M. Cnop (2003). "Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells." Biochem Biophys Res Commun **312**(4): 1118-22.
- Kielar, D., J. S. Clark, A. Ciechanowicz, G. Kurzawski, T. Sulikowski et M. Naruszewicz (1998). "Leptin receptor isoforms expressed in human adipose tissue." Metabolism **47**(7): 844-7.
- Kim, M., Maachi, M., Capeau, J., Bastard, J-P. (2006). "Adiponectin and metabolic syndrome." LigandAssay **11**(
- Kishida, Y., M. Hirao, N. Tamai, A. Nampei, T. Fujimoto, T. Nakase, N. Shimizu, H. Yoshikawa et A. Myoui (2005). "Leptin regulates chondrocyte differentiation and matrix maturation during endochondral ossification." Bone **37**(5): 607-21.

- Kos, K., A. L. Harte, N. F. da Silva, A. Tonchev, G. Chaldakov, S. James, D. R. Snead, B. Hoggart, J. P. O'Hare, P. G. McTernan et S. Kumar (2007). "Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the human hypothalamus." J Clin Endocrinol Metab **92**(3): 1129-36.
- Ku, J. H., C. K. Lee, B. S. Joo, B. M. An, S. H. Choi, T. H. Wang et H. L. Cho (2009). "Correlation of synovial fluid leptin concentrations with the severity of osteoarthritis." Clin Rheumatol **28**(12): 1431-5.
- Kwan Tat, S., N. Amiable, J. P. Pelletier, C. Boileau, D. Lajeunesse, N. Duval et J. Martel-Pelletier (2009). "Modulation of OPG, RANK and RANKL by human chondrocytes and their implication during osteoarthritis." Rheumatology (Oxford) **48**(12): 1482-90.
- Lafeber, F. P., H. L. van Roy, P. M. van der Kraan, W. B. van den Berg et J. W. Bijlsma (1997). "Transforming growth factor-beta predominantly stimulates phenotypically changed chondrocytes in osteoarthritic human cartilage." J Rheumatol **24**(3): 536-42.
- Lago F, D. C., Gómez-Reino J, Gualillo O (2007). "Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation." Nat Clin Pract Rheumatol **3**(12): 716-24.
- Lago, R., R. Gomez, M. Otero, F. Lago, R. Gallego, C. Dieguez, J. J. Gomez-Reino et O. Gualillo (2008). "A new player in cartilage homeostasis: adiponectin induces nitric oxide synthase type II and pro-inflammatory cytokines in chondrocytes." Osteoarthritis Cartilage **16**(9): 1101-9.
- Lajeunesse, D., J. P. Pelletier et J. Martel-Pelletier (2005). "Osteoarthritis: a metabolic disease induced by local abnormal leptin activity?" Curr Rheumatol Rep **7**(2): 79-81.
- Lajeunesse, D. et P. Reboul (2003). "Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling." Curr Opin Rheumatol **15**(5): 628-33.
- Lang, D., J. Knop, H. Wesche, U. Raffetseder, R. Kurrle, D. Boraschi et M. U. Martin (1998). "The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness." J Immunol **161**(12): 6871-7.
- Lark, M. W., J. T. Gordy, J. R. Weidner, J. Ayala, J. H. Kimura, H. R. Williams, R. A. Mumford, C. R. Flannery, S. S. Carlson, M. Iwata et al. (1995). "Cell-mediated catabolism of aggrecan. Evidence that cleavage at the "aggrecanase" site (Glu373-Ala374) is a primary event in proteolysis of the interglobular domain." J Biol Chem **270**(6): 2550-6.
- Laurent, T. C., U. B. Laurent et J. R. Fraser (1996). "The structure and function of hyaluronan: An overview." Immunol Cell Biol **74**(2): A1-7.
- Li, C. et J. M. Friedman (1999). "Leptin receptor activation of SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 modulates Ob receptor signal transduction." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(17): 9677-82.

- Li, Y., D. A. Lacerda, M. L. Warman, D. R. Beier, H. Yoshioka, Y. Ninomiya, J. T. Oxford, N. P. Morris, K. Andrikopoulos, F. Ramirez et al. (1995). "A fibrillar collagen gene, *Coll1a1*, is essential for skeletal morphogenesis." Cell **80**(3): 423-30.
- Lin, S., L. H. Storlien et X. F. Huang (2000). "Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain." Brain Res **875**(1-2): 89-95.
- Lippiello, L., D. Hall et H. J. Mankin (1977). "Collagen synthesis in normal and osteoarthritic human cartilage." J Clin Invest **59**(4): 593-600.
- Liu, C., X. J. Liu, G. Barry, N. Ling, R. A. Maki et E. B. De Souza (1997). "Expression and characterization of a putative high affinity human soluble leptin receptor." Endocrinology **138**(8): 3548-54.
- Liu, H., Y. W. Lee et M. F. Dean (1998). "Re-expression of differentiated proteoglycan phenotype by dedifferentiated human chondrocytes during culture in alginate beads." Biochim Biophys Acta **1425**(3): 505-15.
- Lollmann, B., S. Gruninger, A. Stricker-Krongrad et M. Chiesi (1997). "Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues." Biochem Biophys Res Commun **238**(2): 648-52.
- Lum, Z. P., B. E. Hakala, J. S. Mort et A. D. Recklies (1996). "Modulation of the catabolic effects of interleukin-1 beta on human articular chondrocytes by transforming growth factor-beta." J Cell Physiol **166**(2): 351-9.
- Luo, W., T. S. Kuwada, L. Chandrasekaran, J. Zheng et M. L. Tanzer (1996). "Divergent secretory behavior of the opposite ends of aggrecan." J Biol Chem **271**(28): 16447-50.
- Lynn, R. B., G. Y. Cao, R. V. Considine, T. M. Hyde et J. F. Caro (1996). "Autoradiographic localization of leptin binding in the choroid plexus of ob/ob and db/db mice." Biochem Biophys Res Commun **219**(3): 884-9.
- Machinal-Quelin, F., M. N. Dieudonne, R. Pecquery, M. C. Leneuve et Y. Giudicelli (2002). "Direct in vitro effects of androgens and estrogens on ob gene expression and leptin secretion in human adipose tissue." Endocrine **18**(2): 179-84.
- Macule, F., S. Sastre, S. Lasurt, P. Sala, J. M. Segur et C. Mallofre (2005). "Hoffa's fat pad resection in total knee arthroplasty." Acta Orthop Belg **71**(6): 714-7.
- Maeda, N., I. Shimomura, K. Kishida, H. Nishizawa, M. Matsuda, H. Nagaretani, N. Furuyama, H. Kondo, M. Takahashi, Y. Arita, R. Komuro, N. Ouchi, S. Kihara, Y. Tochino, K. Okutomi, M. Horie, S. Takeda, T. Aoyama, T. Funahashi et Y. Matsuzawa (2002). "Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30." Nat Med **8**(7): 731-7.
- Maffei, M., J. Halaas, E. Ravussin, R. E. Pratley, G. H. Lee, Y. Zhang, H. Fei, S. Kim, R. Lallone, S. Ranganathan et al. (1995). "Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects." Nat Med **1**(11): 1155-61.

- Malfait, A. M., R. Q. Liu, K. Ijiri, S. Komiya et M. D. Tortorella (2002). "Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage." J Biol Chem **277**(25): 22201-8.
- Mao, X., C. K. Kikani, R. A. Riojas, P. Langlais, L. Wang, F. J. Ramos, Q. Fang, C. Y. Christ-Roberts, J. Y. Hong, R. Y. Kim, F. Liu et L. Q. Dong (2006). "APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function." Nat Cell Biol **8**(5): 516-23.
- Martel-Pelletier, J., M. P. Faure, R. McCollum, F. Mineau, J. M. Cloutier et J. P. Pelletier (1991). "Plasmin, plasminogen activators and inhibitor in human osteoarthritic cartilage." J Rheumatol **18**(12): 1863-71.
- Martel-Pelletier, J., R. McCollum, N. Fujimoto, K. Obata, J. M. Cloutier et J. P. Pelletier (1994). "Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis." Lab Invest **70**(6): 807-15.
- Matrisian, L. M. (1992). "The matrix-degrading metalloproteinases." Bioessays **14**(7): 455-63.
- Matyas, J. R., P. F. Ehlers, D. Huang et M. E. Adams (1999). "The early molecular natural history of experimental osteoarthritis. I. Progressive discoordinate expression of aggrecan and type II procollagen messenger RNA in the articular cartilage of adult animals." Arthritis Rheum **42**(5): 993-1002.
- McCowen, K. C., J. C. Chow et R. J. Smith (1998). "Leptin signaling in the hypothalamus of normal rats in vivo." Endocrinology **139**(11): 4442-7.
- McDougall, J. J., L. Watkins et Z. Li (2006). "Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a modulator of joint pain in a rat model of osteoarthritis." Pain **123**(1-2): 98-105.
- Meachim, G., G. Bentley et R. Baker (1977). "Effect of age on thickness of adult patellar articular cartilage." Ann Rheum Dis **36**(6): 563-8.
- Mendler, M., S. G. Eich-Bender, L. Vaughan, K. H. Winterhalter et P. Bruckner (1989). "Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI." J Cell Biol **108**(1): 191-7.
- Mercer, J. G., N. Hoggard, L. M. Williams, C. B. Lawrence, L. T. Hannah et P. Trayhurn (1996). "Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization." FEBS Lett **387**(2-3): 113-6.
- Middleton, J., A. Manthey et J. Tyler (1996). "Insulin-like growth factor (IGF) receptor, IGF-I, interleukin-1 beta (IL-1 beta), and IL-6 mRNA expression in osteoarthritic and normal human cartilage." J Histochem Cytochem **44**(2): 133-41.

- Middleton, J. F. et J. A. Tyler (1992). "Upregulation of insulin-like growth factor I gene expression in the lesions of osteoarthritic human articular cartilage." Ann Rheum Dis **51**(4): 440-7.
- Milan, G., M. Granzotto, A. Scarda, A. Calcagno, C. Pagano, G. Federspil et R. Vettor (2002). "Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss." Obes Res **10**(11): 1095-103.
- Minokoshi, Y., Y. B. Kim, O. D. Peroni, L. G. Fryer, C. Muller, D. Carling et B. B. Kahn (2002). "Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." Nature **415**(6869): 339-43.
- Moktar, N. M., H. M. Yusof, N. H. Yahaya, R. Muhamad et S. Das (2010). "The transcript level of interleukin-6 in the cartilage of idiopathic osteoarthritis of knee." Clin Ter **161**(1): 25-8.
- Moldovan, F., J. P. Pelletier, J. Hambor, J. M. Cloutier et J. Martel-Pelletier (1997). "Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta." Arthritis Rheum **40**(9): 1653-61.
- Morash, B., A. Li, P. R. Murphy, M. Wilkinson et E. Ur (1999). "Leptin gene expression in the brain and pituitary gland." Endocrinology **140**(12): 5995-8.
- Morgelin, M., M. Paulsson, D. Heinegard, U. Aebi et J. Engel (1995). "Evidence of a defined spatial arrangement of hyaluronate in the central filament of cartilage proteoglycan aggregates." Biochem J **307** (Pt 2)(595-601.
- Morton, N. M., V. Emilsson, Y. L. Liu et M. A. Cawthorne (1998). "Leptin action in intestinal cells." J Biol Chem **273**(40): 26194-201.
- Muir, H. (1995). "The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules." Bioessays **17**(12): 1039-48.
- Murphy, G., F. Willenbrock, R. V. Ward, M. I. Cockett, D. Eaton et A. J. Docherty (1992). "The C-terminal domain of 72 kDa gelatinase A is not required for catalysis, but is essential for membrane activation and modulates interactions with tissue inhibitors of metalloproteinases." Biochem J **283** (Pt 3)(637-41.
- Murphy, J. M., K. Dixon, S. Beck, D. Fabian, A. Feldman et F. Barry (2002). "Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis." Arthritis Rheum **46**(3): 704-13.
- Mutabaruka, M. S., M. Aoulad Aissa, A. Delalandre, M. Lavigne et D. Lajeunesse (2010). "Local leptin production in osteoarthritis subchondral osteoblasts may be responsible for their abnormal phenotypic expression." Arthritis Res Ther **12**(1): R20.

- Neumeier, M., J. Weigert, A. Schaffler, G. Wehrwein, U. Muller-Ladner, J. Scholmerich, C. Wrede et C. Buechler (2006). "Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells." J Leukoc Biol **79**(4): 803-8.
- Nguyen, Q., J. S. Mort et P. J. Roughley (1992). "Preferential mRNA expression of prostromelysin relative to procollagenase and in situ localization in human articular cartilage." J Clin Invest **89**(4): 1189-97.
- Nietfeld, J. J., A. J. Duits, M. G. Tilanus, M. E. van den Bosch, W. Den Otter, P. J. Capel et J. W. Bijlsma (1994). "Antisense oligonucleotides, a novel tool for the control of cytokine effects on human cartilage. Focus on interleukins 1 and 6 and proteoglycan synthesis." Arthritis Rheum **37**(9): 1357-62.
- Nishii, N., M. Takasu, Y. Ohba, S. Maeda, K. Kitoh, Y. Ohtsuka, T. Honjo, M. Saito et H. Kitagawa (2006). "Effects of administration of glucocorticoids and feeding status on plasma leptin concentrations in dogs." Am J Vet Res **67**(2): 266-70.
- Nishizawa, H., I. Shimomura, K. Kishida, N. Maeda, H. Kuriyama, H. Nagaretani, M. Matsuda, H. Kondo, N. Furuyama, S. Kihara, T. Nakamura, Y. Tochino, T. Funahashi et Y. Matsuzawa (2002). "Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein." Diabetes **51**(9): 2734-41.
- Ogier, V., O. Ziegler, L. Mejean, J. P. Nicolas et A. Stricker-Krongrad (2002). "Obesity is associated with decreasing levels of the circulating soluble leptin receptor in humans." Int J Obes Relat Metab Disord **26**(4): 496-503.
- Olney, R. C., K. Tsuchiya, D. M. Wilson, M. Mohtai, W. J. Maloney, D. J. Schurman et R. L. Smith (1996). "Chondrocytes from osteoarthritic cartilage have increased expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 (IGFBP-3) and -5, but not IGF-II or IGFBP-4." J Clin Endocrinol Metab **81**(3): 1096-103.
- Olsen, B. R. (1995). "New insights into the function of collagens from genetic analysis." Curr Opin Cell Biol **7**(5): 720-7.
- Olsen, B. R. (1997). "Collagen IX." Int J Biochem Cell Biol **29**(4): 555-8.
- Osaki M, T. L., Choy BK, Yoshida Y, Cheah KS, Auron PE, Goldring MB. (2003). "The TATA-containing core promoter of the type II collagen gene (COL2A1) is the target of interferon-gamma-mediated inhibition in human chondrocytes: requirement for Stat1 alpha, Jak1 and Jak2." Biochem J. **369**(Pt1): 103-15.
- Otero, M., R. Lago, F. Lago, J. J. Reino et O. Gualillo (2005). "Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin-1." Arthritis Res Ther **7**(3): R581-91.
- Pajvani, U. B., M. Hawkins, T. P. Combs, M. W. Rajala, T. Doebber, J. P. Berger, J. A. Wagner, M. Wu, A. Knopps, A. H. Xiang, K. M. Utzschneider, S. E. Kahn, J. M. Olefsky, T. A. Buchanan et P. E. Scherer (2004). "Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity." J Biol Chem **279**(13): 12152-62.

- Palmer, G. et C. Gabay (2003). "A role for leptin in rheumatic diseases?" Ann Rheum Dis **62**(10): 913-5.
- Pastoureau, P. C., A. C. Chomel et J. Bonnet (1999). "Evidence of early subchondral bone changes in the meniscectomized guinea pig. A densitometric study using dual-energy X-ray absorptiometry subregional analysis." Osteoarthritis Cartilage **7**(5): 466-73.
- Pelleymounter, M. A., M. J. Cullen, M. B. Baker, R. Hecht, D. Winters, T. Boone et F. Collins (1995). "Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice." Science **269**(5223): 540-3.
- Peyron, J. G. (1967). "[Articular cartilage and arthrosis]." Sem Hop **43**(2): 114-29.
- Peyron, J. G. (1987). "Risk factors in osteoarthritis--how do they work?" J Rheumatol **14 Spec No**(1-2).
- Plaisance, E. P., P. W. Grandjean, R. L. Judd, K. W. Jones et J. K. Taylor (2009). "The influence of sex, body composition, and nonesterified fatty acids on serum adipokine concentrations." Metabolism **58**(11): 1557-63.
- Poole, A. R., I. Pidoux, A. Reiner, H. Choi et L. C. Rosenberg (1984). "Association of an extracellular protein (chondrocalcin) with the calcification of cartilage in endochondral bone formation." J Cell Biol **98**(1): 54-65.
- Poole, C. A. (1997). "Articular cartilage chondrons: form, function and failure." J Anat **191** (Pt 1)(1-13).
- Poole, C. A., S. Ayad et R. T. Gilbert (1992). "Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy." J Cell Sci **103** (Pt 4)(1101-10).
- Presle, N., P. Pottie, H. Dumond, C. Guillaume, F. Lopicque, S. Pallu, D. Mainard, P. Netter et B. Terlain (2006). "Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production." Osteoarthritis Cartilage **14**(7): 690-5.
- Radin, E. L. et R. M. Rose (1986). "Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage." Clin Orthop Relat Res **213**: 34-40.
- Raynauld, J. P., J. Martel-Pelletier, M. J. Berthiaume, F. Labonte, G. Beaudoin, J. A. de Guise, D. A. Bloch, D. Choquette, B. Haraoui, R. D. Altman, M. C. Hochberg, J. M. Meyer, G. A. Cline et J. P. Pelletier (2004). "Quantitative magnetic resonance imaging evaluation of knee osteoarthritis progression over two years and correlation with clinical symptoms and radiologic changes." Arthritis Rheum **50**(2): 476-87.
- Revilla, M., L. F. Villa, E. R. Hernandez, A. Sanchez-Atrio, J. Cortes et H. Rico (1997). "Influence of weight and gonadal status on total and regional bone mineral content and on weight-bearing and non-weight-bearing bones, measured by dual-energy X-ray absorptiometry." Maturitas **28**(1): 69-74.

- Ronziere, M. C., S. Ricard-Blum, J. Tiollier, D. J. Hartmann, R. Garrone et D. Herbage (1990). "Comparative analysis of collagens solubilized from human foetal, and normal and osteoarthritic adult articular cartilage, with emphasis on type VI collagen." Biochim Biophys Acta **1038**(2): 222-30.
- Ryu, J., B. V. Treadwell et H. J. Mankin (1984). "Biochemical and metabolic abnormalities in normal and osteoarthritic human articular cartilage." Arthritis Rheum **27**(1): 49-57.
- Schaffler, A., A. Ehling, E. Neumann, H. Herfarth, I. Tarner, J. Scholmerich, U. Muller-Ladner et S. Gay (2003). "Adipocytokines in synovial fluid." JAMA **290**(13): 1709-10.
- Schott, A. M., C. Cormier, D. Hans, F. Favier, E. Hausherr, P. Dargent-Molina, P. D. Delmas, C. Ribot, J. L. Sebert, G. Breart et P. J. Meunier (1998). "How hip and whole-body bone mineral density predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS Prospective Study." Osteoporos Int **8**(3): 247-54.
- Scott, J. E. et R. A. Stockwell (2006). "Cartilage elasticity resides in shape module decoran and aggrecan sumps of damping fluid: implications in osteoarthrosis." J Physiol **574**(Pt 3): 643-50.
- Shapiro, F., S. Koide et M. J. Glimcher (1993). "Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage." J Bone Joint Surg Am **75**(4): 532-53.
- Shingleton, W. D., D. J. Hodges, P. Brick et T. E. Cawston (1996). "Collagenase: a key enzyme in collagen turnover." Biochem Cell Biol **74**(6): 759-75.
- Shlopov, B. V., W. R. Lie, C. L. Mainardi, A. A. Cole, S. Chubinskaya et K. A. Hasty (1997). "Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases." Arthritis Rheum **40**(11): 2065-74.
- Sierra-Honigmann MR. , N. A., Murakami C. , García-Cardeña G. , Papapetropoulos A. , Sessa WC. , Madge LA. , Schechner JS. , Schwabb MB. , Polverini PJ. , Flores-Riveros JR. (1998). "Biological action of leptin as an angiogenic factor." Science **281**(5383): 1683-6.
- Silacci, P., J. M. Dayer, A. Desgeorges, R. Peter, C. Manueddu et P. A. Guerne (1998). "Interleukin (IL)-6 and its soluble receptor induce TIMP-1 expression in synoviocytes and chondrocytes, and block IL-1-induced collagenolytic activity." J Biol Chem **273**(22): 13625-9.
- Silbiger, S. M., V. L. Jacobsen, R. L. Cupples et R. A. Koski (1994). "Cloning of cDNAs encoding human TIMP-3, a novel member of the tissue inhibitor of metalloproteinase family." Gene **141**(2): 293-7.
- Simopoulou, T., K. N. Malizos, D. Iliopoulos, N. Stefanou, L. Papatheodorou, M. Ioannou et A. Tsezou (2007). "Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism." Osteoarthritis Cartilage **15**(8): 872-83.

- Skopkova, M., A. Penesova, H. Sell, Z. Radikova, M. Vlcek, R. Imrich, J. Koska, J. Ukropec, J. Eckel, I. Klimes et D. Gasperikova (2007). "Protein array reveals differentially expressed proteins in subcutaneous adipose tissue in obesity." Obesity (Silver Spring) **15**(10): 2396-406.
- Smith-Kirwin, S. M., D. M. O'Connor, J. De Johnston, E. D. Lancey, S. G. Hassink et V. L. Funanage (1998). "Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk." J Clin Endocrinol Metab **83**(5): 1810-3.
- Somwar R, K. D., Sweeney G, Huang C, Niu W, Lador C, Ramlal T, Klip A (2001). "GLUT4 translocation precedes the stimulation of glucose uptake by insulin in muscle cells: potential activation of GLUT4 via p38 mitogen-activated protein kinase." Biochem J. **359**(Pt 3): 639-49.
- Song, H., J. Chan et B. H. Rovin (2009). "Induction of chemokine expression by adiponectin in vitro is isoform dependent." Transl Res **154**(1): 18-26.
- Strongin, A. Y., I. Collier, G. Bannikov, B. L. Marmer, G. A. Grant et G. I. Goldberg (1995). "Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease." J Biol Chem **270**(10): 5331-8.
- Su, S., J. Grover, P. J. Roughley, J. A. DiBattista, J. Martel-Pelletier, J. P. Pelletier et M. Zafarullah (1999). "Expression of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family in normal and osteoarthritic joints." Rheumatol Int **18**(5-6): 183-91.
- Takahashi, Y., Y. Okimura, I. Mizuno, K. Iida, T. Takahashi, H. Kaji, H. Abe et K. Chihara (1997). "Leptin induces mitogen-activated protein kinase-dependent proliferation of C3H10T1/2 cells." J Biol Chem **272**(20): 12897-900.
- Tan, W., F. Wang, M. Zhang, D. Guo, Q. Zhang et S. He (2009). "High adiponectin and adiponectin receptor 1 expression in synovial fluids and synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis." Semin Arthritis Rheum **38**(6): 420-7.
- Tanabe, K., S. Okuya, Y. Tanizawa, A. Matsutani et Y. Oka (1997). "Leptin induces proliferation of pancreatic beta cell line MIN6 through activation of mitogen-activated protein kinase." Biochem Biophys Res Commun **241**(3): 765-8.
- Tardif, G., P. Reboul, J. P. Pelletier, C. Geng, J. M. Cloutier et J. Martel-Pelletier (1996). "Normal expression of type 1 insulin-like growth factor receptor by human osteoarthritic chondrocytes with increased expression and synthesis of insulin-like growth factor binding proteins." Arthritis Rheum **39**(6): 968-78.
- Teichtahl, A. J., A. E. Wluka, J. Proietto et F. M. Cicuttini (2005). "Obesity and the female sex, risk factors for knee osteoarthritis that may be attributable to systemic or local leptin biosynthesis and its cellular effects." Med Hypotheses **65**(2): 312-5.
- Thomas, J. T., S. Ayad et M. E. Grant (1994). "Cartilage collagens: strategies for the study of their organisation and expression in the extracellular matrix." Ann Rheum Dis **53**(8): 488-96.

- Thomas, T. (2003). "Leptin: a potential mediator for protective effects of fat mass on bone tissue." Joint Bone Spine **70**(1): 18-21.
- Thornberry, N. A., H. G. Bull, J. R. Calaycay, K. T. Chapman, A. D. Howard, M. J. Kostura, D. K. Miller, S. M. Molineaux, J. R. Weidner, J. Aunins et al. (1992). "A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes." Nature **356**(6372): 768-74.
- Toda, Y., T. Toda, S. Takemura, T. Wada, T. Morimoto et R. Ogawa (1998). "Change in body fat, but not body weight or metabolic correlates of obesity, is related to symptomatic relief of obese patients with knee osteoarthritis after a weight control program." J Rheumatol **25**(11): 2181-6.
- Tortorella, M. D., T. C. Burn, M. A. Pratta, I. Abbaszade, J. M. Hollis, R. Liu, S. A. Rosenfeld, R. A. Copeland, C. P. Decicco, R. Wynn, A. Rockwell, F. Yang, J. L. Duke, K. Solomon, H. George, R. Bruckner, H. Nagase, Y. Itoh, D. M. Ellis, H. Ross, B. H. Wiswall, K. Murphy, M. C. Hillman, Jr., G. F. Hollis, R. C. Newton, R. L. Magolda, J. M. Trzaskos et E. C. Arner (1999). "Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins." Science **284**(5420): 1664-6.
- Tortorella, M. D., R. Q. Liu, T. Burn, R. C. Newton et E. Arner (2002). "Characterization of human aggrecanase 2 (ADAM-TS5): substrate specificity studies and comparison with aggrecanase 1 (ADAM-TS4)." Matrix Biol **21**(6): 499-511.
- Tu, H., A. J. Kastin, C. Bjorbaek et W. Pan (2007). "Urocortin trafficking in cerebral microvessel endothelial cells." J Mol Neurosci **31**(2): 171-81.
- Ushiyama, T., T. Chano, K. Inoue et Y. Matsusue (2003). "Cytokine production in the infrapatellar fat pad: another source of cytokines in knee synovial fluids." Ann Rheum Dis **62**(2): 108-12.
- van Beuningen, H. M., O. J. Arntz et W. B. van den Berg (1991). "In vivo effects of interleukin-1 on articular cartilage. Prolongation of proteoglycan metabolic disturbances in old mice." Arthritis Rheum **34**(5): 606-15.
- van den Berg, W. B. (1995). "Growth factors in experimental osteoarthritis: transforming growth factor beta pathogenic?" J Rheumatol Suppl **43**(143-5).
- van der Kraan, P. M., H. L. Glansbeek, E. L. Vitters et W. B. van den Berg (1997). "Early elevation of transforming growth factor-beta, decorin, and biglycan mRNA levels during cartilage matrix restoration after mild proteoglycan depletion." J Rheumatol **24**(3): 543-9.
- van der Kraan, P. M., E. L. Vitters, H. M. van Beuningen, L. B. van de Putte et W. B. van den Berg (1990). "Degenerative knee joint lesions in mice after a single intra-articular collagenase injection. A new model of osteoarthritis." J Exp Pathol (Oxford) **71**(1): 19-31.

- van der Kraan, P. M., E. L. Vitters, L. B. van de Putte et W. B. van den Berg (1989). "Development of osteoarthritic lesions in mice by "metabolic" and "mechanical" alterations in the knee joints." Am J Pathol **135**(6): 1001-14.
- Van Dielen FM., v. t. V. C., Buurman WA., Greve JW. (2002). "Leptin and soluble leptin receptor levels in obese and weight-losing individuals." J Clin Endocrinol Metab **87**(4): 1708-16.
- Vertel, B. M. (1995). "The ins and outs of aggrecan." Trends Cell Biol **5**(12): 458-64.
- Vozarova, B., N. Stefan, R. S. Lindsay, J. Krakoff, W. C. Knowler, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, M. Stumvoll, C. Weyer et P. A. Tataranni (2002). "Low plasma adiponectin concentrations do not predict weight gain in humans." Diabetes **51**(10): 2964-7.
- Vuolteenaho, K., A. Koskinen, M. Kukkonen, R. Nieminen, U. Paivarinta, T. Moilanen et E. Moilanen (2009). "Leptin enhances synthesis of proinflammatory mediators in human osteoarthritic cartilage--mediator role of NO in leptin-induced PGE2, IL-6, and IL-8 production." Mediators Inflamm **2009**(345838).
- Wang, C. P., H. L. Hsu, W. C. Hung, T. H. Yu, Y. H. Chen, C. A. Chiu, L. F. Lu, F. M. Chung, S. J. Shin et Y. J. Lee (2009). "Increased epicardial adipose tissue (EAT) volume in type 2 diabetes mellitus and association with metabolic syndrome and severity of coronary atherosclerosis." Clin Endocrinol (Oxf) **70**(6): 876-82.
- Wang, J., R. Liu, M. Hawkins, N. Barzilai et L. Rossetti (1998). "A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat." Nature **393**(6686): 684-8.
- Warnock, J. J. et B. S. Beale (2004). "Arthroscopy of the antebrachiocarpal joint in dogs." J Am Vet Med Assoc **224**(6): 867-74, 5.
- Wegrowski, Y. et F. X. Maquart (2004). "Involvement of stromal proteoglycans in tumour progression." Crit Rev Oncol Hematol **49**(3): 259-68.
- Wei, G., X. Bai, A. K. Sarkar et J. D. Esko (1999). "Formation of HNK-1 determinants and the glycosaminoglycan tetrasaccharide linkage region by UDP-GlcUA:Galactose beta1, 3-glucuronosyltransferases." J Biol Chem **274**(12): 7857-64.
- Weyer, C., T. Funahashi, S. Tanaka, K. Hotta, Y. Matsuzawa, R. E. Pratley et P. A. Tataranni (2001). "Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia." J Clin Endocrinol Metab **86**(5): 1930-5.
- Widdowson, P. S., R. Upton, R. Buckingham, J. Arch et G. Williams (1997). "Inhibition of food response to intracerebroventricular injection of leptin is attenuated in rats with diet-induced obesity." Diabetes **46**(11): 1782-5.
- Williams, L. B., R. L. Fawcett, A. S. Waechter, P. Zhang, B. E. Kogon, R. Jones, M. Inman, J. Huse et R. V. Considine (2000). "Leptin production in adipocytes from morbidly obese subjects: stimulation by dexamethasone, inhibition with troglitazone, and influence of gender." J Clin Endocrinol Metab **85**(8): 2678-84.

- Wilsey, J., S. Zolotukhin, V. Prima et P. J. Scarpace (2003). "Central leptin gene therapy fails to overcome leptin resistance associated with diet-induced obesity." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **285**(5): R1011-20.
- Wluka, A. E., R. Wolfe, S. Stuckey et F. M. Cicuttini (2004). "How does tibial cartilage volume relate to symptoms in subjects with knee osteoarthritis?" Ann Rheum Dis **63**(3): 264-8.
- Wolf, A. M., D. Wolf, H. Rumpold, B. Enrich et H. Tilg (2004). "Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes." Biochem Biophys Res Commun **323**(2): 630-5.
- Xu, A., K. W. Chan, R. L. Hoo, Y. Wang, K. C. Tan, J. Zhang, B. Chen, M. C. Lam, C. Tse, G. J. Cooper et K. S. Lam (2005). "Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes." J Biol Chem **280**(18): 18073-80.
- Xu, J. P., J. Ji et J. C. Shen (2009). "The effect of a cholesterol liquid crystalline structure on osteoblast cell behavior." Biomed Mater **4**(2): 025010.
- Yadav, V. K., F. Oury, N. Suda, Z. W. Liu, X. B. Gao, C. Confavreux, K. C. Klemenhagen, K. F. Tanaka, J. A. Gingrich, X. E. Guo, L. H. Tecott, J. J. Mann, R. Hen, T. L. Horvath et G. Karsenty (2009). "A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure." Cell **138**(5): 976-89.
- Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Ito, A. Tsuchida, T. Yokomizo, S. Kita, T. Sugiyama, M. Miyagishi, K. Hara, M. Tsunoda, K. Murakami, T. Ohteki, S. Uchida, S. Takekawa, H. Waki, N. H. Tsuno, Y. Shibata, Y. Terauchi, P. Froguel, K. Tobe, S. Koyasu, K. Taira, T. Kitamura, T. Shimizu, R. Nagai et T. Kadowaki (2003). "Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects." Nature **423**(6941): 762-9.
- Yamauchi, T., Y. Nio, T. Maki, M. Kobayashi, T. Takazawa, M. Iwabu, M. Okada-Iwabu, S. Kawamoto, N. Kubota, T. Kubota, Y. Ito, J. Kamon, A. Tsuchida, K. Kumagai, H. Kozono, Y. Hada, H. Ogata, K. Tokuyama, M. Tsunoda, T. Ide, K. Murakami, M. Awazawa, I. Takamoto, P. Froguel, K. Hara, K. Tobe, R. Nagai, K. Ueki et T. Kadowaki (2007). "Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions." Nat Med **13**(3): 332-9.
- Zabeau, L., D. Lavens, F. Peelman, S. Eyckerman, J. Vandekerckhove et J. Tavernier (2003). "The ins and outs of leptin receptor activation." FEBS Lett **546**(1): 45-50.
- Zabolotny, J. M., K. K. Bence-Hanulec, A. Stricker-Krongrad, F. Haj, Y. Wang, Y. Minokoshi, Y. B. Kim, J. K. Elmquist, L. A. Tartaglia, B. B. Kahn et B. G. Neel (2002). "PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo." Dev Cell **2**(4): 489-95.
- Zamboni, M., V. Di Francesco, U. Garbin, A. Fratta Pasini, G. Mazzali, C. Stranieri, E. Zoico, F. Fantin, O. Bosello et L. Cominacini (2007). "Adiponectin gene expression and adipocyte NF-kappaB transcriptional activity in elderly overweight and obese women:

- inter-relationships with fat distribution, hs-CRP, leptin and insulin resistance." Int J Obes (Lond) **31**(7): 1104-9.
- Zanni, M., A. Tamburro et D. Rotilio (1995). "IL-1 beta and TGF-beta 1 modulate the sulphation grade of chondro-disaccharides in porcine articular cartilage: a capillary electrophoresis study." J Lipid Mediat Cell Signal **12**(1): 29-44.
- Zha, J. M., W. J. Di, T. Zhu, Y. Xie, J. Yu, J. Liu, P. Chen et G. Ding (2009). "Comparison of gene transcription between subcutaneous and visceral adipose tissue in Chinese adults." Endocr J **56**(8): 935-44.
- Zhang, F., M. B. Basinski, J. M. Beals, S. L. Briggs, L. M. Churgay, D. K. Clawson, R. D. DiMarchi, T. C. Furman, J. E. Hale, H. M. Hsiung, B. E. Schoner, D. P. Smith, X. Y. Zhang, J. P. Wery et R. W. Schevitz (1997). "Crystal structure of the obese protein leptin-E100." Nature **387**(6629): 206-9.
- Ziza JM, Z. V., Desplaces N and Mamouchy P. (2006). "Infections sur prothèses articulaires : conditions du diagnostic et traitement." Revue du Rhumatisme **73**(337-44).

Summary

Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease and represents one of the most frequent and disabling disease. There is a positive association between obesity and OA, and not only for knee joints but also for non-weight-bearing joints suggesting that adipose-derived proteins, namely adipokines, may be some keys factors in OA pathophysiology. First, we found that leptin and adiponectin expression and their receptor evolves in an opposite way and depend on differentiation stage of chondrocyte. The production of adipokines were then compared according to adipose tissue and some differences were found between, the infrapatellat fat pad and subcutaneous adipose tissue. After this work, we aimed to further characterize the role of leptin and adiponectin in OA. Adiponectin production by chondrocytes increases when cartilage is damaged and seems to be directly related with MMP-13 and TGF- β expression. AdipoR1 expression is associated with the expression of matrix components and with Sox9, a transcription factor involved in their synthesis. Adiponectin treatment confirms data in OA patient, that is adiponectin can induce TGF- β and MMP-13. Then, we showed obesity influences the chondrocyte responsivness to leptin. This adipokine seems to protect cartilage collected from normal or overweight patient by stimulating IGF-1, type 2 collagen and TIMP-2 expression while leptin increases MMP-13 expression for obese patients. Finally, experimental OA in Zucker rat deficient in leptin receptor, showed the protective effect of leptin on cartilage and on subchondral bone.

Key words : Adipokines, Obesity, Osteoarthritis (OA), Cartilage

Résumé

L'arthrose est une maladie dégénérative des articulations et représente la deuxième cause d'invalidité en France. En raison des liens entre l'obésité et l'arthrose concernant à la fois les articulations portantes et non portantes, nous faisons l'hypothèse que des protéines produites par le tissu adipeux, les adipokines, constituent des facteurs clés impliqués dans cette arthropathie. En premier lieu, nous avons montré que l'expression de la leptine, de l'adiponectine et de leurs récepteurs évolue de façon inverse et dépend fortement de l'état de différenciation des chondrocytes. Dans une seconde étude, nous avons comparé la production des adipokines par le ligament adipeux de Hoffa à celle mesurée dans la graisse sous-cutanée et avons ainsi mis en évidence des différences entre les 2 tissus adipeux. Les travaux réalisés ensuite ont permis de préciser le rôle des adipokines dans l'arthrose. Ainsi, la production d'adiponectine par les chondrocytes augmente lorsque le cartilage se dégrade et apparaît directement reliée à celle de la MMP-13 et du TGF- β . En revanche, l'expression de son récepteur AdipoR1 est associée à l'expression d'éléments matriciels et d'un facteur de transcription spécifique du cartilage impliqué dans la synthèse de ces éléments. Le traitement des chondrocytes à l'adiponectine a permis de confirmer *in vitro* les données observées *in vivo* chez les patients atteints d'arthrose, à savoir que l'adiponectine induit l'expression du TGF- β et de la MMP-13. Les résultats obtenus avec la leptine indiquent par ailleurs que l'obésité influence fortement la réponse des chondrocytes à cette adipokine. Elle semble ainsi protéger le cartilage chez les patients non obèses en stimulant l'expression de l'IGF-1, du collagène de type 2 et du TIMP-2, mais contribue au processus dégénératif chez les patients obèses en augmentant l'expression de la MMP-13.

Enfin l'induction d'une arthrose expérimentale chez le rat Zucker n'ayant pas de récepteur fonctionnel à la leptine a montré que cette adipokine est susceptible de préserver l'articulation des modifications du cartilage et surtout de l'os sous-chondral.

Mots-clés : Adipokines, Obésité, Arthrose, Cartilage