



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>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ -NANCY I

1999

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE SANTE"

N° bibliothèque | | | | | | | | | |

THESE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

HENRI POINCARÉ - NANCY I

mention « Biologie et Santé - Sciences du Médicament »

présentée et soutenue publiquement le 12 Juillet 1999 par

Corinne GUINGAMP

Etudes morphologique, fonctionnelle, et biochimique de modèles d'arthrose expérimentale chez le rat

Intérêts du modèle d'arthrose induite par injection de iodoacétate

Directeur de thèse : P. GILLET, Professeur

MEMBRES DU JURY

J. POUREL Professeur

B. TERLAIN Docteur

P. GILLET Professeur

JF. STOLTZ Professeur

Rapporteurs : W. HORNEBECK Directeur de Recherches CNRS

X. CHEVALIER Professeur

A Monsieur le Professeur Jacques POUREL,

Ses grandes qualités de Rhumatologue sont parvenues jusqu'à nous, ainsi que l'intérêt qu'il porte à la Recherche. Nous lui témoignons notre reconnaissance d'avoir bien voulu participer à cette thèse.

A Monsieur le Docteur Bernard TERLAIN,

Nous avons apprécié ses grandes connaissances et sa rigueur scientifiques. Il nous a permis de nous révéler dans ce sujet qu'il a initié. Pour les nombreux conseils et les encouragements qu'il nous a adressés, pour la curiosité qu'il a montrée à l'égard de notre travail, nous lui exprimons notre grande considération.

A Monsieur le Professeur Pierre GILLET,

Il s'investit avec un dynamisme et une efficacité peu communs dans le fonctionnement du Laboratoire. Pour la confiance qu'il nous a témoignée et le soutien qu'il nous a souvent apporté, pour ses conseils scientifiques et son avis de Rhumatologue, nous lui exprimons notre sincère gratitude et notre considération.

**A Monsieur William HORNEBECK,
Directeur de Recherches CNRS**

Nous le remercions de bien vouloir juger notre thèse et nous lui exprimons notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Jean-François STOLTZ,

Nous lui témoignons notre reconnaissance d'avoir accepté de juger notre thèse et nous lui exprimons notre grande considération.

A Monsieur le Professeur Xavier CHEVALIER,

Il nous fait l'honneur de juger notre thèse, et nous lui exprimons notre gratitude et notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Patrick NETTER,

Nous le remercions pour son accueil chaleureux au sein du Laboratoire, qu'il dirige avec une énergie peu commune. Pour son soutien tout au long de notre thèse, nous lui exprimons notre sincère reconnaissance et notre profond respect.

A Monsieur le Professeur René-Jean ROYER,

Il nous a accueilli avec bienveillance dans son Laboratoire. Nous lui exprimons notre profond respect.

A Madame le Docteur Pascale POTTIE,

Elle nous a initié à la Recherche scientifique. Pour son aide, son soutien et sa gentillesse tout au long de notre thèse, nous l'assurons de notre profonde reconnaissance et de notre sincère amitié.

A Monsieur le Docteur Amr ABID,

Il nous a initié à la de Biologie Moléculaire. Nous lui exprimons notre reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Jean-Yves JOUZEAU,

Il fait preuve d'une rigueur scientifique à la hauteur de ses grandes connaissances. Nous avons apprécié ses remarques et ses conseils, et nous lui exprimons notre considération.

A Mademoiselle Stéphanie ETIENNE,

à Monsieur Boris VIAL,

à Monsieur David CARRARA,

à Monsieur Pierre BELINGA,

Nous leur assurons nos remerciements pour avoir contribué à ce travail.

A Monsieur Michel THIERY,

Nous l'assurons de notre reconnaissance d'avoir pris soin des animaux.

A Lionel PHILIPPE et à Meriem KOUFANY,

Pour leur bonne humeur quotidienne et leur aide. Nous leur assurons notre sincère amitié.

Aux thésards et à l'ensemble du personnel du Laboratoire.

A Sandra, à Murielle, à Manue, et à tous mes amis,

Pour leur bonne humeur et pour leur soutien, nous leur assurons notre gratitude et notre sincère amitié.

A ma famille,

à mes parents,

à Eric, à mes sœurs Natacha et Gwénaëlle,

à Olivier,

Je dédie cette thèse.

A. Etude bibliographique 4

Chapitre I. Homéostasie du cartilage articulaire

1. Relation structure-fonction du cartilage articulaire hyalin. 6
2. Le cartilage calcifié. 17
3. Les chondrocytes. 18
4. Différenciation et maturation chondrocytaire. 22

Chapitre II. L'arthrose 30

1. Introduction. 30
2. Facteurs étiologiques. 30
3. La douleur articulaire. 37

Chapitre III. Physiopathologie de l'arthrose 40

1. Destruction du cartilage articulaire. 41
2. Ostéophytose. 48
3. Apoptose chondrocytaire dans l'arthrose. 50
4. Les traitements de l'arthrose. 52

Chapitre IV. Les modèles d'arthrose expérimentale 56

B. Etude expérimentale 59

Chapitre V. Matériel et méthodes

1. Animaux. 60
2. Section du ligament croisé antérieur chez le rat. 60
3. Injection intra-articulaire infra-patellaire chez le rat. 61
4. Télémétrie. 61
5. Etudes morphologiques. 62
6. Dosages biochimiques. 64
7. Mise en évidence de la dégradation de l'agrécan par SDS-PAGE. 65
8. Etude de l'expression des ARNm des gènes codant pour l'interleukine-1 β , bax et Bcl-2. 66
9. Mise en évidence des chondrocytes apoptotiques. 68

Annexe. Composition des solutions utilisées 69

- I. Dosage colorimétrique des GAG sulfatés. 69
- II. Synthèse des protéoglycanes. 69
- III. Mise en évidence de la dégradation de l'agrécan par SDS-PAGE. 69
- IV. Synthèse et biotinylation des sondes. 70
- V. Southern blot. 70

Résultats et discussion

Chapitre VI. Sélection d'un modèle d'arthrose développé chez le rat 71

1. Injection intra-articulaire de MIA chez le rat. 73
2. Injection intra-articulaire de papaïne chez le rat. 78
3. Injection intra-articulaire de collagénase bactérienne chez le rat. 81
4. Section du ligament croisé antérieur chez le rat. 84

Discussion 93

1. Injection intra-articulaire de MIA. 94
2. La section du LCA. 96
3. Injection intra-articulaire de papaïne et de collagénase. 99
4. Conclusion. 100

Chapitre VII. Arthrose induite par l'injection de MIA : réponse dose-dépendante 102

Chapitre VIII. Intérêts de l'IRM dans l'arthrose induite par l'injection de MIA 106

1. Introduction. 106

2. Résultats et discussion.	107
Chapitre IX. Modulation pharmacologique de la douleur induite par l'injection de MIA	109
Discussion	111
Chapitre X. Analyse de la protéine porteuse de l'agrécan en SDS-PAGE.	112
1. Résultats.	112
2. Identification des différents fragments de l'agrécan.	113
Discussion	115
Chapitre XI. Apoptose chondrocytaire et arthrose	117
1. Hypothèses.	117
2. Résultats.	118
3. Discussion.	119
<i>Conclusion et perspectives</i>	120
<i>Références</i>	123

Liste des abréviations

AH	Acide hyaluronique
AIF	Apoptosis-induced factor
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BMP	Bone morphogenetic protein
BSP	Bone sialoprotein
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
COX	Cyclo-oxygénase
CS	Chondroïtine sulfate
DS	Dermatane sulfate
FACIT	Fibril associated collagens with interrupted triple-helix
GAG	Glycosaminoglycane
GH	Growth hormone
HS	Héparane sulfate
Ig	Immunoglobuline
IGF BP	Insulin-like growth factor binding protein
IGF	Insulin-like growth factor
Ihh	Indian hedgehog
IL	Interleukine
IL-1R	Interleukin-1 receptor
IL-1Ra	IL-1R antagonist
KS	Kératane sulfate
LCA	Ligament croisé antérieur

MMP	Matrix metalloproteinase
MPa	MégaPascal
MT-MMP	Membrane type metalloproteinase
NGF	Nerve growth factor
NO	Monoxyde d'azote
NOS	NO synthase
PG	Protéoglycane
PKC	Protéine kinase C
PNC	Protéine non collagénique
PTH-rP	Parathyroid hormone-related peptide
RBP	Retinol binding protein
RE	Reticulum endoplasmique
SP	Substance P
TGF	Transforming growth factor
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
tPA (uPA)	Tissue plasminogen activator (ou urokinase plasminogen activator)
TUNEL	Terminal nucleotidyl transferase-mediated desoxyuridine-triphosphate nick end labeling

Publications élaborées au cours de la thèse

Decaris E, **Guigamp C**, Chat M, Philippe L, Grillasca JP, Abid A, Minn A, Gillet P, Netter P. Evidence for a neurogenic transmission inducing a degenerative cartilage damage distant from a local inflammation. *Arthritis and Rheumatism* 1999 (sous presse)

Gégout-Pottie P, Philippe L, Simonin MA, **Guigamp C**, Gillet P, Netter P, Terlain B. Biotelemetry: an original approach to experimental models of inflammation. *Inflammation Research* 1999, 48:417-424

Guigamp C, Gégout-Pottie P, Philippe L, Terlain B, Netter P, Gillet P. Monoiodoacetate-induced experimental osteoarthritis : a dose-response study of loss of mobility, morphology and biochemistry. *Arthritis and Rheumatism* 1997, 40(9):1670-1679

Philippe L, Gégout-Pottie P, **Guigamp C**, Bordji K, Terlain B, Netter P, Gillet P. Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. *American Journal of Physiology* 1997, 273(42):R1550-R1556

Loeuille D, Gonord P, **Guigamp C**, Gillet P, Blum A, Sauzade M, Netter P : In vitro MR microimaging of experimental osteoarthritis in the rat knee. *Journal of Rheumatology* 1997, 24:133-139

Gégout P, Gillet P, Chevrier D, **Guigamp C**, Terlain B, Netter P : Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. *Life Sciences* 1994, 55(17):321-326

Guigamp C, Pottie P, Abid A, Terlain B, Netter P Gillet P: Chondrocyte apoptosis in mono-iodoacetate-induced osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, soumis

Introduction

Introduction

L'arthrose est à la fois le rhumatisme le plus fréquent et l'une des pathologies chroniques les plus répandues. On estime que 15 % de la population mondiale souffrent de cette maladie invalidante et douloureuse. L'atteinte des articulations des membres inférieurs (genoux et hanches) revêt une importance toute particulière puisqu'elle peut conduire, dans les phases ultimes de la maladie, à une invalidité partielle ou totale : l'arthrose a donc une grande importance médico-sociale et économique.

L'arthrose échappe à tout traitement qui se voudrait chondroprotecteur. Seules les poussées inflammatoires de la membrane synoviale, qui s'accompagnent souvent de douleurs articulaires et caractérisent une atteinte déjà sévère, bénéficient d'une thérapeutique médicamenteuse véritablement efficace. L'arthrose apparaît ainsi comme une manifestation inéluctable du vieillissement.

Au moins deux aspects doivent être privilégiés pour optimiser les possibilités thérapeutiques. Il est d'abord nécessaire de déceler l'arthrose de façon précoce, avant sa manifestation clinique par les douleurs articulaires. Une des solutions serait de disposer de techniques d'imagerie performantes, et qui trouvent leur application en clinique. Il est par ailleurs nécessaire de connaître la physiopathologie de l'arthrose, dans le but de proposer de nouvelles cibles pharmacologiques. Il serait alors possible d'envisager qu'un traitement puisse permettre une "réparation" des lésions du cartilage, pour peu qu'il soit débuté dès les phases précoces de la maladie.

Ces différents points de vues nécessitent de disposer de modèles d'arthrose expérimentale chez l'animal. Leur grand nombre reflète là encore la méconnaissance de l'étiologie et de la physiopathologie de l'arthrose. Ces modèles ont été répartis en deux grandes catégories :

- les arthroses mécaniques, qui font référence à une instabilité articulaire,
- les arthroses structurales, qui surviennent à la suite d'une anomalie de la matrice du cartilage, ou d'une dérégulation du métabolisme chondrocytaire.

Plusieurs critères permettant de définir le modèle d'arthrose « idéal » ont été proposés par Bentley en 1974 :

- la présence d'érosion du cartilage et d'ostéophytes,
- des remaniements osseux,
- l'absence de manifestation inflammatoire.

La majorité des modèles d'arthrose répondent à ces critères.

Nous nous sommes intéressés à 4 de ces modèles que nous avons développés chez le rat. Ces modèles sont répartis dans les différentes catégories, et représentent plusieurs étiologies possibles de l'arthrose. Le premier modèle consiste à sectionner le ligament croisé antérieur chez l'animal. C'est un modèle privilégié dans le sens où il reproduit une situation traumatique connue chez l'homme. Trois autres modèles ont été choisis :

- l'injection intra-articulaire de collagénase qui provoque une hyperlaxité ligamentaire; ,
- l'injection infrapatellaire de papaine qui conduit à une altération des constituants matriciels,
- l'injection de mono-iodo-acétate qui induit une souffrance chondrocytaire.

Ces différents modèles ont été comparés selon des critères classiques de morphologie et de biochimie. Nous avons inclus un critère supplémentaire de biomécanique, grâce à la télémetrie. Elle permet d'évaluer l'activité motrice de l'animal et d'introduire la notion de handicap. L'apparition d'un handicap chez l'animal au cours de l'arthrose peut être considérée comme un paramètre « clinique », qui traduit une atteinte articulaire sévère.

Ce critère « clinique » qui nous a paru essentiel, nous a conduit à privilégier l'injection intra-articulaire de MIA dans le genou du rat : l'installation d'un handicap nous a en effet permis, comme dans la pathologie humaine, de distinguer deux phases dans l'évolution de la pathologie expérimentale.

La poursuite de nos travaux sur ce modèle d'arthrose expérimentale induite chez le rat a consisté à étudier les effets d'un traitement à moduler une douleur articulaire, grâce à la télémetrie. Nous avons également vérifié dans quelle mesure l'IRM permettait de déceler une atteinte précoce du cartilage articulaire. Enfin, nous avons également étudié un aspect de la physiopathologie de l'arthrose induite par l'injection intra-articulaire de MIA chez le rat, en essayant de déterminer de quelle façon l'expression d'une souffrance chondrocytaire pouvait contribuer à l'installation d'un processus dégénératif du cartilage articulaire.

A. Etude bibliographique

Chapitre I

Homéostasie du cartilage articulaire

En fonction de sa localisation, le cartilage constitue un tissu de soutien (cartilage élastique des oreilles, fibrocartilage du nez), ou un tissu dont les propriétés rhéologique et de résistance à la pression contribuent à la physiologie de la fonction articulaire (figure I.1). Au cours de pathologies inflammatoire (arthrite) ou dégénérative (arthrose), la destruction du cartilage articulaire provoque une diminution de la fonction articulaire chez les patients, pouvant conduire à des invalidités. L'intérêt porté à ces rhumatismes articulaires, et notamment à l'arthrose, est d'autant plus grand que la prévalence de cette pathologie est importante. Par ailleurs, la prise en charge thérapeutique tardive, lorsque la destruction du cartilage articulaire est avancée, laisse peu de possibilités à un traitement de faire preuve d'effets bénéfiques : la découverte d'une molécule chondroprotectrice est un enjeu économique de taille.

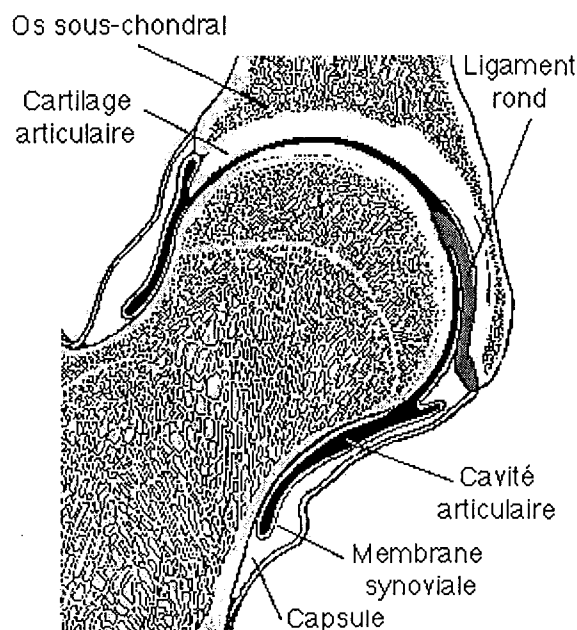


Figure I.1. Schéma d'une coupe sagittale d'une articulation synoviale (hanche).

Le cartilage recouvre les extrémités osseuses. La capsule, constituée de la membrane synoviale tapissée d'un tissu adipeux, et des ligaments externes délimitent la cavité articulaire. Les cellules de la synovie, les synoviocytes, sont de type fibroblastique (synthèse des constituants du liquide synovial, dont le principal est l'acide hyaluronique) et de type macrophage.

I. Relation structure-fonction du cartilage articulaire hyalin.

Le cartilage articulaire possède des propriétés essentielles qui permettent aux mouvements de se dérouler sans contrainte : sa structure et sa surface lisse, ainsi que la présence d'un film liquidien visqueux, le liquide synovial, assurent le glissement entre les pièces articulaires avec un coefficient de friction très bas. Le cartilage doit par ailleurs être résistant à la compression, tout en étant capable de se déformer, de façon à supporter au mieux les contraintes mécaniques. Ces propriétés sont conférées par l'eau qu'il contient, et qui constitue plus de 80 % du poids du tissu hydraté, par les protéoglycanes (PG) auxquels cette eau est associée, et qui sont eux-mêmes piégés dans une trame de collagènes. Ces propriétés du cartilage articulaire lui permettent d'assurer un rôle essentiel dans la répartition des contraintes mécaniques sur une surface maximale de l'os sous-chondral sous-jacent [Radin, 1986]. Ce dernier 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. L'os sous-chondral jouerait ainsi un rôle majeur dans l'amortissement des chocs mécaniques (figure I.2). Les forces appliquées progresseraient ensuite de travées en travées, jusqu'à l'os trabéculaire (figure I.3).

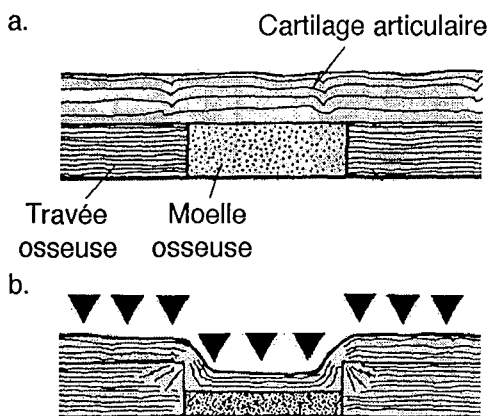


Figure I.2. Schéma représentant le cartilage avant (I.2.a) et pendant l'application d'une contrainte mécanique (I.2.b d'après Radin, 1986).

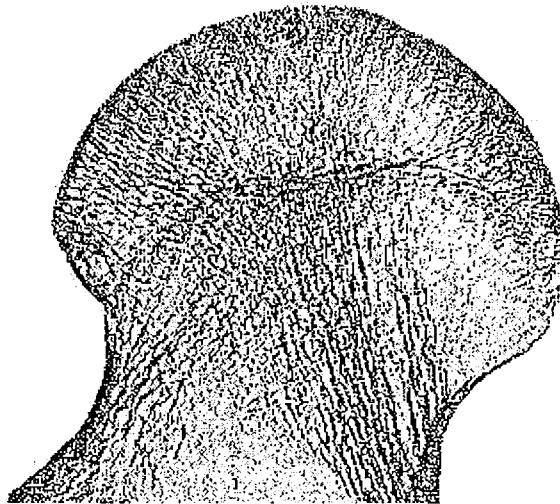


Figure I.3. Radiographie de la tête fémorale. Les travées osseuses suivent les lignes de plus fortes contraintes mécaniques (d'après Sokoloff, 1987).

Ainsi, il est essentiel que l'intégrité du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral soit conservée, de telle sorte que chacun puisse assurer sa fonction de façon optimale, et ainsi préserver la fonction articulaire.

Les propriétés rhéologique et de résistance à la pression du cartilage articulaire dépendent de l'équilibre fragile entre l'eau interstitielle et ses deux principaux constituants : les collagènes (de type II, VI, IX, X, XI, XII et XIV) [Cremer, 1998] et l'agrécane, une macromolécule polyanionique capable de piéger des molécules d'eau. D'autres molécules, plus petites, participent à l'architecture du tissu en assurant des interactions entre les principaux constituants, renforçant ainsi sa structure. D'autres établissent des interactions avec les chondrocytes, leur permettant d'obtenir une information quant au degré de sollicitation du cartilage dans son environnement proche [Buckwalter, 1998].

I.1. L'agrécane : interactions avec l'acide hyaluronique.

Les protéoglycanes sont constitués d'une protéine sur laquelle sont fixées une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAG). L'agrécane est une macromolécule de 1 à 5 10^6 Da, spécifique du cartilage. Il est l'un des PG les plus étudiés et pour lequel il existe une relation claire entre la structure et la fonction [Muir, 1995].

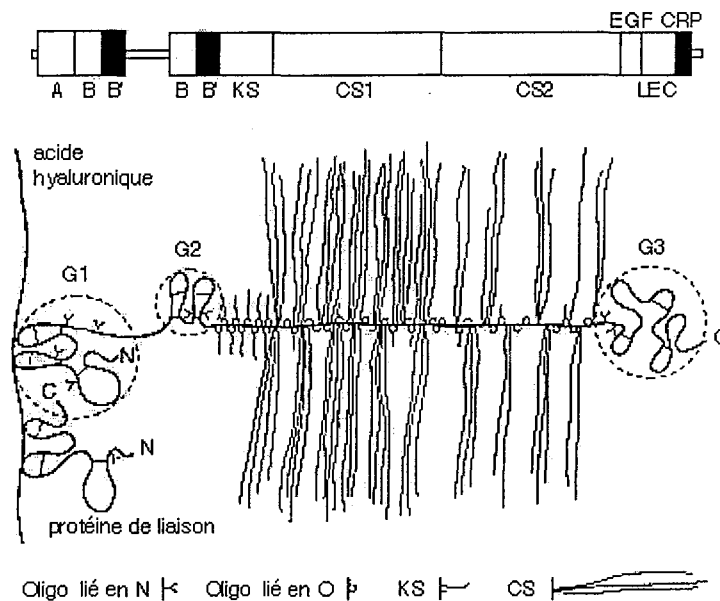


Figure I.4. Interactions entre l'agrécane, l'AH, et la protéine de liaison. La protéine porteuse de l'agrécane (220 kDa environ) présente un grand nombre de séquences Ser-Gly et Glu-Pro substituées par les chaînes de CS (une centaine) et de KS (une trentaine) sur les segments linéaires E1 et E2 qui séparent les domaines G2 et G3. EGF : "epidermal growth factor"; LEC : domaine "lectine-like"; CRP : "complement related peptide (d'après Vertel, 1994).

La particularité de l'agrécan est de concentrer les charges négatives au sein de la matrice extracellulaire du cartilage : 90 % de sa masse est constituée par environ 130 chaînes de GAG sulfatés (tableau I.1), 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 (figure I.4). Les chaînes de GAG sulfatés sont constituées d'homopolymères de 40 à 50 unités disaccharidiques sulfatées de type chondroïtine sulfate (CS) et de type kératane sulfate (KS; tableau I.1, figure I.5). Leurs groupements carboxyles et plus encore les 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-terminale interagit avec l'acide hyaluronique (AH), un GAG non sulfaté dont la structure est linéaire.

Tableau I.1. Composition et structure des principaux GAG du cartilage articulaire.

	Motif du disaccharide	Groupement sulfate		Protéoglycanes
		O-S	N-S	
Chondroïtine 4 ou 6 sulfate (C4S ou C6S)	D-glucosamine + acide D-glucuronique	+	-	Agrécan
Kératane sulfate (KS)	D-glucosamine + galactose	+	-	Agrécan, fibromoduline
Dermatane sulfate (DS)	D-galactosamine + acide D-glucuronique ou acide L-iduronique	+	-	Biglycane, décorine
	D-glucosamine + acide D-glucuronique	-	-	Acide hyaluronique

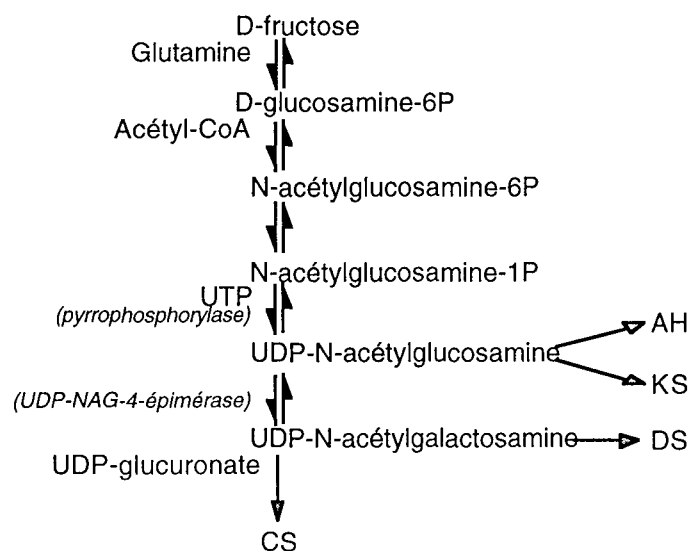


Figure I.5. Voie de biosynthèse des GAG (d'après Marzullo et Lash, 1970).

L'AH (6 à 7 10^3 kDa) est synthétisé par une protéine liée à la membrane plasmique. Côté cytoplasmique, cette protéine lie les unités disaccharidiques (tableau I.1) les unes aux autres, puis transfère la chaîne en cours de synthèse vers le compartiment extracellulaire [Fraser, 1997]. 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 [Mörgelin, 1995].

La protéine de liaison et le domaine G1 présentent une structure très similaire en double-épingle à cheveux et une région "immunoglobulin (Ig)-like". Cette structure met en jeu 4 ponts disulfures, dont la formation détermine la capacité de l'agrécan à s'agréger avec l'AH. Elle ne se produirait qu'une fois le PG libéré dans la matrice extracellulaire, permettant ainsi à l'agrécan nouvellement synthétisé de diffuser hors de l'environnement périchondrocytaire, avant qu'il ne se soit lié à l'AH [Hardingham, 1974].

De façon surprenante, 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, ni avec aucune protéine de la matrice du cartilage hyalin. Un rôle structurant est attribué au domaine G2 : il permettrait la séparation entre le domaine G1 et la région E2 portant les chaînes de GAG sulfatés, facilitant ainsi l'agrégation du PG avec l'AH [Fosang, 1989].

Une multitude de monomères d'agrécan se fixent à une molécule d'AH. Les agrégats supramoléculaires formés (figure I.6) augmentent la densité de charges négatives dans la matrice extracellulaire du cartilage, et constituent des pôles d'attraction pour les cations : l'agrécan est à l'origine d'une pression osmotique importante, qui permet de maintenir un taux d'hydratation élevé du cartilage. La formation de ces agrégats renforce également la fixation de l'agrécan dans la matrice cartilagineuse, en empêchant sa fuite hors de la matrice lors de la déformation du tissu sous l'effet des contraintes.

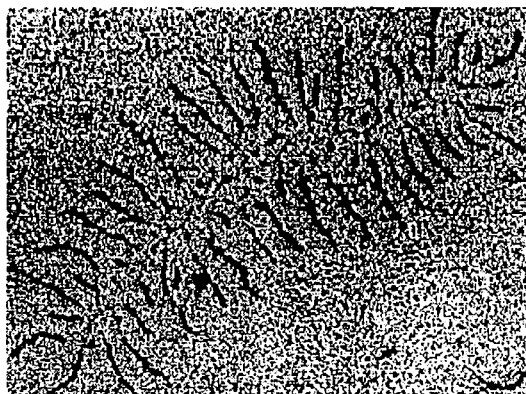


Figure I.6. Photographie en microscopie électronique d'un agrégat formé d'une molécule d'AH sur laquelle sont fixés plusieurs dizaines d'agrécanes (Muir, 1995).

L'agrécan serait également capable d'interagir avec d'autres constituants matriciels *via* le domaine G3 [Brissett, 1998]. Cette extrémité C-terminale 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-terminal G3 constitue un site de liaison pour une glycoprotéine impliquée dans l'adhésion cellulaire, la ténascine R [Aspberg, 1995].

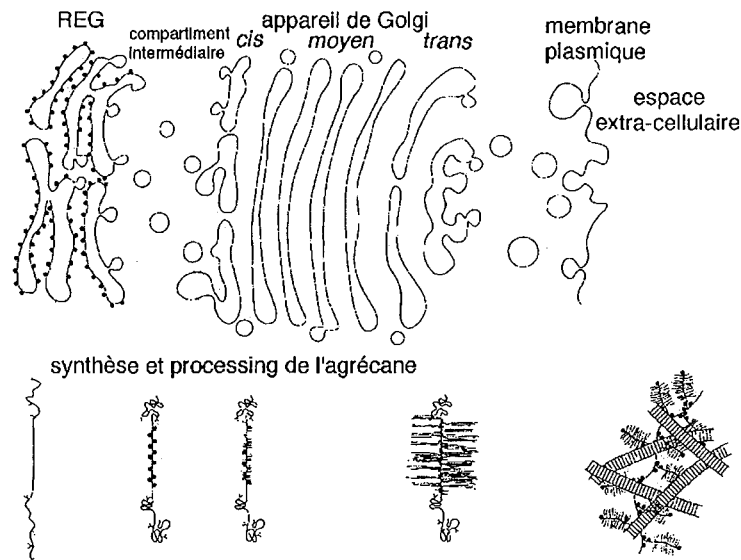


Figure I.7. Transit intracellulaire de l'agrécan en cours de synthèse (d'après Vertel, 1994).

Le domaine G3 de la protéine porteuse de l'agrécan joue également un rôle essentiel lors de la synthèse de l'agrécan, dont les différentes étapes sont celles de la synthèse de toute glycoprotéine : après la traduction, la protéine porteuse est transportée dans le reticulum 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 (figure I.7).

La synthèse d'une protéine porteuse tronquée ne présentant pas le domaine G3 serait la cause de certaines chondrodystrophies nanométriques [Luo, 1996] : le transit de la protéine depuis le RE granuleux vers l'appareil de Golgi est bloqué, et la synthèse de l'agrécan est inhibée (mutation homozygote, létale) ou 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].

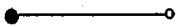
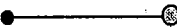
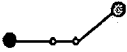
I.2. Les collagènes du cartilage hyalin.

I.2.a. Description.

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 sont sécrétées sous une forme soluble possédant des régions N- et C-terminales non collagéniques, qui participent au contrôle de la fibrillogenèse : leur présence inhibe la formation des fibres. Ces dernières se forment ainsi uniquement dans la matrice extracellulaire, après l'action d'une protéase spécifique [Chapman, 1989].

Le collagène de type II est le collagène majoritaire du cartilage hyalin (80 à 90 % des collagènes, tableau I.2; Cremer, 1998). Le grand nombre de résidus hydroxylysine, qui constituent autant de sites de glycosylation, est une autre caractéristique d'un tissu à caractère très hydrophile. Il forme, avec le collagène de type XI, des fibres mixtes de collagènes. La copolymérisation de quelques molécules de collagène de type XI avec le collagène majoritaire 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 α_1 du collagène XI chez la souris conduit à la formation de fibres de collagène de type II de diamètre anormalement élevé. Cette mutation est à l'origine d'une chondrodysplasie, caractérisée par une fragilité importante du cartilage vis à vis des contraintes mécaniques [Li, 1995].

Tableau I.2. Les collagènes du cartilage articulaire : composition moléculaire, forme et organisation supramoléculaire, interaction avec les protéines de la matrice du cartilage (d'après Thomas, 1994).

Collagène (type et composition)	Forme	Localisation	Interaction avec d'autres constituants matriciels
II [$\alpha_1(\text{II})$] ₃		uniforme	collagènes VI, IX et XI, décorine, fibromoduline, COMP, intégrines $\beta 1$, protéine 66 kDa, annexine V
XI [$\alpha_1(\text{XI})\alpha_2(\text{XI})\alpha_3(\text{XI})$]		uniforme	collagène II
IX [$\alpha_1(\text{IX})\alpha_2(\text{IX})\alpha_3(\text{IX})$]		uniforme	collagène II, décorine, fibromoduline, COMP
X [$\alpha_1(\text{X})$] ₃		cartilage calcifié	annexine V
VI [$\alpha_1(\text{VI})\alpha_2(\text{VI})\alpha_3(\text{VI})$]		chondron	collagène II, biglycane, AH, intégrines ($\beta 1$)
XII		surface articulaire	?
XIV		uniforme	?

La formation et la structure de ces fibres mixtes de collagènes de types II et XI sont sujettes à controverses. Les uns suggèrent que plusieurs molécules de collagène de type XI s'organisent en une fibre centrale, autour de laquelle viennent se fixer les molécules de collagène de type II [Eikenberry, 1992 ; Eyre, 1995]. Les autres proposent qu'un petit nombre de molécules de collagène de type XI s'insèrent entre les molécules de collagène de type II [Olsen, 1997].

Un troisième type de collagène participe à la formation de ces fibres : le collagène de type IX [Bruckner, 1994], qui appartient à la famille des FACIT ("Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple-helix", tableau I.2, figure I.8). Ce collagène est constitué de 4 domaines non collagéniques (NC1 à NC4) alternant avec trois domaines collagéniques (COL1 à COL3), et d'une chaîne de GAG sulfatés (CS ou KS) liée au domaine NC3. Il interviendrait lui aussi dans le contrôle du diamètre des fibres en se glissant dans les interstices entre deux chaînes de collagène de type II. Il empêcherait ainsi l'apposition de nouvelles molécules de collagène de type II. Le domaine NC3 présente la particularité d'être flexible. La nature très basique de son domaine NC4 (chaîne $\alpha 1(\text{IX})$) est un site de liaison pour les chaînes de GAG sulfatés des PG. Le collagène de type II pourrait lui aussi établir des interactions avec l'agrécan, plus précisément au niveau de la zone riche en KS [Hedlund, 1999].

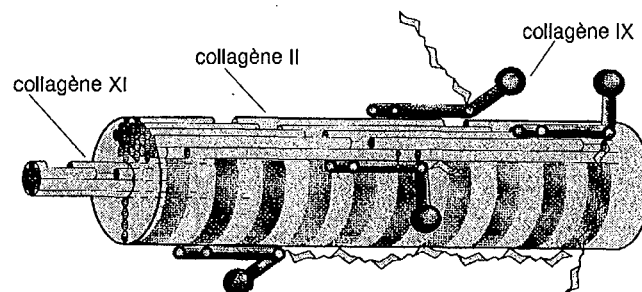


Figure I.8. Interaction du collagène de type II avec les fibres de collagènes de types IX et XI du cartilage hyalin (d'après Eyre, 1995).

Dans le cartilage hyalin, la tension des fibres mixtes de collagènes permet de contenir la pression de gonflement générée par les PG [Bruckner, 1994]. L'agrécan est ainsi "comprimé" dans un volume représentant seulement 10 à 20 % de son volume en solution libre [Johnston, 1997]. Par ailleurs, les interactions entre ces fibres mixtes de collagènes et l'agrécan jouent un rôle essentiel dans le maintien des propriétés biomécaniques du cartilage [Olsen, 1997]. Ainsi, une souris homozygote n'exprimant pas la chaîne 1(IX) et ne présentant donc pas le domaine NC4, développe de façon précoce une pathologie dégénérative non inflammatoire du cartilage, dont les caractéristiques sont très proches de celles d'une arthrose chez l'homme [Fässler, 1994].

Un autre FACIT, le collagène de type VI, présente une distribution plus régionalisée dans l'environnement périchondrocytaire. Il est capable de se lier à l'AH [Laurent, 1996], et possède une séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD) qui lui permet probablement d'établir des interactions avec des protéines de la membrane chondrocytaire [Thomas, 1994]. Ces interactions permettraient de rendre compte du degré de sollicitation du cartilage dans l'environnement du chondrocyte, qui répondrait en modulant le turnover des constituants.

Le collagène de type VI participe à la constitution d'une structure dense autour du chondrocyte appelée chondron. Il a été mis 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 [Poole, 1997], constituait l'unité fonctionnelle et métabolique primaire responsable de l'homéostasie de la matrice du cartilage hyalin (figure I.9). 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 turnover de l'agrécan [Poole, 1997]. De plus, la forme allongée du pôle basal du chondron assure une continuité entre deux chondrons adjacents.

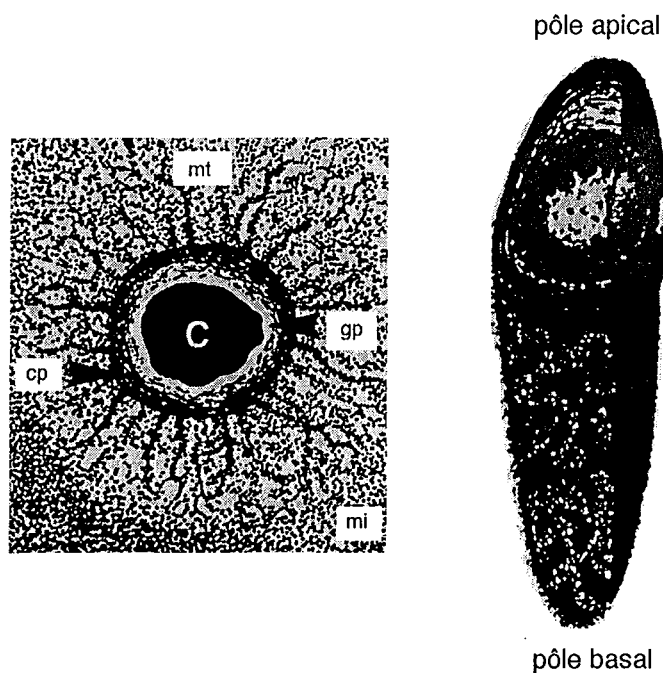


Figure I.9. Organisation matricielle dans l'environnement du chondrocyte (C), entouré du glycocalyx péricellulaire (gp), d'une capsule péricellulaire (cp), d'une matrice territoriale (mt) et interterritoriale (mi) (d'après Poole, 1997).

Plus récemment, les collagènes de type XII et de type XIV (FACIT) ont été mis en évidence au sein de la matrice cartilagineuse. Le premier est davantage localisé dans la couche superficielle du cartilage, et le second présente une répartition uniforme dans tout le cartilage [Thomas, 1994].

I.2.b. Organisation des collagènes au sein du cartilage hyalin.

La résistance du cartilage aux contraintes mécaniques implique une orientation particulière des fibres de collagènes. Ce paramètre et la taille des cellules ont donné lieu à la distinction de 3 couches dans le cartilage hyalin (figure I.10) [Bruckner, 1994; Johnston, 1997] :

. 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 PG 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.

. dans les couches moyenne et profonde, la forte teneur en PG assure une meilleure capacité à supporter les forces de pression. Les fibres de collagènes s'orientent progressivement perpendiculairement à la surface, permettant un ancrage du cartilage dans l'os sous-chondral.

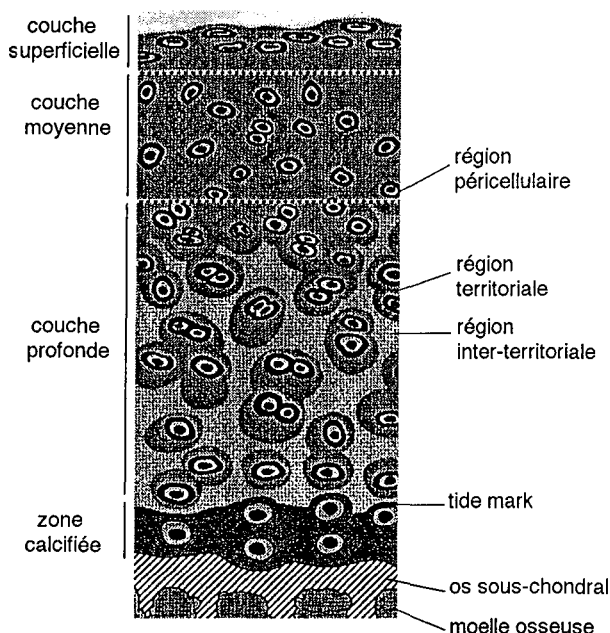


Figure I.10. Les différentes couches du cartilage articulaire, déterminées en fonction de l'orientation des fibres de collagènes et de la morphologie des chondrocytes (d'après Poole, 1993).

La composition et l'organisation de la matrice cartilagineuse autour du chondron a permis de distinguer deux régions concentriques, appelées matrice territoriale et matrice interterritoriale (figures I.9 et I.10). La première est plus concentrée en AH, PG, et fibronectine, une protéine très impliquée dans les mécanismes d'adhésion cellulaire. Les collagènes de type VI et IX y sont plus abondants, le premier intervenant davantage dans les interactions chondrocyte-matrice [Poole, 1997], et le second dans la régulation du diamètre des fibres de collagènes : les fibres de collagènes sont plus fines et plus denses dans l'environnement périchondrocytaire. A l'inverse, les fibres de collagènes dans la matrice interterritoriale ont un diamètre plus important et s'organisent en arcades, telles que les a décrites Benninghoff.

1.3. Les autres molécules du cartilage articulaire : petits protéoglycanes et protéines non collagéniques (figure I.11).

1.3.a. Les petits protéoglycanes.

Les petits PG les plus connus sont la décorine et le biglycane. Ils sont constitués d'une protéine de 40 kDa environ, liant une ou deux chaînes de dermatane sulfate (décorine et biglycane respectivement). La fibromoduline, un autre PG, porte une chaîne de KS [Heinegard, 1989]. Le biglycane est plus concentré dans l'environnement périchondrocytaire [Bianco, 1990], alors que la décorine et la fibromoduline sont davantage présentes dans la couche superficielle [Poole, 1996]. La décorine et la fibromoduline ont été localisées par immunohistochimie à la surface des fibres de collagène de type II. Elles participeraient au contrôle de la fibrillogenèse. Ces PG influenceraient également l'espacement entre les fibres de collagènes, et donc les propriétés de la matrice extra-cellulaire, en établissant des interactions ioniques grâce à leurs chaînes latérales de GAG sulfatés [Scott, 1996]. Plus précisément, des interactions ioniques s'établissent entre la décorine ou la fibromoduline chargées négativement et le domaine NC4 du collagène de type IX, chargé positivement. Ce type d'interaction permet de renforcer la structure de la matrice cartilagineuse et de mieux contenir la pression de gonflement générée par l'agrécane.

Il a également été attribué à la fibromoduline un rôle d'inhibition de l'adhérence des cellules inflammatoires à la surface du cartilage articulaire. Elle se lierait à la fibronectine, une protéine possédant une séquence RGD (arginine-glycine-acide aspartique) facilitant l'adhésion cellulaire, et empêcherait ainsi la reconnaissance de cette séquence RGD par les cellules. La dégradation de la fibromoduline faciliterait l'adhésion et l'afflux de cellules au cours d'une réaction inflammatoire de la membrane synoviale [Jasin, 1995].

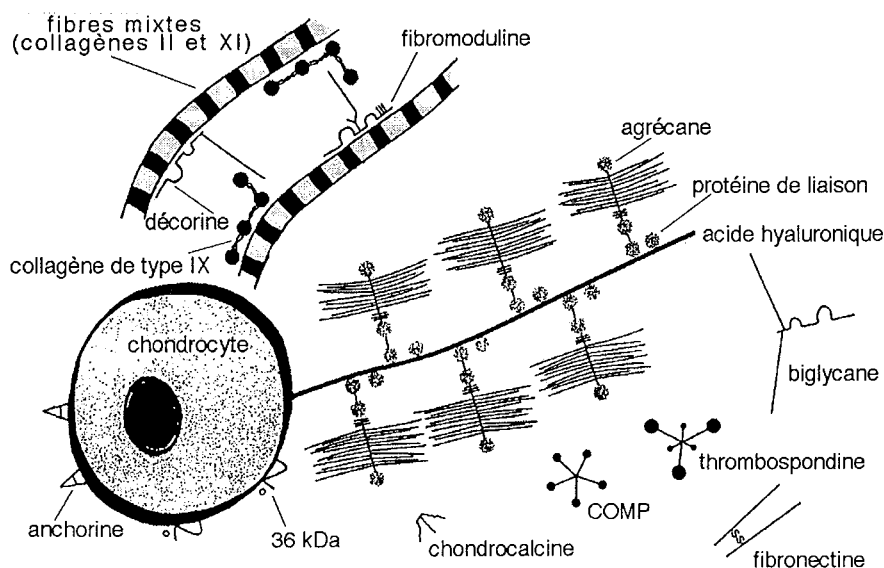


Figure I.11. Représentation schématique de quelques interactions possibles entre un chondrocyte et les principaux constituants de la matrice cartilagineuse, et entre les constituants eux-mêmes (Heinegard, 1992).

1.3.b. Les protéines non collagéniques.

Les protéines non collagéniques (PNC) sont engagées dans des interactions entre les constituants matriciels ou entre les chondrocytes et les constituants matriciels, ou encore confèrent au cartilage ses particularités, notamment l'absence de vascularisation.

La laminine, la thrombospondine et la protéine de 66 kDa encore appelée RGD-CAP (RGD-"collagen fiber-associated protein") [Hashimoto, 1997a] possèdent, comme la fibronectine, une séquence RGD impliquée dans les mécanismes d'adhésion cellulaire mettant en jeu une intégrine. Toutes trois constituent ainsi un intermédiaire entre des protéines de la membrane cytoplasmique des chondrocytes (intégrines) et des constituants matriciels. La fibronectine et la thrombospondine établissent notamment des liaisons avec les chaînes de GAG sulfatés de la décorine ou de la fibromoduline [Bidanet, 1992], et avec les fibres de collagènes [Hashimoto, 1997a].

La ténascine-C [Pacifi, 1994] est une macromolécule constituée de 6 sous-unités de 190 à 320 kDa chacune. Dans le cartilage, elle participerait à des interactions entre les chondrocytes et les constituants matriciels, en établissant des liaisons avec des récepteurs membranaires, dont certaines intégrines, et le collagène de type IX. Elle contribuerait ainsi au maintien du phénotype chondrocytaire. Un autre rôle attribué à la ténascine-C résulte de sa capacité à interagir avec un protéoglycane membranaire, le syndecan-1. Ce dernier est un récepteur d'un facteur de croissance, le bFGF ("basic Fibroblast Growth Factor"). La ténascine-C pourrait ainsi moduler l'interaction du facteur de croissance sur son récepteur et moduler la réponse du chondrocyte au bFGF [Salmivirta, 1991].

Les intégrines et les annexines sont deux grandes familles de protéines membranaires capables d'établir des interactions avec les constituants matriciels. Ces protéines, qui agissent en tant que mécanorécepteurs, permettent aux chondrocytes d'apprécier une modification des contraintes mécaniques appliquées [Fernandez, 1988]. Ces dernières peuvent alors adapter leur métabolisme (turnover des constituants matriciels) à ces nouvelles conditions (solicitations mécaniques).

Les intégrines sont des protéines dimériques transmembranaires, dont les sous-unités α et β confèrent la spécificité au ligand. Elles se lient à la fois à des protéines matricielles et à des protéines du cytosquelette. La sous-famille $\beta 1$ des intégrines est la plus représentée dans le cartilage articulaire. Ces intégrines se lient à certains collagènes ($\alpha 1\beta 1$ et collagènes de type II et VI; $\alpha 2\beta 1$ et collagène de type I), à la fibronectine ($\alpha 5\beta 1$) ou encore à la laminine [Holmval, 1995; Loeser, 1997; Enomoto-Iwamoto, 1997]. D'autres intégrines, dont $\alpha 3\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha v\beta 5$ sont exprimées par les chondrocytes [Woods, 1994, Ostergaard, 1998].

Le CD44, une autre protéine membranaire, constitue le principal récepteur de l'AH [Aruffo, 1990]. La fixation de l'AH sur son récepteur a été mise en cause dans les phénomènes d'adhésion et de prolifération cellulaire. Ce type d'interaction serait également impliqué dans

l'induction de l'expression d'un facteur de croissance, le TGF ("transforming growth factor ") [Ishida, 1997]. L'inhibition de l'expression de ce récepteur dans le chondrocyte conduit également à l'inhibition de la synthèse des PG [Chow, 1998] : le CD44 participerait ainsi à la régulation de la synthèse des constituants matriciels.

D'autres PNC participent à des interactions entre les principaux constituants matriciels, renforçant ainsi la structure du cartilage. C'est le cas de la CMP ("cartilage matrix protein"), une protéine constituée de trois unités identiques. Elle se lie à l'agrécan au niveau de la région E2, mettant en jeu différents types d'interactions ioniques et covalentes [Hauser, 1996] et interagit également avec les fibres de collagène de type II [Winterbottom, 1992]. Ainsi, elle constituerait une sorte de pont entre les deux principaux constituants du cartilage articulaire, les collagènes et l'agrécan. La COMP ("cartilage oligomeric matrix protein"), est une protéine spécifique du cartilage, dont la structure ressemble à celle de la thrombospondine. C'est une protéine calcium-dépendante qui interagit avec le collagène de type IX [Briggs, 1995].

D'autres protéines confèrent au cartilage ses particularités. Par exemple, l'absence de vascularisation met en jeu des protéines inhibitrices de l'angiogenèse, telles que les inhibiteurs des métalloprotéinases (TIMP, "tissue inhibitor of metalloproteinases") ou encore la chondromoduline I. C'est une protéine glycosylée, qui résulte du clivage de la partie C-terminale d'un précurseur transmembranaire de plus de 300 kDa. Elle est localisée dans la région interterritoriale et exerce ses pouvoirs inhibiteurs de l'angiogenèse en empêchant la croissance des cellules endothéliales [Hiraki, 1997].

La protéine matricielle Gla, qui a été mise en évidence à la fois dans le cartilage hyalin et dans les artères, inhibe la calcification : des souris n'exprimant pas cette protéine présentent une calcification ectopique de ces deux tissus [Luo, 1997].

II. Le cartilage calcifié.

Le tissu sous-jacent au cartilage hyalin est souvent considéré comme la quatrième couche du cartilage articulaire : le cartilage calcifié réalise une transition entre le cartilage hyalin et l'os sous-chondral. Les constituants majeurs ne sont plus ni le collagène de type II ni l'agrécan, mais le collagène de type X. Ce collagène constitue, avec le collagène de type VIII, une classe particulière : tous deux s'organisent en formant des latices (tableau I.2) [Sutmüller, 1997]. Le rôle du collagène de type X est mal connu. Il contribuerait à la consolidation de la matrice cartilagineuse ou jouerait un rôle stimulant de l'angiogenèse [Jacenko, 1993].

La chondromoduline II contribue au processus d'ossification endochondrale en stimulant la croissance des cellules hématopoïétiques [Hiraki, 1996]. C'est aussi le cas de la BSP ("bone sialoprotein") ou de la chondrocalcine, un propeptide du collagène de type II, qui présente une forte affinité pour l'hydroxyapatite [Hinek, 1987].

L'annexine V (ou anchorine-CII), une protéine membranaire exprimée par les chondrocytes hypertrophiques, est surtout connue pour ses capacités à protéger les cellules apoptotiques des phagocytes. Insérée dans la membrane plasmique, l'annexine V forme un canal pour les ions calcium [Kirsch, 1997]. La liaison de l'annexine V aux collagènes de types II et X régulerait le flux de calcium dans le pore formé par l'annexine V, exerçant ainsi un contrôle de l'accumulation de l'ion dans les vésicules matricielles, et du processus de minéralisation de la matrice cartilagineuse [Von der Mark, 1997].

L'AH est un constituant fondamental du cartilage calcifié. Il est nécessaire à la structuration de cette couche particulière du cartilage, en permettant l'agrandissement des lacunes chondrocytaires [Pavasant, 1996] : ce mécanisme accompagne un processus de maturation chondrocytaire, amenant les chondrocytes à exprimer progressivement le phénotype d'une cellule ostéoblastique.

III. Les chondrocytes.

Dans le cartilage de la tête fémorale chez l'homme, les chondrocytes ne représentent que 1 % du volume tissulaire, soit 10 000 cellules/mm³ [Stockwell, 1967]. La proportion des cellules dans le cartilage hyalin est plus faible que celle de tout autre tissu. Un RE granuleux et un appareil de Golgi très développés sont la preuve d'une activité métabolique importante, nécessaire à la synthèse des constituants d'une matrice extracellulaire si abondante. Les chondrocytes assurent également le renouvellement des constituants matriciels.

III.1. Turnover des constituants de la matrice cartilagineuse.

Le renouvellement des constituants matriciels met en jeu plusieurs familles d'enzymes. Il existe quatre classes principales de protéinases, déterminées par le groupe chimique responsable de l'hydrolyse. Les cystéine protéinases et les aspartate protéinases exercent leur activité enzymatique à pH acide dans le compartiment intracellulaire, alors que les sérine protéinases et les métalloprotéinases (MMP) agissent à pH neutre dans la matrice extracellulaire. Certaines comme le système plasminogène-plasmine (sérine protéinases), sont indispensables à l'activation des pro-MMP, et sont également capables 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, 1991]. La plasmine, qui possède la capacité de dégrader les constituants matriciels, contribue également à l'activation de plusieurs MMP, dont les collagénases.

III.1.a. Les MMP.

Les MMP [Shingleton, 1996] partagent un certain nombre de point communs :

- elles renferment un atome de zinc dans leur site catalytique;
- elles sont sécrétées sous la forme d'une pro-enzyme inactive;
- une hydrolyse est nécessaire pour conduire à l'activation de l'enzyme; le propeptide perdu renferme une séquence conservée entre les différentes MMP (PRCGVPD; proline-arginine-cystéine-glycine-valine-proline-acide aspartique), dont le résidu cystéine (C) se lie avec l'atome de zinc du site catalytique. La rupture de cette liaison conduit à l'activation de l'enzyme;
- un ion calcium et un environnement à pH neutre sont également indispensables à leur activité.

Les collagénases.

Parmi les MMP (tableau I.3), les collagénases (MMP1 ou collagénase interstitielle; MMP13 ou collagénase-3) 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 3/4 et le 1/4 de la longueur de la molécule intacte. A la température corporelle, ces fragments devenus instables, perdent leur structure en triple hélice. Les chaînes polypeptidiques peuvent alors être dégradées par d'autres protéinases [Aimes, 1995].

Les gélatinases.

Les gélatinases dégradent les collagènes dénaturés. L'une d'entre elles, la MMP2, est sécrétée par les chondrocytes associée à un inhibiteur de métalloprotéinase, le TIMP2 ("Tissue inhibitor of metalloproteinase") [Murphy, 1992]. L'activation de la MMP2 met en jeu un complexe trimoléculaire membranaire constitué d'une métalloprotéinase membranaire (MT-MMP), du TIMP2 et de la MMP2 [Strongin, 1995]. La synthèse et la sécrétion de cette MT-MMP sont probablement liées à celles de la MMP2.

Les stromélysines.

Les stromélysines constituent la troisième classe de MMP, dont la MMP3 (ou stromélysine-1) et la MMP10 (ou stromélysine-2) sont exprimées par les chondrocytes. Ces enzymes se caractérisent par leur très grande spécificité vis à vis de leur substrat (tableau I.3). Les stromélysines, une fois activées, peuvent à leur tour activer les procollagénases [Matrisian, 1992].

Tableau I.3. Les protéinases impliquées dans le renouvellement des constituants de la matrice cartilagineuse (d'après Shingleton, 1996).

Classe/Nom	PM (kDa) forme (latente)/active	Activateurs	Substrats
MMP			
<i>Collagénases</i>			
MMP1	(57) 48	cathepsine B stromélysine plasmine	collagènes I, II, III, X.
MMP13	(60) 48		collagènes I, II, III, gélatine, peptides.
<i>Gélatinases</i>			
MMP2	(72) 66	MT-MMP	collagène X, gélatine, agrécane, FN.
<i>Stromélysines</i>			
MMP3	(60) 50	plasmine	PG, protéine de liaison, FN, collagène III, gélatine.
MMP10	(53) 47		collagène II, gélatine, FN,
<i>MT-MMP</i>			
MMP14	63		active la MMP2
MMP15	72		?
MMP16	64		active la MMP2
MMP17	70		?
Sérine protéinases			
Plasminogène-plasmine		tPA et uPA (*)	active certaines MMP et le plasminogène
Cathépsine G		—	agrécane, collagène II.
Cystéine protéinases			
Cathépsine B		—	collagène II, agrécane, protéine de liaison.
Cathépsine L			collagène I, agrécane, protéine de liaison.
Aspartate protéinase			
Cathépsine D		—	agrécane, gélatine

III.1.b. Les inhibiteurs des protéinases.

Toutes les MMP sont inhibées par des inhibiteurs naturels non spécifiques (TIMP, "Tissue inhibitor of MMP"). TIMP1 est une glycoprotéine de 28 kDa, particulièrement stable en fonction de la température et du pH [Hodges, 1994]. Cet inhibiteur est très similaire au TIMP2. Ces deux protéines se lient à la forme active des MMP, dans un rapport 1:1. Leur activité inhibitrice se situe dans le domaine N-terminal. Un troisième membre de cette famille d'inhibiteurs de protéases existe, le TIMP3. Il se lie après sa sécrétion à la matrice extracellulaire [Silbiger, 1994].

L'activité des activateurs du plasminogène (uPA et tPA) est modulée par des inhibiteurs spécifiques, les inhibiteurs de l'activateur du plasminogène (PAI, "plasminogene activator inhibitor"). Il en existe deux types (PAI1 et PAI2) qui forment des complexes stables avec l'uPA et le tPA [Levin, 1983]. Les cystatines sont les inhibiteurs naturels des cystéine protéinases, et l' α_2 -macroglobuline celui de la cathépsine B (aspartate protéinase).

Tous ces inhibiteurs jouent un rôle essentiel dans le contrôle du turnover des constituants matriciels des tissus conjonctifs. Les TIMP inhibent les MMP actives, et ainsi empêchent l'activation des proenzymes. Les PAI, en inhibant l'activation du système plasminogène-plasmine, modulent également l'activation des pro-MMP par la plasmine.

III.2. Métabolisme chondrocytaire.

En raison de l'absence de vascularisation, l'activité chondrocytaire dépend d'un métabolisme principalement anaérobie [Otte, 1991]. Un gradient décroissant de la pression partielle en oxygène s'instaure depuis la surface articulaire vers la couche profonde du cartilage calcifié, dans laquelle la tension en oxygène n'est que de 1 %. Les chondrocytes de la couche superficielle auraient un métabolisme énergétique mixte, c'est à dire dépendant à la fois de la glycolyse et de la voie de la phosphorylation oxydative, en raison d'une teneur en oxygène plus importante [Dunham, 1992].

L'apport des nutriments aux chondrocytes se fait par imbibition, et dépend ainsi de l'alternance compression-décompression du cartilage au cours des mouvements. Ces déformations produisent des signaux mécaniques *via* les récepteurs membranaires de type intégrines, ainsi que des signaux physico-chimiques qui contribuent au contrôle de l'activité chondrocytaire. Ils sont provoqués par le déplacement des ions dans l'environnement périchondrocytaire, et créent une variation de potentiel [Gray, 1988]. De plus, des pressions importantes provoquent l'inactivation de pompes Na^+/K^+ , modulant ainsi la composition ionique/osmotique intracellulaire, et de cette façon le métabolisme des chondrocytes [Hall, 1999].

Enfin, les signaux les plus connus, auxquels toutes cellules répondent, sont les facteurs solubles de type hormones, facteurs de croissance, ou cytokines. Dans le cartilage, ces facteurs sont pour la plupart produits par les chondrocytes eux-mêmes, et ils agissent selon des voies autocrine ou paracrine. Ils participent au contrôle de l'activité chondrocytaire, aux processus de différenciation et de maturation cellulaires.

IV. Différenciation et maturation chondrocytaire.

La majorité des études portant sur la différenciation chondrocytaire ont été réalisées sur le cartilage de croissance. Ce dernier assure la croissance des os longs et, chez l'homme, persiste jusqu'à la fin de la croissance. Plus épais, il permet une meilleure distinction des couches cellulaires. Il présente également des caractéristiques proches de celles du cartilage articulaire.

Dans le cartilage de croissance, le processus de différenciation chondrocytaire obéit à une progression spatio-temporelle, dont les différentes phases ont été caractérisées en fonction de l'activité chondrocytaire (prolifération cellulaire, synthèse des constituants matriciels) et de la morphologie cellulaire. Plusieurs couches sont distinguées depuis l'épiphyse vers la diaphyse (figure I.12) :

- dans la zone de réserve, les cellules souches se divisent peu. Elles assurent la pérennisation du tissu : au cours de leur différenciation, les chondrocytes perdent leur capacité à proliférer;
- dans la zone proliférative, les cellules se divisent et s'organisent en colonnes. Elles acquièrent le phénotype d'un chondrocyte, synthétisant une matrice extracellulaire riche en collagène de type II, en agrécane et en AH. Elles perdent simultanément leurs capacités à proliférer;
- dans la zone de maturation, l'hypertrophie des chondrocytes se caractérise par une augmentation du volume cellulaire;
- dans le cartilage calcifié, les cellules ont un volume cellulaire 5 à 10 fois supérieur à celui d'un chondrocyte. Ces chondrocytes hypertrophiques synthétisent une matrice moins abondante, essentiellement constituée de collagène de type X. Ils expriment progressivement le phénotype d'une cellule ostéoblastique : ils synthétisent le collagène de type I, l'ostéopontine, l'ostéonectine et présentent une activité phosphatase alcaline élevée [Descalzi Cancedda, 1992].

La calcification de la matrice extracellulaire est concomitante à l'invasion vasculaire par des capillaires et à la colonisation par des ostéoclastes qui dégradent la matrice cartilagineuse calcifiée. La plupart des chondrocytes hypertrophiques s'engagent alors vers une mort cellulaire par apoptose. Roach [1995] a également proposé que les chondrocytes hypertrophiques, après une division asymétrique donnent naissance à 2 cellules filles. La cellule la plus volumineuse s'orienterait vers une mort par apoptose, la seconde deviendrait un ostéocyte.

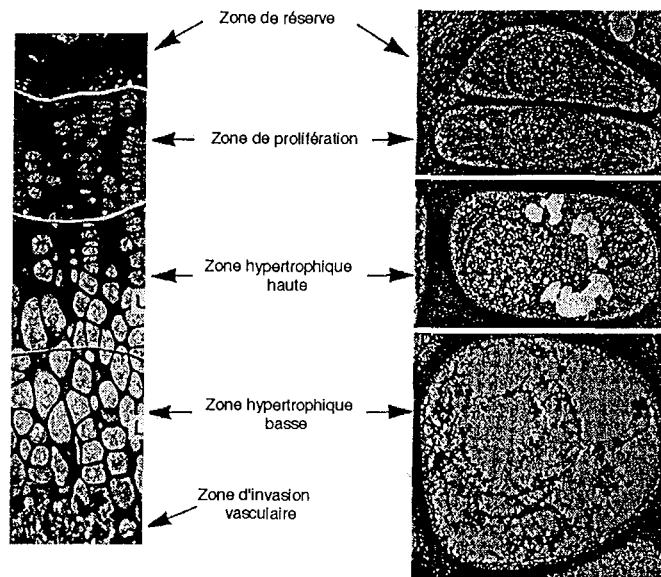


Figure I.12. Les différentes couches du cartilage de croissance (d'après Corvol, 1996).

Trois principales familles de facteurs de croissance ont été impliquées dans la chondrogenèse : celles des FGF ("Fibroblast growth factors"), des IGF ("insulin-like growth factors"), et celle des TGF ("transforming growth factors ") [Hill, 1992].

IV.1. Les facteurs de croissance.

IV.1.a. Le bFGF.

La famille des FGF comporte une dizaine de membres, qui possèdent des propriétés mitogènes, d'inhibition de la différenciation cellulaire, et certaines propriétés de facteurs angiogéniques ou neurotropes [Mason, 1994].

Le FGF a été décelé dans le compartiment intracellulaire [Kilkenny, 1996], dans la membrane cellulaire, et dans la matrice extra-cellulaire associé aux chaînes de GAG sulfatés (héparanes sulfates, HS). L'interaction du facteur de croissance avec les constituants matriciels permet d'une part de prolonger sa demi-vie, et d'autre part de moduler ses effets en l'empêchant d'accéder à ses récepteurs cellulaires. Ce sont des récepteurs de type tyrosine kinases (FGFR), ou des PG membranaires de type HS tels que les syndécanes [McKeehan, 1998] dont le domaine cytoplasmique est associé au cytosquelette [Chernousov, 1993]. Une des propriétés de ces PG membranaires est d'augmenter grandement l'affinité du FGF pour le FGFR [Shimazu, 1996].

Dans le cartilage, la présence du bFGF (ou FGF-2) est connue depuis plus de 15 ans. La teneur du bFGF décline en même temps que la synthèse d'ADN : le bFGF constitue un signal autocrine de la prolifération cellulaire. Il est le facteur le plus mitogène vis à vis des chondrocytes [Hill, 1992].

Le bFGF a également été décelé dans le noyau de 30 % des chondrocytes [Kilkenny, 1996]. Cette localisation nucléaire du facteur de croissance est associée à un rôle dans la différenciation chondrocytaire, distinct de ses effets mitogènes : il inhiberait à la fois le processus de maturation cellulaire conduisant les chondrocytes à s'hypertrophier, et la calcification de la matrice cartilagineuse [Kato, 1990]. Ainsi, la perte des capacités mitogènes des chondrocytes et la maturation cellulaire sont liées à la diminution du nombre de récepteurs membranaires du bFGF et à une modification du type de FGFR exprimé [Szebenyi, 1995]. La modulation de la maturation cellulaire par le bFGF permettrait la différenciation optimale des chondrocytes.

IV.1.b. Les IGF.

Il existe deux isoformes d'IGF, l'IGF-I et l'IGF-II. Toutes deux sont produites par les chondrocytes, l'IGF-I en quantité plus importante. L'IGF-I et l'IGF-II ont toutes deux des propriétés mitogènes. Cependant, l'IGF-II est plus efficace sur les chondrocytes fœtaux, alors que l'IGF-I agit davantage sur les cellules d'un tissu mature [Vetter, 1986]. L'IGF-I est également capable d'induire la synthèse des constituants matriciels, plus particulièrement celle des PG. L'IGF-II interviendrait davantage dans la régulation du glucose intracellulaire [Bhaumick, 1991]. Ce sont des facteurs capables d'induire la croissance du cartilage, sous le contrôle de l'hormone de croissance (GH, "growth hormone") qui module l'expression de l'IGF-I. Des récepteurs à la GH ont également été décelés sur la membrane cellulaire des chondrocytes. Les IGF ainsi que la GH agiraient en synergie et stimuleraient à la fois la prolifération chondrocytaire et la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire, notamment celle des PG [Barnard, 1998].

La synthèse simultanée de récepteurs solubles des IGF, les IGFBP (« IGF binding proteins »), conduit à la modulation des effets de ces facteurs. Ils modulent la fixation des IGF sur leurs récepteurs de haute affinité, l'IGFR1 et l'IGFR2. Il existerait une dizaine de ces récepteurs solubles (IGFBP1 à IGFBP10) [Rechler, 1997]. Quatre d'entre eux (IGFBP2 à 5) sont exprimés par les chondrocytes, dont deux ont une localisation préférentielle sur la membrane cellulaire (IGFBP 2 et 3) [Martel-Peletier, 1998]. Les IGFBP présentent des affinités différentes pour l'IGF-I par rapport à l'IGF-II : l'IGFBP3 et l'IGFBP4 sont ainsi impliquées dans l'inhibition des effets de l'IGF-I. Quant à l'IGFBP6, elle présente une plus grande affinité pour l'IGF-II, et constitue ainsi un élément de rétrocontrôle du métabolisme du glucose par les chondrocytes [Morales, 1997].

IV.1.c. Les TGF β .

La famille des TGF β comporte une vingtaine de membres. Des taux élevés de TGF β ont été mis en évidence dans la matrice extracellulaire du cartilage hyalin et dans le cartilage calcifié. Ces deux tissus diffèrent cependant par le sous-type de TGF β exprimé [Fukumara, 1998].

Le TGF β [Lawrence, 1996] est synthétisé sous la forme d'un précurseur inactif (figure I.12), dont l'activation met en jeu soit l'environnement acide (hydrolyse chimique) soit des enzymes [Nunes, 1996]. Le TGF β se lie aux petits PG décorine, biglycane et fibromoduline [Hildebrand, 1994] qui exercent ainsi un rétrocontrôle sur l'activité du facteur de croissance, et, en le protégeant d'une activité protéolytique, ils contribuent à augmenter sa demi-vie.

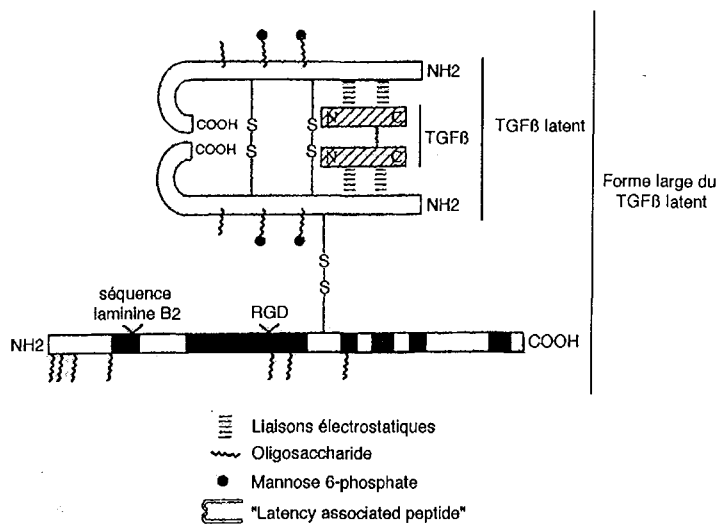


Figure I.13. Schéma des deux formes latentes du TGF β , qui mettent en jeu des interactions ioniques et covalentes.

Le TGF β exerce ses effets en se liant à des récepteurs membranaires de trois types. Les principaux récepteurs (I et II) sont de type sérine/thréonine kinases. Ils existent en tant qu'homodimères, et il est supposé que le récepteur actif soit un hétérotétramère [Saltis, 1996]. Il a également été localisé dans le compartiment intracellulaire, suggérant un rôle intracrine, mais sans que ce dernier ait pu être déterminé [Thorp, 1992].

Le TGF β seul inhibe la prolifération cellulaire [Vivien, 1990]. Certains sous-types de TGF β (TGF β -1 et TGF β -2) induisent la différenciation chondrocytaire et stimulent la synthèse des collagènes [Thorp, 1992]. Le TGF β inhibe également la dégradation des constituants matriciels en induisant la synthèse des inhibiteurs naturels des métalloprotéases, les TIMP, augmentant encore ses effets en faveur d'une accumulation des constituants matriciels [Günther, 1994]. Enfin, le TGF β favorise la calcification de la matrice cartilagineuse en stimulant l'activité de la nucléoside triphosphate pyrophosphohydrolase et le dépôt de pyrophosphate dans la matrice [Rosen, 1997].

Les BMP (« bone morphogenetic proteins ») sont une sous-famille de celle des TGF. Elles ont d'abord été identifiées dans l'os, et elles ont été rendues responsables de la formation ectopique de cartilage et d'os. Dans le cartilage, elles favorisent la chondrogenèse et stabilisent le phénotype chondrocytaire.

IV.1.d. Interactions entre bFGF, IGF et TGF β au cours de la chondrogenèse.

Si les effets de ces facteurs de croissance paraissent assez simples, leur présence conjointe dans la matrice cartilagineuse offre une régulation beaucoup plus fine et plus complexe de la différenciation et de l'activité des chondrocytes. Ils sont non seulement capables de moduler leurs effets mutuels mais également leur sécrétion.

Le TGF β potentialiserait les effets mitogènes du bFGF [Baird, 1990], en augmentant notamment l'expression de ses récepteurs. La présence de ces deux facteurs de croissance ralentirait le processus de différenciation chondrocytaire [Bradham, 1994].

La stimulation de la synthèse des GAG par les IGF, indispensables à la présentation du bFGF à son récepteur, constitue une autre voie aboutissant à la potentialisation des effets du bFGF. La présence simultanée de l'IGF et du bFGF conduit à une stimulation de la prolifération cellulaire et de la synthèse des constituants matriciels [Osborn, 1989]. Par contre, la présence simultanée du TGF β et de l'IGF conduit à une diminution de la synthèse des protéines totales, qui s'explique par une diminution de la synthèse des collagènes en faveur de celle des PG [Hill, 1992]. Ces effets mettent en jeu une augmentation de l'expression des récepteurs à l'IGF-I induite par le TGF β [Tsukasaki, 1994].

IV.2. Les rétinoïdes.

Les rétinoïdes sont des dérivés de la vitamine A, dont seuls quelques uns sont actifs. Les plus connus sont les acides rétinoïques *all trans* et *9 cis*. Les cellules possèdent des récepteurs membranaires spécifiques du complexe retinol-RBP ("retinol binding protein"), des récepteurs cytoplasmiques ("cellular retinol binding proteins" et "cellular retinoic acid binding protein") ainsi que des récepteurs nucléaires RAR et RXR ("retinoic acid receptors" et "retinoid X receptors"). Ces récepteurs nucléaires, après fixation de leur ligand et dimérisation, sont capables de moduler l'expression de nombreux gènes en se fixant sur l'ADN, au niveau d'éléments de réponses aux rétinoïdes [Napoli, 1996].

L'étude de leurs effets sur les chondrocytes a donné lieu à des résultats très contradictoires. Une des raisons pourrait être l'état de différenciation des chondrocytes, en fonction duquel la réponse aux rétinoïdes est différente [Iwamoto, 1993].

Les rétinoïdes peuvent stimuler la prolifération cellulaire, l'inhiber, ou n'avoir aucun effet. Ils inhibent la synthèse des constituants matriciels et induisent leur dégradation [Morales, 1992] .

stimulant l'expression des métalloprotéases [Meats, 1985]. Mais ils peuvent aussi l'inhiber en stimulant la synthèse des inhibiteurs naturels de ces enzymes, les TIMP [Wright, 1991].

Enfin, les rétinoïdes stimulent la maturation chondrocytaire : ils induisent la différenciation des chondrocytes en cellules de type ostéoblastique, et le processus d'ossification endochondrale [Pacifici, 1991]. Cette induction de la différenciation chondrocytaire par les rétinoïdes pourrait être liée à une diminution du métabolisme du glutathion intracellulaire [Teixeira, 1996] : la modulation de l'état redox en thiols du chondrocyte semble avoir une grande importance, notamment en terme de régulation de la transcription des gènes codant pour les protéines matricielles telles que les collagènes de types II et X [Habuchi, 1991]. Ainsi, la liaison des facteurs de transcription Fos et Jun à l'élément de réponse AP-1 est sensible à l'état redox en thiols de la cellule.

IV.3. Les métabolites de la vitamine D₃.

La vitamine D a été la première identifiée en tant que précurseur d'une hormone stéroïde. La vitamine D₃ est normalement produite dans la peau à partir du 7-déhydrocholestérol, sous l'effet des ultraviolets. Elle est biologiquement inactive, à moins de subir une première hydroxylation dans le foie, puis une deuxième dans le rein. Le produit formé, la 1,25-dihydroxy vitamine D₃ (1,25-(OH)₂D₃) est alors une véritable hormone, capable d'interagir avec un récepteur nucléaire et de modifier, comme le font les dérivés de la vitamine A, l'expression de nombreux gènes. La modulation de l'expression des gènes nécessite la formation d'un hétérodimère avec un récepteur d'un autre type, tels que les RXR [Darwish, 1995].

Le rôle physiologique de la vitamine D est de maintenir les taux plasmatiques de calcium et de phosphore pour optimiser les fonctions neuromusculaires et la minéralisation du squelette. Les effets de la vitamine 1,25-(OH)₂D₃ sur le cartilage sont confus. Elle induit la synthèse d'ADN, et donc la prolifération cellulaire, et peut conjointement soit inhiber la synthèse des GAG sulfatés, soit la stimuler. Cette vitamine jouerait également un rôle majeur dans la différenciation terminale des chondrocytes, en diminuant l'activité de la phosphatase alcaline, empêchant ainsi la minéralisation de la matrice cartilagineuse.

IV.4. "Parathyroid hormone-related protein" (PTH-rP) et "Indian hedgehog" (Ihh).

Le PTH-rP est synthétisé par de nombreux tissus. Pour autant, ses taux sanguins sont très faibles : son mode d'action serait ainsi essentiellement paracrine. Les effets du PTH-rP sont médiés par le même récepteur que celui de l'hormone thyroïdienne qui intervient dans l'homéostasie des taux de calcium.

Des relations étroites entre le PTH-rP et les hedgehog ont été mises en évidence. Les hedgehog constituent une famille de protéines présentant une activité protéolytique, donnant naissance à un facteur biologiquement actif par autocatalyse. Ce facteur emprunte les voies paracrines pour faire valoir ses effets. Les chondrocytes, qui ont perdu leur capacités à proliférer, expriment alors le récepteur de PTH/PTH-rP, puis la protéine Ihh : elle agirait sur les cellules péri-chondrocytaires en stimulant la production de PTH-rP. Un rétrocontrôle négatif exercé par le PTH-rP conduirait à une inhibition de la synthèse de Ihh [Wallis, 1997]. Ces deux facteurs sont impliqués dans la stimulation de la croissance du cartilage [Kronenberg, 1997].

IV.5. Etat redox des chondrocytes et minéralisation de la matrice cartilagineuse.

L'initiation de la maturation chondrocytaire et de l'ossification endochondrale correspond à une modification du potentiel redox des cellules [Shapiro, 1986]. Ces modifications de l'état cellulaire seraient liées à l'appauvrissement en oxygène dans les couches profondes du cartilage. Elles s'accompagnent d'une augmentation du rapport NADH/NAD⁺ [Shapiro, 1986], d'une diminution et du taux intracellulaire de glutathion réduit [Habuchi, 1991; Rajpurohit, 1996], et d'une accumulation d'un intermédiaire de la glycolyse, le phospho-énol-pyruvate. Il a été montré que la diminution du taux intracellulaire de glutathion réduit induisait la différenciation chondrocytaire [Teixeira, 1996]. Le phospho-énol-pyruvate est capable d'induire la libération du calcium par les mitochondries [Shapiro, 1978]. Une modification de l'état redox des chondrocytes, lorsque le taux en oxygène dans les couches profondes du cartilage diminue, pourrait ainsi constituer un signal de l'initiation du processus d'ossification endochondrale.

IV.6. Contribution des constituants matriciels au processus de différenciation chondrocytaire.

Il est connu depuis longtemps que les chondrocytes en culture en monocouche perdent rapidement leur phénotype, caractérisé par la synthèse du collagène de type II et de l'agrécan. En culture en monocouche sur un gel composite de collagène de type I/agarose, les cellules acquièrent rapidement la morphologie de chondrocytes, et synthétisent également des taux plus élevés de collagène de type II et d'agrécan que des chondrocytes en culture en monocouche sur un support en plastique [McDougall, 1996]. La présence de fibronectine inhibe le processus de différenciation chondrocytaire [Thomas, 1988], et, dans un système de culture tridimensionnel, elle stimule la synthèse des PG [Martin, 1998]. A l'inverse, la différenciation des chondrocytes en culture en gel de collagène est plus rapide lorsque ce dernier est enrichi en agrécan.

L'accumulation des ions calcium dans les vésicules matricielles nécessaire à la minéralisation de la matrice cartilagineuse est sous le contrôle d'une protéine membranaire, l'annexine V, et met en jeu une interaction entre cette protéine membranaire et les collagènes de types II et X [Kirsch, 1997]. Le collagène de type XI contribuerait également au processus de maturation chondrocytaire : la délétion de la chaîne $\alpha 1(XI)$ conduit à la désorganisation des chondrocytes du cartilage de croissance, et à une déficience du processus de maturation des chondrocytes en chondrocytes hypertrophiques.

Le rôle de ces différents constituants matriciels dans le maintien du phénotype chondrocytaire met également en jeu des protéines présentant des séquences RGD, capables de se lier aux intégrines [Yasuda, 1996]. Ainsi, la diminution simultanée de l'expression de certaines intégrines et du taux intracellulaire de TGF β a été associée à une diminution des interactions indirectes entre les chondrocytes et la fibronectine [Yasuda, 1996]. Or, la diminution du taux intracellulaire de TGF β correspond à l'initiation de la maturation des chondrocytes en chondrocytes hypertrophiques.

Ainsi, une modification des interactions entre les chondrocytes et les constituants matriciels peut conduire à une altération du phénotype chondrocytaire.

Chapitre II

L'arthrose

L'arthrose a longtemps été confondue avec les rhumatismes articulaires inflammatoires : elle n'a été décrite pour la première fois qu'à la fin du XIX^{ème} siècle par Charcot. L'arthrose désigne en premier lieu une atteinte du cartilage articulaire qui ne s'accompagne d'aucune manifestation inflammatoire lors des phases précoces de la maladie. Lorsque l'atteinte articulaire devient sévère, une réaction inflammatoire survient qui affecte toutes les structures articulaires et contribue à une évolution plus rapide de la maladie. Une définition récente a été formulée à l'occasion d'un « workshop », et souligne la complexité de la maladie : « l'arthrose est un groupe de maladies dont l'étiologie peut être différente mais qui présente des caractéristiques biologiques, morphologiques, et cliniques très similaires. Cette pathologie affecte le cartilage bien évidemment, mais également l'ensemble de l'articulation, c'est à dire l'os sous-chondral, les ligaments, la capsule, la membrane synoviale, et les muscles péri-articulaires. La dégénérescence du cartilage articulaire conduit progressivement à la fibrillation de la couche superficielle du cartilage, puis à la formation de fissures aboutissant à la mise à nu de l'os sous-chondral » [Flores, 1998].

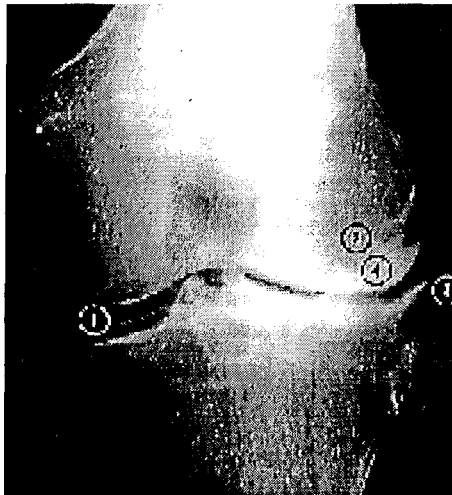


Figure II.1. Radiographie du genou d'un patient atteint d'une gonarthrose (arthrose du genou) : la mesure de l'interligne séparant les extrémités osseuses (1) rend compte d'une érosion du cartilage. La sclérose de l'os sous-chondral (2), une géode dans l'os sous-chondral (3) et des ostéophytes(4) sont également visibles.

Plusieurs stades relatifs à la progression de l'arthrose et à la sévérité des lésions articulaires ont été définis. Le premier stade est appelé chondromalacie. Elle décrit un ramollissement du cartilage articulaire, qui se manifeste d'un point de vue histologique par un épaississement et par l'apparition de fissures parallèles à la surface articulaire dans la couche moyenne du cartilage [Ohno, 1988]. Ces fissures progressent ensuite vers la surface articulaire, donnant au cartilage de la couche superficielle un aspect fibrillaire : c'est le deuxième stade de l'arthrose. Ces fissures s'approfondissent, atteignant progressivement l'os sous-chondral. Le stade ultime de l'arthrose est la mise à nu de l'os sous-chondral. De façon paradoxale, l'érosion du cartilage dans les zones portantes est associée à une hypertrophie d'un tissu ostéocondral dans les régions les moins sollicitées, donnant naissance aux ostéophytes (figure II.1).

L'arthrose est une pathologie articulaire d'autant plus difficile à appréhender qu'elle est asymptomatique pendant plusieurs années : 5 % de la population de moins de 25 ans présentent une atteinte modérée, et plus de 40 % ont une atteinte modérée à 40 ans, sans qu'aucune douleur ou gêne fonctionnelle ne se manifestent [Praemer, 1992]. Ces signes cliniques, lorsqu'ils surviennent, traduisent le plus souvent des lésions profondes dans le cartilage des régions portantes, atteignant parfois l'os sous-chondral.

L'arthrose, dont la fréquence est étroitement liée à l'âge, est perçue comme une fatalité : l'absence de technique d'imagerie suffisamment performante pour déceler une arthrose débutante en clinique, la complexité de cette pathologie et les faibles capacités du cartilage à "cicatriser", sont autant de raisons pour lesquelles aucune solution thérapeutique satisfaisante n'a été proposée jusqu'à présent.

2. Facteurs étiologiques.

De façon surprenante, certaines articulations très sollicitées mécaniquement ne sont pas sujettes aux rhumatismes dégénératifs. Le cas le plus démonstratif est celui de la cheville, très sollicitée mais habituellement indemne d'arthrose (figure II.2).

La manifestation tardive de l'arthrose lorsque la destruction articulaire est avancée, rend difficile l'identification du (des) facteur(s) étiologique(s). Les traumatismes mécaniques ou certains désordres génétiques ont pu être identifiés comme étant la cause de l'installation précoce d'un processus dégénératif. Cependant, ces facteurs étiologiques ne concernent qu'une faible partie de la population (figure II.3).

2.1. Facteurs mécaniques.

Le cartilage articulaire possède une capacité surprenante à supporter et à résister aux fortes contraintes mécaniques [Afoke, 1987]. Cependant, des chocs trop violents peuvent être la cause de fissurations dans le cartilage, qui s'étendent rapidement en raison des mouvements [Cicuttini, 1995]. Une hyperlaxité ligamentaire peut également être la cause d'une arthrose. Le manque de maintien de l'articulation se manifeste alors par des forces de cisaillement aboutissant à la fibrillation de la couche superficielle du cartilage [Gillquist, 1990].

Les mécanismes en jeu lors de microtraumatismes répétés sont beaucoup moins élucidés. Ils peuvent se manifester chez les sportifs, ou chez les personnes présentant une surcharge pondérale [McAllindon, 1996]. L'application de fortes pressions conduit à la modulation du métabolisme chondrocytaire [Takahashi, 1997] : une augmentation modérée des contraintes mécaniques (5 mégapascals, MPa) conduit à une stimulation de la synthèse de l'agrécan; des pressions importantes (50 MPa), ou à l'inverse, l'absence de contrainte mécanique, conduisent à une inhibition de l'anabolisme [Gray, 1988].

D'après Takahashi [1998], la diminution de la synthèse des constituants matriciels par les chondrocytes, en réponse à l'application de fortes contraintes, est en relation avec une augmentation de l'expression de certaines cytokines (IL-6 et TNF α). La modulation de l'expression de ces deux cytokines pourrait être en relation avec l'organisation du cytosquelette : les variations du volume chondrocytaire en réponse à l'application des contraintes mécaniques seraient transmises par le cytosquelette, et conduiraient à la déformation du noyau de la cellule [Guilak, 1995]. Les éléments du cytosquelette participeraient ainsi à un système de transduction du signal en relation avec la modification de l'application des contraintes mécaniques, permettant à la cellule d'y répondre de façon appropriée [Benjamin, 1994].

Certaines espèces animales développent de façon spontanée une arthrose précoce. Chez la souris STR-ORT (métaplasie chondro-osseuse des tissus mous, conduisant à une ossification des ligaments responsable d'une instabilité articulaire; Collins, 1994) la synthèse d'IL-1 β et d'IL-6 par les chondrocytes augmente en fonction de l'âge des souris, et précède l'apparition de lésions dans le cartilage articulaire [Chambers 1997].

2.2. Désordres génétiques.

Jusqu'à présent, seul le collagène de type II a été incriminé dans le caractère héréditaire de la pathologie humaine (tableau II.1). Ces mutations ont en général des conséquences somatiques : elles sont à l'origine de différentes formes de nanisme, d'atteintes oculaires ou auditives [Williams, 1995].

Il existe ainsi des formes d'arthroses diffuses, dont la plus connue a été décrite en 1952 par Kellgren et Moore. Ce type d'arthrose se caractérise par une atteinte des premières articulations carpo-métacarpophalangiennes (formation des nodosités d'Heberden, figure II.2) et par une atteinte des genoux. Il semblerait qu'une inflammation articulaire accompagnée de l'hypertrophie de l'os adjacent soit la première manifestation de cette arthrose.

Des souris présentant une délétion de la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type IX [Fässler, 1994], ou à l'inverse, surexprimant le domaine NC4 de ce même collagène [Haimès, 1995] développent une arthrose : ces expérimentations de mutagenèse dirigée permettent de mettre en avant l'importance de la structure et de l'architecture de la matrice du cartilage, afin qu'il résiste au mieux aux contraintes mécaniques.

Plus récemment, il a été montré que l'expression d'un récepteur de type II du TGF β défectueux s'accompagne du développement d'une pathologie dégénérative du cartilage articulaire [Serra, 1997]. Cette mutation se traduit par la calcification du cartilage articulaire en raison de la différenciation ultime des chondrocytes en cellule de type ostéoblastique.

Tableau II.1. Les principales mutations du collagène de type II
(d'après Williams, 1995).

Dysplasie spondylo-épiphysaire <i>(troubles de l'ossification endochondrale et perturbation de la chondrogenèse)</i>	1 3 5 9 10 11 15 33 34	délétion (aa 964 à 999, exon 48) duplication (aa 970 à 984, exon 46) Gly ⁹⁹⁷ →Ser (exon 48) Arg ⁷⁸⁹ →Cys (exon 41) Arg ⁷⁵ →Cys (exon 11) Gly ²⁴⁷ →Ser (exon 19) Gly ⁴⁹³ →Ser (exon 30) Gly ¹⁷¹ →Arg (exon 15) duplication 9 pb (exon 42)
Dysplasie spondylo-méta-épiphysaire	12 25 29	Gly ¹⁵⁴ →Arg (exon 15) Gly ⁷⁰⁹ →Cys (exon 39) Gly ³⁰⁴ →Cys (exon 21)
Dysplasie de Kniest <i>nanisme dysmorphique, anomalies oculaires (cataracte, décollement de rétine), surdité progressive</i>	28 30 31 32	délétion de 21 pb (exon 12) délétion de 9 pb (exon 44) délétion de l'exon 21 (in-frame) délétion de 19 pb (exon 34)
Achondrogenèse*/hypochondrogenèse <i>* absence presque complète des os des membres (forme de nanisme non viable)</i>	2 7 16 19 20 26 35 36 37	Gly ⁹⁴³ →Ser (exon 46) Gly ⁵⁷⁴ →Ser (exon 33) Gly ⁸⁵³ →Glu (exon 43) Gly ⁹⁸⁸ →Arg (exon 48) Gly ⁶⁹¹ →Arg (exon 38) Gly ⁸¹⁷ →Val (exon 42) Gly→Ile (exon 31) Gly ⁷⁶⁹ →Ser (exon 41) Gly ⁵⁰⁴ →Ala (exon 35)
Syndrome de Stickler <i>arthro-ophtalmopathie héréditaire progressive</i>	6 8 13 17 21 22	Arg ⁷³² →Stop (exon 40) Arg ⁹ →Stop (exon 7) frame shift (exon 40) délétion IVS12 frame shift (exon 48) frame shift (exon 43)
Syndrome de Wagner	23	Gly ⁶⁷ →Asp (exon 10)
Arthrose	4 18	Arg ⁵⁰⁴ →Cys (exon 31) Gly ⁵⁰⁴ →Ser (exon 48)

2.3. Facteurs systémiques et métaboliques.

Plusieurs études font état d'une relation entre des désordres systémiques et une atteinte dégénérative du cartilage articulaire. En 1961, une association entre une atteinte dégénérative des articulations des mains et un taux élevé de cholestérol a été soulignée [Kellgren, 1961]. Un peu plus tard, l'arthrose a également été associée à l'hypertension artérielle [Lawrence, 1975], ou encore à une hyperuricémie [Acheson, 1975]. Une étude plus récente montre une association entre le taux de glucose sanguin, une hypercholestérolémie, et la gonarthrose [Hart, 1995]. Chez ces patients, la survenue de l'arthrose pourrait être liée à une résistance à l'insuline, ou encore à de faibles taux d'IGF.

2.4. Autres facteurs étiologiques : hypothèses.

Dans la plupart des cas, l'étiologie de l'arthrose est inconnue. Des données cliniques et expérimentales ont permis d'avancer quelques hypothèses.

Certains auteurs ont mis en évidence une dégradation des fibres de collagène de type II dans le cartilage articulaire sénescant similaire à celle constatée lors d'une arthrose débutante. Dans les deux cas, la dégradation du collagène de type II est initiée autour des chondrocytes de la couche superficielle du cartilage, puis progresse vers les couches plus profondes. D'après ces observations, Hollander [1995] suggère que l'arthrose est une involution du cartilage articulaire identique mais plus rapide que celle caractérisant un cartilage sénescant.

D'après une seconde hypothèse, l'arthrose résulterait d'une modulation du phénotype chondrocytaire. Les cellules du cartilage exprimeraient le phénotype de chondrocytes dédifférenciés synthétisant le collagène de type I, et celui de chondrocytes hypertrophiques synthétisant le collagène de type X. La synthèse d'une matrice inapte à résister aux contraintes mécaniques aboutirait au développement de lésions au sein du cartilage articulaire [Von der Mark, 1992].

Selon une troisième hypothèse, l'initiation et la progression d'une arthrose sont deux événements différents [Radin, 1986] : l'initiation résulterait d'un épaississement de l'os sous-chondral. La structure en travées de ce dernier permettrait de supporter des contraintes mécaniques importantes; le cartilage, quant à lui, aurait pour rôle de répartir ces contraintes sur une surface maximale de l'os sous-chondral. L'épaississement des travées rendrait l'os sous-chondral moins souple, et donc moins apte à absorber les forces exercées. Il s'ensuivrait alors l'application de contraintes sur le cartilage d'autant plus grandes que la structure de l'os sous-chondral est dense, conduisant ainsi à une souffrance chondrocytaire. Bailey [1997] attribue ce remodelage de l'os sous-chondral à une laxité de plus en plus grande des ligaments en fonction de l'âge. D'autres suggèrent que la condensation de l'os sous-chondral n'est pas nécessaire lors de l'initiation de l'arthrose. Elle serait cependant indispensable à la progression des phénomènes dégénératifs [Burr, 1997].

3. La douleur articulaire.

3.1. Les principales voies nerveuses impliquées dans la sensation douloureuse.

L'arthrose est une pathologie articulaire qui affecte près de 80 % de la population de plus de 70 ans [Peyron, 1987]. Le caractère souvent invalidant de l'arthrose, en raison des douleurs articulaires et de la gêne fonctionnelle, en fait un véritable problème de santé publique. De façon surprenante, il n'existe pas de relation entre une atteinte anatomo-clinique et la symptomatologie douloureuse [Lawrence, 1966].

La douleur peut avoir son origine dans les structures articulaires ou osseuse. Contrairement au cartilage, la capsule, les ligaments, les ménisques, le périoste et l'os sous-chondral sont innervés par un réseau de fibres myélinisées et non myélinisées [Perrot, 1996; Johnston, 1997]. Il existe des récepteurs articulaires sensitifs appelés mécanorécepteurs, présents dans la capsule, dans les ligaments et dans les ménisques, mais absents de la membrane synoviale. Ils répondent à des stimulations mécaniques physiologiques telles que la pression et l'étirement, et sont impliqués dans la proprioception. Les mécanorécepteurs transmettent un signal qui emprunte les fibres myélinisées A α et A β , très peu nombreuses.

Le second type de récepteurs articulaires sensitifs sont les nocicepteurs, impliqués dans la perception de la douleur. Ils sont constitués par les extrémités des fibres myélinisées afférentes A δ et par les extrémités des fibres afférentes C non myélinisées. Les fibres myélinisées afférentes A δ sont présentes à la surface des ligaments, et représentent environ 20 % de l'innervation articulaire. Les fibres afférentes C non myélinisées sont les plus répandues dans les tissus articulaires (40 % de l'innervation articulaire), notamment dans la membrane synoviale.

Les douleurs articulaires peuvent être de nature mécanique (mise à nu de l'os sous-chondral) ou inflammatoire (synovite secondaire à une arthrose). Les douleurs mécaniques sont courantes et mettent en jeu les nocicepteurs de la capsule, des ligaments et de l'os. Les douleurs articulaires de nature inflammatoire trouvent principalement leur origine dans la membrane synoviale. Elles mettent en jeu la stimulation des nocicepteurs, et se traduisent par une augmentation de leur activité spontanée, une diminution de leur seuil d'activation, une réponse exagérée à un stimulus, et par le recrutement de fibres nociceptives silencieuses [Guirimand, 1996].

De nombreux médiateurs sont capables de stimuler les nocicepteurs. Les principaux sont les protons, les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et IL-6), la bradykinine, la sérotonine et l'histamine, ainsi que les prostaglandines et les leucotriènes [Schaible, 1993]. Les signaux nociceptifs sont acheminés par les fibres A δ myélinisées et les fibres C non myélinisées (figure II.3) vers les neurones de la corne dorsale spinale [Perrot, 1996; Johnston, 1997]. La libération

conjointe de substance P (SP), de CGRP ("calcitonine gene-related peptide"), de glutamate et d'aspartate dans la corne dorsale conditionne l'activation des neurones spinaux qui se projettent directement ou indirectement dans le thalamus.

La stimulation répétée des neurones de la corne dorsale par les fibres C, et le nombre croissant de neurones spinaux et supraspinaux recrutés dans la transmission des signaux nociceptifs contribuent à l'exagération de la sensation de la douleur.

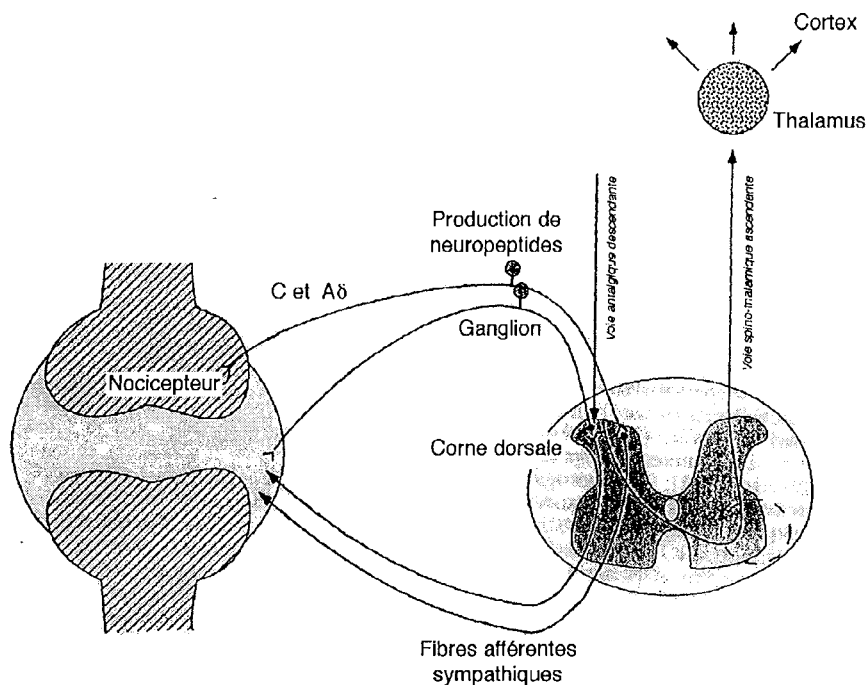


Figure II.3. Schéma des principales voies impliquées dans la genèse et l'entretien de la douleur (d'après Perrot, 1996).

Une seconde voie conduit à la potentialisation de la réaction inflammatoire et de la douleur. Elle met en jeu les fibres C non myélinisées. Cette particularité leur confère la capacité de conduire l'influx nerveux dans les deux directions, afférente et efférente. La stimulation des nocicepteurs conduit à la genèse d'un signal afférent vers la moelle épinière, et d'un second signal efférent qui conduit à la libération de neuromédiateurs à proximité du site initial : c'est le réflexe d'axone.

Des récepteurs aux opioïdes ont également été mis en évidence dans l'articulation. Ils participent à la modulation de la douleur, comme cela a été suggéré à la suite d'une injection intra-articulaire de morphine. Elle agirait en modulant la libération de SP [Stein, 1991].

3.2. Neuropeptides et arthrose.

La SP et le CGRP ont été mis en évidence dans l'articulation au cours de l'arthrose [Fortier, 1997]. Ces deux peptides sont associés à une vasodilatation et à une inflammation. La SP stimule également la libération des prostaglandines et des collagénases par les synoviocytes, et celle des cytokines par les monocytes. De plus, les synoviocytes expriment un plus grand nombre de récepteurs à la SP [Sakai, 1998]. La libération de SP dans l'articulation a été associée à une atteinte du cartilage plus sévère au cours d'une arthrose.

Chapitre III

Physiopathologie de l'arthrose

L'arthrose a longtemps été considérée comme une involution normale du cartilage articulaire due à l'âge. Cependant, le développement de nouvelles méthodologies a permis de mettre en évidence des modifications biochimiques au sein de la matrice cartilagineuse en fonction de l'âge (tableau III.1) bien différentes de celles caractérisant une arthrose.

Tableau III.1. Modifications des paramètres biochimiques

- au sein d'un cartilage sénescant par rapport à un cartilage jeune;
- au sein d'un cartilage arthrosique par rapport à un cartilage sénescant.

Paramètres	Cartilage sénescant	Cartilage arthrosique
Eau	↓	↑
Densité cellulaire	↓	↓ zones portantes ↑ ostéophytes
Réponse aux facteurs de croissance/cytokines	↓	↑
TIMP/MMP	↑ (diminution du catabolisme)	↓ (augmentation du catabolisme)
Agrécan	↓	↓
Sulfatation des GAG	↓	?
CS/KS	?	↑
AH	↑	↓
Protéine de liaison	↓	?
Formation des agrégats	↓	↓

L'arthrose résulte d'un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des constituants matriciels (figure II.4). De multiples facteurs sont impliqués tels que les cytokines, les facteurs de croissance, les radicaux libres et les prostaglandines, qui contribuent à la dérégulation du métabolisme chondrocytaire [Westacott, 1996]. L'érosion du cartilage dans les régions les plus sollicitées résulte à la fois d'une inhibition de la synthèse des constituants de la matrice cartilagineuse et d'une augmentation de leur dégradation. A l'inverse, dans les régions non portantes, l'ostéophytose traduit un déséquilibre en faveur d'une accumulation des constituants matriciels.

La genèse de ces deux types de lésions au sein d'une même articulation la rend d'autant plus difficile à étudier et à comprendre. Elle met en jeu des mécanismes physiopathologiques si différents qu'il a parfois été suggéré qu'elles étaient les manifestations de deux pathologies différentes.

1. Destruction du cartilage articulaire.

1.1. Chondrocytes, IL-1 β et TNF α .

L'interleukine-1 β (IL-1 β) et le "tumor necrosis factor- α " (TNF- α) sont deux cytokines pro-inflammatoires. 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 de 17 kDa 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, 1992]. L'IL-1 α est un messenger autocrine intracellulaire, dont le précurseur (pro-IL-1 α) peut être transporté à la surface de la cellule, à laquelle il se lie par un résidu mannose à une protéine membranaire [Brody, 1989].

Tableau I.4. Les acteurs de la transduction du signal induite par l'IL-1.

Seconds messagers	AMPc, PGE2, NO diacylglycérol, céramides,
Enzymes	lysophosphatidate acyltransférase, phosphatidate phosphohydrolase, sphingomyelinase, PKA, PKCb, MAP kinase, MAP kinase kinase, hsp 27 kinase, béta caséine kinase, tyrosine kinases, phosphatases.
Facteurs de transcription	NF- κ B, AP-1, NF-IL-6.

Deux types de récepteurs membranaires à l'IL-1 β ont été identifiés (IL-1RI et IL-1RII). Cependant, seul IL-1RI induit la transduction du signal (tableau I.4). Elle met en jeu un co-récepteur, la protéine accessoire du récepteur de l'IL-1 (IL-1RAcP) [Lang, 1998]. L'activation du complexe IL-1RI / IL-1RAcP par une protéine kinase initie la transduction du signal, aboutissant à l'activation de facteurs de transcriptions tels que le NF κ B.

Il existe également un antagoniste du récepteur à l'IL-1 β (IL-1Ra; Dinarello, 1994) qui présente une forme extracellulaire et une forme intracellulaire, résultant du splicing alternatif du gène codant pour l'IL-1Ra. Les récepteurs solubles de types I et II (IL-1sRI et IL-1sRII) constitués du domaine extracellulaire des récepteurs de types I et II de l'IL-1 β respectivement (après hydrolyse) agissent eux aussi en tant qu'inhibiteurs de l'IL-1 β . L'IL-1sRI est également capable de fixer l'IL-1Ra : tous deux inhibent alors mutuellement leurs effets.

Le TNF- α est un peptide susceptible de se lier à deux types de récepteurs : p55 et p75, dont il existe également des formes solubles. La liaison du TNF- α au récepteur p75 est insuffisante pour induire la transduction du signal. Il semble que ce récepteur de plus faible affinité permette de piéger la cytokine pour la présenter ensuite au récepteur de plus forte affinité, le récepteur p55. Ce dernier est par ailleurs impliqué dans la transduction du signal.

Dans le cartilage sain, ces cytokines doivent réguler l'expression des protéases et ainsi contribuer au maintien de l'homéostasie tissulaire. Le récepteur de IL-1 β (IL-1R) est exprimé en plus grand nombre par les chondrocytes de la couche superficielle. Ils sont ainsi plus sensibles aux effets de l'IL-1 β [Häuselmann, 1996]. Les deux récepteurs du TNF α (TNF α -R), p55 et p75 sont également exprimés, de façon plus importante par les chondrocytes des régions portantes [Webb, 1997]. Cependant, l'expression de l'IL-1 β et du TNF- α dans le cartilage sain a rarement été mise en évidence [Tiku, 1992; Middleton, 1996].

La contribution de l'IL-1 β et du TNF α à la destruction du cartilage au cours de l'arthrose est controversée : l'étude conjointe de l'expression de ces deux cytokines, dans des échantillons de cartilage humain atteint d'arthrose ou au cours d'une arthrose expérimentale chez l'animal, privilégie dans certains cas la participation de ces deux cytokines [Melchiori, 1998; Chambers, 1997]. Dans d'autres cas, le TNF α est la cytokine la plus impliquée dans la destruction du cartilage [Cameron, 1997]. Enfin, certains auteurs ne mettent en cause ni l'un ni l'autre de ces médiateurs dans la destruction du cartilage articulaire [Leistad, 1998]. Ainsi, il apparaît difficile d'impliquer avec certitude l'une, l'autre, ou ces deux cytokines dans la physiopathologie de l'arthrose.

Pourtant, en raison de leurs effets délétères multiples, ces cytokines apparaissent comme les "meilleurs candidats" pouvant être responsables de la destruction du cartilage articulaire [Chevalier, 1997]. Bien que leur structure et celle de leurs récepteurs soient différentes, l'IL-1 β et le TNF α exercent des effets similaires. De plus, ces cytokines potentialisent mutuellement leurs effets lorsqu'elles sont présentes conjointement.

Comme toute cytokine, l'IL-1 β et le TNF α modulent le métabolisme des cellules cibles en exerçant un contrôle positif ou négatif sur l'expression de nombreux gènes. Ces médiateurs conduisent à la fois à l'inhibition de la synthèse des principaux constituants du cartilage, et à leur dégradation [Pelletier, 1991]. En raison de la rapidité d'induction de l'expression de ces

cytokines, les gènes codant pour ces deux cytokines sont qualifiés de gènes précoces : aucune synthèse *de novo* n'est nécessaire. La transcription de ces gènes met en jeu l'activation d'un (ou plusieurs) facteur(s) de transcription(s) pré-existant(s) sous une forme latente (AP1, NF- κ B, NK- β A...) par des tyrosines kinases [Finbloom, 1995], puis leur fixation sur un élément de réponse en amont du site de transcription [Auron, 1994].

1.1. Chondrocytes et IL-1 β .

Une augmentation du nombre des IL-1R de type I a été décelée au cours de l'arthrose [Martel-Pelletier, 1992] : les chondrocytes d'un cartilage arthrosique sont ainsi beaucoup plus sensibles aux effets délétères de l'IL-1 β que ceux d'un cartilage sain [Warnock, 1994].

Il en est de même pour le TNF α : un plus grand nombre de récepteurs à été mis en évidence dans le cartilage au cours de l'arthrose, et les chondrocytes ont ainsi une plus grande aptitude à répondre à cette cytokine.

1.2. Régulation de l'expression de nombreux médiateurs par l'IL-1 β et le TNF- α .

1.2.a. L'interleukine-6.

La synthèse d'IL-6 par les chondrocytes peut être induite à la fois par l'IL-1 β et par le TNF α [Nietfeld, 1990; Malfait, 1994]. Son expression au cours de l'arthrose est connue [Middleton, 1996; Dodds, 1994]. Elle induit notamment l'augmentation de l'expression des récepteurs membranaires de l'IL-1 β et du TNF α par les chondrocytes [Nietfeld, 1990, Elson, 1997]. Cet effet de l'IL-6 permet d'expliquer la sensibilité plus grande des chondrocytes à ces deux cytokines pro-inflammatoires [Nietfeld, 1994]. Cependant, l'IL-6 stimule également l'expression de l'antagoniste soluble du récepteur de l'IL-1 β (IL-1Ra) [Jordan, 1995]. Elle conduit à l'inhibition de la production de radicaux libres induite par l'IL-1 β , et inhibe la dégradation des constituants matriciels en diminuant la production de collagénase et en stimulant celle des TIMP. Il semblerait que ces effets "protecteurs" de l'IL-6 dépendent de la présence conjointe de son récepteur soluble [Silacci, 1998].

1.2.b. L'IL-18.

L'IL-18 est une cytokine appartenant à la famille de l'IL-1. L'induction de son expression par les chondrocytes en réponse à une stimulation par l'IL-1 β laisse penser qu'elle pourrait être produite au cours de l'arthrose. L'IL-18 induit la production de radicaux libres, de prostaglandines, d'IL-6 et de protéases par les chondrocytes. Cette cytokine contribuerait largement à la dégradation des constituants du cartilage [Olee, 1999].

1.2.c. Les prostaglandines et les radicaux libres.

Les prostaglandines et les radicaux libres, dont le monoxyde d'azote (NO, "nitric oxide"), sont connus pour leur large contribution aux phénomènes inflammatoires. La synthèse de ces médiateurs par les chondrocytes dans l'arthrose a été montrée [Amin, 1998; Attur, 1998]. Elle met en jeu l'induction de l'expression de leurs enzymes de synthèse, la NO synthase inductible (iNOS) et la cyclo-oxygénase inductible COX-2 [Grabowski, 1997; Amin, 1997].

Les effets délétères des radicaux libres, et notamment du NO, sur les constituants matriciels et sur le métabolisme chondrocytaire sont multiples. Ces espèces très réactives contribuent à l'inhibition de la synthèse des constituants matriciels et à leur dégradation (AH, PG, collagènes). Ces effets s'exercent soit directement [Moseley, 1995; Panasyuk, 1994], soit indirectement, à la suite de l'activation de collagénases latentes [Murrel, 1995] et de l'inactivation de leurs inhibiteurs naturels, les TIMP [Shabani, 1998]. Les radicaux libres sont également soupçonnés de moduler l'expression de certains gènes, tels que celui de l'agrécan, ou encore ceux de certaines collagénases. Trois mécanismes ont été proposés : les radicaux libres sont susceptibles de moduler directement l'activité de certaines protéines kinases [Panasyuk, 1994]. Une seconde voie mettrait en jeu la modulation de la transduction du signal induite par le complexe intégrine $\alpha 5 \beta 1$ -fibronectine-protéine kinase par les radicaux libres [Clancy, 1997]. Et enfin, le NO pourrait agir en tant que véritable second messager [Lo, 1998].

Cependant, l'intérêt de la modulation de l'activité de iNOS au cours de l'arthrose est controversée : dans certains modèles de culture de chondrocytes en présence d'IL-1 β ou de TNF α , l'inhibition de iNOS a conduit à une augmentation de la dégradation des constituants matriciels [Hanglow, 1995; Stefanovic-Racic, 1996]. A l'inverse, l'inhibition de iNOS a permis d'antagoniser les effets d'une injection intra-articulaire d'IL-1 β chez le rat [Presle, sous presse], ou encore de réduire la progression d'une arthrose expérimentale chez le chien [Pelletier, 1998].

Les prostaglandines sont des médiateurs clés de la réaction inflammatoire [Vane, 1998]. Bien que l'arthrose ne présente pas de caractère inflammatoire au cours des phases précoces, l'expression de COX-2 [Amin, 1997] et la production de taux élevés de prostaglandines E2 [Attur, 1998] par les chondrocytes ont été mises en évidence.

La contribution des prostaglandines E2 dans la destruction du cartilage est peu connue, et de surcroît ambiguë. A des concentrations élevées, les prostaglandines E2 inhibent la synthèse des collagènes [O'Keefe, 1992; Di Battista, 1996]. A l'inverse, les prostaglandines E2 sont susceptibles de moduler la dégradation des constituants matriciels, en inhibant l'expression des MMP [Steinberg, 1991; Di Battista, 1994]. Elles stimulent également la prolifération des chondrocytes et la synthèse des PG. Cet effet des prostaglandines semble médié par l'IGF-I, dont les prostaglandines stimulent la synthèse [Di Battista, 1996]. Cependant, les prostaglandines moduleraient également l'action de l'IGF-I en induisant l'expression des IGF-BP [Di Battista 1997].

1.2.d. L'IGF-I.

Plusieurs auteurs ont mis en évidence une augmentation du taux d'IGF-I dans des échantillons de cartilage humain atteints d'arthrose [Middleton, 1992; Olney, 1996]. Elle a été assimilée à une réponse des chondrocytes pour compenser l'atteinte du cartilage [Middleton, 1992]. Cependant, la surexpression de l'IGF-I et de son récepteur membranaire (IGF-R-I) ont été reliées à une atteinte articulaire plus sévère [Middleton, 1996]. Elle peut s'expliquer par la surexpression conjointe des IGF-BP, conduisant à une absence de réponse des cellules à l'IGF-I [Olney, 1996; Tardif, 1996]. Ce déséquilibre entre la synthèse de l'IGF-I et des IGF-BP a été attribué à la fois à l'IL-1 β et au TNF α [Olney, 1995].

1.3. Modulation de l'expression des principaux constituants du cartilage par l'IL-1 β .

Les effets délétères de l'IL-1 β sur l'anabolisme chondrocytaire ont été maintes fois étudiés *in vivo* et *in vitro*. La méthode la plus employée consiste à étudier l'incorporation d'un élément radioactif, le $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ dans le cas d'une étude de la synthèse de l'agrécan, la proline marquée sur l'atome de carbone (^{14}C) ou sur l'atome d'hydrogène (^3H) dans le cas de la synthèse des collagènes.

L'injection intra-articulaire d'IL-1 β chez la souris [van de Loo, 1989; van Beuningen, 1991] ou chez le rat [Gégout, 1994], ou encore l'ajout de cette cytokine à un milieu de culture de chondrocytes ou d'explants de cartilage [Cipolletta, 1998] conduit à une diminution de la synthèse des GAG sulfatés. Cette inhibition de la synthèse de l'agrécan ou du collagène de type II induite par l'IL-1 β et par le TNF α met en jeu une régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle [Dodge, 1998; Lump, 1996] :

- la régulation transcriptionnelle par l'IL-1 β dans le chondrocyte emprunterait plusieurs voies intracellulaires, dont une susceptible d'être inhibée par des activateurs des protéines kinases C (PKC) [Arner, 1991]. *c-fos* contribue également à la modulation de l'expression du gène de l'agrécan par l'IL-1 β [Tsuji, 1996; Lo, 1998];

- la régulation post-transcriptionnelle exercée par l'IL-1 β et qui affecte l'agrécan consiste en une inhibition des sulfotransférases : elle conduit à une diminution de la sulfatation des chaînes de GAG sulfatés [Zanni, 1995]. Dans le cas de la modulation post-transcriptionnelle du collagène de type II par l'IL-1 β , la diminution de l'activité de la prolyl hydroxylase est en cause. Le collagène n'étant plus suffisamment hydroxylé, il est rapidement dégradé dans le compartiment cellulaire. Cet effet de l'IL-1 β serait médié par le NO [Grumbles, 1997].

1.4. Dégradation des constituants du cartilage.

Au cours de l'arthrose, l'expression des protéinases est augmentée, alors que celle de leurs inhibiteurs est diminuée [Belcher, 1996; Martel-Pelletier, 1994]. Les MMP les plus exprimées sont la MMP1 (collagénase 1), la MMP13 (collagénase 3), la MMP3 (stromélysine 1; Billingham, 1997) et la MMP9, une gélatinase [Mohtai, 1993]. Toutes ces enzymes sont très présentes à proximité des lésions du cartilage. La localisation de la MMP1 dans la couche superficielle du cartilage laisse supposer qu'elle est davantage impliquée dans les phases précoces de l'arthrose [Nguyen, 1992]. La présence de la MMP13, qui est exprimée dans toutes les couches du cartilage, traduit le caractère irréversible de l'atteinte articulaire [Moldovan, 1997]. La MMP-8 (ou collagénase neutrophile) a 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, 1997]. La particularité de cette MMP est de cliver l'agrécane en un site particulier entre les domaines G1 et G2 [Fosang, 1994] (entre les résidus acide glutamique³⁷³-alanine³⁷⁴) qui est également celui d'une protéinase très récemment séquencée, l'agrécanease [Lark, 1996; Tortorella, 1999]. Cette protéinase appartiendrait aux différentes familles d'enzymes, dont celle des MMP actives à pH neutre [Hughes, 1997].

Plusieurs isoenzymes de la hyaluronidase sont également synthétisées par les chondrocytes, et qui contribuent elles aussi à la dégradation de la matrice cartilagineuse [Flannery, 1998].

1.4.a. Contribution de la fibronectine.

La dégradation d'un des constituants mineurs de la matrice cartilagineuse, la fibronectine, génère plusieurs fragments qui possèdent une activité protéolytique [Homandberg, 1992; Chevalier, 1996]. Un fragment de 29 kDa possède la particularité d'hydrolyser l'agrécane au niveau du site de clivage de l'agrécanease [Homandberg, 1997a]. L'injection intra-articulaire des fragments de cette protéine provoque d'ailleurs une atteinte du cartilage [Homandberg, 1993].

Le rôle de la fibronectine dans la dégradation des constituants du cartilage ne se limite pas à l'activité protéolytique de plusieurs de ses fragments. La fixation d'un de ces fragments sur l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, conjointement à celle de l'IL-1 β sur son récepteur, induit une augmentation de l'expression de la MMP-3, de la MMP-1, de la MMP-9, et de la MMP-2 [Werb, 1989; Arner, 1995]. De plus, l'interaction entre la fibronectine et les intégrines $\beta 1$ permettrait également de stimuler davantage l'expression de l'IL-6 induite par l'IL-1 β [Yonezawa, 1996]. Or, la fibronectine ainsi que l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ à laquelle elle se lie, sont toutes deux surexprimées au cours de l'arthrose [Loeser, 1997; Arner, 1995].

La contribution de la fibronectine à la destruction du cartilage articulaire est d'autant plus importante que sa concentration dans le cartilage arthrosique est bien supérieure à celle d'un cartilage sain. Cette augmentation de l'expression de la fibronectine se situe essentiellement dans la couche superficielle du cartilage [Chevalier, 1996a; Chevalier, 1996b].

1.4.b. Conséquences de la dégradation des collagènes et de l'agrécan.

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, 1997]. Ils sont alors beaucoup plus sensibles à l'action des protéinases. Un nouvel équilibre s'installe alors entre la pression osmotique générée par les protéoglycanes 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 rendrait irréversible une atteinte du cartilage [Hasty, 1990].

Bien que le turn-over de l'agrécan soit plus rapide que celui des collagènes, sa dégradation conduit à une diminution des propriétés rhéologiques du cartilage. Le principal site de clivage de l'agrécan se situe entre les domaines globulaires G1 et G2 : sa structure linéaire sur laquelle aucun glycosaminoglycane n'est fixé le rend particulièrement sensible à une hydrolyse protéolytique. L'agrécan perd alors 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, 1992].

1.5. Tentative de réparation.

Au cours des phases précoces de l'arthrose, plusieurs modifications sont interprétées comme des tentatives de réparation : la synthèse de l'agrécan [Gaffen, 1997], des petits PG biglycane, décorine et fibromoduline [CS-Szabo, 1997], ainsi que celle des collagènes de type II et de type VI [Aigner, 1997; Ronzière, 1990] est accrue. La modulation de l'expression de ces gènes aboutit à l'élaboration d'une matrice cartilagineuse dont la constitution et les propriétés biomécaniques sont différentes [Matyas, 1999]. Ceci contribue certainement à la progression des phénomènes dégénératifs.

La modulation de la synthèse et de la dégradation de l'agrécan au cours des phases précoces de l'arthrose se traduit par ailleurs par l'apparition de plusieurs épitopes fœtaux, dont l'épitope 846. Ces épitopes apparaissent dans le cartilage au cours de la vie fœtale, puis disparaissent progressivement, au point de ne plus être détectés à 30 ans. Au cours de l'arthrose, les uns, décelés sur les chondroïtines sulfates (épitopes 3-B-3 et 7-D-4) sont associés à une augmentation de la synthèse de l'agrécan, et d'autres, présents sur les chaînes de kératane sulfate (épitope 5-D-4) [Hazell, 1995] sont associés à sa dégradation.

2. Ostéophytose.

L'ostéophytose est un processus conduisant à l'hypertrophie d'un tissu de nature ostéochondrale dans les régions non portantes. Les chondrocytes ont recouvré des propriétés mitotiques, et forment des clones de cellules (ou "clusters"). Le résultat de cette prolifération anarchique est la présence de nombreuses cellules constituant un même chondron [Kouri, 1998]. Dans ces régions et à l'inverse des zones portantes, le déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des constituants est en faveur d'une accumulation des constituants matriciels. Bien que le TGF β ne fasse pas preuve de propriétés mitogènes excepté en présence de bFGF, il est le facteur qui possède les capacités les plus grandes à induire la synthèse excessive des constituants matriciels [van Beuningen, 1994].

2.1. TGF β et ostéophytose.

Les chondrocytes d'un cartilage arthrosique expriment davantage le TGF β [Chambers, 1997], et sont également plus sensibles à ses effets [Jahng, 1997].

La propriété la plus connue du TGF β est sa capacité à induire fortement la synthèse des constituants matriciels. Cependant, ce facteur induit une diminution de la sulfatation des GAG, en modulant l'activité ou la synthèse des sulfotransférases [Zanni, 1995].

Le TGF β est également capable d'induire l'expression d'autres constituants matriciels, notamment celle de petits PG, tels que la fibromoduline, le biglycane et la décorine. Or, tous ces PG sont capables de lier le précurseur du facteur de croissance, modulant ainsi son activation par les enzymes protéolytiques. Le TGF β exerce ainsi un rétrocontrôle négatif sur sa propre activité.

La synthèse de la fibronectine est également stimulée par le TGF β , ainsi que l'expression des intégrines $\beta 1$: le TGF β conduit ainsi à une modification des interactions entre les chondrocytes et les constituants matriciels, et pourrait ainsi contribuer à une modulation du phénotype chondrocytaire. A l'inverse, Lafeber [1997] suggère que la surexpression du TGF β dans un cartilage arthrosique pourrait contribuer à un processus de redifférenciation des cellules dont le phénotype serait altéré.

2.2. Modulation du phénotype chondrocytaire.

La mise en évidence de l'expression du collagène de type X par les chondrocytes des régions ostéophytiques traduit une maturation chondrocytaire [Hoyland, 1991]. La présence de protéines osseuses telles que la BSP ("bone sialoprotein") [De Bri, 1997] va dans le sens d'une telle hypothèse. La présence de collagène de type I est plus ambiguë et reflète soit l'aboutissement de cette maturation chondrocytaire en cellule ostéoblastique, soit traduit une

dédifférenciation cellulaire [Aigner, 1995]. Le recouvrement des capacités des chondrocytes des régions ostéophytiques à proliférer suggère aussi une dédifférenciation cellulaire. Ces deux processus pourraient exister, et correspondre à deux réponses cellulaires différées sous le contrôle des facteurs solubles et des contraintes mécaniques.

Seuls les chondrocytes des régions non portantes semblent répondre au TGF β [van Beuningen, 1994]. Une étude fait également état d'une surexpression du bFGF à la jonction entre le cartilage et la membrane synoviale au cours de l'arthrose [Qu, 1995]. Or, dans un modèle d'arthrose induite par immobilisation chez le lapin, la présence conjointe du TGF β et du bFGF stimule fortement la prolifération chondrocytaire [Okasaki, 1996]. La présence simultanée du TGF β et du bFGF pourrait ainsi contribuer à la formation des "clusters" dans les ostéophytes.

Aigner et ses collaborateurs [1995] ont esquissé une hypothèse, mettant en jeu une différenciation des chondrocytes des couches profondes du cartilage des zones non portantes, ainsi que des cellules de la jonction entre le cartilage, la membrane synoviale et le périoste. Les chondrocytes entreraient dans un processus de maturation cellulaire conduisant à la calcification de la matrice cartilagineuse. Les cellules mésenchymateuses peu différenciées, situées à la jonction entre le cartilage, le périoste et la membrane synoviale auraient les potentialités de cellules fibroblastiques, cartilagineuses ou osseuses, capables de synthétiser différents types de collagènes (I, II, III, et X). Elles seraient ainsi impliquées dans le phénomène d'ostéophytose.

2.3. Interactions entre le TGF β et l'IL-1 β .

Le TGF β est susceptible de moduler l'expression de nombreux gènes. Il est capable d'inhiber l'expression de l'IL-1 β et celle de l'IL-1R [Pronost, 1995]. Le TGF β permet également de lever la répression exercée par l'IL-1 β sur l'expression des gènes codant pour l'agrécan et le collagène de type II [Lump, 1996]. En revanche, le TGF β n'est pas capable de moduler l'augmentation de l'expression des protéinases induite par l'IL-1 β .

Ces effets du TGF β s'expliquent notamment par sa potentialité à moduler la synthèse du NO, un des nombreux médiateurs dont la synthèse est stimulée par l'IL-1 β . Cette modulation mettrait en jeu une régulation transcriptionnelle du gène codant pour iNOS. Une régulation post-transcriptionnelle existe également, qui se manifeste par une diminution de la stabilité de l'ARNm et la diminution de la vitesse de traduction, et par une augmentation de la vitesse de dégradation de la protéine iNOS [Vodovotz, 1993].

Ces multiples propriétés du TGF β ont permis de l'envisager en tant que molécule potentiellement chondroprotectrice [van den Berg, 1995]. Cependant, sa capacité à induire fortement la synthèse des constituants matriciels conduit à la formation d'ostéophytes [Pronost, 1995].

3. Apoptose chondrocytaire dans l'arthrose.

L'apoptose, qui désigne une mort cellulaire programmée, qui est un processus actif mettant en jeu de nombreux effecteurs. A l'inverse, la mort cellulaire par nécrose est un processus passif, non régulé, qui conduit à la libération du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire qui s'accompagne d'une réaction inflammatoire.

En microscopie électronique, l'apoptose se caractérise par une condensation du cytoplasme et une condensation de la chromatine le long de la membrane nucléaire. Elle traduit le clivage internucléosomal de l'ADN par des endonucléases calcium dépendantes. Puis apparaissent des convolutions de la membrane cytoplasmique et de la membrane nucléaire qui forment les corps apoptotiques : ils renferment des fragments du noyau et des organites intracellulaires, évitant ainsi leur libération dans le milieu extracellulaire et une réaction inflammatoire associée. Dans le cartilage, l'isolement des chondrocytes et l'absence de cellule macrophagique ne permet pas la phagocytose de ces corps apoptotiques [Majno, 1995].

Erlacher [1995] est le premier à suggérer une apoptose chondrocytaire au cours de l'arthrose : il a mis en évidence la surexpression d'une protéine, la "B cell lymphoma-2" (Bcl-2) à proximité des lésions. De façon paradoxale, cette protéine inhibe la mort cellulaire par apoptose en réponse à de nombreux stimuli. Erlacher suggère que cette surexpression de Bcl-2 par les chondrocytes au cours de l'arthrose représente une alternative des chondrocytes pour échapper à l'apoptose.

La découverte de *bcl-2* a précédé l'émergence de toute une famille de gènes qui possèdent des séquences très similaires à celle de *bcl-2* [Craig, 1995]. Les uns codent pour des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, les autres sont pro-apoptotiques telles que bax, la plus connue. La particularité de cette famille de protéines est leur capacité à interagir les unes avec les autres : un homodimère Bcl-2/Bcl-2 par exemple empêche la cellule d'entrer en apoptose. A l'inverse, l'homodimère bax/bax entraîne la cellule dans cette voie. Ces deux protéines sont également capables de former des hétérodimères, annulant leurs effets respectifs. Ainsi, le devenir de la cellule dépend d'un équilibre fragile mettant en jeu bax et Bcl-2, ainsi que toutes les autres de protéines de la même famille.

Le mode d'action de Bcl-2 et des autres membres de cette famille est mal connu. Un des mécanismes d'action de Bcl-2 est d'empêcher tout transport de protéines ou d'ions entre les différents compartiments intracellulaires et le cytosol et inversement : elle a en effet été localisée à la surface de la membrane nucléaire et de la membrane mitochondriale. Elle interagit notamment avec la cyclophiline D présente dans la membrane mitochondriale externe, empêchant la fuite des ions calcium hors du compartiment mitochondrial, et diminuant ainsi

l'activité des endonucléases dépendantes du calcium [Marzo, 1998]. Bcl-2 contribue également de cette façon à maintenir le potentiel de membrane de la mitochondrie, dont l'effondrement constitue une des premières manifestations de l'apoptose [Richter, 1993]. Le maintien du potentiel de membrane de la mitochondrie par Bcl-2 empêche également la libération d'un facteur pro-apoptotique, l'AIF ("apoptosis induced factor"), une protéase présente sous une forme latente [Susin, 1996]. Une autre propriété attribuée à Bcl-2 est d'être anti-oxydant. Dans certains cas, il a même été montré qu'elle inhibait la production de radicaux libres. Il a également été suggéré que Bcl-2 puisse antagoniser les effets de l'ICE, en diminuant son activation [Cosulich, 1996]. Cette protéase responsable de l'activation de l'IL-1 β , fait partie d'une famille d'enzymes impliquées dans l'apoptose, les caspases. Elles sont synthétisées sous une forme latente et s'activent mutuellement en cascade, l'ICE étant la première activée : elle tient un rôle essentiel dans la cascade d'événements conduisant à la mort cellulaire [Nicholson, 1995]. Elles conduisent notamment au clivage de substrats tels que les poly (ADP-ribose), précipitant ainsi la cellule vers l'apoptose [Cohen, 1997].

L'apoptose chondrocytaire au cours de l'arthrose a été mise en évidence par plusieurs auteurs [Blanco, 1998; Hashimoto, 1998a]. Cette mort cellulaire programmée pourrait par ailleurs expliquer la diminution de la densité cellulaire observée au cours de l'arthrose. Quelques voies ont été suggérées. L'une d'entre elles met en jeu le récepteur Fas et son ligand. Il appartient à la famille des récepteurs du TNF et son ligand Fas, lui, à celle du TNF et du NGF. La liaison du ligand Fas au récepteur Fas conduit la cellule à une mort par apoptose. Le récepteur Fas a été mis en évidence dans les chondrocytes [Hashimoto, 1997]. Par contre, le ligand Fas n'est pas exprimé par les chondrocytes. Cette voie jouerait un rôle mineur dans l'apoptose du chondrocyte au cours de l'arthrose, excepté lorsqu'elle est associée à une inflammation de la membrane synoviale : le ligand Fas a en effet été mis en évidence dans le liquide synovial et dans le tissu synovial inflammatoire.

Les radicaux libres pourraient contribuer à une apoptose chondrocytaire, voire même l'induire [Buttke, 1994]. En ce qui concerne le NO, dont la synthèse par les chondrocytes au cours de l'arthrose est maintenant acquise, sa présence serait nécessaire mais non suffisante [Blanco, 1995]. Ainsi, la production de NO par les chondrocytes des couches superficielle et moyenne a été corrélée à une mort cellulaire par apoptose dans un modèle d'arthrose par section du ligament croisé chez le chien [Hashimoto, 1998b].

L'apoptose chondrocytaire au cours de l'arthrose permet de justifier une diminution de la densité cellulaire au sein du cartilage, ou encore le caractère irréversible de la maladie. A l'inverse, les chondrocytes des régions ostéophytiques retrouvent leurs capacités à proliférer, et synthétisent une matrice extracellulaire abondante. Le lien (s'il existe) entre ces deux réponses des chondrocytes, si différentes en fonction de leur localisation, pourrait peut-être permettre de mieux comprendre la physiopathologie de l'arthrose.

4. Les traitements de l'arthrose.

La prise en charge thérapeutique tardive des patients (manifestations symptomatiques de l'arthrose lors des phases tardives uniquement) offre peu de possibilité aux traitements chondromodulateurs de faire preuve d'un effet sur le cartilage. Les différents traitements sont avant tout symptomatiques. Cependant, des données expérimentales récentes ont montré que certains agents pharmacologiques ou certaines thérapies faisaient preuve de capacités chondromodulatrices.

4.1. Traitements symptomatiques de l'arthrose.

Certaines mesures consistent à adopter une hygiène de vie, pour diminuer limiter les contraintes biomécaniques sur la hanche, par l'utilisation d'une canne par exemple : la sollicitation moindre d'une articulation atteinte permet de soulager la douleur [Altman, 1998].

Un traitement de kinésithérapie permet de diminuer les douleurs et d'empêcher l'enraidissement articulaire pour maintenir au mieux la fonction articulaire et éviter l'installation de positions antalgiques progressivement irréversibles (flexion de hanche ou du genou). Enfin, les traitements médicamenteux, s'ils ne permettent pas de moduler le processus dégénératif du cartilage articulaire qui caractérise l'arthrose, contribuent dans la plupart des cas à soulager la douleur.

4.1.a. Anti-inflammatoires non stéroïdiens et antalgiques.

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont communément prescrits dans l'arthrose. Ce sont des inhibiteurs de COX-1 et/ou de COX-2. Ces enzymes catalysent la conversion de l'acide arachidonique en endopéroxydes, les précurseurs des prostaglandines. Les prostaglandines contribuent activement aux phénomènes inflammatoires [Vane, 1998] et douloureux.

De nombreuses études ont prouvé l'efficacité des AINS en tant que traitement symptomatique des rhumatismes articulaires. Certaines ont également montré des effets chondroprotecteurs de certains AINS [Ghosh, 1993], qui stimuleraient la synthèse des constituants du cartilage, ou encore inhiberaient leur dégradation. A l'inverse, d'autres travaux font état d'effets délétères des AINS sur le cartilage : ils aggraveraient l'inhibition de la synthèse des constituants du cartilage et conduiraient à l'augmentation de leur dégradation au cours de l'arthrose.

Les résultats des études cliniques n'apportent guère plus de précision quant à un effet bénéfique ou délétère des AINS sur le cartilage, dans le traitement de l'arthrose. Un effet propre délétère des AINS est difficile à établir : la disparition des douleurs s'accompagne en général d'une

sollicitation mécanique plus importante des articulations, qui contribue à une progression plus rapide de la pathologie. A l'inverse, il ne fait aucun doute des effets secondaires gastro-intestinaux fréquents consécutifs à la prise des AINS. Ces effets secondaires sont attribués à l'inhibition simultanée des deux isoformes, l'une constitutive et la seconde inducible, de la COX. Le développement actuel d'inhibiteurs préférentiels ou sélectifs de COX-2 permet d'envisager de nouvelles possibilités thérapeutiques, en minimisant les effets délétères à la fois sur le tractus gastro-intestinal et sur le cartilage, pour peu que les prostaglandines contribuent à l'homéostasie du cartilage.

Les antalgiques tels que le paracétamol présentent une efficacité similaire à celle des AINS dans le traitement symptomatique de l'arthrose [March, 1994]. Son mode d'action antalgique est jusqu'à présent mal connu. A forte dose, il inhibe la synthèse des prostanoïdes. Le paracétamol présente un rapport bénéfice-risque bien supérieur à celui des AINS, excepté dans le cas d'une insuffisance hépatique ou d'une insuffisance rénale.

4.1.b. Injections intra-articulaires de stéroïdes.

Les injections intra-articulaires de corticoïdes (infiltrations) sont préconisées lors des poussées inflammatoires. Les formes cristallines de corticoïdes constituent une administration à libération prolongée : les effets antalgiques peuvent atteindre plusieurs semaines [Derendorf, 1986]. Cependant, les effets des stéroïdes sur le cartilage restent eux aussi controversés. Chez le lapin, un traitement hebdomadaire pendant 4 à 9 semaines conduit à une dégénérescence du cartilage articulaire. A l'inverse, un traitement similaire a permis de réduire la progression des érosions et le développement des ostéophytes dans un modèle d'arthrose chez le cobaye et chez le chien [Williams, 1985; Pelletier, 1989]. Ces effets chondroprotecteurs des corticoïdes ont été attribués à une inhibition de la synthèse et de l'activation des métalloprotéases, et à une augmentation de la synthèse de leurs inhibiteurs naturels, les TIMP. Les corticoïdes permettraient également de réduire la sécrétion de l'AH par les cellules de la membrane synoviale, les synoviocytes, contribuant ainsi à diminuer l'épanchement synovial.

En clinique, excepté dans certains cas, deux administrations par voie intra-articulaire de corticostéroïdes, lorsqu'elles sont espacées d'au moins de 4 à 6 mois d'intervalle, ne semblent pas exercer d'effets délétères sur le cartilage [Brandt, 1996].

4.1.c. La capsaïcine.

La capsaïcine est un dérivé du poivre rouge. En application locale (pommades), la capsaïcine stimule la libération de SP et empêche son accumulation dans les terminaisons nerveuses. Initialement, le transport de la SP est bloqué, mais en traitement continu, la synthèse du neuropeptide est diminuée. Cependant, l'effet antalgique bénéfique de la capsaïcine n'est ressenti qu'après 3 à 4 semaines de traitement [Altman, 1994].

4.1.d. Le diméthylsulfoxyde.

Il présente des propriétés anti-inflammatoires, grâce à une activité de type superoxyde dismutase. Il est utilisé en application cutanée dans le traitement des arthroses inflammatoires [Heberhardt, 1995]. Il n'est cependant pas commercialisé en France.

4.2. Injections intra-articulaires d'acide hyaluronique.

L'injection intra-articulaire d'AH suit le concept de viscosupplémentation. L'acide hyaluronique a par ailleurs fait preuve de propriétés anti-inflammatoires [Ghosh, 1994]. Il inhibe la migration des cellules inflammatoires de façon dose-dépendante. L'AH est également très sensible aux radicaux libres, et il contribuerait ainsi à protéger les tissus de leurs effets néfastes. Il permettrait de moduler la synthèse des prostanoïdes, et de réduire la réponse inflammatoire. L'AH influencerait de cette façon la perception de la douleur, dans laquelle les prostaglandines interviennent. Enfin, l'AH serait capable de diminuer le rapport protéase/TIMP. Ces multiples propriétés de l'AH justifient l'intérêt qui lui est porté en tant qu'agent de viscosupplémentation, voire même chondromodulateur. Cependant, ni les études expérimentales [Ghosh, 1995; Smith, 1998], ni les études cliniques [Frizziero, 1998; Peyron, 1993 ; Dahlberg, 1994] s'accordent sur l'intérêt d'un tel traitement dans l'arthrose. Il est possible que les potentialités chondroprotectrices des différentes molécules d'AH dépendent de la taille ou de la structure de la molécule [Shimizu, 1998].

4.3. Les traitements dits chondroprotecteurs.

Plusieurs molécules ont été présentées comme possédant des propriétés chondroprotectrices, bien que leurs effets en clinique soient peu significatifs. C'est le cas des pentosanes sulfatés, des GAG polysulfatés, et de complexe GAG-peptide. Des interactions entre les cellules (synoviocytes et chondrocytes) et ces molécules polysulfatées contribueraient à stimuler la synthèse d'AH [Ghosh, 1996; McCarty, 1998]. L'apport exogène de chondroïtines sulfates conduit à une augmentation des concentrations en PG dans le cartilage, ainsi qu'à une diminution de l'activité catabolique [Uebelhart, 1998]. Il a même été montré que les chondroïtines sulfates protégeaient les chondrocytes d'une mort cellulaire par apoptose induite par les radicaux libres [Conrozier, 1998].

Les insaponifiables de soja ont présenté des propriétés similaires : ils stimuleraient la synthèse des constituants matriciels et permettraient de moduler leur dégradation. Ces effets ont été attribués à la fois à la stimulation de la synthèse du TGF β par les chondrocytes, ainsi qu'à l'augmentation de la synthèse du PAI-1, bloquant ainsi la cascade d'activation des MMP [Boumediene, 1999].

La diacérhéine serait un inhibiteur de la production ou des effets des cytokines, notamment de l'IL-1 β . Elle présenterait également des effets antalgiques, perceptibles après quelques semaines de traitement et persistant plusieurs mois, même après l'arrêt du traitement.

Des inhibiteurs de MMP, ou encore la superoxyde dismutase (SOD) sont proposés en tant que chondromodulateurs [Carney, 1993; Brewster, 1998]. Certaines cytokines, telles que l'IL-4 ou encore l'IL-10 présentent un certain intérêt puisque qu'elles sont susceptibles de moduler à la fois la synthèse de l'IL-1 β et du TNF α , et les effets de ces cytokines en stimulant la synthèse de l'IL-1Ra. Ce dernier a fait preuve d'effets chondroprotecteurs lorsqu'il est injecté par voie intra-articulaire [Caron, 1996], ou plus récemment, après vectorisation de son gène dans les synoviocytes, et qui a conduit à sa surexpression et une augmentation de la protéine dans l'articulation [Müller-Ladner, 1997]. Cependant, ces molécules n'ont pas encore d'application clinique en Rhumatologie.

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 nécessite le recours aux modèles expérimentaux chez l'animal.

1. Généralités.

En 1974, Bentley proposait différents critères pour définir un modèle d'arthrose expérimentale "idéale" :

- 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 PG 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 ont été développés. 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 dysrégulation du métabolisme chondrocytaire (tableau IV.1).

L'existence de tous 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 modèle d'arthrose par instabilité articulaire, sans la nécessité d'un geste opératoire [Van der Kraan, 1990] : l'action de la collagénase porte sur les structures constituées de collagène de type I, telles que les tendons, les ligaments et les ménisques, et provoque ainsi une instabilité articulaire. 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, démontre également la nécessité de préserver une matrice extracellulaire du cartilage intacte. L'organisation de ses constituants détermine la capacité du tissu à résister aux contraintes mécaniques, et la régulation du métabolisme chondrocytaire dépend également des interactions établies entre les cellules et les constituants matriciels. L'intégrité de la matrice cartilagineuse est étroitement liée au métabolisme chondrocytaire : l'injection intra-articulaire de mono-iodo-acétate, qui induit une dérégulation du métabolisme chondrocytaire, est un autre modèle d'arthrose expérimentale. Cet agent a la capacité d'inhiber certaines enzymes de la glycolyse [Kalbhen, 1985]. Les chondrocytes étant dépendent d'un métabolisme anaérobie, l'injection intra-articulaire de MIA provoque une diminution des taux d'ATP intracellulaires et une souffrance cellulaire, aboutissant au développement d'une arthrose.

Tableau IV.1. Arthroses expérimentales : classification physiopathologique des modèles proposés (modifiée d'après Arlet et Gédéon).

I- Arthroses mécaniques.

1. Instabilité ligamentaire (genou) :

- a. *injection intra-articulaire de collagénase bactérienne [van der Kraan, 1990];*
- b. *section du ligament croisé antérieur [Pond, 1973];*
- c. section du ligament latéral interne [Shoji, 1978];
- d. section du ligament croisé antérieur, du ligament latéral interne et ménisectomie [Hulth, 1970].

2. Désaxation : ostéotomie de valgisation du tibia [Reimann, 1973].

3. Incongruence :

- a. Résection méniscale (genou) [Moskowitz, 1973];
- b. luxation permanente de la rotule [Bennet, 1937].

4. Hyperpression :

- a. compression élastique (conservation du mouvement) [Gritzka, 1973];
- b. compression permanente [Salter, 1960].

5. Immobilisation (plâtre, attelle) [Thaxter, 1965].

II- Arthroses structurales.

1. Traumatismes :

- a. fracture articulaire [Haldeman, 1938];
- b. contusion du cartilage condylien [Shands, 1931] ou rotulien [Gédéon, 1978].

2. Action enzymatique :

- a. *injection intra-articulaire de papaïne [Murray, 1964], d'un fragment de la fibronectine [Homandberg, 1993];*
- b; injection d'un homogénat acellulaire de foie ou de cartilage autologue [Caruso, 1968].

3. Induction enzymatique : injection intra-articulaire de vitamine A [Boni, 1969].

4. Modulation du métabolisme chondrocytaire :

- a. injection intra-articulaire de corticostéroïdes [Salter, 1967],
- b. d'anti-inflammatoire non cortisoniques,
- c. *de mono-iodo-acétate [Kalbhen, 1974].*

5. Ischémie :

- a. injection de particules de carbone ou de thrombine [Rutishauser, 1966];
 - b. destruction des vaisseaux rotuliens [Zahir, 1972].
-

B. Etude expérimentale

Matériel et méthodes

Chapitre V

Matériel et méthodes

Seul le principe des différentes méthodes utilisées est décrit ici. La préparation des différentes solutions nécessaires a fait l'objet d'une annexe à la fin de ce chapitre.

1. Animaux.

Toutes les études ont été réalisées chez le rat Wistar mâle (150 - 225 g, *Charles River*, Saint-Aubin-lès-Elbœuf, France). Ils sont stabulés dans une animalerie thermorégulée ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) 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 en plastique, avec 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 2 à 7 jours. Les rats sont répartis par groupes de 5 (études biochimiques) à 6-10 (études télémétriques) pour permettre une analyse statistique de chacune des études.

Tous les rats sont sacrifiés selon la même procédure : après une anesthésie par injection intrapéritonéale d'un mélange d'hydrochlorure de kétamine (50 mg/kg) et d'acépromazine (1,25 mg/kg), ils subissent une élongation cervicale.

2. Section du ligament croisé antérieur chez le rat.

Les rats sont anesthésiés par un mélange d'hydrochlorure de kétamine 50 mg/kg-acépromazine 1,25 mg/kg injecté par voie péritonéale. Une incision est réalisée le long de la rotule et une luxation patellaire est pratiquée de façon à atteindre le ligament croisé antérieur (LCA) à l'aide d'un crochet dont la courbure est tranchante. Le ligament du genou droit est sectionné, puis les muscles et la peau sont suturés par plans successifs. Le genou gauche est opéré de la même façon, le crochet est ensuite enfoncé dans la cavité articulaire sans créer de lésion ligamentaire (arthrotomie).

Chez les rats témoins, seul le genou droit est opéré, sans induire de lésions ligamentaires (arthrotomie).

3. Injection intra-articulaire infra-patellaire chez le rat.

Le genou constitue une articulation de choix pour l'étude de pathologies articulaires expérimentales chez le rat. C'est une des articulations les plus volumineuses et la plus facilement accessible, dans laquelle la rotule constitue une entité anatomique à part entière, qui est aisément prélevée.

Le choix des différents modèles d'arthroses induites par l'injection intra-articulaire d'une substance a été déterminé selon leur appartenance aux différentes catégories de modèles (arthrose métabolique, structurale, ou mécanique), et par les travaux de Van der Kraan [1992] chez la souris : le premier consiste à injecter une solution de mono-iodo-acétate [Kalbhen, 1977, 1979; Bohanon, 1991] (MIA, *Merck-Clévenot*, Nogent sur Marne, France). Les deux autres substances injectées par voie intra-articulaire sont deux enzymes, soit la papaïne [Murray, 1964; Bentley, 1971], soit une collagénase bactérienne [Van der Kraan, 1989] (*Sigma*, Saint Quentin Fallavier, France; tableau V.1). Toutes les solutions sont filtrées avant d'être injectées. Selon les études, les rats ont été sacrifiés entre 1 jour (J1) et 60 jours (J60) après l'injection.

Tableau V.1. Composition des solutions injectées par voie infra-patellaire chez le rat.

	Excipient (50 µl)	Quantité
MIA	Sérum physiologique	3 à 0,01 mg
Collagénase <i>Clostridium histolyticum</i> (type IV, 540U/mg)		0,3 mg
Papaïne (17 U/mg)	HCl 0,03M / L-cystéine 0,09 M (<i>Sigma</i>)	1 mg

4. Télémétrie.

La télémétrie (de type *Mini-Mitter*, Sunriver, Orégon, USA) fonctionne sur le principe d'un émetteur-récepteur, et permet l'enregistrement en continu de la mobilité spontanée et de la température des rats, sans aucune intervention. Elle nécessite une animalerie spécialement aménagée (cages, antennes réceptrices, matrices de consolidation et système informatique recueillant et stockant les données), thermorégulée et dont l'air est renouvelé. Les phases diurnes et nocturnes de 12 h chacune alternent régulièrement. Les rats disposent d'une nourriture standardisée et d'eau à volonté.

Au cours d'une opération sous anesthésie générale (hydrochlorure de kétamine 50 mg/kg-acépromazine 1,25 mg/kg), les émetteurs (de type VM-HF, *Mini-Mitter*, système d'analyse Data Quest 3) sont implantés dans la cavité abdominale des rats [Scales, 1987; Pottie, 1999]. Chaque animal est ensuite placé dans une cage individuelle, posée sur une plaque réceptrice. Le déplacement de l'animal (et donc de l'émetteur) est capté par l'antenne : une unité de déplacement est alors convertie en une impulsion électrique, aussitôt enregistrée. La somme de ces impulsions rend compte de l'activité spontanée du rat au cours d'une période considérée.

La mesure de la température dépend de la fréquence d'émission de l'émetteur (500 à 1000 Hz). Elle nécessite le calibrage préalable de chaque émetteur à deux températures seuil (35 °C et 39 °C).

La fièvre et la perte de mobilité des rats consécutives à l'opération nécessitent une période de rétablissement de 4 à 5 jours : les différents paramètres (activité spontanée et température corporelle) sont alors reproductibles d'une phase (diurne ou nocturne) à l'autre [Gégout, 1999].

5. Etudes morphologiques.

Une étude macroscopique (état de surface du cartilage) ou une étude histologique (hématoxyline-éosine-safran (HES), safranine O-Fast Green) ont été réalisées sur les différents compartiments articulaires du genou du rat (rotule, gouttière inter-condylienne, condyles fémoraux et plateaux tibiaux). Des scores ont été établis, inspirés de ceux de Mankin, pour grader l'atteinte articulaire (tableau V.2). Ces études n'ont pas été systématiques.

5.1. Etude macroscopique.

L'articulation du genou est finement disséquée : les ligaments sont sectionnés pour séparer les différentes pièces anatomiques (fémur, tibia-péroné, rotule). Les ménisques sont ôtés et les différentes surfaces articulaires (rotule, gouttière intercondylienne, condyles fémoraux et plateaux tibiaux) sont photographiées.

5.2. Etude histologique.

L'articulation du genou est prélevée puis les tissus sont fixés dans un tampon phosphate 85 mM-formol 10 % v/v (pH 7,4) pendant 48 h. Les échantillons sont ensuite décalcifiés ("Rapide Decalcifiant Osseux", *Eurobio*, Les Ulis, France; 12 h) et déshydratés dans des bains d'alcool de concentration croissante (50° à 100°) puis dans le toluène. Les genoux sont inclus dans la paraffine et des coupes de 5 µm sont réalisées. Elles sont déparaffinées et réhydratées avant la coloration.

dans la paraffine et des coupes de 5 µm sont réalisées. Elles sont déparaffinées et réhydratées avant la coloration.

Tableau V.2. Gradation des lésions de surface du cartilage des différents compartiments articulaires du genou du rat

a. Score macroscopique.

Score	Aspect de la surface articulaire
0 =	surface "normale"
1 =	décoloration du cartilage
2 =	érosions du cartilage dans les zones portantes
3 =	érosions du cartilage atteignant l'os sous-chondral
4 =	mise à nu importante de l'os sous-chondral

b. Score histologique.

I. Structure (surface).		III. Coloration au Bleu de Toluidine.	
Normale.	0	Homogène et intense (normale).	0
Surface irrégulière, avec pannus/fibrose.	1 2	Décoloration de la couche superficielle, jusqu'à la zone moyenne.	1 2
Fissures jusqu'à la zone de transition, la zone radiale, la zone calcifiée.	3 4 5		
II. Cellules (répartition).		IV. Epaisseur de la couche de chondrocytes hypertrophiques.	
Normale.	0		
Hypercellularité diffuse.	1	Normale.	0
Hypocellularité.	2	Modérée.	1
		Réduite.	2

5.2.a. Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran.

L'HES est une coloration standard, qui permet tout aussi bien de visualiser les cellules que les constituants matriciels :

- l'hématoxyline colore les noyaux des cellules en bleu foncé,
- l'éosine se fixe sur les éléments acidophiles et leur confère une coloration rose (cytoplasme, fibres nerveuses, fibres élastiques et musculaires),
- le safran se fixe sur les collagènes et sur certaines protéines telles que l'osséine ou la chondrine (coloration jaune).

5.2.b. Coloration bleu de Toluidine.

Le bleu de Toluidine est une coloration métachromatique permettant de mettre en évidence la présence de GAG carboxylés, sulfatés ou phosphatés.

5.2.c. Coloration Safranine O-Fast Green.

La Safranine O est une coloration spécifique des PG, pour laquelle une relation entre l'intensité de la coloration et la concentration en GAG sulfatés dans le cartilage articulaire a été mise en évidence [Van der Kraan, 1994]. Le Fast Green est une coloration bleu turquoise spécifique des collagènes.

6. Dosages biochimiques.

Toutes les études biochimiques ont été réalisées sur le cartilage patellaire. Trois aspects ont été abordés :

- le contenu du cartilage patellaire en collagènes et PG,
- la synthèse des PG,
- et leur dégradation.

6.1. Dosage colorimétrique des GAG sulfatés.

Ce dosage colorimétrique est basé sur la formation d'un complexe entre les GAG sulfatés et un colorant, le bleu de diméthyl-méthylène (DMB, *Sigma*). Nous avons appliqué une méthode de dosage en microplaque adaptée de celles de Farndale [1986] et de Goldberg [1989].

Ce dosage a été appliqué à la fois sur le cartilage patellaire et sur des milieux de cultures, après l'incubation de rotules pendant 24 h (RPMI 1640 HEPES-HCO₃ supplémenté en L-glutamine 2 mM, streptomycine 100 µg/ml, et pénicilline 100 UI/ml, ; *Gibco*, Cergy Pontoise, France). Ce dosage, appliqué au cartilage patellaire, rend compte de son contenu en GAG sulfatés. Le dosage des GAG sulfatés dans un milieu de culture libérés par les rotules est un indice de la dégradation des constituants du cartilage. En fonction du type d'échantillon, les conditions de dosage sont différentes. C'est la raison pour laquelle seul le principe du dosage est décrit.

Les rotules ont été préalablement décalcifiées dans une solution d'acide formique (5 %, v/v) pour permettre une biopsie centropatellaire (2 mm de diamètre, *Stiefel*, Strasbourg, France), et ainsi distinguer le centre (zones portantes) et la périphérie (zones non portantes) des rotules. Le cartilage est ensuite séparé de l'os sous-jacent.

De façon à solubiliser les tissus et éliminer les interactions non spécifiques du colorant avec les protéines, les échantillons (milieu de culture, cartilage patellaire) sont soumis à une digestion à la papaïne¹ (17 U/mg, *Sigma*). La digestion est arrêtée et le volume des échantillons de cartilage digéré est ensuite ajusté avec un tampon Tris/HCl (50 mM, pH 8). La formation d'un complexe rose-violet entre les GAG sulfatés et le réactif coloré² est appelé métachromasie ($\text{Volume}_{\text{échantillon}}/\text{Volume}_{\text{réactif}} = 2/25 \text{ à } 3/25$, en fonction du type d'échantillon). La lecture de la densité optique (DO) à 525 nm doit être rapide, avant la précipitation du complexe.

6.2. Synthèse des protéoglycanes.

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

Nous avons adapté une méthode développée par Van den Berg [1982] sur des rotules de souris pour apprécier la synthèse des PG dans le cartilage patellaire chez le rat. Elle consiste à mettre en culture les explants dans un milieu (RPMI 1640 HEPES- HCO_3 , *Gibco*; 3 h, 37°C, 5 % CO_2) supplémenté en L-glutamine (2 mM, *Gibco*), en antibiotiques (streptomycine 100 µg/ml, pénicilline 100 UI/ml, *Gibco*) et en $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (0,7 µci/ml; *Dupont-Nemours*, ville, France). Plusieurs lavages (sérum physiologique, chlorure de cétypyridine³) permettent d'éliminer le $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ non incorporé, puis la décalcification des rotules (acide formique 5 %, v/v) de réaliser une biopsie centropatellaire (2 mm de diamètre, *Stiefel*). Les échantillons sont solubilisés (Soluène-350, *Packard*, Rungis, France; 0,5 ml) et le ^{35}S incorporé est compté dans un compteur β après l'ajout d'un liquide scintillant (Hionic-Fluor, *Packard*; 4,5 ml) [Gégout, 1994; Guingamp, 1997].

7. Mise en évidence de la dégradation de l'agrécan par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).

Le cartilage patellaire est coupé finement au scalpel, puis les PG sont extraits dans une solution de chlorure de guanidine contenant des inhibiteurs de protéases⁴ (24 h, 4 °C). Les protéoglycanes sont précipité avec une solution d'éthanol (100°, 3 volumes), puis resolubilisés dans un tampon Tris/HCl (100 mM, pH 8) contenant les inhibiteurs de protéases. Les GAG sulfatés sont dosés avant une digestion par la chondroïtinase ABC et la kératanase (*Sigma*; 0,25 U et 0,5 U/ mg de GAG sulfatés respectivement).

La migration dans un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE, 8 cm x 8 cm x 1,5 mm) est réalisée dans un gel de séparation à 6 % (p/v)⁵, surmonté d'un gel de concentration à 3 %⁶. L'échantillon, constitué par l'équivalent de 20 µg de GAG sulfatés auxquels ont été ajoutés un volume de tampon Laemmli (*Sigma*), est porté à ébullition puis déposé. La migration est réalisée pendant 90 min à 30 mA constant, jusqu'à la sortie du front. Les protéines sont révélées par une coloration argentique (Silver Stain Plus, *Biorad*, Ivry-sur-Seine, France).

8. Etude de l'expression des ARNm des gènes codant pour l'interleukine-1 β , bax et Bcl-2.

8.1. Extraction des ARN totaux du cartilage, transcription inverse (RT) et réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Les rotules sont préalablement décalcifiées dans une solution d'acide tétra-acétique éthylène diamine (EDTA, 5 %, p/v; *Gibco*) et le cartilage est séparé de l'os sous-jacent. Les cartilages patellaires des rats de chaque groupe sont rassemblés puis broyés.

Des essais préliminaires pour extraire les ARN totaux d'après la méthode de Chomczynski et Sacchi [1987] dans une solution Trizol (*Gibco*)/chloroforme (10 %), conduisent à la coprécipitation des PG. Cette méthode a été combinée à une purification supplémentaire des ARN totaux sur une membrane de silice (RNeasy Total RNA Kit, *Qiagen*, Courtabœuf, France) [Re, 1995].

La concentration en ARN totaux est ensuite déterminée par la lecture de la DO à 260 nm, et les rapport DO260nm/DO280nm sont calculés. Les échantillons d'ARN sont conservés à -80 °C.

Tableau V.3. Conditions de PCR pour l'étude de l'expression des ARNm des gènes codant pour la G3PDH, bax, Bcl-2 et l'IL-1 β dans le cartilage patellaire.

	Amorces		Temperature d'annealing	Nbre de cycles
	"Forward"	"Reverse"		
GPDH	5'ACGGATTTGGCCGTATTGGCCGC3'	5'ATCCTGGGCTACACTGAGGACCA3'	60 °C	30
bax	5'GGGCCCACCAGCTCTGAACA3'	5'CACTGTCTGCCATGTGGGGG3'		35
Bcl-2	5'CAGAGGGGCTACGAGTGGGAT3'	5'GCGATGTTGTCCACCAGGGGT3'		
IL-1 β	5'CCAAGCCCTTGACCTGGGCTGT3'	5'GGAAGACACGGGTTCATGGTG3'	57.5 °C	40

Après la dénaturation des ARN totaux (1 µg, 70 °C, 5 min), la synthèse du brin d'ADN complémentaire (ADNc) est réalisée dans le tampon RT (50 µl, *Gibco*), en présence d'amorces poly-dT (20 µM, *Eurogentec*, Seraing, Belgique), par la transcriptase inverse (200 U, Superscript™ RNase H⁻ Reverse Transcriptase, *Gibco*) pendant 2 h à 42 °C.

Les ADNc des gènes codant pour l'IL-1β, bax et Bcl-2 sont amplifiés par PCR sur un thermocycler GENE E (*Techne, OSI*, Maurepas, France). Les conditions de PCR pour chacun de ces marqueurs ont été préalablement optimisées (tableau V.3). Cinq microlitres des échantillons d'ADNc sont ajoutés à un tampon PCR de type Tris/HCl (*Gibco*; pour la G3PDH, bax et Bcl-2) ou à un tampon ammonium quaternaire (*Qiagen*, pour l'IL-1β), contenant les amorces "forward" et "reverse", et les dNTP (0,2 mM pour chacun des dNTP). Les échantillons sont dénaturés pendant 5 min à 94 °C, puis la PCR est initiée par l'ajout de la Taq polymérase (2,5 U; *Gibco*) à 80 °C. Chaque cycle d'amplification comprend une étape de dénaturation (94 °C, 1 min), une étape d'hybridation de l'amorce (1 min) et une élongation (72 °C, 1 min). La PCR se termine par une étape supplémentaire d'élongation de 10 min (72 °C).

8.2. Synthèse et biotinylation des sondes.

Les sondes sont synthétisées par RT-PCR. Après migration dans un gel d'agarose 1 % p/v (*Gibco*, tampon Tris-borate-EDTA⁷) et solubilisation du gel, les produits de PCR sont purifiés (Quiaquick Gel Extraction Kit, *Qiagen*). Les ADNc sont clonés dans un plasmide (pCR 2.1, 50 ng, Original TA Cloning Kit, *Invitrogen*, Leek, Pays-Bas). La transformation de bactéries *E coli* compétentes ('TOP10F', Ultracompt™ *E coli* cells, *Invitrogen*; "heat shock" pendant 30 s à 42 °C) est optimisée par une incubation préalable des bactéries en présence de β-mercaptoéthanol (25 mM). Après 24 h en culture sur un milieu LB Agar (*Sigma*; ampicilline 100 µg/ml, *Sigma*; X-Gal 0,5 mM, IPTG 5 %, *Eurobio*), les colonies positives sont sélectionnées pour une "midi-préparation" en milieu LB (*Sigma*; 50 ml, 37 °C, pendant 12 h). Les cellules sont ensuite lysées et les plasmides récupérés sur une colonne échangeuse d'anions (*Qiagen Plasmid, Qiagen*). La sonde est extraite du plasmide par des enzymes de restriction (*EcoRI* et *Hind III*, *Gibco*) puis purifiée. Les sondes sont ensuite biotinylées (Bioprime DNA labelling System, *Gibco*).

8.3. Southern blot.

Après migration dans un gel d'agarose 1 %, les produits de PCR sont transférés sur une membrane de nylon (Hybon-N+, *Amersham*, Les Ulis, France) en conditions alcalines (NaOH 0,4 N). L'hybridation en présence des sondes appropriées se déroule pendant 12 h, dans un tampon d'hybridation⁸ à 65 °C (G3PDH, bax) ou 60 °C (Bcl-2, IL-1β). Plusieurs lavages⁹

précèdent une incubation dans un tampon PBS (10 mM, sans calcium ni magnésium) en présence du conjugué streptavidine-phosphatase alcaline, qui réagit avec un substrat luminescent (SuperSignal Substrate Western Blotting, *Interchim*, Montluçon, France). La révélation des bandes est réalisée sur des film X-OMAT (*Polylabo*, Strasbourg, France). Les films sont scannés puis les résultats traités sur NIH image.

9. Mise en évidence des chondrocytes apoptotiques.

Deux méthodes ont été utilisées. La première est une méthode TUNEL ("terminal nucleotidyl transferase [TdT]-mediated desoxyuridinetriphosphate [UTP] nick-end labeling) pour déceler la fragmentation de l'ADN dans les noyaux. Cette méthode a été appliquée sur des coupes longitudinales de rotules de rats. Les rotules ont préalablement été fixées dans une solution de paraformaldéhyde (4 %), puis décalcifiées (EDTA 10 %) et deshydratées avant l'inclusion dans la paraffine. Les coupes de 5 µm ont été successivement déparaffinages, réhydratées, avant le marquage des extrémités de l'ADN fragmenté : les coupes ont été préalablement digérées avec la protéinase K puis elles ont été incubées pendant 60 min à 37°C dans la solution de marquage (Boehringer Mannheim). Un contre-marquage est réalisé à l'iodure de propidium, et les coupes sont rapidement observées sous microscope en lumière fluorescente.

La deuxième méthode est la cytométrie de flux. Le cartilage des condyles fémoraux et des plateaux tibiaux est prélevé dans des conditions stériles. Les chondrocytes sont isolés grâce à une double digestion à la pronase (2 mg/ml, 4 h, 37°C; Sigma) puis à la collagénase (1,5 mg/ml, 15 h, 37°C, Sigma). Les cellules sont récupérées après une centrifugation et resuspendues dans une solution d'iodure de propidium. Les cellules sont aussitôt passées dans le cytomètre (XL, Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA).

Ces deux méthodes ont été appliquées sur des rotules (méthode TUNEL; n = 3 par temps) et sur les chondrocytes du compartiment fémoro-tibial (cytométrie de flux, n = 2 par temps) saines 2 et 10 jours après une injection intra-articulaire de 0,03 mg de MIA dans les genoux des rats.

Annexe

Composition des solutions utilisées

I. Dosage colorimétrique des GAG sulfatés.

1 Digestion des échantillons par la papaïne.

Elle est optimale dans un tampon phosphate 2 mM (pH 8), contenant de l'EDTA (1 mM, *Sigma*), et du dithiotréitol (2 mM, *Sigma*), un activateur de la papaïne. L'enzyme est utilisée à une concentration de 0,3 mg/ml (*Sigma*, 17 U/mg). La digestion est arrêtée par neutralisation des groupements thiols par le MIA (220 mM, 10 µl, *Merk-Clévenot*).

2 Réactif coloré.

Dissoudre 32 mg de DMB (*Sigma*) dans 5 ml d'éthanol, et ajusté à 1 l avec un tampon formate de sodium (4 g)-acide formique (4 ml, QSP 1 l), pH 3.

II. Synthèse des protéoglycanes.

5 Solution de chlorure de cétylpyridine (CPC)/formol.

0,4 g de CPC (*Sigma*) dissous dans 10 ml de formol (*Surgipath, Labonord, Villeneuve d'Ascq, France*) + 70 ml d'eau distillée.

III. Mise en évidence de la dégradation de l'agrécan par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).

6 Solution d'extraction des protéoglycanes.

acétate de sodium 50 mM + chlorure de guanidine 4 M + phénylméthylsulfonylfluoride 5 mM + acide-6-amino-hexanoïque 100 mM + N-éthylmaléimide 10 mM + éthylène diamine tétra-acétique 10 mM + hydrochloride de benzamidine 5 mM (*Sigma*).

7 Gel de séparation.

6,1 ml d'eau stérile + 1,2 ml Gel Prosieve (*FMC, revendu par Tébu*) + 2,5 ml de tampon Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8) + 0,1 ml SDS 10 % (p/v) + 0,1 ml de persulfate d'ammonium 10 % (p/v, *Sigma*) + 4 µl de tétra-éthylméthylène diamine (*TEMED, Sigma*).

⁸Gel de concentration.

3,95 ml d'eau stérile + 0,3 ml Gel Prosieve (*Tébu*) + 0,65 ml tampon Tris-HCl (1 M, pH 6,8), 50 µl SDS 10 % (p/v, *Sigma*) + 50 µl de persulfate d'ammonium 10 % (p/v, *Sigma*) + 5 µl de TEMED (*Sigma*)

Tampon d'électrophorèse (Tris-glycine-SDS).

Tris 25 mM + glycine 0,1 M, SDS 0,1 % p/v (*Sigma*).

IV. Synthèse et biotinylation des sondes.

⁹ Tampon Tris-borate-EDTA (10x).

108 g Tris base + 55 g acide borique + 40 ml EDTA 0,5 M, QSP 1 l d'eau ultra-pure (*Sigma*).

V. Southern blot.

¹⁰ Tampon d'hybridation.

tampon SSC 2x supplémenté avec "Liquid Block Solution" (10 %, v/v), SDS (0,5 % p/v; *Sigma*) et dextran sulfate (5 %, *Sigma*).

Tampon SSC 20x (pH 7) = NaCl 3M + citrate trisodique dihydraté 0,3 M (*Sigma*).

Une incubation de chaque membrane dans un tampon de préhybridation, identique au tampon d'hybridation (mais ne contenant pas les sondes biotinylées, 1 h, 60 ou 65 °C selon les marqueurs) précède l'hybridation.

¹¹ Solutions de lavages.

a. Tampon SSC à une concentration finale de 2x, 1x, puis 0.1x + SDS (0.1 % p/v); 2x30 min chacun.

b. Tampon phosphate 10 mM pH 7,4 (sans calcium ni magnésium) + Liquid Block Solution (10 %, v/v; 1 x 1 h).

Etude expérimentale

Résultats et discussion

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. Cependant, ces modèles d'arthrose sont plus rarement exploités. Une des raisons pourrait être 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.

En raison du grand nombre de modèles d'arthrose expérimentale induite, il est difficile d'en privilégier un en particulier. Nous avons ainsi porté notre choix sur plusieurs modèles reconnus (injections intra-articulaires de MIA, de papaïne, ou de collagénase, section du ligament croisé antérieur) qui pourraient représenter différentes étiologies de l'arthrose (anomalies du métabolisme chondrocytaire, atteinte de la matrice cartilagineuse, ou instabilité articulaire respectivement). Ces modèles, que nous avons développés chez le rat, ont été comparés selon différents paramètres. Le principal critère retenu a été la survenue d'un handicap locomoteur qui puisse rendre compte d'une atteinte sévère du cartilage articulaire : ce modèle reproduirait alors les symptômes cliniques majeurs d'une arthrose.

Ces critères (lésions du cartilage, survenue d'un handicap) nous ont conduit à privilégier l'arthrose expérimentale induite par l'injection intra-articulaire de MIA dans le genou, chez le rat. Trois aspects ont alors été abordés :

- la capacité de méthodes d'imagerie à déceler une atteinte précoce du cartilage,
- la capacité de différents traitements à moduler la douleur articulaire chez le rat,
- une approche de la physiopathologie de l'arthrose dans ce modèle.

Chapitre VI

Sélection d'un modèle d'arthrose développé chez le rat

Parmi les différents modèles que nous avons développés chez le rat, la survenue d'une arthrose à la suite de l'injection par voie intra-articulaire d'une solution de MIA a été attribuée à une souffrance chondrocytaire provoquée par l'inhibition de certaines enzymes de la glycolyse. L'injection intra-articulaire de papaïne, une enzyme protéolytique qui dégrade les constituants de la matrice extra-cellulaire, conduit à une altération des propriétés du cartilage. L'injection intra-articulaire d'une collagénase bactérienne spécifique du collagène de type I, entraîne une hyperlaxité ligamentaire : elle conduit, comme dans le cas de la section du ligament croisé antérieur, à une instabilité articulaire.

Les deux principaux paramètres que nous avons retenus pour déterminer la pertinence de ces modèles ont été l'apparition de lésions du cartilage reproduisant celles de la pathologie humaine (étude macroscopique parfois complétée d'une étude histologique), ainsi que la survenue d'un handicap locomoteur (mesure de la mobilité spontanée du rat par la biotélémétrie), qui constitue le symptôme majeur de la pathologie humaine. Ces différents modèles ont également été caractérisés sur le plan de la biochimie du cartilage selon trois critères :

- la synthèse des PG, mesurée par l'incorporation *ex vivo* de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ dans le cartilage patellaire;
- la dégradation des PG évaluée par le dosage colorimétrique des GAG sulfatés libérés par des rotules en culture,
- ou le contenu du cartilage patellaire en GAG sulfatés.

1. Injection intra-articulaire de MIA chez le rat.

1.1. Etude de la mobilité spontanée du rat.

La télémétrie permet un enregistrement continu de la mobilité des rats et de leur température, sans l'intervention d'un observateur. Elle fonctionne sur le principe d'un émetteur placé dans la cavité péritonéale du rat au cours d'une intervention chirurgicale sous anesthésie générale, et d'un récepteur placé sous la cage du rat. Une période de rétablissement d'une durée de 5 jours avant le

début de l'expérimentation est nécessaire pour que les rats présentent un cycle nycthéral reproductible d'un jour à l'autre.

L'injection de sérum physiologique (50 μ l) par voie intra-articulaire dans les genoux des rats (rats témoins) ne provoque aucune variation de leur activité spontanée : la diminution progressive de la mobilité spontanée des rats entre J21 et J30 est attribuée à une diminution de leur espace vital dans les cages en raison d'une augmentation pondérale.

Par contre, l'injection intra-articulaire de MIA (0,3 mg, J1) conduit aussitôt à une hypomobilité qui s'installe de façon brutale (J1, -54 %) et transitoire : dès J3, les rats ont une activité spontanée comparable à celle des témoins (figure VI.1).

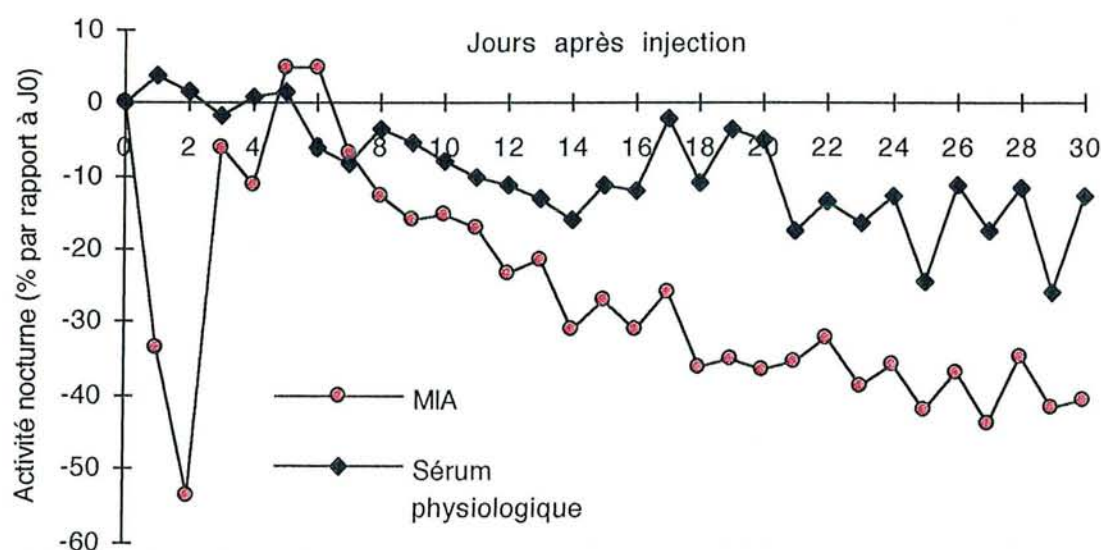


Figure VI.1. Mesure de la mobilité spontanée du rat par télémétrie (n=12 rats par groupe), après une injection intra-articulaire dans chaque genou de sérum physiologique (50 μ l, témoins), ou de MIA (0,3 mg/50 μ l).

La télémétrie permet de mettre en évidence une seconde phase d'hypomobilité chez les rats qui ont reçu une injection intra-articulaire de MIA. Le profil de ce handicap diffère du premier : son installation est cette fois progressive, et il est irréversible jusqu'à J30. Ce handicap représente une perte de mobilité significative de -30 % à -15 % par rapport aux rats témoins (J19 et J29 respectivement).

L'hypomobilité précoce (J1 à J2) induite chez le rat par l'injection de MIA s'accompagne d'un phénomène fébrile très modérée visible au cours de la phase diurne suivante (J2; figure VI.2). Aucune variation de la température des animaux n'a été décelée au cours de l'installation du second handicap locomoteur (J14 à J30).

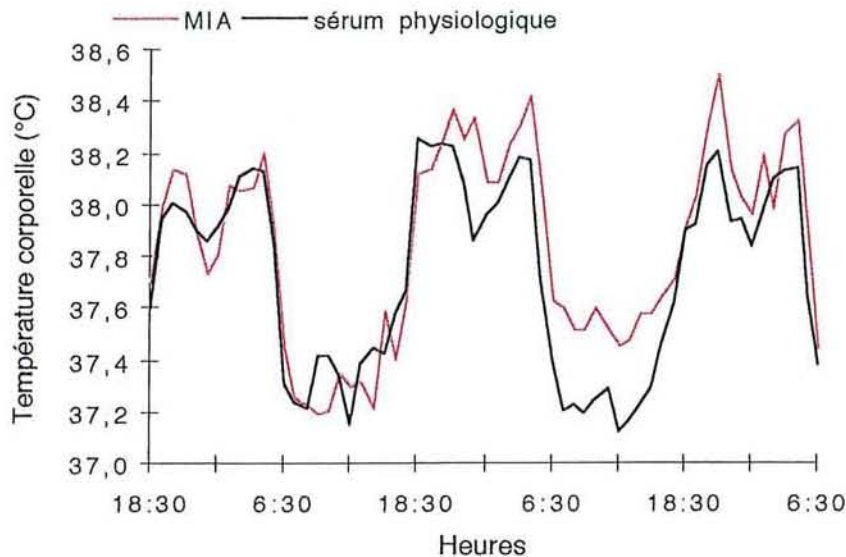


Figure VI.2. Mesure de la température corporelle du rat par télémetrie (n=12 rats par groupe), après à une injection intra-articulaire dans chaque genou de sérum physiologique (50 μ l, témoins), ou de MIA (0,3 mg/50 μ l).

1.2. Etude macroscopique de la rotule à la suite de l'injection infra-patellaire de MIA chez le rat.

L'injection de MIA conduit dès J10 à des lésions caractérisées par un aspect translucide du cartilage patellaire et par l'hypertrophie discrète des bords de la rotule. A J40, l'os sous-chondral de la rotule n'est plus recouvert que d'une fine couche de cartilage, et des ostéophytes volumineux se sont développés dans les régions non portantes (figure VI.3).

(a)



(b)



Figure VI.3. Observation macroscopique d'une rotule d'un rat 40 jours après l'injection infra-patellaire de sérum physiologique (a) ou de MIA (0,3 mg; b). Noter des érosions dans le centre de la rotule, et des ostéophytes volumineux dans les régions non portantes.

L'atteinte du cartilage du compartiment fémoro-tibial est plus sévère : l'os sous-chondral est mis à nu dans les régions portantes, et des ostéophytes volumineux sont visibles, notamment sur les bords de la gouttière intercondylienne.

1.3. Variations de la synthèse des PG consécutives à l'injection de MIA.

La synthèse des PG est mesurée par l'incorporation *ex vivo* de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (3 h, 37 °C, 5 % CO_2) dans le cartilage patellaire. Une biopsie centropatellaire permet de distinguer la synthèse des PG par les chondrocytes du cartilage du centre et de la périphérie de la rotule. Les résultats obtenus à la suite des injections infra-patellaires de MIA, de papaïne ou encore de collagénase bactérienne dans le genou du rat sont comparés à ceux d'un cartilage sain (injection intra-articulaire de sérum physiologique; pourcentages de variation).

L'injection intra-articulaire de MIA dans le genou du rat conduit à des perturbations de la synthèse des PG, dont la cinétique est très différente entre le cartilage centropatellaire et le cartilage péripatellaire (figure VI.4).

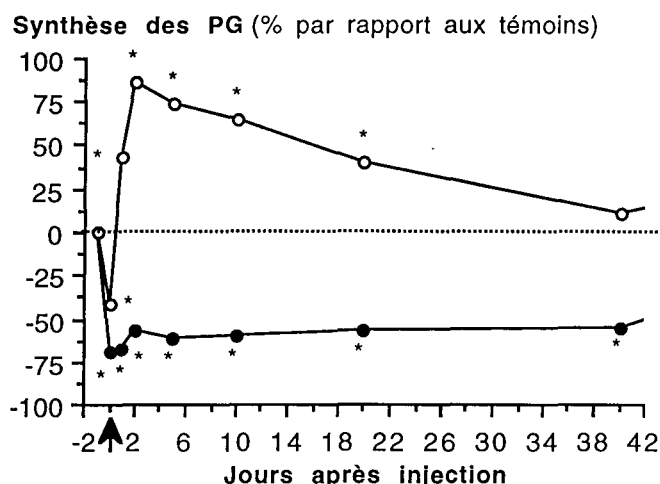


Figure VI.4. Effets d'une injection intra-articulaire de MIA (0,3 mg/50 μl) dans le genou chez le rat sur la synthèse des PG dans le cartilage patellaire. La synthèse des PG est évaluée par incorporation *ex vivo* de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (3h, 37°C, 5% CO_2). Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation des dpm par rapport à l'incorporation obtenue dans des rotules de rats témoins (injection intra-articulaire de sérum physiologique, 50 μl). Cercle plein = cartilage centropatellaire (n=5), cercle vide = cartilage péripatellaire (n=5). * = p<0,05, ANOVA suivi d'un test t de Student.

Dans le centre de la rotule, l'anabolisme est inhibé dès J0 et jusqu'à J40, de -70 à -32 % respectivement (p<0,05), par rapport à des rats témoins (injection intra-articulaire de sérum physiologique). Dans le cartilage péripatellaire, l'injection de MIA induit aussitôt une diminution de la synthèse des PG (J0, -42 %, p<0,05). Cependant, dès J1, l'incorporation de ^{35}S est stimulée (+90 % à J2 par rapport aux témoins). Elle diminue ensuite progressivement (+42 % à J20, p<0,05) et atteint des niveaux comparables à ceux de rotules de rats témoins à J40.

1.4. Modulation de la dégradation des PG induite par l'injection de MIA.

La dégradation des PG dans cartilage patellaire est estimée par le dosage des GAG sulfatés libérés par des rotules en culture (24 h, 5 % CO₂). Les résultats obtenus à la suite des injections intra-articulaires de MIA, de papaïne ou de collagénase bactérienne, sont exprimés en quantité de GAG sulfatés libérés (µg) rapportée au poids du cartilage patellaire (mg), puis comparés aux concentrations obtenues par des rotules de rats témoins (injection intra-articulaire de sérum physiologique; pourcentages de variation).

La dégradation des PG à la suite de l'injection intra-articulaire de MIA (0,3 mg/50µl; figure VI.5) dans le genou du rat augmente, mais de façon non significative (+31 % à J6 par rapport à des rotules de rats témoins). Puis la libération dans le milieu de culture des GAG sulfatés est significativement diminuée à partir de J10 et jusqu'à J40, jusqu'à -79 % (J15, 4±1 µg/mg de cartilage, par rapport à 18±3 µg/mg pour des rotules de rats témoins).

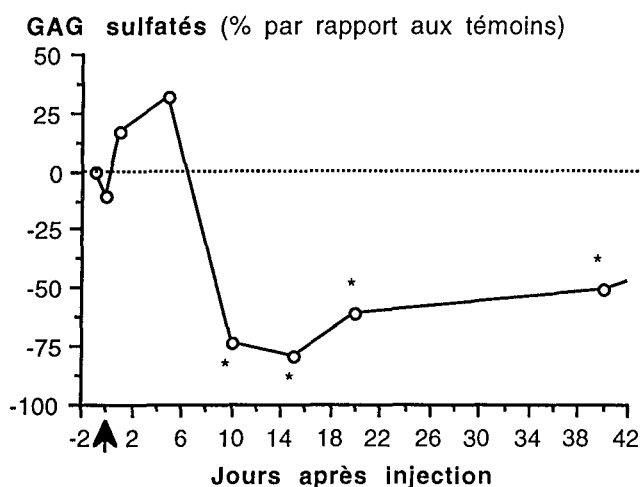


Figure VI.5. Effets d'une injection intra-patellaire de MIA (0,3 mg/50 µl) ou de sérum physiologique (50 µl) chez le rat (n=5 par groupe) sur la dégradation des PG. Elle est évaluée par le dosage des GAG sulfatés libérés par les rotules de rats en culture (24h, 37 °C, 5 % CO₂; dosage colorimétrique par le DMB). Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation des concentrations de GAG sulfatés (rapportés au poids du cartilage patellaire) après injection de MIA par rapport aux témoins. * = p<0,05, ANOVA, suivi d'un test t de Student.

En résumé,

l'injection intra-articulaire de MIA (0,3 mg) dans le genou du rat induit une hypomobilité précoce et transitoire. Un second handicap s'installe dès J14 de façon progressive et irréversible. Il semble qu'il soit lié à la progression de l'atteinte dégénérative du cartilage articulaire, et survient lorsque l'os est mis à nu. Les érosions du cartilage et les ostéophytes ont été respectivement attribuées à une inhibition de la synthèse des PG dans le centre de la rotule, et à l'inverse, à une augmentation de la synthèse des PG et à une inhibition de leur dégradation dans le cartilage péripatellaire.

2. Injection intra-articulaire de papaïne chez le rat.

2.1. Etude de la mobilité spontanée des rats.

L'injection par voie intra-articulaire dans les genoux de papaïne (1 mg, 17 U/mg) conduit à une forte diminution de l'activité locomotrice des rats dès J1 (-38 %; figure VI.6), dont l'amplitude est cependant moindre que celle consécutive à l'injection de MIA (J1, -54 %).

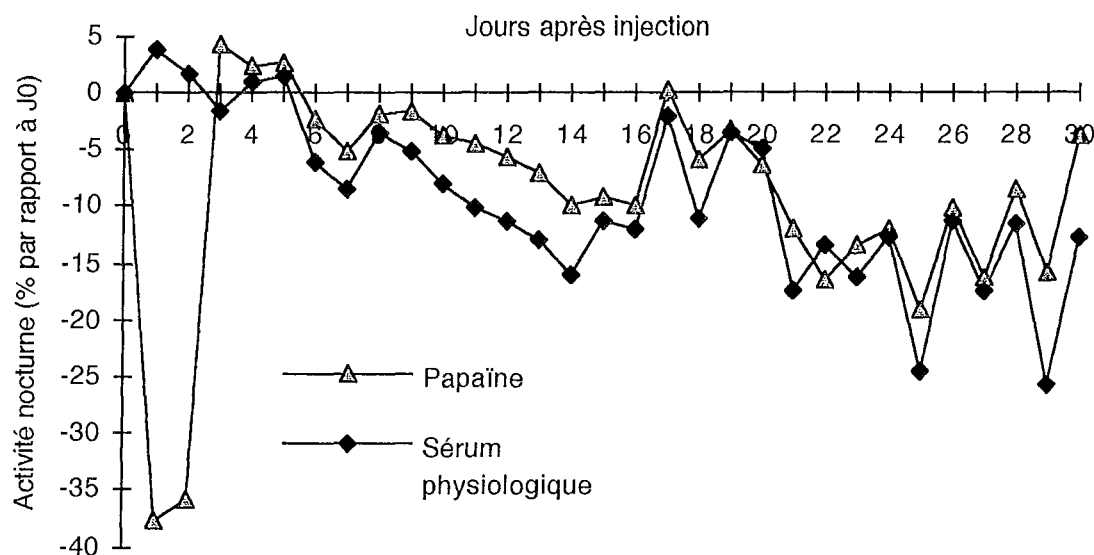


Figure VI.6. Mesure de la mobilité spontanée du rat par la télémétrie (n=12 rats par groupe), après une injection intra-articulaire dans chaque genou de sérum physiologique (50 μ l, témoins) ou de papaïne (1 mg/50 μ l, 17 U/mg).

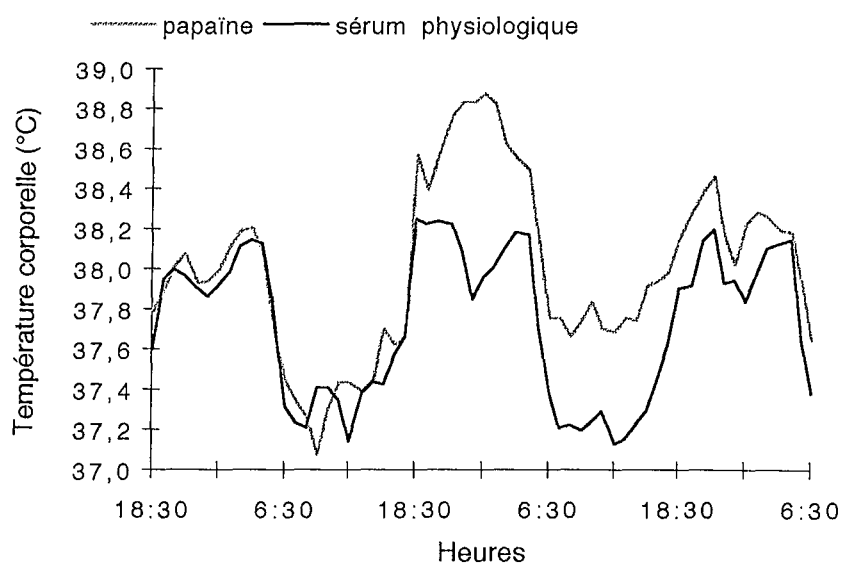


Figure VI.7. Mesure de la température du rat par la télémétrie (n=12 rats par groupe), après une injection intra-articulaire dans chaque genou de sérum physiologique (50 μ l, témoins) ou de papaïne (1 mg/50 μ l, 17 U/mg).

Cette diminution de l'activité des rats s'installe de façon brutale, mais elle est transitoire : dès J3, l'activité spontanée des rats est à nouveau comparable à celle des témoins (injection intra-articulaire de sérum physiologique), et, contrairement à l'injection de MIA, aucune variation de la mobilité n'est décelée jusqu'à la fin de l'expérimentation (J30).

L'injection intra-articulaire de papaïne conduit également à une phase d'hyperthermie transitoire, dont la durée est équivalente à celle de la perte de mobilité (J1 à J2, figure VI.7).

2.2. Etude morphologique et histologique du cartilage articulaire.

L'injection intra-articulaire de papaïne chez le rat ne conduit à aucune atteinte macroscopique du cartilage (J40). Une étude histologique complémentaire a cependant révélé une hypercellularité au sein du cartilage (figure VI.8).

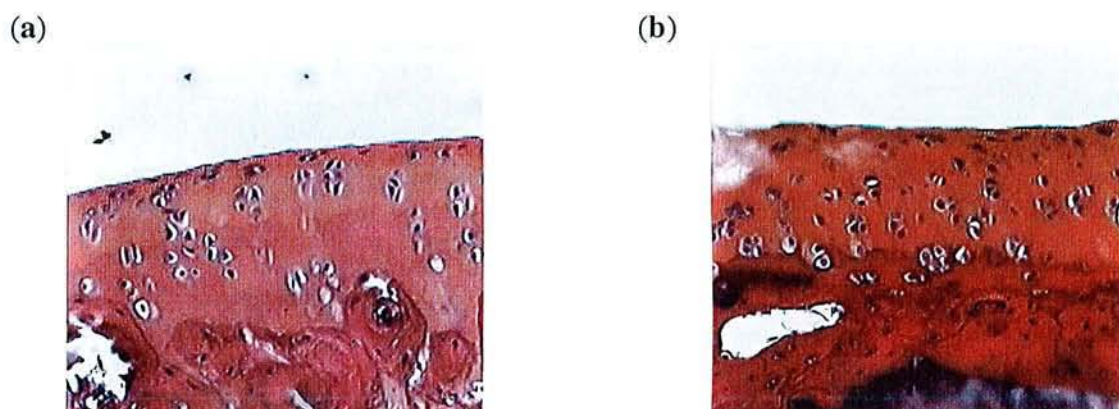


Figure VI.8. Coupe histologique du cartilage articulaire d'un plateau tibial d'un rat 40 jours après l'injection infra-patellaire de papaïne (17 U/mg, 1 mg; **a**). La comparaison à un cartilage sain (injection de sérum physiologique; **b**) permet de constater une hypercellularité du cartilage en réponse à l'injection de papaïne.

2.3. Variations de la synthèse des PG consécutives à l'injection de papaïne.

Contrairement à l'injection de MIA, celle de papaïne (1 mg/50µl, 17 U/mg) provoque des variations de la synthèse des PG similaires entre le cartilage du centre et de la périphérie de la rotule (figure VI.9). Celle-ci est cependant inhibée de façon plus importante dans le cartilage centropatellaire par rapport au cartilage péripatellaire le jour de l'injection (J0, -56 % et -21 % respectivement, par rapport à des rats témoins).

Synthèse des PG (% par rapport aux témoins)

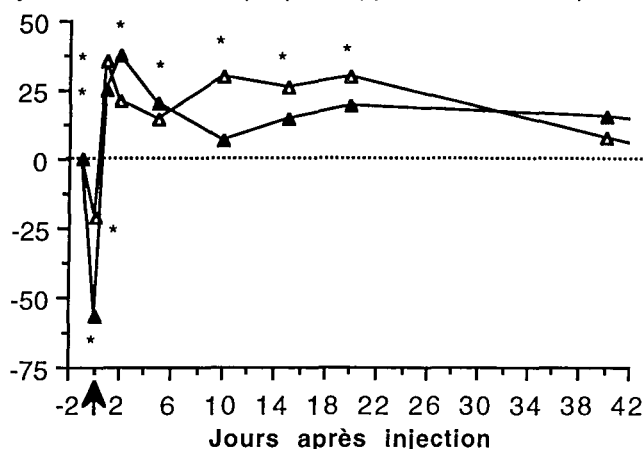


Figure VI.9. Variations de la synthèse des PG dans le cartilage patellaire induites par l'injection intra-articulaire de papaïne chez le rat (1 mg/50 μ l, 17 U/mg) dans le genou (n=5 rats par groupe). La synthèse des PG est évaluée par incorporation *ex vivo* de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (3h, 37 °C, 5 % CO_2). Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation des dpm par rapport à des rats témoins (injection intra-articulaire de sérum physiologique). Triangle plein = cartilage centropatellaire, triangle vide = cartilage péripatellaire.

* = $p < 0,05$, ANOVA, suivi d'un test t de Student.

L'incorporation de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ est ensuite significativement plus élevée dans le cartilage centropatellaire de J2 à J5. Cette augmentation de la synthèse des PG persiste plus longtemps dans le cartilage péripatellaire (+30 % à J20, $p < 0,05$). Les taux de ^{35}S incorporés sont ensuite comparables à ceux de rotules de rats témoins, dès J10 dans le cartilage centropatellaire et à J40 dans le cartilage péripatellaire.

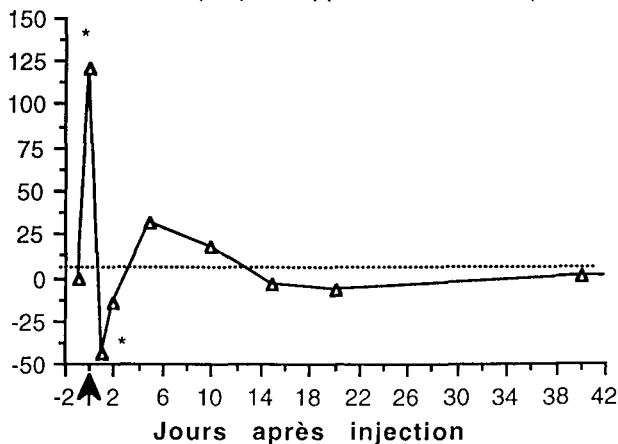
2.4. Variations de la dégradation des PG consécutives à l'injection de papaïne.

Le dosage des GAG sulfatés libérés par les rotules en culture permet de mettre en évidence l'activité protéolytique de la papaïne sur les constituants du cartilage : l'injection intra-articulaire de l'enzyme chez le rat conduit aussitôt (J0) à la libération de 42 ± 5 μ g GAG sulfatés /mg de cartilage dans le milieu de culture (24 h, 37 °C, 5 % CO_2), alors que les concentrations de GAG sulfatés libérés par les rotules de rats témoins (injection intra-articulaire de sérum physiologique) ne s'élèvent qu'à 19 ± 4 μ g GAG sulfatés/mg de cartilage (figure VI.10).

Figure VI.10. Dégradation des PG évaluée par le dosage colorimétrique (DMB) des GAG sulfatés libérés par des rotules de rats en culture (24h, 37 °C, 5 % CO_2). Les rats ont reçu une injection intra-articulaire de papaïne (1 mg/50 μ l, 17 U/mg) dans le genou (n=5 rats par groupe). Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation des concentrations de GAG sulfatés (quantités rapportées au poids du cartilage patellaire) par rapport à celles obtenues pour des rotules de rats témoins (injection intra-articulaire de sérum physiologique).

* = $p < 0,05$, ANOVA suivi d'un test t de Student.

GAG sulfatés (% par rapport aux témoins)



Les concentrations de GAG sulfatés dans les milieux de culture à J5 sont à nouveau transitoirement plus élevées (+32 %) : la dégradation des PG dans le cartilage patellaire en réponse à l'injection de papaïne est ensuite comparable à celle d'un cartilage sain (injection de sérum physiologique; 19 ± 4 à 8 ± 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ à J10 et J40 respectivement).

En résumé,

l'injection intra-articulaire de papaïne (1 mg, 17 U/mg) dans le genou du rat conduit à une hypomobilité transitoire, qui s'accompagne d'un phénomène fébrile. Malgré des variations importantes du métabolisme chondrocytaire, aucune atteinte macroscopique du cartilage articulaire n'a été décelée. L'histologie n'a révélé qu'une hypercellularité du cartilage.

3. Injection intra-articulaire de collagénase bactérienne chez le rat.

3.1. Etude de la mobilité spontanée des rats.

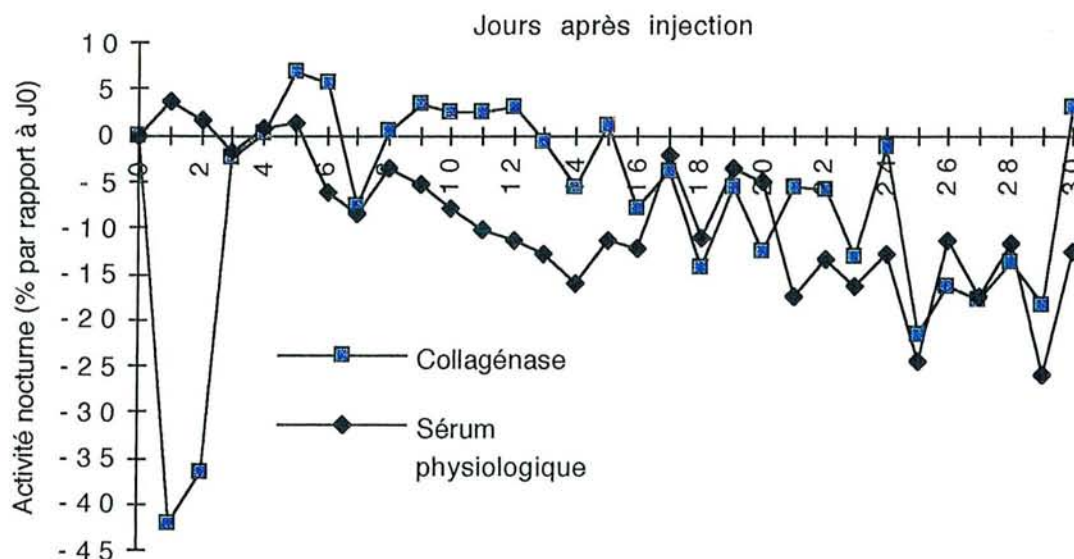


Figure VI.11. Mesure de la mobilité spontanée du rat par télémétrie (n=12 rats par groupe), après une injection intra-articulaire dans chaque genou de sérum physiologique (50 μl , témoins) ou de collagénase bactérienne (*Clostridium histolyticum*, 0,3 mg/50 μl , 540 U/mg).

L'injection intra-articulaire de collagénase bactérienne (*Clostridium histolyticum*; 0,3 mg/50 μl , 540 U/mg) induit une diminution de l'activité spontanée des rats dès l'injection (J1, -42 %; figure VI.11). Cette hypomobilité, dont l'amplitude est comparable à celle induite par l'injection de papaïne (-38 %, J1), s'installe de façon brutale mais transitoire : dès J3, les rats ont à nouveau

une activité spontanée comparable à celle des rats témoins (figure V.11). Aucune autre variation de la mobilité n'a ensuite été décelée (J30).

L'injection de collagénase bactérienne dans le genou du rat provoque une hyperthermie qui est équivalente à celle de l'hypomobilité. Le profil (durée, amplitude) est en fait tout à fait similaire à celui observé à la suite de l'injection intra-articulaire de papaïne.

3.2. *Etude morphologique et histologique du cartilage articulaire.*

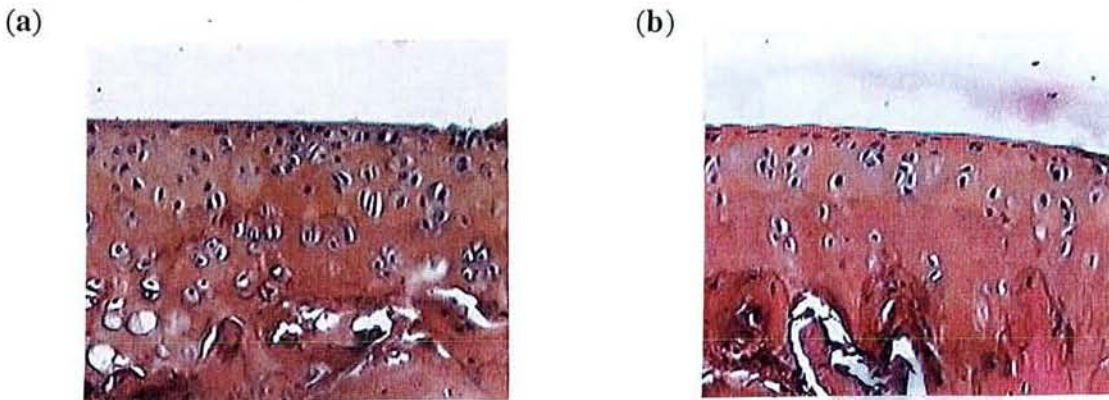


Figure VI.13. Coupe histologique du cartilage d'un plateau tibial d'un rat après l'injection intra-articulaire de collagénase bactérienne (*Clostridium histolyticum*, 0,3 mg ,540 U/mg; a). Il existe une hypercellularité du cartilage en réponse à l'injection de l'enzyme, par rapport à une injection de sérum physiologique (b).

De la même façon que l'injection de papaïne, celle de collagénase n'a conduit à aucune atteinte de la surface du cartilage (J40). Une étude histologique complémentaire a mis en évidence une hypercellularité du cartilage, comme dans le cas de l'injection de papaïne (figure VI.13).

3.3. *Variations de la synthèse des PG consécutives à l'injection de collagénase.*

Les modifications de la synthèse des PG induites par l'injection de collagénase bactérienne (figure VI.14) sont similaires entre le cartilage du centre et de la périphérie de la rotule : l'incorporation de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (3 h, 37 °C, 5 % CO_2) est d'abord significativement inhibée à J0 (-28 % et -32 % à J0 dans le cartilage centropatellaire et dans le cartilage péripatellaire respectivement, par rapport aux témoins) et J1 (-26 % dans le cartilage centropatellaire, $p < 0,05$). La synthèse des PG augmente ensuite progressivement jusqu'à J40 (+43 % et +38 % $p < 0,05$, dans le cartilage centropatellaire et péripatellaire respectivement, par rapport aux témoins).

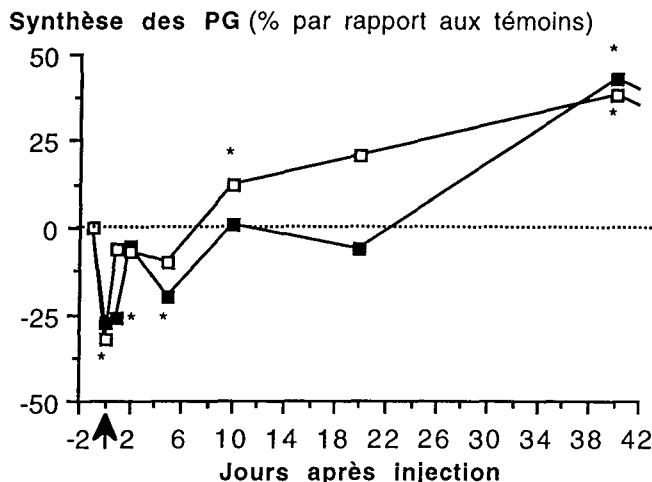


Figure VI.14. Variations de la synthèse des PG (incorporation *ex vivo* de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$, 3h, 37 °C, 5 % CO_2) dans le cartilage patellaire du rat à la suite d'une injection infrapatellaire de collagénase bactérienne (*Clostridium histolyticum*, 540 U/mg; 0,3 mg/50 μl). Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation des dpm par rapport à l'incorporation obtenue par des rotules de rats témoins (injection intra-articulaire de sérum physiologique, 50 μl).

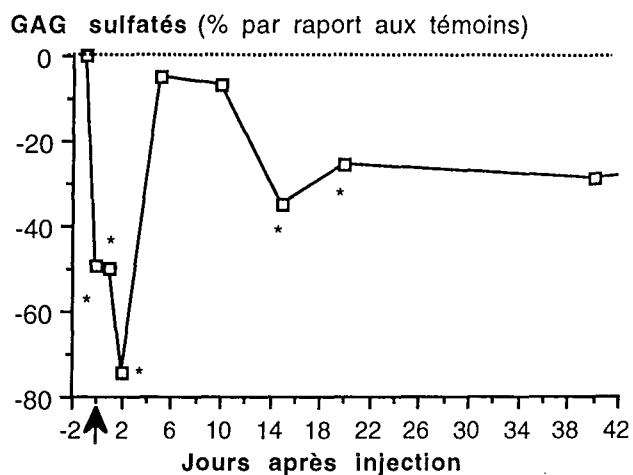
*= $p < 0,05$ ANOVA suivi d'un test t de Student.
Carré plein = cartilage centropatellaire (n=5), carré vide = cartilage péripatellaire (n=5).

3.4. Modulation de la dégradation des PG consécutive à l'injection de collagénase.

L'injection intra-articulaire de collagénase bactérienne (*Clostridium histolyticum*, 540 U/mg, 0,3 mg/50 μl) conduit tout d'abord à une forte diminution des taux de GAG sulfatés libérés dans le milieu de culture (24 h, 37 °C, 5 % CO_2), jusqu'à -75 % environ à J2 (figure VI.15).

Figure VI.15. Cinétique de libération des GAG sulfatés par des rotules de rats en culture (24h, 37 °C, 5 % CO_2), reflétant la dégradation des PG (dosage colorimétrique des GAG sulfatés par le DMB). Les rats ont reçu une injection intra-articulaire de collagénase dans le genou (*Clostridium histolyticum*, 540 U/mg; 0,3 mg/50 μl , n=5). Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation des concentrations de GAG sulfatés (μg GAG sulfatés rapportés au poids du cartilage patellaire) par rapport à celles obtenues par des rotules de rats témoins (injection intra-articulaire de sérum physiologique, n=5).

* = $p < 0,05$ ANOVA suivi d'un test t de Student.



Puis, de J5 à J10, les concentrations de GAG sulfatés libérés (quantité de GAG sulfatés libérés rapportée au poids du cartilage patellaire) sont comparables à celles obtenues par des rotules de rats témoins (15 ± 4 à 17 ± 3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ à J5 et J10 respectivement). Enfin, la dégradation des PG est à nouveau inhibée de J15 à J40 (-26 à -35 %, $p < 0,05$ à J15 et J20).

En résumé,

l'injection intra-articulaire de collagénase bactérienne (*Clostridium histolyticum*, 540 U/mg; 0,3 mg/50 µl) dans le genou du rat conduit à une hypomobilité transitoire, qui s'accompagne d'un phénomène fébrile, comme dans le cas de l'injection intra-articulaire de papaïne. L'histologie n'a révélé qu'une hypercellularité du cartilage, bien que l'injection de l'enzyme ait conduit à des variations importantes du métabolisme chondrocytaire.

4. Section du ligament croisé antérieur chez le rat.

La télémetrie nous a permis de mesurer l'activité des rats au cours de la progression des lésions du cartilage consécutives à la section du LCA. Les lésions cartilagineuses ont été caractérisées lors d'une observation macroscopique (J75) et d'une étude histologique (J15, J30, J45, J60 et J75).

Le dosage des GAG sulfatés (dosage colorimétrique par le DMB) 30 et 75 jours après la section du LCA, et la mesure de la synthèse des PG dans les régions portantes et non portantes du cartilage patellaire à J15, J30, J45, J60 et J75 nous ont permis de caractériser l'atteinte du cartilage sur le plan de la biochimie. Nous avons également déterminé sur ces mêmes paramètres les conséquences d'une arthrotomie.

4.1. Etude de la mobilité spontanée du rat consécutive à la section du ligament croisé antérieur.

Pour éviter deux anesthésies générales à 5 jours d'intervalle, l'implantation de l'émetteur dans la cavité péritonéale de chaque rat a été réalisée en même temps que l'arthrotomie ou la section du ligament croisé antérieur. Ainsi, pour distinguer l'hypomobilité post-opératoire liée à l'anesthésie (implantation des émetteurs, témoins anesthésiés) de l'hypomobilité due à l'arthrotomie ou à la section du LCA, les résultats ont été exprimés en pourcentage de variation de la mobilité des rats après arthrotomie ou après la section du LCA par rapport aux témoins anesthésiés.

Une arthrotomie ou la section du LCA conduit à une diminution importante de l'activité spontanée des rats (-36 % et -52 % respectivement par rapport aux témoins anesthésiés, figure VI.16). Dans le cas d'une arthrotomie, cette phase d'hypomobilité est transitoire et ne dure que 4 jours. Dans le cas de la section du LCA l'activité locomotrice des rats est diminuée jusqu'à J15 (-24 % à J9 par rapport aux témoins anesthésiés). Cette différence disparaît entre J16 et J30.

Seule la section du LCA conduit à une phase fébrile d'une durée de 3 jours (figure VI.17).

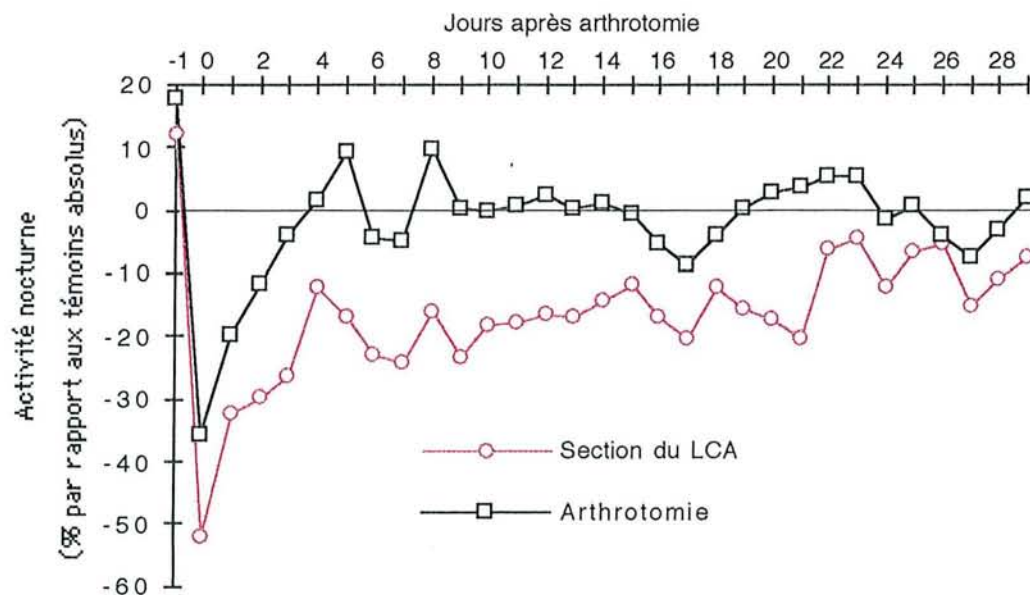


Figure VI.16. Mesure de la mobilité spontanée du rat par télémétrie, après arthrotomie (n=12) ou section du LCA (n=12; J0). Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation de l'activité nocturne par rapport à des témoins anesthésiés (implantation des émetteurs, n=12).

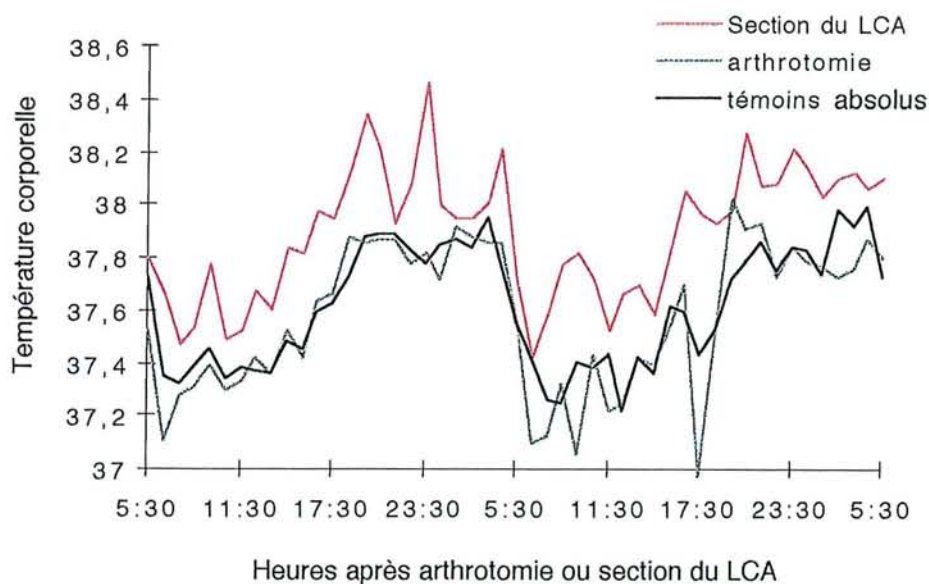


Figure VI.17. Mesure de la température des rats par télémétrie, après arthrotomie (n=12), section du LCA (n=12) ou chez les témoins anesthésiés (implantation des émetteurs; n=12, J0).

4.2 Etude morphologique.

L'étude macroscopique a été réalisée 75 jours après la section du LCA (n=5 rats par groupe). Elle permet d'apprécier l'étendue des lésions sur toute la surface articulaire des différents compartiments.

L'étude histologique (n=5 rats par groupe) a été réalisée dès J15 et jusqu'à J75, pour déterminer les modifications fines de la surface du cartilage et au sein de la matrice survenant à la suite de la section du LCA, et pour suivre leur évolution dans le temps. Une gradation des lésions observées d'après des critères d'état de surface du cartilage, de la cellularité du tissu, de l'intensité de la coloration au Bleu de Toluidine et de la densité de l'os sous-chondral ont permis de mieux apprécier la sévérité de l'atteinte articulaire.

4.2.a. Etude macroscopique.

La section du LCA conduit au développement de lésions sévères du cartilage des plateaux tibiaux (figure VI.18) : des érosions profondes laissant apparaître l'os sous-chondral (J75) sont visibles sur la région antérieure des plateaux tibiaux (3 rats / 5). A l'inverse, des ostéophytes se sont développés dans la région postérieure. L'atteinte de la rotule se caractérise par une chondromalacie, avec parfois une érosion du cartilage (3 rats / 5) dans la zone d'insertion du ligament infrapatellaire. De façon surprenante, aucune lésion n'est décelée sur les condyles fémoraux : la surface du cartilage apparaît régulière.

4.2.b. Etude histologique.

Le cartilage des différents compartiments articulaires à la suite d'une arthrotomie, présente un aspect normal. Une fibrose de la membrane synoviale, et un faible infiltrat cellulaire ont été observés à J15, mais qui n'évoluent pas jusqu'à J75 : la gradation d'une atteinte du cartilage d'après un score histologique de Mankin modifié (voir la section "Matériel et méthodes") est comprise entre 0 et 2,2, sachant que le score maximal pouvant être obtenu pour une surface articulaire considérée est de 26 (tableau VI.1).

La section du LCA conduit dès J15 à une hypercellularité et un épaissement du cartilage des plateaux tibiaux et des condyles fémoraux dans les régions portantes. Sa surface est régulière, excepté chez un rat chez qui la section du LCA a déjà conduit à la fissuration de la couche superficielle du cartilage des plateaux tibiaux, lui donnant un aspect velvétique.

Tableau VI.1. Gradation des lésions du cartilage de chacun des compartiments d'après 4 critères histologiques :

1. l'état de surface; 2. la répartition cellulaire; 3. l'intensité de la coloration au Bleu de Toluidine; 4. la densité de l'os sous-chondral (voir la description détaillée du score dans le chapitre "Matériel et méthodes"). Les valeurs obtenues pour chacun de ces critères ont été moyennées (n=5 rats par groupe; score maximum = 26 par surface articulaire) pour chaque compartiment articulaire (rotule, plateaux tibiaux, condyles fémoraux).

	Rotule		Plateaux tibiaux		Condyles fémoraux		Total (/78)	
Jours	Arthrotomie	ACL	Arthrotomie	ACL	Arthrotomie	ACL	Arthrotomie	ACL
15	1,4	4,0	0,2	4,6	0,0	4,6	1,6	13,2
30	1,2	5,0	0,0	8,8	0,2	6,2	1,4	20,0
45	1,6	7,6	0,0	11,6	0,4	10,0	2,0	29,2
60	0,2	6,4	0,2	9,0	0,6	7,8	1,0	23,2
75	2,2	5,8	0,2	8,4	0,2	7,4	2,6	22,8

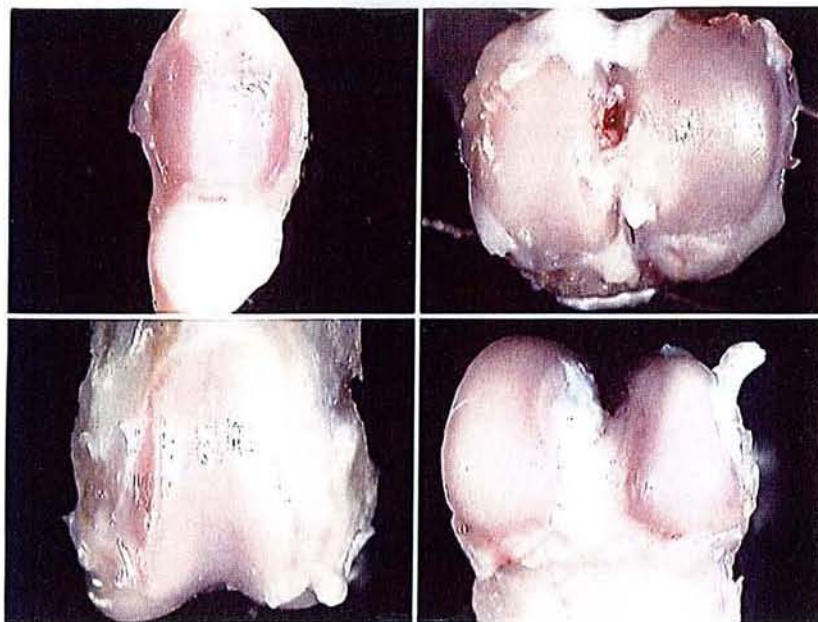
A J30, le cartilage des plateaux tibiaux et des condyles fémoraux de tous les rats présente cet aspect velvétique. Chez certains, les fissurations atteignent la couche profonde dès J45 (2 rats/5). Toutes ces zones fibrillaires deviennent acellulaires et fixent moins les colorants spécifiques des PG (Bleu de Toluidine, figure VI.19) : la gradation des lésions d'après le score histologique montre une évolution rapide des lésions entre J15 et J45, quel que soit le compartiment articulaire considéré (tableau VI.1).

Dans les régions non portantes des plateaux tibiaux et des condyles fémoraux, des "clusters" se sont développés dès J30, et persistent jusqu'à J75. Des ostéophytes parfois volumineux sont visibles à J60 sur la région postérieure des plateaux tibiaux (2 rats / 5; figure VI.19).

Dans la rotule, des modifications de la couche de cartilage calcifié surviennent dès J15, alors qu'une atteinte de la couche superficielle (fissures) dans le cartilage n'est pas visible avant J75. L'atteinte précoce de la couche de cartilage calcifiée correspond à un amincissement de la couche de chondrocytes hypertrophiques, et s'accompagne d'un épaissement des travées de l'os sous-chondral sous-jacent au cartilage (figure VI.19). Ces modifications sont moins visibles au niveau des plateaux tibiaux et des condyles fémoraux.

Une inflammation de la membrane synoviale survient en raison d'une hypersollicitation de la zone d'ancrage du ligament infrapatellaire. Cette inflammation de la membrane synoviale conduit à une atteinte du cartilage, atteignant parfois les couches profondes. Cependant, elle reste très localisée.

A $\begin{array}{c|c} a & c \\ \hline b & d \end{array}$



B $\begin{array}{c|c} a & c \\ \hline b & d \end{array}$

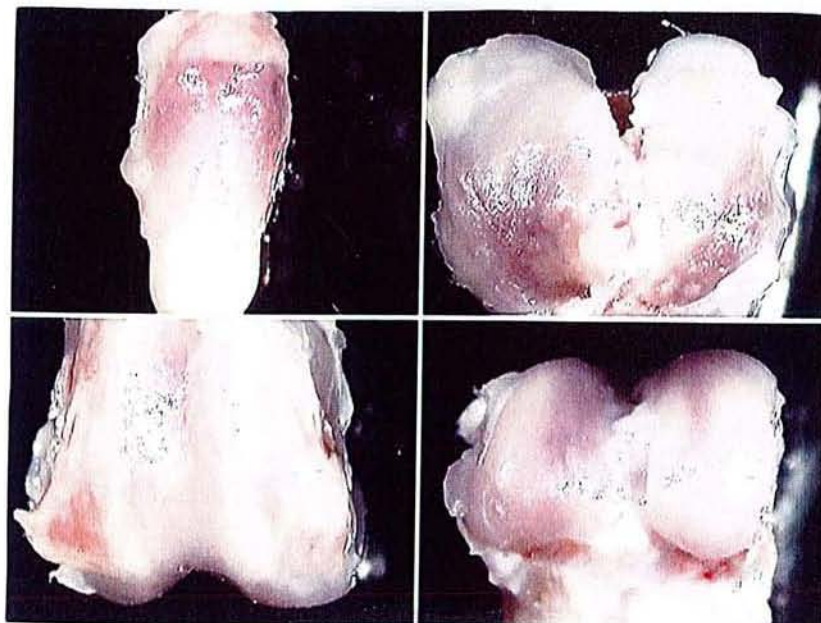


Figure VI.18. Les surfaces articulaires de la rotule (a), de la gouttière intercondylienne (b), des plateaux tibiaux (c) et des condyles fémoraux (d) du rat 75 jours après arthrotomie (A) ou après section du LCA (B). Des érosions importantes du cartilage articulaire sont visibles sur la partie antérieure des plateaux tibiaux et au niveau de l'insertion du ligament infrapatellaire. Des ostéophytes se sont développés dans la partie postérieure des plateaux. Le cartilage des condyles fémoraux présente un aspect normal.

4.3. Biochimie des PG du cartilage patellaire à la suite de la section du ligament croisé antérieur.

La section du LCA du genou droit et une arthrotomie pratiquée sur le genou gauche chez les rats a permis de rendre compte des effets propres de l'instabilité articulaire sur la synthèse des PG dans le cartilage patellaire (incorporation *ex vivo* de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$, 3 h, 37 °C, 5 % CO_2) et sur le contenu du cartilage en GAG sulfatés (dosage colorimétrique par le DMB). Les effets sur ces mêmes paramètres d'une arthrotomie pratiquée sur le genou droit d'un second groupe de rats ont été déterminés en comparant les résultats obtenus à ceux de la rotule du genou controlatéral sain.

4.3.a. Synthèse des PG dans le cartilage patellaire.

Une arthrotomie n'induit aucune variation significative de l'incorporation *ex vivo* de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ dans le cartilage patellaire par rapport aux témoins absolus (J15 à J75; tableau VI.2). Il est ainsi permis de comparer directement les variations de la synthèse des PG consécutives à la section du LCA à celle mesurée dans le cartilage patellaire du genou controlatéral après arthrotomie.

Tableau VI.2. Effets d'une arthrotomie (genou droit) sur la synthèse des PG dans le cartilage centropatellaire et péripatellaire, par rapport au genou controlatéral non opéré (incorporation *ex vivo* de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$; 3h, 37 °C, 5 % CO_2). Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation des dpm obtenu dans le cartilage patellaire du genou après arthrotomie par rapport à ceux de la rotule du genou controlatéral (n=5 rats par groupe).

Jours après arthrotomie	Synthèse des PG dans le cartilage patellaire après arthrotomie (% par rapport au genou controlatéral sain)				
	15	30	45	60	75
Centre de la rotule (moyenne±sd)	2,24±3,88	6,22±2,73	7,63±5,10	0,90±8,23	7,48±7,70
Périphérie de la rotule (moyenne±sd)	0,44±0,94	7,63±1,48	-2,52±4,10	7,21±4,44	11,01±5,59

La section du LCA conduit à une augmentation significative de la synthèse des PG dans le cartilage centropatellaire dès J15 (+30 %, figure VI.20) par rapport à celle mesurée dans le genou controlatéral après arthrotomie. Entre J30 et J45, aucune variation de l'anabolisme n'a été décelée. Puis, à J75, l'incorporation de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ est diminuée de façon significative dans le cartilage centropatellaire (-14 %, $p<0,05$).

Dans les régions non portantes, la section du LCA n'a conduit à aucune variation de la synthèse des PG par rapport au genou controlatéral après arthrotomie.

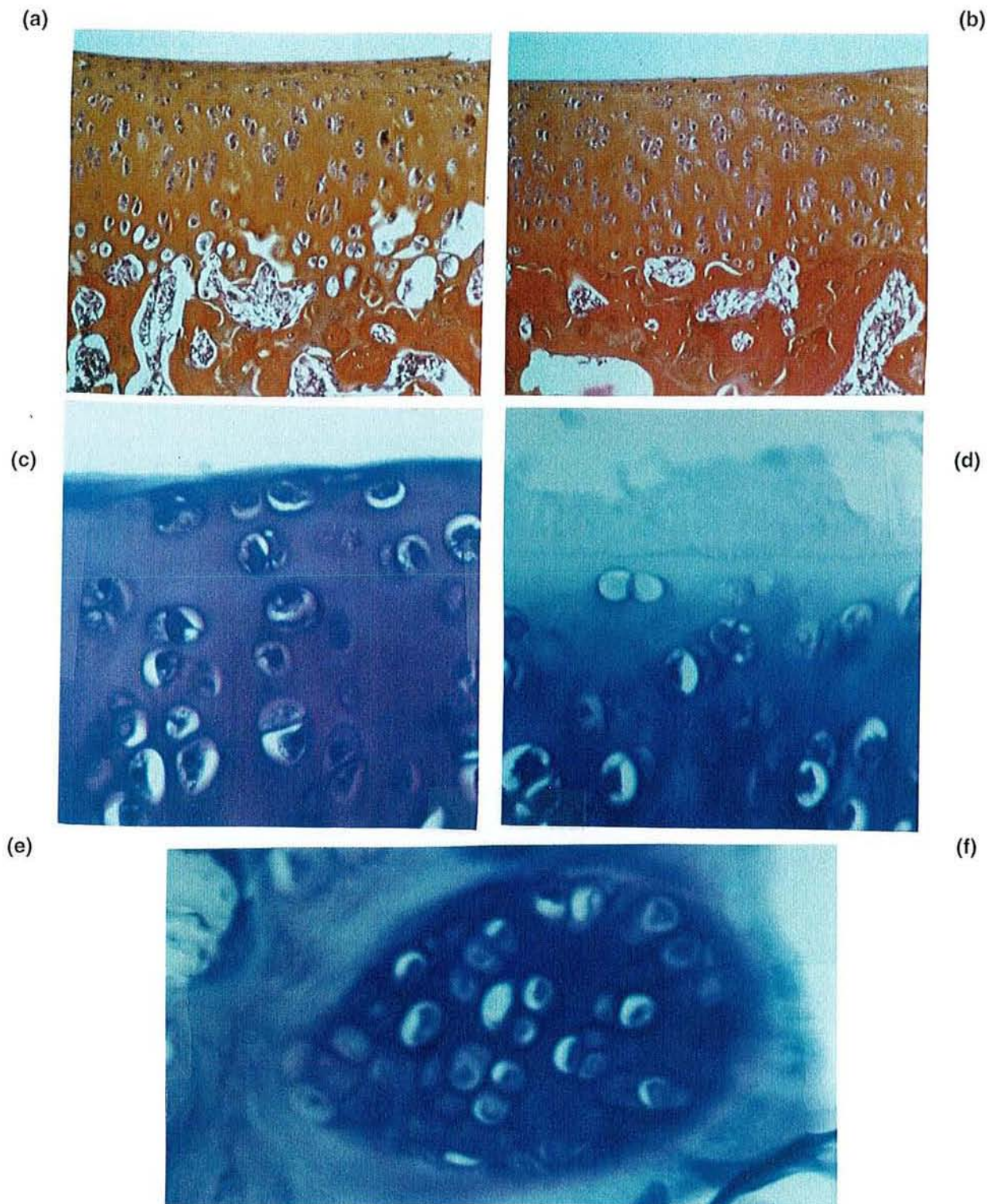


Figure VI.19. Coupes histologiques du cartilage articulaire après une arthrotomie ou la section du LCA. chez le rat :

(a) coupe axiale d'une rotule après arthrotomie et (b) après section du LCA (J15, x10); noter la diminution d'épaisseur de la couche calcifiée du cartilage, et la condensation de l'os sous-chondral. Cartilage des plateaux tibiaux d'un rat (c) après arthrotomie et (d) après section du LCA (J45, Bleu de Toluidine). (e) "Cluster" dans le cartilage des régions non portantes des plateaux tibiaux et (f) ostéophyte 60 jours après la section du LCA .

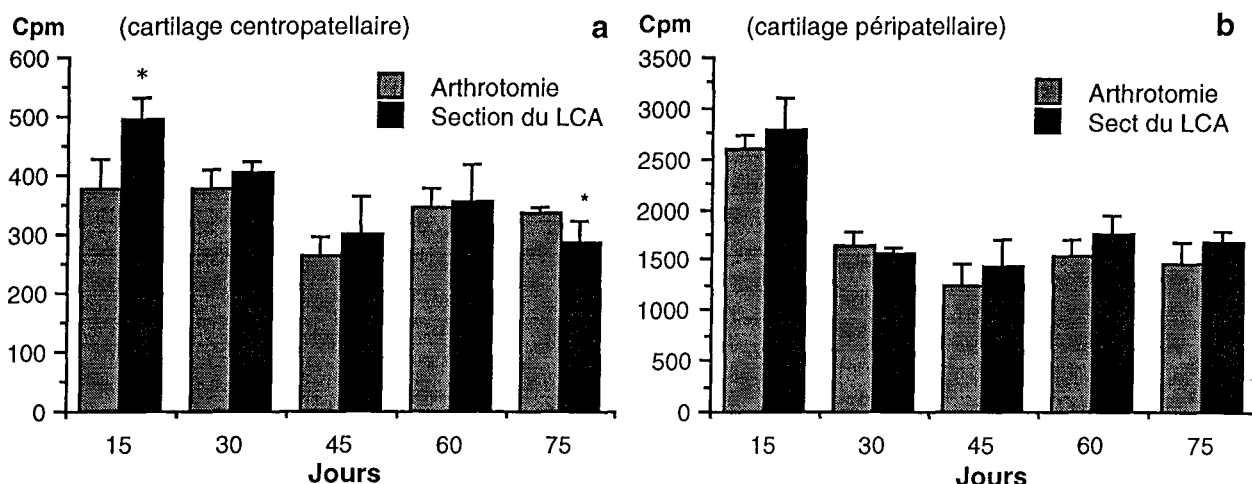


Figure VI.20. Variations de la synthèse des PG après la section du ligament croisé antérieur chez le rat (genou droit, J15 à J75; incorporation *ex vivo* de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$, 3 h, 37 °C, 5 % CO_2) dans le cartilage centropatellaire (a) et péripatellaire (b). Les résultats sont exprimés en cpm (n=5 rats par groupe). * = $p < 0,05$ (ANOVA suivi d'un test t de Student).

4.3.b. Contenu du cartilage patellaire en GAG sulfatés.

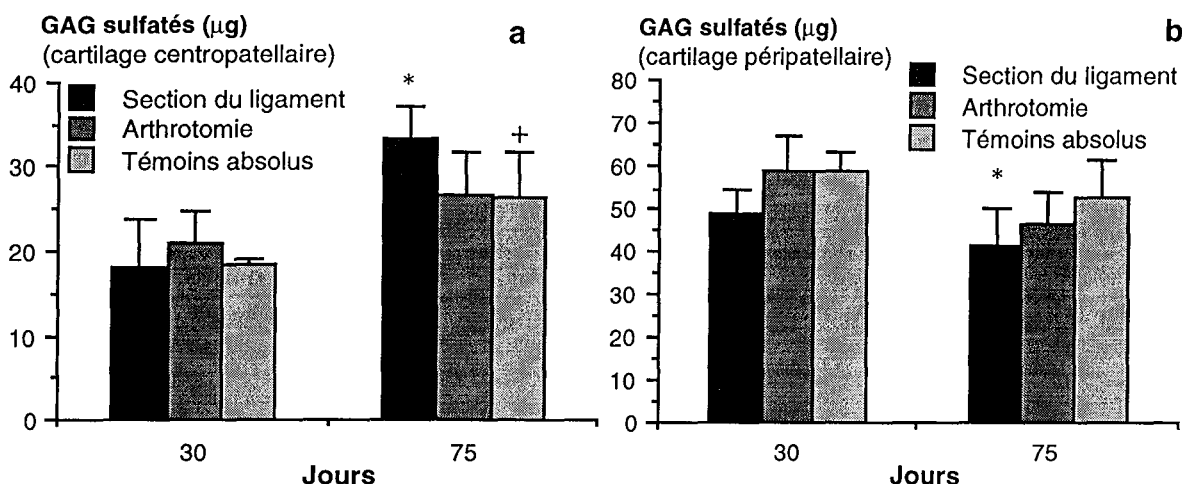


Figure VI.21. Contenu du cartilage centropatellaire (a) et péripatellaire (b) en GAG sulfatés (µg) après la section du ligament croisé antérieur chez le rat (n=5), ou après une arthrotomie (n=10, J30 et J75) par rapport à des rats témoins (n=5), déterminé par le dosage colorimétrique par le DMB.

* = $p < 0,05$ par rapport au groupe de rats après arthrotomie et + = $p < 0,05$ entre J30 et J75 pour les rats d'une même catégorie (ANOVA suivi d'un test t de Student).

Entre J30 et J75, la teneur en GAG sulfatés augmente dans le cartilage centropatellaire (figure VI.21.a) et péripatellaire (figure VI.21.b) chez les rats témoins (+29 % $p < 0,05$, et +15 % respectivement).

Une arthrotomie chez le rat n'induit aucune variation significative du contenu en GAG sulfatés dans le cartilage patellaire (J30 et J75), par rapport aux rats témoins sains. A l'inverse, des variations significatives apparaissent 75 jours après la section du ligament croisé antérieur : dans

le centre de la rotule, la teneur en GAG sulfatés augmente de +26 % par rapport aux témoins absolus (26 ± 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ cartilage), alors qu'elle est diminuée dans le cartilage péripatellaire (-21 %, figure VI.21).

En résumé,

la section du LCA chez le rat conduit, comme l'arthrotomie, à une hypomobilité en raison de douleurs post-opératoires. L'amplitude de cette hypomobilité est cependant plus importante et sa durée plus longue dans le cas de la section du LCA, et elle s'accompagne d'une hyperthermie de plusieurs jours. Aucune diminution tardive de l'activité motrice des rats après section du LCA n'a été décelée, malgré une érosion du cartilage pouvant atteindre l'os sur les bords antérieurs des plateaux tibiaux. Dans ce modèle d'arthrose, une inflammation de la membrane synoviale au niveau de l'insertion du ligament infra-patellaire contribue de façon importante à la destruction du cartilage : la concentration en GAG sulfatés dans le cartilage péripatellaire est diminuée significativement. A l'inverse, la teneur du cartilage centropatellaire en GAG sulfatés est plus importante, à laquelle contribue une augmentation de la synthèse des PG.

Discussion

L'arthrose est une pathologie dégénérative du cartilage articulaire, non inflammatoire, bien connue d'un point de vue clinique : les symptômes majeurs que sont les douleurs articulaires ou une gêne fonctionnelle caractérisent une atteinte articulaire sévère. A l'inverse, l'initiation de l'arthrose et sa progression sont volontiers asymptomatiques. Une fibrillation la couche superficielle du cartilage apparaît dans les régions portant les plus sollicitées. Les fissures s'approfondissent et atteignent progressivement l'os sous-chondral. A l'opposé, des ostéophytes se développent dans les régions les moins sollicitées, qui correspondent à l'hypertrophie d'un tissu de nature ostéochondrale.

Les méthodes d'imagerie actuelles utilisées en clinique ne permettent pas de déceler des atteintes modérée du cartilage, et les traitements médicamenteux ne sont ainsi prescrits que lorsque les symptômes apparaissent. C'est une des raisons pour lesquelles aucun traitement n'a encore pu faire preuve en clinique de capacités chondroprotectrices efficaces, puisqu'à ce stade, l'atteinte articulaire est sévère.

Le manque de connaissance de la physiopathologie de l'arthrose, tant en clinique que sur le plan de la pharmacologie, justifie l'utilisation de modèles d'arthrose expérimentale chez l'animal. L'exploitation de ces modèles contribue à mettre en évidence par des méthodes d'imagerie plus récentes (imagerie par résonance magnétique, échographie) une atteinte du cartilage. Ces modèles permettent également d'étudier la physiopathologie de l'arthrose, dans le but de proposer de nouvelles cibles pharmacologiques. Ces approches exigent de distinguer chez l'animal une manifestation qui pourrait rendre compte de la progression de l'arthrose expérimentale, telle que la diminution de la fonction articulaire qui, chez l'homme, est liée à des douleurs ou à une gêne fonctionnelle. La télémetrie nous a autorisé une telle approche, puisqu'elle permet de déceler une hypomobilité chez le rat. Ce paramètre "clinique", en plus des critères jusqu'à présent retenus pour décrire un modèle d'arthrose expérimentale chez l'animal, à savoir des lésions similaires à celles observées dans la pathologie humaine, a été déterminant dans le choix d'un modèle.

Nous avons développé chez le rat 4 modèles d'arthrose expérimentale déjà décrites chez d'autres espèces animales, qui pourraient constituer différentes étiologies possibles de la pathologie humaine : la première est une perturbation du métabolisme chondrocytaire induite par l'injection intra-articulaire de MIA dans le genou du rat. L'injection de papaine conduit à la dégradation des constituants du cartilage, et à la désorganisation de la matrice extracellulaire. L'injection intra-articulaire de collagénase, de la même façon que la section du LCA, provoque une instabilité articulaire.

Les résultats des études menées en télémetrie, des observations macroscopiques et histologiques ou de la biochimie du cartilage sont très différents en fonction du modèle considéré. L'injection intra-articulaire de MIA ou la section du LCA ont conduit à une atteinte articulaire caractérisée par des érosions du cartilage et une ostéophytose, en relation avec l'installation d'un handicap tardif dans le cas de l'injection de MIA. En revanche, l'injection intra-articulaire de papaïne ou l'injection de collagénase bactérienne n'ont conduit qu'à une altération discrète du cartilage articulaire (hypercellularité), malgré des perturbations importantes du métabolisme chondrocytaire.

1. Injection intra-articulaire de MIA.

L'induction d'une arthrose expérimentale par l'injection intra-articulaire de MIA a été décrite pour la première fois chez la poule par Kalbhen, en 1977. Il a constaté l'installation rapide d'un processus dégénératif du cartilage en réponse à l'injection d'une solution de MIA dans le genou de la poule, dont les lésions se caractérisaient par une érosion du cartilage dans les régions portantes et des ostéophytes volumineux en périphérie. Un peu plus tard, il a attribué ces effets du MIA à une inhibition de certaines enzymes de la glycolyse possédant un groupement thiol, par une réaction d'alkylation. Les chondrocytes étant tributaires d'un métabolisme anaérobie (le cartilage est avasculaire), l'inhibition de ces enzymes conduit à une diminution d'ATP intracellulaire, principale source d'énergie pour la cellule [Kalbhen, 1985].

Notre étude chez le rat montre que l'injection intra-articulaire de MIA (0,3 mg) conduit rapidement à une atteinte articulaire sévère (J40), avec à la fois des érosions du cartilage dans les régions portantes et des ostéophytes dans les régions les moins sollicitées. La réalisation de ce modèle chez différentes espèces telles que le rat [Williams, 1984], le cobaye [Williams, 1989], la souris [Van der Kraan, 1992], ou le cheval [Gustafson, 1992], a permis de constater des lésions similaires en réponse à l'injection intra-articulaire de MIA : ce modèle d'arthrose expérimentale semble n'avoir aucune spécificité d'espèce.

L'étude menée en télémetrie a permis de mettre en évidence deux diminutions de l'activité spontanée du rat en réponse à l'injection de MIA. La première survient aussitôt après l'injection. Elle s'installe de façon brutale (-54 % par rapport aux témoins, J1) et transitoire. Elle s'accompagne d'une faible variation de la température du rat, et traduit un effet systémique en réponse à l'injection intra-articulaire de MIA. Cependant, l'importance de cet effet paraît insuffisant pour expliquer une diminution si importante de l'activité spontanée des rats. L'injection de sérum physiologique chez les rats témoins ne conduisant à aucune modulation de leur activité spontanée, il est possible que le MIA puisse lui-même générer des sensations douloureuses, à l'origine de cette hypomobilité.

La seconde phase d'hypomobilité débute à J14. Le profil d'installation de cette perte de mobilité des rats est très différente de la première : elle survient progressivement, et s'aggrave de façon irréversible jusqu'à la fin de l'expérimentation (J30). La sévérité de l'atteinte articulaire observée à J40 permet de supposer que la progression de l'arthrose induite chez le rat par l'injection intra-articulaire de MIA dans les genoux puisse s'accompagner d'un handicap locomoteur. Son installation progressive et son caractère irréversible refléteraient l'atteinte articulaire toujours plus sévère, qui pourrait être à l'origine à la fois de douleurs et d'une gêne fonctionnelle.

L'installation et la progression des lésions induites par l'injection intra-articulaire de MIA dans le genou du rat s'accompagnent de variations du métabolisme chondrocytaire. De façon surprenante, la réponse des chondrocytes du cartilage centropatellaire et du cartilage péripatellaire est très différente : la synthèse des PG est respectivement inhibée et fortement stimulée. Ces différences permettent cependant d'expliquer en partie l'érosion du cartilage centropatellaire et la formation des ostéophytes dans le cartilage péripatellaire.

La diminution de l'anabolisme dans le cartilage centropatellaire peut être attribuée à l'épuisement de l'ATP intracellulaire résultant de l'inhibition de la glycolyse par le MIA [Kalbhen, 1985]. En revanche, l'augmentation de l'anabolisme dans le cartilage péripatellaire est plus difficile à analyser. Une étude de Mason [1991] montre que la glycolyse et la synthèse des PG dans des explants de cartilage exposés brièvement au MIA sont inhibées transitoirement. Une phase de "réparation" se manifeste ensuite par une hyperactivité métabolique des chondrocytes. *In vivo*, les effets du MIA injecté dans la cavité articulaire chez le rat peuvent être modulés par la proximité de la membrane synoviale, qui faciliterait la diffusion du produit hors de la cavité articulaire. Van Osch [1994] attribue cette différence de réponse des chondrocytes à l'injection intra-articulaire de MIA chez la souris à la production de facteurs de croissance par les synoviocytes, et à leur plus grande concentration dans les régions non portante.

L'activité chondrocytaire est également modulée en fonction de la sollicitation mécanique du cartilage [Takahashi, 1998], plus importante dans les régions portantes. La résistance du cartilage des régions les plus sollicitées nécessiterait un métabolisme chondrocytaire plus actif, et expliquerait par ailleurs une sensibilité plus grande des chondrocytes de ces régions aux effets du MIA [Van Osch, 1994]. Dunham [1992] fait une constatation équivalente sur les chondrocytes de la couche superficielle par rapport à ceux des couches plus profondes : à la suite de l'injection intra-articulaire de MIA chez le rat, il mesure l'activité enzymatique de différentes enzymes de la glycolyse susceptibles d'être inhibées par le MIA. Il observe que les chondrocytes de la couche superficielle sont moins sensibles aux effets du MIA que ceux des couches plus profondes, en raison d'une dépendance moins grande à la glycolyse.

La dégradation des PG est un aspect qui, à notre connaissance, n'a pas été étudié dans ce modèle d'arthrose expérimentale, et qui a, en général, été peu décrit dans des modèles d'arthrose chez l'animal. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la dégradation des PG, mesurée par la libération des GAG sulfatés par des rotules en culture. Nous avons ainsi constaté une augmentation transitoire de la dégradation des PG de plus de 30 %, mais non significative, par rapport à des rotules de rats témoins (injection intra-articulaire de sérum physiologique). Par la suite, l'inhibition de la dégradation atteint -75 % (par rapport aux témoins). Ces variations de la dégradation des PG peuvent être attribuées à deux phénomènes. Le premier est relatif à l'inhibition de la glycolyse par le MIA, conduisant à l'épuisement des taux d'ATP intracellulaires. Le chondrocyte ne peut alors plus réguler le flux ionique entre les milieux extracellulaire et intracellulaire, la cellule gonfle et meurt par nécrose [Majno, 1995], comme l'a suggéré van den Berg [1991]. La libération dans le milieu extracellulaire du contenu cellulaire, et notamment des protéases, conduit à une augmentation transitoire de la dégradation des PG tant qu'elles sont actives. Ensuite, l'épuisement de ces protéases aboutit à une diminution de la dégradation. Le deuxième phénomène pourrait être une synthèse excessive des inhibiteurs de protéases conjointe à l'augmentation de la synthèse des constituants matriciels dans les régions non portantes : elle contribuerait à la fois à la diminution de la dégradation des PG que nous avons constatée, et à favoriser l'accumulation des constituants matriciels dans les régions ostéophytiques. Parmi les nombreux médiateurs capables de moduler le métabolisme chondrocytaire, le TGF β est capable de stimuler la synthèse des constituants matriciels et d'inhiber simultanément leur dégradation. Ces propriétés du TGF β permettent de lui attribuer un rôle essentiel dans le processus d'ostéophytose [Van den Berg, 1995].

2. La section du LCA.

Parmi les nombreux modèles d'arthrose mécanique (instabilité articulaire, incongruence), la section du LCA chez l'animal [Pond, 1973] reproduit une situation traumatique connue chez l'homme qui conduit à l'installation précoce d'une arthrose. Pour cette raison, la section du LCA est devenu le modèle d'arthrose expérimentale de référence pour l'étude de la physiopathologie de l'arthrose [Schwartz, 1981; Williams, 1982; Stockwell, 1983; McDevitt, 1988; Dedrick, 1993; Vilensky, 1997] ou encore des effets de traitements sur l'évolution de la pathologie [Caron, 1996; Hamanishi, 1996; Brandt, 1997]. Il a couramment été décrit chez le chien, le lapin, mais également chez le cobaye et le rat : ce modèle, comme l'injection intra-articulaire de MIA, ne semble pas avoir de spécificité d'espèce.

Notre étude chez le rat, montre que la section du LCA conduit à l'apparition rapide de lésions du cartilage dans le compartiment fémoro-tibial dès 15 jours. Elles se caractérisent par une

hypercellularité et un épaissement du cartilage. D'après le score de Mankin [1971], une hypercellularité du cartilage reflète un stade très précoce du cartilage. Quant à l'épaississement du cartilage, il correspond à une chondromalacie [Ohno, 1988], qui peut être considérée dans certains cas comme le premier stade de l'arthrose. Les forces de cisaillement qui s'exercent en raison de l'instabilité articulaire conduisent à une altération de la couche des petits PG recouvrant la surface du cartilage. Les fibres de collagènes démasquées seraient alors plus sensibles à une rupture mécanique. L'équilibre entre la tension des fibres de collagène et la pression de gonflement liée aux PG est rompu, et le cartilage s'hydrate davantage. Il devient alors plus mou et moins apte à supporter les contraintes [Stockwell, 1983].

Quatre semaines après la section du LCA chez le rat, nous avons constaté des fissurations dans la couche superficielle du cartilage qui s'approfondissent ensuite, atteignant même l'os sous-chondral dans la région antérieure des plateaux tibiaux (J75). Chez le rat, la localisation des érosions du cartilage articulaire dans la région antérieure s'explique par un effet "tiroir" : la position permanente en flexion du genou chez le rat conduit au glissement du fémur sur les bords antérieurs des plateaux tibiaux. Cette zone, qui devient la plus sollicitée mécaniquement, est alors le siège des érosions les plus sévères. Nous avons également constaté dans quelques cas (2 rats sur 5) l'apparition d'ostéophytes volumineux dans la région postérieure des plateaux tibiaux. Ces différents stades caractérisant l'évolution d'une atteinte du cartilage, de la chondromalacie à la fissuration du cartilage, ainsi que la formation des ostéophytes et la condensation de l'os sous-chondral, sont décrits par Brandt [1991] chez le chien après section du LCA. Il semble cependant, que la progression des lésions chez cette espèce soit plus lente : la fibrillation de la couche superficielle du cartilage est en général observée plusieurs mois après la section du LCA.

L'étude en télémetrie met en évidence une phase d'hypomobilité chez les rats à la suite d'une arthrotomie ou de la section du LCA. Le mode d'expression de nos résultats en pourcentage de variation de la mobilité des rats après une arthrotomie ou la section du LCA par rapport aux rats témoins anesthésiés permet de rendre compte des effets propres de ces deux actes chirurgicaux sur les genoux des rats. L'arthrotomie à elle seule conduit à une hypomobilité importante (-36 %) et transitoire, qui peut être attribuée à des douleurs post-opératoires. La section du LCA donne lieu à une diminution plus importante de l'activité spontanée des rats (-52 %, J0) par rapport à une arthrotomie. Pendant plus de 15 jours, la mobilité des rats est diminuée de 20 % en moyenne entre J5 et J15. L'atteinte dégénérative à ce stade ne justifie pas cette hypomobilité persistante. Il est possible qu'elle soit liée à des effets systémiques (une fièvre de quelques jours a été décelée), ou à des douleurs post-opératoires, prenant naissance dans les ligaments ou dans la membrane synoviale.

A l'inverse, à J75, la télémetrie n'a permis de déceler aucune baisse de l'activité spontanée des rats, malgré des érosions du cartilage articulaire atteignant parfois l'os sous-chondral. Une atteinte similaire chez le rat à la suite de l'injection de MIA a pourtant conduit à une perte de la

fonction articulaire. Il est possible que la localisation des lésions au centre des articulations (injection de MIA) ou sur le bord antérieur des plateaux tibiaux (section du LCA) ne conduisent pas de la même manière à une perte de la fonction articulaire. Chez l'homme, aucune relation n'a été montrée entre la sévérité d'une atteinte articulaire et l'intensité des douleurs articulaires.

L'atteinte du cartilage patellaire est plus tardive : la fibrillation de la couche superficielle du centre de la rotule ne survient que 75 jours après la section du LCA. Cette observation histologique n'est pas corrélée à l'augmentation significative du contenu en GAG sulfatés du cartilage centropatellaire (+26 %). Elle s'explique en partie par une augmentation de la synthèse des PG, significative à J15.

Cette augmentation de l'anabolisme des chondrocytes au cours des phases précoces de l'arthrose est classiquement décrite dans ce modèle d'arthrose expérimentale [Schwartz, 1981; Adams, 1995]. Elle a également été constatée dans des échantillons de cartilage humain présentant les signes d'une arthrose débutante [Adams, 1995; CS-Szabo, 1997]. Carney [1992] a également montré qu'à ce stade précoce d'une arthrose induite par la section du LCA chez le chien, la dégradation des constituants matriciels du cartilage n'est pas différente de celle constatée chez des animaux témoins : ces modulations du métabolisme chondrocytaire conduisent à une accumulation des constituants matriciels, comme nous avons pu le constater par le dosage des GAG sulfatés dans le cartilage patellaire. Cette réponse chondrocytaire est interprétée comme la preuve d'une tentative de réparation du cartilage. Cependant, cette phase est transitoire : elle est suivie d'une diminution de la synthèse des PG (-15 %, à J75 $p < 0,05$), qui traduit une souffrance chondrocytaire.

A l'inverse, dans les régions non portantes de la rotule, nous avons constaté une diminution de la teneur en GAG sulfatés du cartilage à la suite de la section du LCA (J75). Elle ne s'accompagne d'aucune variation de la synthèse des PG. Les observations histologiques nous ont permis de constater une inflammation de la membrane synoviale, consécutive à l'arthrotomie. De plus, à la suite de l'effet "tiroir" provoqué par la section du LCA, la rotule ne s'articule plus comme elle devrait dans la gouttière intercondylienne, et le ligament infrapatellaire est hypersollicité : la synovite est plus importante à ce niveau, et elle conduit à une atteinte sévère du cartilage et de l'os sous-chondral sous-jacent. Cette synovite permet d'expliquer la diminution de la teneur du cartilage patellaire en GAG sulfatés, bien qu'aucune variation de la synthèse des PG n'ait été constatée. Elle est une caractéristique du modèle d'arthrose induite par section du LCA [Myers, 1990], et, chez le rat, elle semble prendre une part active à la destruction du cartilage articulaire.

3. Injection intra-articulaire de papaïne et de collagénase .

L'injection intra-articulaire de papaïne est un modèle d'arthrose expérimentale qui a été décrit chez le lapin [Murray, 1964]. Cette arthrose survient en raison de l'activité protéolytique de l'enzyme sur les constituants matriciels du cartilage. L'étiologie de l'arthrose induite par l'injection intra-articulaire de collagénase chez la souris est la même que celle provoquée par la section du LCA : cette enzyme dégrade spécifiquement le collagène de type I qui constitue entre autre les structures ligamentaires : elle conduit à une hyperlaxité ligamentaire et à une instabilité articulaire [Van der Kraan, 1990].

Malgré les perturbations du métabolisme chondrocytaire induites par l'injection intra-articulaire unique de papaïne ou de collagénase bactérienne chez le rat Wistar, nous n'avons constaté qu'une hypercellularité au sein du cartilage (J40). De plus, ces injections intra-articulaires de papaïne ou de collagénase bactérienne dans les genoux des rats n'ont conduit qu'à une hypomobilité précoce consécutive à l'injection. Dans les deux cas, cette hypomobilité s'accompagne d'une fièvre, qui traduit la participation de phénomènes systémiques. Ils s'expliquent par la diffusion de ces enzymes hors du compartiment articulaire et par leur activité protéolytique sur tous les tissus sans distinction.

L'activité protéolytique de la papaïne sur le cartilage, lorsqu'elle est injectée par voie intra-articulaire chez le rat, est mise en évidence par une augmentation brutale de la dégradation des PG. A l'inverse, la synthèse des PG est inhibée de façon transitoire. L'injection intra-articulaire de papaïne chez la souris a conduit à cette même inhibition transitoire de la synthèse des PG : van Osch [1994] a expliqué ce phénomène par une dégradation des protéines membranaires des chondrocytes, et plus particulièrement celle des récepteurs de l'IGF-I, le facteur de croissance qui possède les capacités les plus importantes à stimuler la synthèse des PG. Nous avons ensuite constaté une forte stimulation de l'anabolisme (J1 à J20, +37 % et +25 % respectivement), avant que l'activité chondrocytaire ne soit à nouveau comparable à celle de rotules rats témoins (J40).

L'injection intra-articulaire de collagénase bactérienne chez le rat induit dans un premier temps une inhibition de la synthèse des PG (J0 à J2). Van der Kraan [1990] a attribué ces modulations du métabolisme chondrocytaire aux effets de l'enzyme non pas sur le cartilage mais sur le tissu synovial, qui conduirait par exemple à la production de cytokines ou de protéinases par les synoviocytes. Nous avons d'ailleurs observé une inhibition de la dégradation des PG dès l'injection et jusqu'à J40, démontrant ainsi que cette enzyme n'exerce pas ses effets protéolytiques sur les constituants du cartilage.

L'augmentation de la synthèse des PG dans le cartilage patellaire à la suite de l'injection intra-articulaire de papaïne, à laquelle s'ajoute une diminution de la dégradation des PG dans le cas de l'injection de collagénase, conduisent à une accumulation des constituants matriciels. Van der Kraan [1992] a lui aussi obtenu des résultats comparables concernant la synthèse des PG en

réponse à l'une ou l'autre de ces injections intra-articulaires chez la souris. Par contre, il décrit dans les deux cas l'apparition d'érosions du cartilage dans les régions portantes, et des ostéophytes dans les régions les moins sollicitées [Van der Kraan, 1990]. Il est possible que dans ces deux modèles décrits chez la souris, la contribution des protéinases soit essentielle à l'installation d'un processus dégénératif du cartilage articulaire. A l'inverse, chez le rat, la modulation du métabolisme chondrocytaire que nous avons constaté permettrait de compenser l'atteinte de la matrice du cartilage ou l'hyperlaxité ligamentaire induites respectivement par l'injection de papaïne ou de collagénase.

Cette différence de réponse à l'injection intra-articulaire de collagénase chez le rat par rapport à la souris pourrait s'expliquer par une prédisposition différente de certaines souches à développer une arthrose spontanée : chez les souris C57BL10, l'injection intra-articulaire de collagénase bactérienne conduit au développement d'une arthrose avec une incidence moins importante que chez les souris C57BL6. Il est ainsi possible, que cette même injection de collagénase bactérienne chez des rats d'une souche développant spontanément une arthrose, telle que les rats Fischer [Smale, 1995], conduise à l'installation d'une arthrose.

Dans le cas de l'injection intra-articulaire de papaïne, Havdrup [1982] a constaté que la prédisposition des lapins à développer une arthrose dépendait de leur âge : chez des lapins jeunes, l'injection de papaïne conduit simplement à une hypercellularité du cartilage, comme nous l'avons observé chez le rat. Il a attribué cette réponse chondrocytaire à la déplétion du cartilage en facteurs anti-mitotiques. L'absence d'interactions appropriées entre les chondrocytes et les constituants matriciels après l'action protéolytique de la papaïne pourrait également constituer un signal pro-mitotique. A l'inverse, chez le lapin âgé, l'injection unique de papaïne dans les genoux conduit rapidement à l'apparition de fissures dans le cartilage articulaire, ainsi qu'à une condensation de l'os sous-chondral [Bentley, 1971; Havdrup 1982; Coulais, 1983].

Ainsi, les effets de la papaïne ou de la collagénase bactérienne injectées par voie intra-articulaire peuvent être des facteurs déclenchant l'installation d'un processus dégénératif du cartilage articulaire, qui semble dépendre de la capacité des chondrocytes à compenser l'atteinte articulaire. L'injection intra-articulaire de papaïne par exemple, peut constituer soit un modèle d'étude de la réparation du cartilage, soit un modèle d'arthrose expérimentale.

4. Conclusion.

Chez le rat Wistar, l'hypercellularité du cartilage observée en réponse à l'injection intra-articulaire de papaïne ou de collagénase bactérienne pourrait être le signe d'une arthrose débutante. Cependant, l'injection intra-articulaire de l'une ou l'autre de ces enzymes provoque une phase précoce d'hypomobilité qui est associée à des effets systémiques. Ces injections intra-articulaires de papaïne ou de collagénase bactérienne telles que nous les avons réalisées chez le rat Wistar ne conduisent pas, d'après nos critères, à une arthrose expérimentale.

La section du LCA semble être le modèle le plus prisé d'après la littérature, en raison de sa similarité avec la clinique. Cependant, dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas constaté de phase d'hypomobilité malgré l'atteinte articulaire sévère (mise à nu de l'os sous-chondral dans la partie antérieure des plateaux tibiaux), excepté au cours des phases précoces : nous l'avons attribuée à des douleurs (arthrotomie) et une fièvre post-opératoires. De plus, la synovite qui accompagne le développement de l'arthrose induite par la section du LCA constitue une divergence par rapport à la définition même de l'arthrose. Sa contribution dans la destruction du cartilage, comme nous avons pu le constater, est importante. Il est ainsi difficile de distinguer la participation de la synovite de celle des phénomènes dégénératifs dans la destruction du cartilage. Enfin, il semble difficile d'obtenir une bonne reproductibilité des résultats, tant du point de vue des études macroscopiques (formation des ostéophytes par exemple) que biochimiques.

L'injection intra-articulaire de MIA dans le genou du rat conduit à un processus dégénératif du cartilage articulaire, dont la sévérité a été reliée à l'installation progressive et irréversible du handicap (jusqu'à J30). Dans ces conditions, l'arthrose expérimentale induite chez le rat par l'injection intra-articulaire de MIA dans les genoux reproduit les principaux symptômes cliniques de l'arthrose chez l'homme : la survenue de douleurs articulaires ou d'une gêne fonctionnelle sont à l'origine d'une diminution de la fonction articulaire, et accompagnent une atteinte articulaire sévère. La caractérisation de cette arthrose expérimentale par l'étude de la synthèse des PG dans le cartilage centropatellaire et dans le cartilage péripatellaire a mis en évidence respectivement une forte inhibition de la synthèse et à l'inverse une forte stimulation de l'anabolisme. Ces deux phénomènes contribuent à l'érosion du cartilage dans les régions portantes, et à l'ostéophytose dans les régions non portantes.

Nous avons voulu déterminer dans quelle mesure il était possible de moduler la progression de ce processus dégénératif induit par l'injection intra-articulaire de MIA dans le genou du rat, dans le but d'étudier les phénomènes physiopathologiques au cours des phases précoces de cette arthrose expérimentale, et qui seraient caractérisées par l'absence de handicap.

Chapitre VII

Arthrose induite par l'injection de MIA : réponse dose-dépendante

La modulation de l'atteinte dégénérative du cartilage induite par l'injection intra-articulaire de MIA, dans le genou du rat a consisté à faire varier la quantité de MIA injectée. Les effets des doses de 0,01 mg, 0,03 mg, 0,1 mg, 0,3 mg et 3 mg ont été étudiés, toujours selon les mêmes critères :

- dans la mesure ou le handicap constitue un symptôme caractérisant l'arthrose chez l'homme, nous avons mesuré l'activité spontanée du rat;
- une étude morphologique (macroscopique et histologique) nous a permis de caractériser les lésions dans les différents compartiments articulaires,
- le dosage des GAG sulfatés et la mesure de la synthèse des PG dans le cartilage patellaire nous ont permis de "quantifier" l'atteinte.

Nous avons voulu déterminer s'il existait une relation entre ces différents paramètres, et plus particulièrement par rapport à l'installation d'un handicap.

Les résultats de cette étude, qui a fait l'objet d'une publication placée en annexe à la fin de ce chapitre, sont brièvement rappelés dans le paragraphe qui suit.

Résultats.

La télémetrie nous a permis une nouvelle approche des pathologies articulaires [Gégout, 1994; Otterness, 1993], puisqu'elle permet d'introduire la notion de handicap articulaire chez l'animal, notamment au cours de l'arthrose induite par une injection intra-articulaire de MIA dans les genoux chez le rat : l'installation progressive d'une hypomobilité irréversible à partir de J15 définit, au cours de l'évolution de cette arthrose expérimentale, une phase symptomatique, comparable à la manifestation clinique de l'arthrose chez l'homme qui signale une atteinte articulaire sévère.

La télémetrie nous a permis de mettre en évidence deux phases d'hypomobilité en réponse à l'injection intra-articulaire de MIA chez le rat. La première survient aussitôt après l'injection. Elle est transitoire, et surtout dose-dépendante : la perte de mobilité la plus importante est induite par les plus fortes doses (0,1 à 3 mg, -17 à -48 % respectivement à J2, par rapport à la période de référence précédant le jour d'induction). En raison de l'absence d'effets systémiques (phase apyrétique), nous avons attribué cette hypomobilité précoce à des sensations douloureuses en

rapport avec la nature et la concentration du produit injecté : l'injection infra-patellaire de sérum physiologique ou d'une faible dose de MIA (0,01 et 0,03 mg) ne conduisent à aucune diminution de la mobilité spontanée du rat.

Les deux plus fortes doses de 0,3 et 3 mg conduisent à une seconde phase d'hypomobilité qui s'installe à partir de J15. Cette fois, le profil de l'installation de cette hypomobilité ne montre aucune relation avec la dose : elle est progressive et irréversible jusqu'à J30. Aucune fièvre n'a été décelée tout au long de l'expérience (J0 à J30) : là encore, cette diminution de l'activité spontanée des rats ne peut être liée à des effets systémiques, comme c'est le cas dans des modèles d'arthrite aiguë ou chronique induites chez le rat respectivement par l'injection intra-articulaire de zymosan [Gégout, 1994] ou d'Adjuvant complet de Freund [Phillipe, 1997].

Quinze jours après l'injection intra-articulaire des deux fortes doses de MIA (0,3 et 3 mg) dans le genou du rat, une mise à nu de l'os sous-chondral dans les régions portantes et des ostéophytes volumineux ont été observés. A l'inverse, les doses plus faibles (0,03 et 0,1 mg), qui ne conduisent à aucune perte de la mobilité spontanée des rats, ne conduisent qu'à une atteinte modérée du cartilage. Ainsi, l'installation progressive d'un handicap à J15 aurait pour origine des douleurs prenant naissance dans l'os sous-chondral et la membrane synoviale [Perrot, 1996].

Cette mise à nu de l'os sous-chondral après l'injection des fortes doses a été confirmée par l'étude histologique. Les plus faibles doses ont conduit à une hypertrophie transitoire du cartilage articulaire (0,03 mg, J15), qui a également été décrite par d'autres auteurs [Brandt, 1991; Van der Kraan, 1992]. L'évolution trop rapide des lésions en réponse à l'injection des doses élevées de MIA (0,3 et 3 mg) n'ont pas permis d'observer cet état transitoire du cartilage. Dans les régions non portantes ostéophytiques, les chondrocytes ont proliféré et donné naissance à des clusters.

La sévérité des lésions observées 15 jours après l'injection des fortes doses de MIA (0,3 et 3 mg), lorsque le handicap s'installe, se traduit par des variations significatives de la concentration en GAG sulfatés dans le cartilage centropatellaire et péripatellaire : elle est diminuée dans le centre de la rotule et augmentée dans les régions péripatellaires. Dans le cas de l'injection de la dose de 0,03 mg, qui ne conduit à l'installation d'aucun handicap, les concentrations en GAG sulfatés dans le cartilage centropatellaire et dans le cartilage péripatellaire ne sont pas significativement altérées.

La teneur du cartilage en GAG sulfatés résulte à la fois de la synthèse des PG et de leur dégradation. L'injection de MIA dans les genoux des rats conduit à des variations de la synthèse des PG, évaluée par l'incorporation *ex vivo* de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$, qui dépendent à la fois du site articulaire considéré, et de la dose injectée.

Dans le centre de la rotule, l'anabolisme est diminué de façon irréversible en réponse à l'injection de doses de 0,3 et 3 mg de MIA. Par contre, la dose de 0,03 mg conduit à des inhibitions

successives de la synthèse des PG, qui alternent avec des taux d'incorporation de ^{35}S comparables à ceux de rotules de rats témoins (J6 et J20).

Dans le cartilage péripatellaire, la variation de l'anabolisme chondrocytaire dépend de la dose : l'injection de 3 mg de MIA conduit à une inhibition importante de la synthèse à J2 (-85 %). Puis les taux d'incorporation retrouvent progressivement des niveaux comparables à ceux d'un cartilage sain (J20). La dose inférieure de 0,3 mg provoque dans un premier temps une inhibition de la synthèse des PG (J2), puis une forte stimulation de l'anabolisme (+80 %, J10) qui reflète les premiers signes d'une ostéophytose [Williams, 1989]. Enfin, la plus faible dose (0,03 mg) conduit à des augmentations successives de la synthèse des PG dans le cartilage péripatellaire.

Ces variations de la synthèse des PG à la suite de l'injection infra-patellaire de MIA peuvent être attribuées à un métabolisme différent des chondrocytes des régions portantes et non portantes [Van Osch, 1994], en raison d'une différence de sollicitation mécanique du cartilage entre ces régions. En effet, la concentration en GAG sulfatés est plus importante dans le centre des rotules par rapport au cartilage péripatellaire. Il est possible que des concentrations plus élevées en GAG sulfatés permettent de mieux compenser les plus fortes sollicitations mécaniques dans le centre de la rotule. Pourtant, la densité cellulaire du cartilage dans les régions portantes est moindre [Eggli, 1988] : les chondrocytes du centre de la rotule auraient ainsi un métabolisme plus actif, et seraient plus sensibles aux effets du MIA.

L'inhibition de la synthèse des PG, quelle que soit la dose considérée, et son augmentation dans les régions non portantes explique en partie la diminution et l'augmentation respectives de la concentration en GAG sulfatés dans le cartilage centropatellaire et péripatellaire. Ces variations du métabolisme contribuent également à l'érosion du cartilage dans les zones portantes, et à la formation des ostéophytes dans les régions les moins sollicitées.

En résumé, le modèle d'arthrose induite par l'injection intra-articulaire de MIA présente plusieurs avantages : elle conduit au développement de lésions articulaires caractéristiques d'une arthrose chez l'homme, avec à la fois des érosions du cartilage et une ostéophytose. Grâce à la télémetrie, nous avons pu mettre en évidence une diminution précoce et transitoire de l'activité spontanée des rats, dont l'amplitude et la durée dépendent de la dose injectée. Elle a été attribuée à des sensations douloureuses induites par le MIA. La survenue d'un handicap plus tardif est liée à des érosions du cartilage atteignant l'os sous-chondral. L'évolution progressive et irréversible de ce handicap reflète la progression du processus dégénératif, et peut résulter à la fois de douleurs articulaires mais également d'une gêne fonctionnelle.

La télémetrie a ainsi permis de caractériser l'évolution de l'arthrose induite par l'injection intra-articulaire de MIA dans les genoux chez le rat par une phase précoce et une phase tardive, déterminées par l'installation d'un handicap (J15). Ces caractéristiques de la pathologie

expérimentale évoquent les symptômes cliniques d'une arthrose chez l'homme, à savoir la survenue d'un handicap lorsque la destruction articulaire est avancée.

Nous avons ainsi exploité ce modèle d'arthrose expérimentale chez le rat selon deux aspects :

- les fortes doses qui induisent une hypomobilité précoce ont permis d'apprécier l'efficacité de différents traitements à moduler les douleurs articulaires. L'installation du handicap à J15 a également permis de définir une phase précoce, au cours de laquelle des méthodes d'imagerie ont été évaluées pour déceler une atteinte bénigne du cartilage.
- La plus faible dose de 0,03 mg de MIA permet d'étudier les phases précoces de l'arthrose dans ce modèle, pour essayer d'en définir les mécanismes physiopathologiques. L'intérêt de cette faible dose est d'autant plus grand qu'il a été montré chez la souris une diminution de l'activité de certaines enzymes de la glycolyse en fonction de l'âge, associée à l'apparition de manifestations dégénératives dans le cartilage articulaire [Pataki, 1980].

MONO-iodoacetate-INDUCED EXPERIMENTAL OSTEOARTHRITIS

A Dose-Response Study of Loss of Mobility, Morphology, and Biochemistry

CORINNE GUINGAMP, PASCALE GEGOUT-POTTIE, LIONEL PHILIPPE, BERNARD TERLAIN,
PATRICK NETTER, and PIERRE GILLET

Objective. To characterize the dose-responsiveness of morphologic and biochemical chondral changes relative to mobility in mono-iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis (OA) in rats.

Methods. Rat mobility was assessed by biotelemetry. Articular lesions were characterized by macroscopic and histologic examinations. Cartilage proteoglycan metabolism was evaluated by the 1,9-dimethylmethylene blue dye binding assay and by radiosulfate incorporation in patellar cartilage.

Results. Spontaneous locomotor activity was rapidly, transiently, and dose-dependently decreased after MIA injection into rat knees (primary response). Thereafter, only high doses (0.3 mg and 3.0 mg) led to a secondary progressive long-term loss of spontaneous mobility on day 15, when subchondral bone was exposed. These 2 doses resulted in significant changes in cartilage proteoglycan concentration at day 15 and a strong inhibition of anabolism in the peripheral patellae by day 2, contrasting with the effects of lower doses (0.01, 0.03, and 0.1 mg).

Conclusion. When a sufficient dose of MIA is used, this model can easily and quickly reproduce OA-like lesions and functional impairment in rats, similar to that observed in human disease. These parameters, as well as proteoglycan metabolism, could serve as indicators for studying chondroprotective drugs, or

for evaluating the ability of imaging techniques to detect and evaluate chondral lesions.

Osteoarthritis (OA) is a degenerative disease of the joints, which is characterized by fibrillation and erosion in cartilage, chondrocyte proliferation and osteophyte formation at the joint margins, and sclerosis of subchondral bone. These changes result from poorly understood events occurring over a long period, and are characterized by both cartilage matrix degradation and inhibition of matrix component synthesis (1). At late stages of the disease, articular damages eventually lead to joint impairment and pain. Many experimental models mimicking the lesions of OA have been developed to study the pathophysiology of the disease and to evaluate the putative chondroprotective properties of antirheumatic drugs. Experimental OA animal models can be classified according to the etiology by which they are induced (2): load impact-induced trauma (3), surgically induced (4-7) or enzymatically induced (8) joint instability, extracellular matrix damages (9-11), or disturbances of chondrocyte metabolism induced by substances such as mono-iodoacetate (MIA) (12), vitamin A, and steroids (for review, see ref. 13).

Unlike spontaneous OA (14-17), experimental induction of OA in animals makes it possible to influence the onset and course of the disease. OA-like lesions in various models have already been studied macroscopically, histologically, and biochemically, to assess the role of mediators such as cytokines (18,19), growth factors (20), proteases (21), and other mediators (22) in OA pathophysiology, and to evaluate biologic markers. Recent studies suggest that, as in humans, a clinical parameter such as spontaneous mobility also may be useful as an indicator of joint impairment in animals. Spontaneous mobility has recently been highlighted as a pertinent index in lipopolysaccharide-induced arthritis in

Supported by grants from Contrat de Recherche Externe INSERM 930910, and Projet Hospitalier de Recherche Clinique.

Corinne Guingamp, BSc, Pascale Gegout-Pottie, PhD, Lionel Philippe, BSc, Bernard Terlain, PhD, Patrick Netter, MD, PhD, Pierre Gillet, MD, PhD: Faculté de Médecine, Vandoeuvre-les-Nancy, France.

Address reprint requests to Patrick Netter, MD, PhD, Department of Pharmacology, URA CNRS 1288, Faculté de Médecine, Avenue de la Forêt de Haye, BP 184, F 54505 Vandoeuvre-les-Nancy, France.

Submitted for publication November 4, 1996; accepted in revised form April 29, 1997.

hamsters (23) and zymosan-induced arthritis in rats (24), but no such information is available about spontaneous mobility in OA models that use rodents. Rodents are useful species for such studies because their nyctohemeral activity has been studied extensively, and many models of OA have been developed that use mice, hamsters, and rats. Injection of MIA into a joint is known to rapidly induce OA-like lesions in both rodent and nonrodent models (e.g., guinea pigs, rats, mice, hens, and horses) (25–29).

Since our previous results had suggested that a loss of spontaneous mobility could be detected in this model (30), we set out to assess spontaneous mobility during MIA-induced OA in the rat, relative to the doses of MIA injected into the knee joint. Macroscopic and biochemical comparisons were performed to detect the most prominent disturbance characterizing or leading to joint dysfunction.

MATERIALS AND METHODS

Induction of OA. Male Wistar rats weighing 150 gm (Charles River, Saint-Aubin-les-Elbeuf, France) were housed in solid-bottomed plastic cages designed to allow easy access to standard laboratory food and water *ad libitum*. Rats were kept in a 12:12 light–dark cycle (light-on period, 6:00 AM–6:00 PM) in a controlled temperature chamber (mean $\pm$ SD $24 \pm 1^\circ\text{C}$). Various doses of MIA (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, or 3.0 mg; Merck-Clevenot, Nogent-sur-Marne, France), dissolved in 50 μl of sterile physiologic saline solution, were injected through the infrapatellar ligament. On day 0, the right knee joint was injected with MIA. For biochemical and histologic studies, the left knee received sterile saline and served as the control.

Determination of mobility by biotelemetric analysis. Spontaneous mobility was recorded hourly using battery-operated biotelemetric transmitting devices (1.8 cm in diameter, 4.5 gm, VM-FH Disc, Mini-Mitter, Data Quest 3 system of analysis; Sunriver, OR) implanted intraperitoneally under sterile conditions (31,32). Rats were housed in individual plastic cages that were kept on the receiver plates. Activity measurement was based on the changes produced in the orientation of the implanted transmitter relative to the stationary receiver as the rats moved around, resulting in a change in the strength of the signal detected by the receiver, which thereupon transmitted a pulse of activity to the computer. The rat, being nocturnal, begins to move spontaneously after the onset of darkness. Therefore, only activity during the light-off period was measured (in pulses/hour). After a period of adaptation of 5 days following surgical implantation of the transmitter, rat spontaneous nocturnal mobility was assessed.

For biotelemetric studies, both rat knees were injected with MIA to optimize the sensitivity of the measure. Control rats received intraarticular injections of saline bilaterally. Two different experiments were performed. To study the effect on spontaneous mobility of injection of MIA into rat knees, the first experiment used a 3.0-mg dose of MIA ($n = 24$, compared with 24 saline-injected controls). In the second experiment, to

establish the dose response, 4 doses of MIA (0.01, 0.03, 0.1, and 0.3 mg) were injected intraarticularly into rat knees ($n = 8$ rats per group). Control rats ($n = 8$) received saline. Results of both experiments are presented together and are expressed as the mean percentage of variations of rat mobility versus the value on the night of reference (day -1), which was just before intraarticular injection (day 0). The value for each animal was normalized to this given night, and therefore, each animal served as its own control.

Macroscopic study. On day 30, at the end of the telemetric study, rats were anesthetized intraperitoneally with ketamine hydrochloride (50 mg/kg) and acepromazine (1.25 mg/kg), and killed by cervical dislocation. Since each rat received bilateral injections of either MIA or saline for the biotelemetric studies, we isolated only the right knee of each rat for macroscopic study ($n = 8$ per group), which was then carefully dissected to assess the severity of chondral alterations. The left knee was not scored in this study, because the left patellae were used for determining the sulfated glycosaminoglycan (GAG) concentration (see below). Macroscopic lesions were graded as follows: 0 = normal appearance; 1 = slight yellowish discoloration of the chondral surface; 2 = little cartilage erosions in load-bearing areas; 3 = large erosions extending down to the subchondral bone; and 4 = large erosions with large areas of subchondral bone exposure.

Each of the chondral compartments of the knee (the medial and lateral femoral condyles, the medial and lateral tibial plateaus, the patella, and the femoral groove) was graded separately by 2 observers (CG, PG) who were blinded to the induction procedure. The 6 compartment scores were combined (for a maximum possible score of 24) and the mean was determined for each group.

Histologic study. On days 15 and 30 ($n = 5$ rats per group), rats were killed and the whole knee joints that had been injected with either MIA (right knee) or saline (left control knee) were fixed immediately with 10% formalin, decalcified, and embedded in paraffin. Sagittal sections were prepared and stained with hematoxylin–eosin–Safran or Safranin O–fast green.

Cartilage metabolism. Measurement of proteoglycan synthesis. Proteoglycan synthesis was assayed as described by van den Berg et al (33), with some modifications (24). Rats were killed as described earlier, and the patellae from the injected right knees and the control left knees were carefully dissected out. They were placed in 2 ml of medium consisting of RPMI 1640 with HEPES and sodium bicarbonate, supplemented with L-glutamine (2 mM), penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), and $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (0.7 $\mu\text{Ci/ml}$; Amersham, Les Ulis, France). After incubation for 3 hours (37°C , 5% CO_2), patellae were washed with 10 ml of cold (4°C) physiologic saline solution and fixed overnight in 0.5% cetylpyridinium chloride (Sigma) in phosphate buffered formalin. After decalcification in 5% formic acid for 6 hours, the central area of the patella was sampled with a 2 mm-diameter biopsy punch (Stiefel, Nanterre, France). The punched-out patellae and the remaining peripheral part of the patellae were separately dissolved overnight in 0.5 ml of Soluene-350 (Packard, Rungis, France). The amount of ^{35}S -sulfate incorporated in each compartment was counted using scintillation fluid (Hionic Fluor; Packard).

Results are expressed as the differences between the MIA-injected right patellae and left control patellae in the mean percentage of ^{35}S incorporated.

Determination of sulfated GAG concentrations. On day 15 (at the onset of the secondary loss of mobility) and day 30 (at the end of the biotelemetric studies), the patellae were carefully isolated and placed overnight in 5% formic acid for decalcification. A 2 mm-diameter sample of central patella was punched out, and cartilage was stripped from the underlying bone. The sulfated GAG content was assessed in both the central punched-out and the peripheral patellar cartilage by the 1,9-dimethylmethylene blue assay (34), adapted for small pieces of tissue. Cartilage samples were previously air-dried and weighed on a Sartorius scale (2024 MP model, limit of precision = 0.01 mg) before enzymatic digestion. An additional experiment showed that a previous tissue fixative step in 0.5% cetylpyridinium chloride in phosphate buffered formalin was not necessary. Results are expressed as the total sulfated GAG content (in μg) per mg of cartilage dry weight.

Statistical analysis. Data for each group are presented as the mean $\pm$ SEM. The different groups were compared using Student's *t*-test (paired values) for the different parameters, except for the biotelemetric studies, in which locomotor activity in experimental and control groups was compared using repeated-measures analysis of variance, followed by Fisher's *t*-test. A *P* value of less than 0.05 was taken as significant in all cases.

RESULTS

Mobility changes after intraarticular injection of MIA. In the rats injected with 3.0 mg of MIA (as adapted from previous studies in mice [27]), the response was biphasic, whereas the activity of the saline-injected control rats was constant from day to day (Figure 1). The spontaneous nocturnal activity after a dose of 3.0 mg was strongly decreased by days 1 and 2, and had returned to normal control values by day 5 (primary loss of mobility). After recovering normal activity levels, rats injected with 3.0 mg of MIA became progressively less active from day 15 to day 30 (the end of the telemetric study). The dose of 0.3 mg of MIA had a similar effect on spontaneous mobility in rats. The lower dose of 0.1 mg of MIA was the only dose (versus the other low doses of 0.01 mg and 0.03 mg) to provoke a primary transient loss of mobility (Figure 1). Thereafter, these low doses induced no changes in rat activity throughout the experiment.

Macroscopic study. Cartilage lesions were scored at the end of the experiment, on day 30. Their severity varied with the doses of MIA injected into the joint and with the articular compartments studied (Figure 2). The 2 highest doses that led to functional impairment (0.3 and 3.0 mg) provoked lesions affecting the whole of the articular surface, with large chondral erosions and expo-

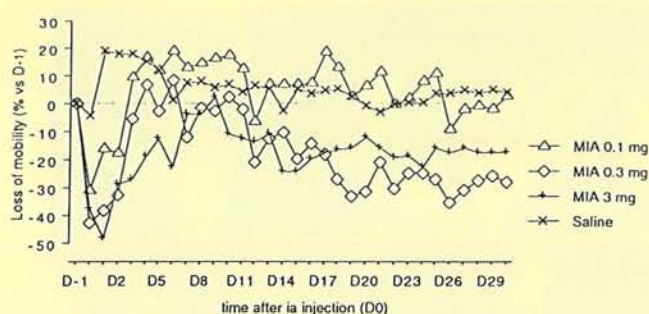


Figure 1. Biotelemetric assessment of the spontaneous nocturnal mobility of rats from day 0 (D0) to day 30. On day 0, both rat knees were injected intraarticularly (ia) with either saline (controls) or various doses of mono-iodoacetate (MIA) (3.0, 0.3, 0.1, 0.03, or 0.01 mg). Results are expressed as the percentage loss of nocturnal mobility versus the preinjection reference day (D -1) (mean of 2 experiments; see Materials and Methods). Locomotor activity was significantly altered in the 3.0-mg and 0.3-mg MIA batches compared with controls ($P < 0.05$, by repeated-measures analysis of variance from day 0 to day 30, followed by Fisher's *t*-test,) but was not different in the other batches versus controls (for the sake of clarity, the results for the 0.03-mg and 0.01-mg batches have not been depicted in this figure). Note that the results for the 3.0 mg and 0.3 mg batches are not statistically significantly different from each other.

sure of subchondral bone (lesions graded 21.56 and 22.78, respectively) in both the tibial plateaus and femoral condyles (Table 1). The patella and femoral groove were always less affected, as can be seen from the macroscopic score. Large osteophytes were present in the periphery of the femoral condyles and tibial plateaus. In knees injected with 0.03 or 0.1 mg of MIA, lesions by day 30 were less severe. The cartilage on the central load-bearing areas of each articular surface was thin and yellowish, with focal erosions on the femoral condyles and tibial plateaus (lesions graded 8.00 and 13.45, respectively). The lowest experimental dose, 0.01 mg, induced no macroscopic changes under our experimental conditions.

Histologic study. At day 15 after administration of 0.3 or 3.0 mg of MIA (Figure 3), sclerosed subchondral bone was exposed in the tibialfemoral compartment. In the femoropatellar joint, Safranin O staining of the cartilage was greatly reduced, and beneath cartilage erosions, subchondral bone sclerosis was seen. Large osteophytes were present at the joint margins, as were clusters of chondrocytes, which showed increased density of the pericellular matrix when stained with Safranin O. The synovial membrane was hyperplastic and fibrotic, with a slight infiltration of mononuclear leukocytes at the higher doses of MIA. On day 15 after injection with 0.03 or 0.1 mg of MIA, cartilage was thicker and reduced Safranin O staining was observed. Clusters (at both 0.03-

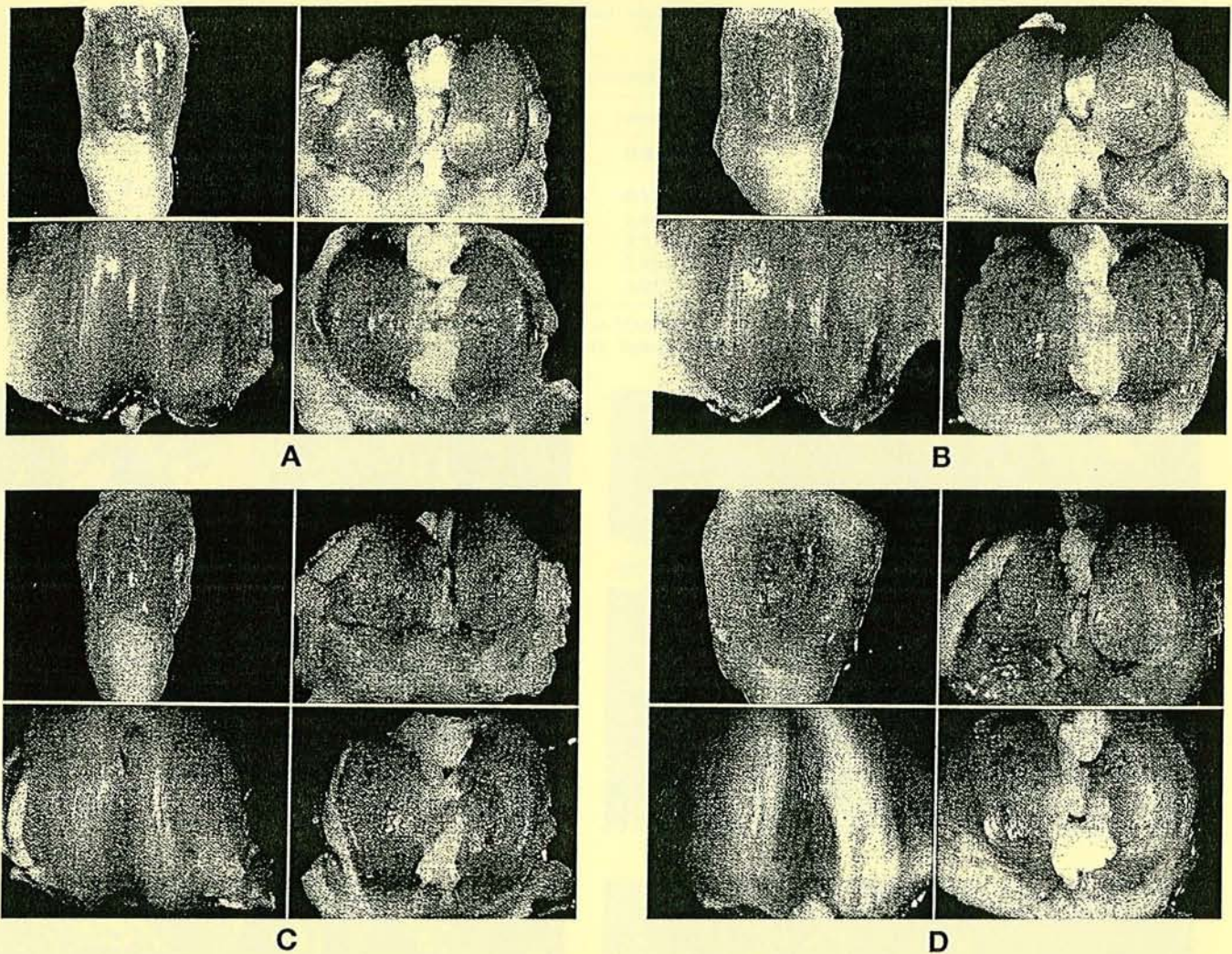


Figure 2. Macroscopic features of osteoarthritic lesions in the various groups studied, on day 30. The right knees of 8 rats per group were carefully dissected under a magnifying glass. The different articular surfaces shown in each part of the figure are the patella (upper left), femoral groove (lower left), femoral condyles (upper right), and tibial plateaus (lower right). **A**, No macroscopic lesions can be seen in the normal rat knee, similar to the findings in the 0.01-mg mono-iodoacetate (MIA) treatment group. **B**, After intraarticular injection with 0.03 mg MIA, central patellar erosions of hyaline cartilage are apparent and can also be seen in weight-bearing areas of the femoral condyles and tibial plateaus. **C**, In the 0.1-mg MIA group, cartilage erosions are more pronounced, and osteophytosis is apparent in the femoral groove and peripatella. **D**, In the 0.3-mg and 3.0-mg MIA batches, large subchondral bone exposures are present in the different compartments, and osteophytosis is prominent in the peripatella and femoral groove.

and 0.1-mg doses) and small osteophytes (at 0.1 mg) formed at the joint margins. The synovial membrane looked normal and contained no inflammatory cells.

On day 30 after injection with 3.0 mg of MIA (data not shown), cartilage no longer covered the bony epiphysis. Subchondral bone was greatly remodeled, with a lamellar organization paralleling the surface. After 0.3-mg injection, subchondral bone was exposed in the femorotibial compartment. There was only slight cartilage staining with Safranin O in osteophytes. At lower doses of MIA (0.03 and 0.1 mg), cartilage was

thinner and Safranin O staining was decreased in the central parts of the articular cartilage by day 30. Cartilage in the central part of the tibiofemoral joint was also depleted of chondrocytes, which had proliferated and formed clusters at the joint margins. Osteophytes were observed at day 30 only after doses of higher than 0.1 mg were administered. The higher the dose of MIA, the more hyperplastic and fibrotic was the synovial membrane.

Effects of MIA doses on cartilage proteoglycan anabolism. We first evaluated the effects of MIA injection into the right knee on the ex vivo proteoglycan

Table 1. Macroscopic appearance on day 30 after injection of saline or various doses of mono-iodoacetate (MIA) into rat knees*

Injection	Patella	Femoral groove	Tibial plateaus		Femoral condyles		Total score
			Medial	Lateral	Medial	Lateral	
Saline, 50 μ l	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 $\pm$ 0.00
MIA, mg							
0.01	0.00	0.00	0.44	0.55	0.00	0.00	1.00 $\pm$ 0.37
0.03	1.22	0.33	2.11	1.44	1.55	1.33	8.00 $\pm$ 0.82
0.10	2.22	1.22	2.67	2.33	2.33	2.67	13.45 $\pm$ 0.75
0.30	3.11	3.00	3.56	3.89	4.00	4.00	21.56 $\pm$ 0.50
3.00	3.33	3.78	3.89	3.89	3.89	4.00	22.78 $\pm$ 0.49

* Scoring system for macroscopic lesions is detailed in Materials and Methods. Total score is the sum of the score for each compartment (maximum score 24). Values are the mean $\pm$ SEM of 2 experiments.

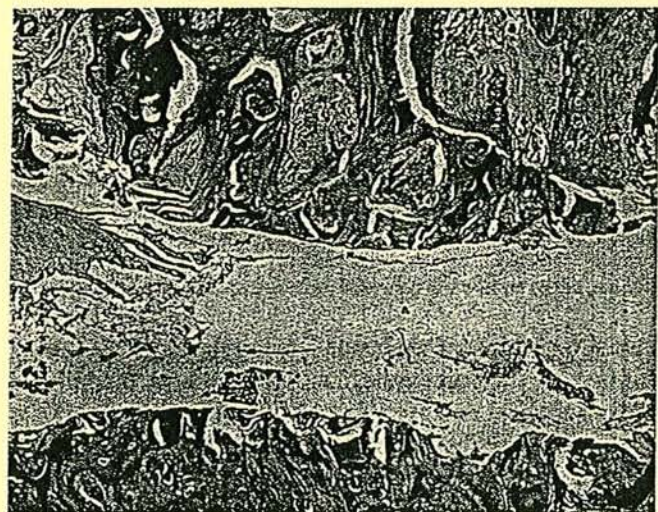
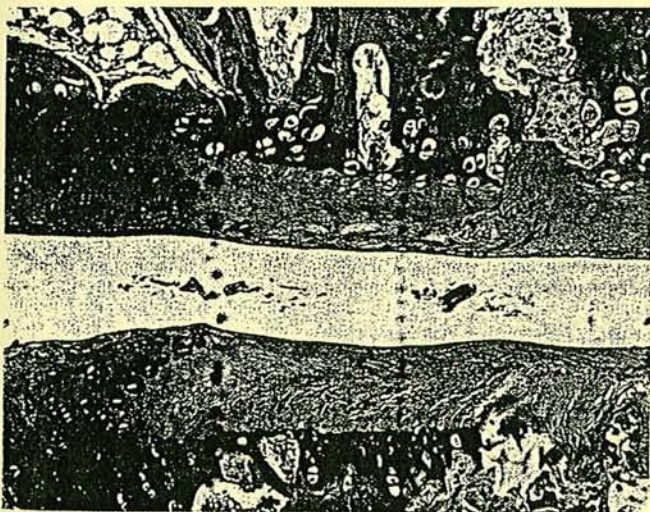
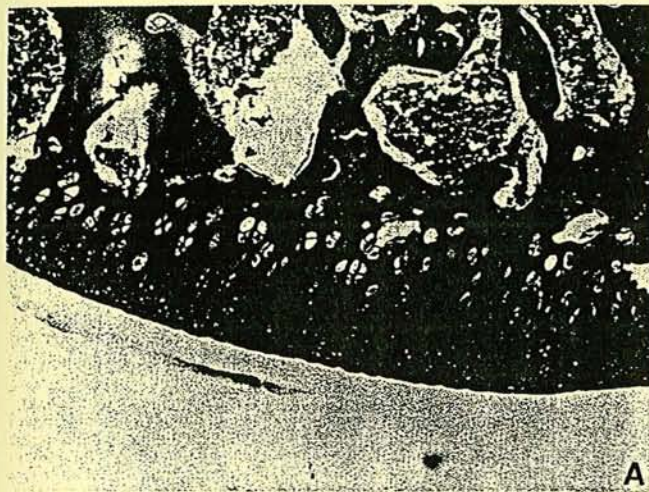
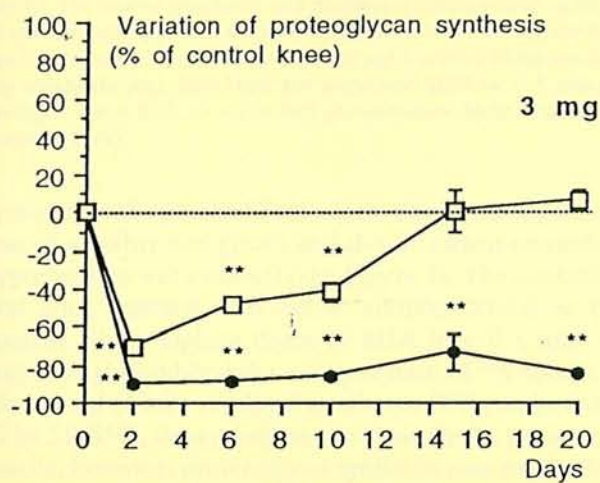


Figure 3. Histologic sagittal section of rat knee joints on day 15 after intraarticular injection of saline (A), 0.03 mg mono-iodoacetate (MIA) (B), 0.1 mg MIA (C), or 0.3 mg MIA (D). A, Normal femoral cartilage shows a thickness of $\sim 250 \mu\text{m}$. A similar appearance was observed in the 0.01-mg MIA group. B, Note the hypertrophy of the cartilage with clusters at the surface. A diffuse depletion of proteoglycan is obvious as compared with calcified cartilage. C, Thinning of the cartilage in weight-bearing areas, with loss of Safranin O staining. Osteoid tissue is present in subchondral bone. D, Complete erosion of the cartilage, subchondral sclerosis, and fibrous synovitis, with lesions of the meniscus. (Safranin O-fast green stained, original magnification $\times 100$.)

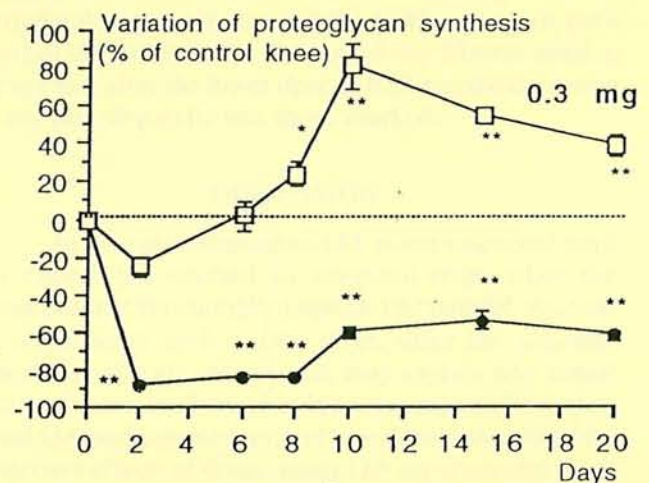
Table 2. Spontaneous mobility in rats throughout the experiment (day 0 to day 30) and proteoglycan synthesis on day 2 and day 20 after intraarticular injection (day 0) of sterile saline or various doses of mono-iodoacetate (MIA)*

Injection	Rat mobility, <i>P</i>	³⁵ S incorporation			
		Day 2		Day 20	
		Central	Peripheral	Central	Peripheral
Saline, 50 μ l	—	2.52 $\pm$ 7.75	-2.54 $\pm$ 7.2	5.81 $\pm$ 1.05	3.06 $\pm$ 3.65
MIA, mg					
0.01	NS (n = 8)	4.92 $\pm$ 4.11	14.54 $\pm$ 8.09	3.77 $\pm$ 5.24	11.91 $\pm$ 5.37
0.03	NS (n = 8)	-52.78 $\pm$ 10.67†	19.41 $\pm$ 10.06	-17.29 $\pm$ 5.33†	3.61 $\pm$ 7.09
0.10	NS (n = 8)	-87.18 $\pm$ 0.95†	9.68 $\pm$ 7.53	-51.11 $\pm$ 6.85†	22.14 $\pm$ 7.12†
0.30	<0.05 (n = 8)	-88.32 $\pm$ 0.98†	-25.01 $\pm$ 4.84†	-56.2 $\pm$ 3.48†	30.98 $\pm$ 3.74†
3.00	<0.05 (n = 24)	-90.01 $\pm$ 1.23†	-70.38 $\pm$ 3.27†	-84.31 $\pm$ 1.16†	6.88 $\pm$ 5.6

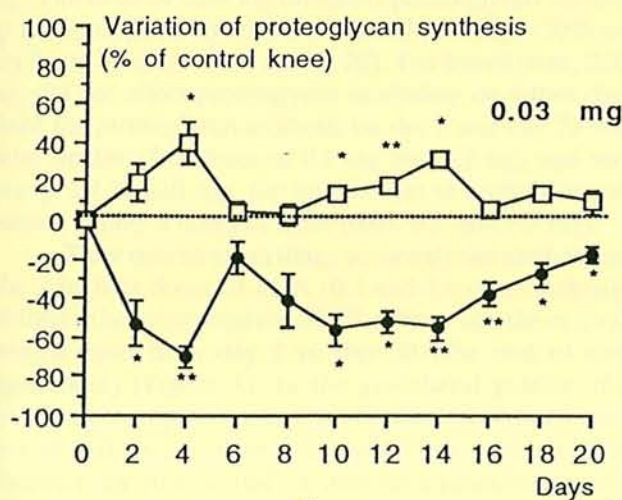
* Values for ³⁵S incorporation are the mean $\pm$ SEM percentage (n = 5 rats per group) of proteoglycan synthesis in the patellae of the right knee versus the left control knee. *P* values for rat mobility (versus saline-injected control rats, n = 32) are by repeated-measures analysis of variance. NS = not significant. † *P* < 0.05 versus the left control knee, by Student's *t*-test.



A



B



C

Figure 4. Time course of proteoglycan synthesis in patellar cartilage, as measured by $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ incorporation after intraarticular injection of various doses of mono-iodoacetate (MIA) in the right knee joint of rats. A, 3.0 mg. B, 0.3 mg. C, 0.03 mg. The contralateral knee (control) received saline. Results are expressed as the percentage of change in ³⁵S incorporation in the central (●) and peripheral (□) parts of the patella in the right knee versus the left control knee (n = 5 per group in 2 repeated experiments). Bars show the mean $\pm$ SEM. * = *P* < 0.05; ** = *P* < 0.01 versus control, by Student's *t*-test.

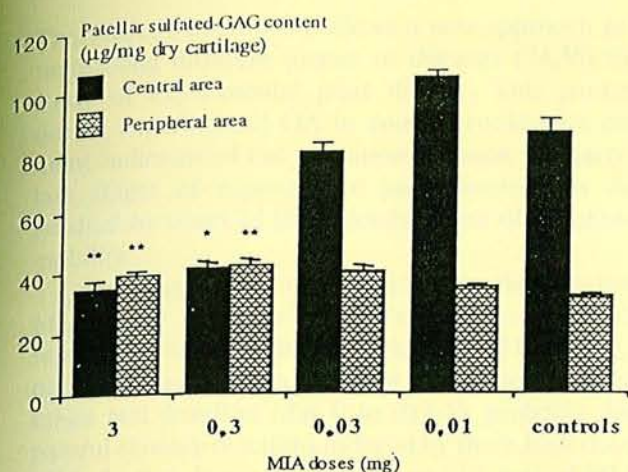


Figure 5. Measurement of the patellar sulfated glycosaminoglycan (sulfated-GAG) content after intraarticular injection of monoiodoacetate (MIA) (3.0, 0.3, 0.03, or 0.01 mg) into the rat knee joint at day 15. The central punch-out and peripheral sulfated-GAG contents of patellar cartilage were assessed by the 1,9-dimethylmethylene blue dye binding assay. The GAG amount (in μg) is related to the cartilage dry weight (in mg). Bars show the mean and SEM ($n = 5$ rats per group). * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$ versus control, by Student's t -test (paired values).

synthesis in the patella (Table 2) on day 2 (when primary loss of mobility was great) and day 20 (when secondary hypomobility was evident) (see Figure 1). The contralateral knee injected with saline solution served as the control. The 3 highest doses of MIA (0.1, 0.3, and 3.0 mg) strongly inhibited the incorporation of ^{35}S -sulfate in the central patella on day 2 by almost 90%, and on day 20 by 51–85%, depending on the dose. In the peripheral patella, however, proteoglycan synthesis rose to 20–30% above the normal level, except at the highest dose of 3.0 mg. The dose of 0.03 mg inhibited proteoglycan synthesis less strongly in the patellar central part (by ~50% on day 2 and by only ~20% on day 20). The lowest dose, 0.01 mg, did not affect proteoglycan anabolism on either day. Since the proteoglycan synthesis on day 2 and day 20 was quite similar after doses of 0.1 mg and 0.3 mg, and was unaffected by 0.01 mg, the time course of anabolism was studied at only 3 doses of MIA (0.03, 0.3, and 3.0 mg).

Time course of cartilage proteoglycan anabolism.

The 2 highest doses of MIA (0.3 and 3.0 mg) markedly inhibited the incorporation of ^{35}S -sulfate into the central patellar area from day 2 to day 20 (the end of this experiment) (Figure 4). In the peripheral patella, the chondrocyte response was dose dependent. After injection of 3.0 mg, proteoglycan anabolism was strongly inhibited (by 70% at day 2), and then gradually recovered (by day 15). After 0.3 mg, however, the joint

margins exhibited a marked uptake of ^{35}S between days 8 and 20, and reached up to 80% by day 10. Interestingly, after the dose of 0.03 mg, anabolism variations were characterized by returns toward initial values at day 6 and day 20, in both parts of the patella.

Patellar sulfated GAG concentration. Sulfated GAG levels in the patellae were assessed on day 15 (Figure 5), when the secondary loss of spontaneous mobility induced by the 2 highest doses of MIA (0.3 and 3.0 mg) was detected, and at the end of the telemetric experiment (day 30, data not shown). In control rats, the concentration of sulfated GAG was 3 times as high in the central part of the patella as in the peripheral area (85 μg and 31 μg per mg of dried cartilage, respectively, on day 15). After the doses of 0.3 and 3.0 mg, the concentrations of sulfated GAG in the 2 regions of the patella differed significantly from those in the controls, being much lower in the center and much higher in the peripheral region of the patella (~40 $\mu\text{g}/\text{mg}$ in both parts of the patella). The findings at day 30 were similar, except that after the lower dose of 0.03 mg, the depletion in the central patella was more marked.

DISCUSSION

In humans, established OA is not suspected until the disease has reached an advanced stage, when the joints become functionally impaired or painful. Arousal of suspicion at such a late stage, after the articular lesions are already very severe, may explain why actual treatments are ineffectual at inducing repair. To understand OA pathophysiology and to evaluate the chondroprotective effects of drugs, many OA experimental models have been developed. In this study, OA was induced in rats by intraarticular injection of MIA into the knee joint. This easy and rapid method of intraarticular injection into the rat knee joint also has the great advantage of easily modulating the progression and severity of the articular lesions by modifying the concentration of MIA.

In this study, using morphologic and biochemical parameters, we have characterized the progression of the disease induced in rats by different doses of MIA. In addition, we assessed rat spontaneous mobility by biotelemetry throughout the progression of the experimental joint disease. Biotelemetry has the great advantage of providing continuous monitoring of rat spontaneous mobility and temperature. In experimental joint diseases, decreased activity obviously reflects the functional impairment, pain, local inflammation, or febrile phenomena that can accompany the disease process (35).

Therefore, biotelemetry allows a new approach to distinguishing different phases of diseases (24,36) in the study of experimental joint disease. This parameter during experimental OA in animals could be a convenient indicator of the transition between the early and late stages of experimental joint diseases, as distinguished by onset of the secondary loss of spontaneous mobility.

In this study, immediately after the injection of MIA, there was a primary, transient period of dose-related decreased mobility. High doses of MIA (0.1, 0.3, or 3.0 mg) resulted in the most severe hypomobility in range and duration (day 0 to day 5), probably due to painful sensory reactions induced by these high doses of MIA. In fact, lower doses (0.01 or 0.03 mg) of MIA or saline induced nonsignificant changes in rat mobility. Therefore, the pain reaction just after intraarticular injection depends on both the nature of the injected product and its concentration.

After injection of the 2 highest doses of MIA (0.3 and 3.0 mg), there was a second period of progressive loss of spontaneous mobility, from day 15 until the end of the telemetric study (day 30). Since the experimental OA was characterized by a lack of fever throughout the biotelemetric experiment (day 0 to day 30, regardless of the dose; data not shown), both primary and secondary decreases of mobility were probably not attributable to systemic inflammation, unlike the observations of telemetric experiments under similar conditions, in which arthritides were induced by local injection of zymosan (24) or Freund's complete adjuvant (37) into the rat knee joint or hindpaw, respectively.

At the beginning of the secondary loss of mobility (day 15), subchondral bone was exposed in load-bearing areas and surrounded by osteophytes at the joint margins. In contrast, low doses of MIA (0.03 and 0.1 mg) led to only mild cartilage lesions, and did not detectably limit mobility. Subchondral bone and synovium, unlike cartilage, are innervated. Therefore, at the late stages of OA, both exposed subchondral bone and synovium could produce joint pain (38). Thus, the long-term loss of activity in the rats from day 15 after injection of 0.3 or 3.0 mg of MIA mimics the clinical signs of the human disease, namely, pain and functional impairment of the joint when articular destruction is advanced. Onset of the secondary hypomobility characterized the transition between the early silent stage and the late stage during this experimental joint disease in rats, as has been observed in human OA.

Articular damage induced by MIA was also characterized by histologic examination. After the doses of

0.3 and 3.0 mg, cartilage staining with Safranin O was decreased in load-bearing areas, with exposure of subchondral bone evident at day 15. Transient hypertrophy of the articular cartilage before erosion (39,40) was observed only at a lower dose of MIA (0.03 mg, at day 15), probably because the damage progressed too rapidly at higher doses (0.3 and 3.0 mg). In peripheral osteophytic regions, chondrocytes proliferated and formed clusters (day 15).

Articular lesions resulted from an imbalance between anabolism and catabolism in cartilage. After MIA injection into the rat knees, ^{35}S incorporation varied among articular sites and between doses of MIA as early as day 2; in the central area of the patella, ^{35}S -sulfate was strongly decreased. The decrease in anabolism was irreversible after injection of the highest doses (0.3 and 3.0 mg), but after the lower dose (0.03 mg), successive returns toward normal values were noted. At the joint margins, the response to MIA varied with the dose; the dose of 3.0 mg decreased anabolism, which recovered gradually. After administration of 0.3 mg MIA, proteoglycan synthesis was initially decreased (by day 2) and thereafter enhanced, which might be the first sign of osteophytosis (41). At the joint margins, the dose of 0.03 mg also provoked an increase in radiolabeled sulfate uptake, with successive returns toward normal uptake. Several authors have attributed this site-specific difference in anabolism between the central and peripheral areas after exposure to MIA to differences in cartilage loading or chondrocyte metabolism (42). In fact, in control rats, the higher sulfated GAG concentration in the central patella compared with the peripheral patella probably compensates for the greater central load-bearing. However, cell density is lower in central load-bearing regions (43,44), which suggests that chondrocytes of the central region of the patella might have a more active metabolism and might be more sensitive to MIA than those of the peripheral region.

These variations in proteoglycan synthesis after injection of MIA contribute to the changes in sulfated GAG concentration in the patellar cartilage. On day 15 after injection of 0.3 or 3.0 mg of MIA, when impairment of articular function was detected, the concentration of sulfated GAG was significantly decreased in the load-bearing area of the patella and increased at the joint margins. After injection of the lower doses (0.03 or 0.1 mg), changes were only noted by day 30. The sulfated GAG concentration therefore accounts for the central erosions and presence of osteophytes at the joint margins. However, catabolism also plays an essential role in OA progression, and it might participate, in conjunction

with anabolism, to the variations in sulfated GAG concentration in this model.

The effects of injecting MIA into rat knee are thus strongly related to its concentration. After the 2 highest doses used (0.3 and 3.0 mg), areas of exposed subchondral bone surrounded by large osteophytes (0.3 mg) were noted as early as day 15, and the rat spontaneous locomotion decreased. Intermediate doses (0.03 and 0.1 mg) provoked mild cartilage lesions, but no decreased mobility. Biochemical changes relative to the onset of limited spontaneous mobility at day 15 were the significant changes in patellar sulfated GAG concentration and the decreased anabolism in the peripheral part of the patellar cartilage on day 2 (0.3 and 3.0 mg).

In summary, MIA-induced OA in the rat knee is a useful model that has notable advantages. MIA consistently induces rapid chondral erosion and osteophytes, the severity of which depends on the dose injected. Biotelemetry provides a good background measure of joint impairment during the course of experimental joint diseases. In MIA-induced OA (at doses of 0.3 and 3.0 mg), both primary and secondary loss of spontaneous mobility have been detected and linked to the consequences of pain or the consequences of pain and joint dysfunction, respectively. Therefore, biotelemetry offers a novel approach to the study of the functional and therapeutic aspects of experimental OA, and by quantifying the limitation of mobility, helps in distinguishing between the early and late stages of this experimental joint disease, as has been found in human OA. This distinction between the early and late stages of MIA-induced OA also helps in evaluating the usefulness of imaging techniques that are intended to detect lesions during early stages of this experimental joint disease (45).

In addition, in our experimental model of OA, high doses of MIA (0.3 and 3.0 mg) induced chondral and subchondral alterations with prolonged inhibition of proteoglycan synthesis in the central part of the patellae, whereas a lower dose of MIA (0.03 mg) induced only local cartilage erosions with transient reversible injuries of chondrocytes, mimicking flares of OA. These results gave us new insights into the pathophysiology of OA, especially during early events. In addition, repeated injection of apparently harmless doses of MIA into rat knees (the very low dose of 0.01 mg provoked neither articular lesions nor metabolic disturbances) might be a way of inducing experimental OA that provokes successive microstresses on chondrocytes, so that it might be a more true mimic of "real" OA.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mériem Koufany, Stéphanie Etienne, and Michel Thierry for their technical assistance, and Suzanne Miller for English-language editing.

REFERENCES

1. Poole AR, Rizkalla G, Ionescu M, Reiner A, Brooks E, Rorabeck C, Bourne R, Bogoch E: Osteoarthritis in the human knee: a dynamic process of cartilage matrix degradation, synthesis and reorganisation. *Agents Actions* 39 (suppl):3-13, 1993
2. Pritzker KPH: Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects. *Ann Rheum Dis* 53:406-420, 1994
3. Mazières B, Blanckaert A, Thiechart M: Experimental post-traumatic osteoarthritis of the knee: quantitative microscopic study of the patella and the femoral condyles. *J Rheumatol* 14 (suppl 1):119-121, 1987
4. Pond MJ, Nuki G: Experimentally induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis* 32:387-388, 1973
5. Moskowitz RW, Davis W, Sammarco J, Martens M, Baker J, Mayor M, Burstein AH, Frankel VH: Experimentally induced degenerative joint lesions following partial meniscectomy in the rabbit. *Arthritis Rheum* 16:397-405, 1973
6. Schwartz ER, Leveille CR, Stevens JW, Won HO: Proteoglycan structure and metabolism in normal and osteoarthritic cartilage of guinea pigs. *Arthritis Rheum* 24:1528-1539, 1981
7. Vignon E, Bejui J, Mathieu P, Hartmann JD, Ville G, Evreux JC, Descotes J: Histological cartilage changes in a rabbit model of osteoarthritis. *J Rheumatol* 14:104-106, 1987
8. Van der Kraan PM, Vitters EL, van Beuningen HM, van de Putte LBA, van den Berg WB: Degenerative knee joint lesions in mice after a single intra-articular collagenase injection: a new model of osteoarthritis. *J Exp Pathol* 71:19-31, 1990
9. Murray DG: Experimentally induced arthritis using intra-articular papain. *Arthritis Rheum* 7:211-219, 1964
10. Williams JM, Ongchi DR, Thonar EJ: Repair of cartilage injury following intra-articular chymopapain-induced matrix proteoglycan loss. *J Orthop Res* 11:705-716, 1993
11. Williams JM, Uebelhart D, Thonar EJMA, Kocsis K, Modis L: Alteration and recovery of the spatial orientation of the collagen network of articular cartilage in adolescent rabbits following intra-articular chymopapain injection. *Connect Tissue Res* 34:105-117, 1996
12. Williams JM, Brandt KD: Immobilization ameliorates chemically-induced articular cartilage damage. *Arthritis Rheum* 27:208-216, 1984
13. Moskowitz RW: Experimental models of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis, Diagnosis and Management*. Edited by RW Moskowitz, DS Howell, VM Goldberg, HJ Mankin. Philadelphia, WB Saunders, 1984
14. Bendele AM, Hulman JF: Spontaneous cartilage degeneration in guinea pigs. *Arthritis Rheum* 31:561-565, 1988
15. Burton-Wurster N, Hui-Chou CS, Greisen HA, Lust G: Reduced deposition of collagen in the degenerated articular cartilage of dogs with degenerative joint disease. *Biochem Biophys Acta* 718:74-84, 1982
16. Evans RG, Collins C, Miller P, Ponsford FM, Elson CJ: Radiological scoring of osteoarthritis progression in STR/ORT mice. *Osteoarthritis Cartilage* 2:103-109, 1994
17. Smale G, Bendele A, Horton WE: Comparison of age-associated degeneration of articular cartilage in Wistar and Fischer 344 rats. *Lab Anim Sci* 45:191-194, 1995
18. Pelletier JP, DiBattista JA, Raynauld JP, Willhem S, Martel Pelletier J: The in vivo effects of intra-articular corticosteroid injection on cartilage lesion, stromelysin interleukin 1, and onco-

- gene protein synthesis in experimental osteoarthritis. *Lab Invest* 72:578-586, 1995
19. Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Tardif G, Mineau F, Geng C, Pelletier J-P: Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis: suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum* 39:1535-1544, 1996
 20. Van den Berg WB, van Osch GJVM, van der Kraan PM, van Beuningen HM: Cartilage destruction and osteophytes in instability-induced murine osteoarthritis: role of TGF β in osteophyte formation? *Agents Actions* 40:215-219, 1993
 21. Pelletier J-P, Martel-Pelletier JM: Cartilage degradation by neutral proteoglycanases in experimental osteoarthritis: suppression by steroids. *Arthritis Rheum* 28:1393-1401, 1985
 22. Vignon E, Mathieu P, Bejui J, Descotes J, Hartman D, Patricot LM, Richard M: Study of an inhibitor of plasminogen activator (taxenamic acid) in the treatment of experimental osteoarthritis. *J Rheumatol* 18:131-133, 1991
 23. Otterness IG, Bliven ML, Milici AJ, Poole AR: Comparison of mobility changes with histological and biochemical changes during lipopolysaccharide-induced arthritis in the hamster. *Am J Pathol* 144:1098-1108, 1994
 24. Gegout P, Gillet P, Chevrier D, Guingamp C, Terlain B, Netter P: Characterisation of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. *Life Sci* 55:321-326, 1994
 25. Kalbhen DA, Blum U: Theoretisches Konzept und experimentelle Bestätigung für ein neues Arthrose-Modell am Versuchstier. *Arzneimittelforschung Drug Res* 27:527-531, 1977
 26. Williams JM, Brandt KD: Exercise increases osteophytes formation and diminishes fibrillations following chemically induced articular cartilage injury. *J Anat* 139:599-611, 1984
 27. Kalbhen DA, Buchmann U: Die Tierexperimentelle Gonarthrose der Ratte und ihre Therapie mit Glykosaminoglykanpolysulfat (GAGPS). *Z Rheumatol* 44:100-107, 1985
 28. Van der Kraan PM, Vitters EL, van de Putte LBA, van den Berg WB: Development of osteoarthritic lesions in mice by "metabolic" and "mechanical" alterations in the knee joint. *Am J Pathol* 135:1001-1014, 1989
 29. Bohanon TC, Schneider RK, Weisbrode SE: Fusion of the distal intertarsal and tarsometatarsal joints in the horse using intra-articular sodium mono-iodoacetate. *Equine Vet J* 23:289-295, 1991
 30. Chevrier D, Gegout P, Guingamp C, Gillet P, Terlain B, Netter P: Telemetric study of mono-iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis in rats (abstract). *Mediators Inflamm* 3:304, 1994
 31. Kozak W, Conn CA, Kluger MJ: Lipopolysaccharide induces fever and depressed locomotor activity in unrestrained mice. *Am J Physiol* 266:R125-R135, 1994
 32. Scales WE, Kluger MJ: Effect of antipyretic drugs on circadian rhythm in body temperature of rats. *Am J Physiol* 253:R306-R313, 1987
 33. Van den Berg WB, Kruysen MWM, van de Putte LBA: The mouse patella assay: an easy method of quantitating articular cartilage chondrocyte function in vivo and in vitro. *Rheumatol Int* 1:165-169, 1982
 34. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ: Improved quantification of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochem Biophys Acta* 883:173-177, 1986
 35. Williams JM, Zurawski J, Mikecz K, Glant TT: Functional assessment of joint use in experimental inflammatory murine arthritis. *J Orthop Res* 11:172-180, 1993
 36. Otterness IG, Milici AJ, Bliven ML: Some factors affecting inhibition and restoration of mobility after induction of an acute arthritis in the hamster. *Agents Actions* 40:225-227, 1993
 37. Phillippe L, Gegout P, Pierfite C, Guingamp C, Gillet P, Terlain B, Netter P: Inhibition of proteoglycan synthesis and variation of mobility in adjuvant arthritis in rats (abstract). *Inflamm Res* 44 (suppl 3):S256, 1995
 38. Perrot S, Guilbaud G: Pathophysiology of joint pain. *Rev Rhum Engl Ed* 63:485-492, 1996
 39. Brandt K: Transection of the anterior cruciate ligament in the dog: a model of osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 21:22-32, 1991
 40. Van der Kraan PM, Vitters EL, van Beuningen HM, van den Berg WB: Proteoglycan synthesis and osteophyte formation in "metabolically" and "mechanically" induced murine degenerative joint disease. *Int J Exp Pathol* 73:335-350, 1992
 41. Williams JA, Eugene JM, Thonar A: Early osteophyte formation after chemically induced articular cartilage injury. *Am J Sport Med* 17:7-15, 1989
 42. Van Osch GJVM, van der Kraan PM, van den Berg WB: Site specific inhibition of cartilage proteoglycan synthesis in the murine knee joint: differences between 3 metabolic stimuli. *J Rheumatol* 21:1107-1112, 1994
 43. Eggli PS, Enzicker EB, Schenk RK: Quantification of structural features characterizing weight- and less-weight-bearing regions in articular cartilage: a stereological analysis of femoral condyles in young adult rabbits. *J Anat* 222:217-227, 1988
 44. Stockwell RA: The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage. *J Anat* 109:411-421, 1971
 45. Loeuille D, Gonnord P, Guingamp C, Gillet P, Blum A, Sauzade M, Netter P: In vitro magnetic resonance microimaging of experimental osteoarthritis in the rat knee joint. *J Rheumatol* 24:133-139, 1996

Chapitre VIII

Intérêts de l'IRM dans l'arthrose induite par l'injection de MIA

La télémetrie nous ayant permis de distinguer une phase précoce et une phase tardive symptomatique au cours de l'arthrose induite par l'injection de MIA (0,3 mg) dans le genou chez le rat, l'intérêt de l'IRM dans cette pathologie expérimentale a été évalué par sa capacité à mettre en évidence des lésions du cartilage avant que le handicap ne s'installe (J15). Ce travail a fait l'objet d'une publication placée en annexe à la fin de ce chapitre [Loeuille, 1997].

1. Introduction.

La radiologie standard est exploitée depuis de nombreuses années dans le diagnostic des pathologies articulaires, notamment de l'arthrose. Cependant, son utilisation est limitée pour détecter la pathologie au cours des phases précoces asymptomatiques. L'arthroscopie permet bien une étude directe du cartilage, mais c'est une technique invasive. A l'inverse, l'IRM est non invasive, et elle est susceptible de différencier distinctement les tissus mous. Elle a ainsi suscité beaucoup d'intérêts pour l'exploration du cartilage articulaire.

L'IRM a permis de mettre en évidence une atteinte du cartilage que la radiologie standard ne détecte pas. Des altérations des contours, de l'épaisseur de cartilage ainsi que des anomalies du signal ont été notées au cours de l'observation d'échantillons de cartilage articulaire pathologiques humains. L'intérêt d'une arthrose expérimentale chez l'animal est de permettre une comparaison entre le cartilage sain et le cartilage pathologique. Chez le rat, une seule étude a été réalisée, dans un modèle de monoarthrite [Carpenter, 1994].

La plupart des imageurs cliniques fonctionnent entre 0,5 et 1,5 Tesla (T), et les études expérimentales utilisent des imageurs de 2 à 2,5 T. Un imageur de plus grande résolution spatiale (8,5 T) permet d'apprécier le cartilage articulaire chez des animaux de petite taille tels que le rat. Nous avons ainsi comparé les images IRM obtenues à des radiologies et des coupes histologiques au cours de la progression de l'arthrose induite par l'injection intra-articulaire de MIA (0,3 mg) chez le rat.

2. Résultats et discussion.

Une séquence particulière dite "Fat Sat SE Sequence" permet de supprimer le signal de la graisse et d'obtenir ainsi un meilleur contraste entre les différentes structures articulaires [Watson, 1993; Carpenter, 1994; Tyler, 1995] : chez le rat, le cartilage apparaît comme une fine couche de 250 μm d'épaisseur environ, dont l'intensité du signal est intermédiaire. Dans certains cas, le cartilage sain présente un aspect trilaminaire (cartilage épiphysaire, des plateaux tibiaux, des ménisques, cartilage de croissance) : une zone moyenne en hyposignal est encadrée d'une zone superficielle et d'une zone profonde en hypersignal. Cet aspect du cartilage a été décrit dans d'autres espèces. Il n'existe pas d'explication satisfaisante à cette différence du signal dans le cartilage. Certains l'ont attribué à une différence d'hydratation entre les différentes couches du cartilage articulaire [Lehner, 1989], d'autres ont reconnu les différentes couches du cartilage déterminées par l'histologie [Modl, 1991]. Une troisième hypothèse proposée par Rubenstein [1993] relie cet aspect trilaminaire du cartilage à une mobilité différente des ions H^+ : il distingue les H^+ libres et ceux liés aux fibres de collagènes. D'autres auteurs suggèrent une relation avec la concentration en PG [Paul, 1993]. Dans notre étude, l'aspect trilaminaire du cartilage persiste jusqu'à 5 jours après l'injection de MIA dans le genou du rat, alors que l'histologie a mis en évidence une déplétion du cartilage non calcifié en PG.

L'IRM nous a permis de déceler des modifications du cartilage et de l'os dans ce modèle d'arthrose chez le rat (J10). Dans les zones portantes, un amincissement du cartilage a été observé, et à l'inverse, l'épaisseur du cartilage est plus importante dans les zones non portantes (J15). Les ostéophytes qui apparaissent en hypersignal par rapport au cartilage articulaire, poussent la rotule hors de la gouttière intercondylienne. Les ménisques apparaissent amincis et moins denses, et leur surface semble irrégulière (J15).

L'os sous-chondral est également remodelé de façon importante (J10). L'os trabéculaire conserve sa structure en travées, et s'épaissit progressivement. Des kystes volumineux dans les régions portantes apparaissent ensuite en hypersignal et des géodes dans la région des condyles fémoraux sont décelées (J15).

Des altérations du signal des tissus mous ont également été notées : le ligament de Hoffa et le ligament infrapatellaire par exemple ont une structure hétérogène après l'injection de MIA (J5). Le premier présente une taille réduite, et à l'inverse, le ligament infrapatellaire est plus épais [Fakri, 1995].

La radiographie montre un amincissement de l'espace fémoro-tibial, des modifications de la densité des ménisques et de leurs contours (J10), ainsi que des érosions de l'os sous-chondral dans les phases avancées de l'arthrose. Elle met également en évidence une décalcification osseuse que l'IRM ne décèle pas.

Plusieurs études ont décrit une atteinte du cartilage articulaire dans l'arthrose par l'IRM dans différents modèles expérimentaux. Dans un modèle d'arthrose induite par l'injection intra-articulaire de papaïne chez le lapin, Paul [1991] a montré une relation entre une modification du signal du cartilage en IRM (1,5 T), l'épaisseur du cartilage (étude histologique) et la perte en PG. Gahunia [1995] a lui aussi montré une relation entre une anomalie du signal IRM et des observations histologiques.

Les régions du cartilage caractérisées par une prolifération cellulaire ou un aspect fibrillaire apparaissent en hypersignal sur les images IRM. Les temps de relaxation T1 et T2 sont plus élevés. Ces modifications des temps de relaxation sont reliées aux variations des concentrations des principaux constituants du cartilage (collagènes et PG), à l'orientation des fibres de collagènes, et aux interactions de surface de ces fibres avec les molécules d'eau. Ces résultats ont été interprétés comme la preuve d'une tentative de réparation du cartilage, conjointement à une destruction du cartilage articulaire.

La détermination des temps de relaxation T1 et T2 du cartilage sur un imageur de 8,5 T permettra de mieux quantifier l'atteinte du cartilage dans ce modèle chez le rat. Les images obtenus par l'IRM ont cependant permis de mettre en évidence des lésions précoces du cartilage que la radiographie standard ne permet pas de déceler. Elle a également permis de déceler des anomalies du signal des tissus mous, non visualisés par la radiologie. L'IRM constitue ainsi un outil intéressant pour évaluer une atteinte du cartilage articulaire, et pour mettre en évidence les propriétés chondroprotectrices d'agents pharmacologiques.

Chapitre IX

Modulation pharmacologique de la douleur induite par l'injection de MIA

Cet aspect a simplement fait l'objet d'une étude en télémetrie, puisqu'elle constitue le meilleur outil pour évaluer l'intensité de la douleur articulaire, grâce à la mesure de la mobilité spontanée du rat. Les animaux ont suivi différents traitements pendant une durée de 7 jours, qui ont débutés le jour même de l'injection intra-articulaire de MIA. Nous avons ainsi déterminé l'efficacité d'un AINS classique, le kétoprofène, d'un AINS plus sélectif de COX-2, le nimésulide, et d'un antalgique, le paracétamol (administration par voie orale) à moduler la baisse de mobilité induite par l'injection de 0,3 mg de MIA dans le genou du rat. Les effets d'une injection intra-articulaire d'un anesthésique local, la xylocaïne, et du DMSO ont également été vérifiés.

Résultats.

L'injection intra-articulaire de MIA (J0) conduit à une baisse importante de la mobilité spontanée du rat. Elle est maximale à J2 (-68 %). Jusqu'à J7, cette diminution de la fonction articulaire se réduit progressivement (-20 %; figure IX.1).

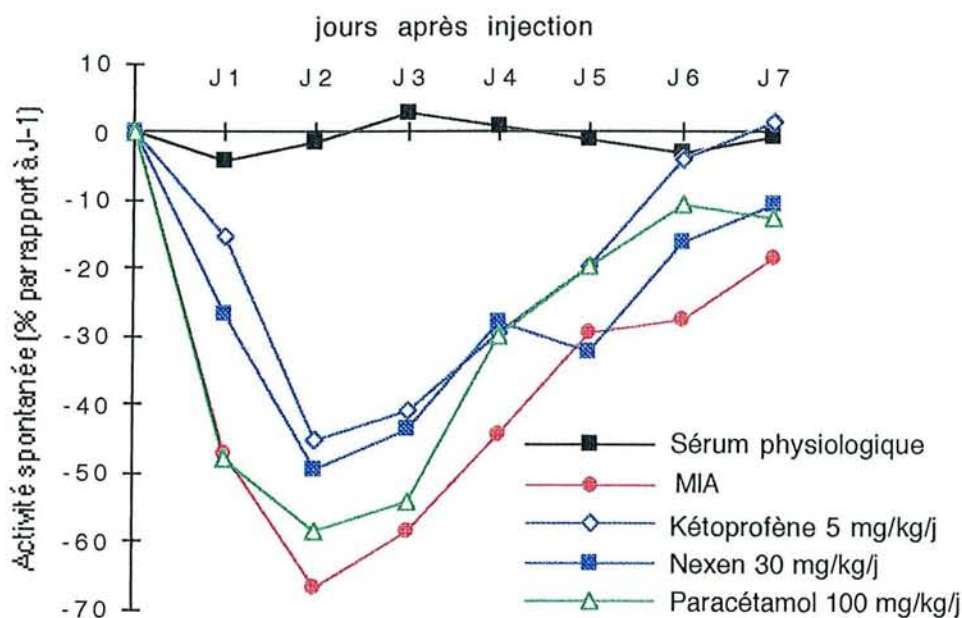


Figure IX.1. Efficacité du kétoprofène (5 mg/kg/j), du nimésulide (30 mg/kg/j) et du paracétamol (100 mg/kg/j) à moduler la douleur induite chez le rat par une injection intra-articulaire de MIA (0,3 mg; n=5 rats par groupe). L'intensité de la douleur est fonction de l'amplitude de l'hypomobilité.

Le kétoprofène (5 mg/kg/j) et le nimésulide (30 mg/kg/j) présentent une efficacité équivalente et significative entre J1 et J4 à moduler cette diminution de la mobilité spontanée du rat (de l'ordre de 20 %) par rapport aux rats non traités (figure IX.1).

Le paracétamol, l'antalgique le plus communément prescrit, n'a aucun effet entre J1 et J3. Il présente une tendance à moduler cette hypomobilité induite par l'injection intra-articulaire de MIA de J4 à J6, mais qui n'atteint pas celle des deux AINS.

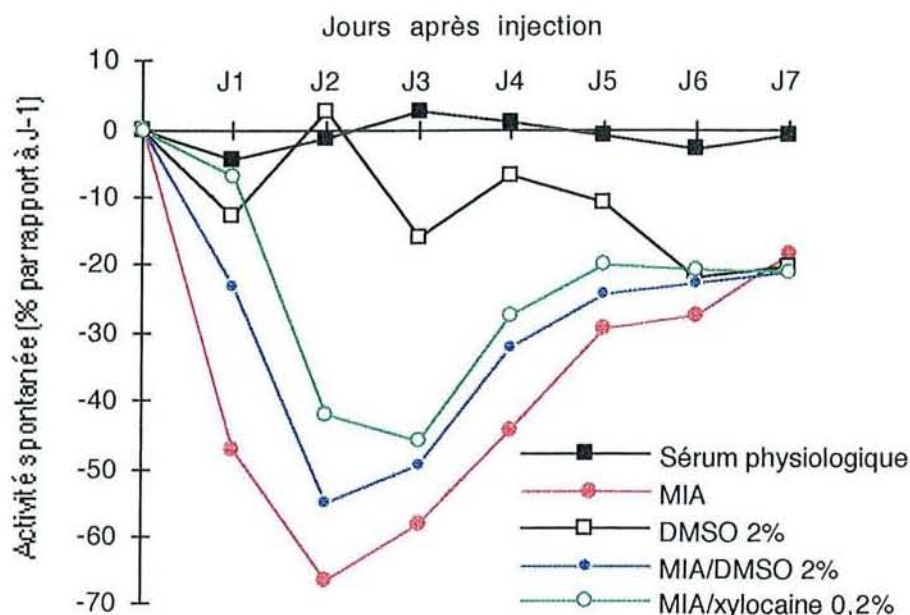


Figure IX.2. Efficacité de l'injection intra-articulaire de DMSO 2% ou de xylocaïne à moduler le handicap induit par l'injection intra-articulaire bilatérale de MIA (0,3 mg; n=5 rats par groupe).

L'injection intra-articulaire de DMSO (2 %), un anti-oxydant utilisé en tant qu'antalgique notamment dans l'arthrose [Heberhardt, 1995], montre une capacité importante à moduler la douleur induite par l'injection intra-articulaire de MIA chez le rat (figure IX.2). Ses effets se traduisent par une diminution de l'activité des rats de -23 %, alors que chez les rats non traités, elle atteint 47 % à J1. Ses effets bénéfiques s'amenuisent progressivement jusqu'à J7.

L'injection intra-articulaire de xylocaïne reverse totalement les effets de l'injection infrapatellaire de MIA (J1) chez le rat. A J2, la diminution de l'activité des rats traités atteint près de 40 %, alors que chez les rats non traités, cette hypomobilité est de -70 % environ. Les effets de la xylocaïne perdurent jusque J4 ($p < 0,05$) : une différence de près de 20 % subsiste encore entre les rats traités et non traités.

In vitro Magnetic Resonance Microimaging of Experimental Osteoarthritis in the Rat Knee Joint

Eingegangen
A Atemwegsforschung

17. Aug. 1998

DAMIEN LOEUILLÉ, PATRICK GONORD, CORINNE GUINGAMP, PIERRE GILLET, ALAIN BLUM, MICHEL SAUZADE, and PATRICK NETTER

ABSTRACT. *Objective.* To visualize articular changes during iodoacetate induced osteoarthritis (OA) of the rat knee using high resolution magnetic resonance imaging (MRI).

Methods. All images were acquired on a 8.5T microimager on *ex vivo* rat knees. After optimization studies, 3D spin echo sequences were used with TR 1200 ms and TE 15 ms; 40 sagittal images were obtained with a resolution of $400 \times 60 \times 60 \mu\text{m}$. OA lesions were achieved by injecting 3 mg iodoacetate in the right knee joint (Day 0). Progression of OA changes was studied at Days 5, 10, 15, 20, 30, 90 and corresponding radiographs and histological sections were obtained.

Results. Spin echo images of the normal rat knee clearly visualized cortical bone, calcified menisci, patella, and cruciate ligaments as dark regions. Cartilage and muscles appeared as intermediate signal. In some cases a trilaminar appearance of cartilage and growth plate was depicted. This appearance persisted at Day 5, although cartilage presented a marked loss of proteoglycans. After Day 10 the menisci appeared irregular and inhomogeneous. After Day 15, MRI showed important alterations of articular cartilage, predominant on weight bearing areas of femoral condyles. Osteophytic remodeling was also seen around the patella. From Day 20 to Day 90 anatomical changes progressively affected epiphyseal bone, leading to subchondral cysts and loss of its regular trabecular structure.

Conclusion. High field MRI provides a sensitive method for investigating *ex vivo* focal erosions of cartilage and established osteochondral remodeling in experimental OA in the rat. In this model, microimaging provides more information about early modifications of cartilage and soft tissue than radiographic exploration, in good correlation with histological data. (*J Rheumatol* 1997;24:133-9)

Key Indexing Terms:

EXPERIMENTAL MODEL

CARTILAGE

OSTEOARTHRITIS

MAGNETIC RESONANCE IMAGING

Articular cartilage, which is essential for joint function, is the first structure affected in many rheumatic diseases. In the early stage of cartilage degeneration, for example, during the onset of osteoarthritis (OA), the turnover of cartilage matrix increases with no accompanying depletion of matrix. Later, there is net depletion of proteoglycans, and the structure and orientation of collagen in the superficial layer of cartilage are altered¹⁻³. These alterations provoke a characteristic swelling of the hyaline cartilage. In advanced OA, cartilage becomes dehydrated and hypocellular, with

decreased concentrations of macromolecules (collagens, aggrecan). Standard radiography⁴ has been used for many years in diagnostic imaging of cartilage diseases, particularly OA, but is of limited value to detect and monitor the disease in the early stages. Arthroscopy allows direct study of the cartilage⁵ and permits early detection of OA lesions, but it is invasive⁶. Magnetic resonance imaging (MRI), on the other hand, can show changes in articular cartilage before lesions become apparent on radiographs and it can very accurately depict changes in soft tissues⁷⁻⁹. Furthermore, it is noninvasive.

Most recent MRI studies have been performed on diseased cartilage, considering alterations in its contour and thickness and also signal abnormalities. Few authors have studied the appearance of normal human articular cartilage in MR images, or its correlation with arthroscopy or from cadaveric studies¹⁰⁻¹². Studies in various experimental models (dog¹³, macaque¹⁴, rabbit¹⁵, guinea pig¹⁶) have assessed the normal appearance of hyaline cartilage and chondral alterations in OA of the knees in these animals. In the rat knee, MRI has only been used to show the changes during antigen induced monoarticular arthritis¹⁷. Most clinical studies are performed using MR imagers operating at 0.5-1.5 T¹⁸, whereas experimental animal models are performed at 2-2.5 T. Using a more sensitive 8.5 T microimager (MRI at

From the Laboratoire de Pharmacologie and Clinique Rhumatologique, Faculté de Médecine, URA CNRS 1288 Vandoeuvre les Nancy, and Institut d'Electronique Fondamentale, URA CNRS 2212, Université Paris Sud, France.

Supported by grants from Contrat de Recherche externe INSERM (930910), GDR CNRS 1210, and PHRC.

D. Loeuille, MD, Resident; C. Guingamp, Predoctoral Student; P. Gillet, MD, Assistant Professor; A. Blum, MD, Professor of Radiology; P. Netter, MD, Professor of Clinical Pharmacology; Faculté de Médecine, URA CNRS 1288; P. Gonord, PhD, Assistant Professor; M. Sauzade, PhD, Professor of Biophysics, Institut d'Electronique Fondamentale, URA CNRS 2212, Université Paris Sud.

Address reprint requests to Pr. P. Netter, Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires, Service de Pharmacologie, Faculté de Médecine, BP 184, Avenue de la forêt de Haye, Vandoeuvre les Nancy 54505, France.

Submitted April 15, 1996 revision accepted May 22, 1996.

high field strength) to examine normal rat knees and the knees of rats with OA at higher spatial resolution, we studied normal rat knees *in vitro* and followed the progression of osteochondral alterations induced by iodoacetate injected intraarticularly. At each stage of the MR study, corresponding radiographs and histological sections were obtained, and the information available from the different techniques was compared.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animal model. Experimental OA was induced in male Wistar rats (180–200 g) by injecting, on Day 0, 3 mg of sodium iodoacetate (Merck) dissolved in 50 μ l of sterile saline into the right knee joint through the patellar ligament. At each of 7 time points (Days 5, 10, 15, 20, 25, 30, and 90), the amputated knees of 4 rats with OA were imaged, and at the same time 2 normal rat knees were imaged as controls. One to 3 days before these MR examinations, the studied rats to be examined were anesthetized and killed by cervical dislocation; their knees were dissected out to preserve the integrity of the knee joint, avoiding the presence of intraarticular air, and were stored at 4°C until examination.

MRI. To obtain reproducible sections, amputated normal and OA knees, in flexed position, were placed in the center of the magnetic field gradient, with a reference saline solution next to the patella. All images were acquired on an 8.5 T MR microimager. Imaging at high field strength (> 3 tesla) is potentially advantageous because of the higher theoretical signal-to-noise ratio (S/N) and higher spatial resolution. We used 3 dimensional (3D) imaging, because it permitted us to obtain thinner slices and to image the entire joint. In addition, 3D data can improve the assessment of OA by permitting the joint to be viewed in any desired orientation, lessening the chance that some significant feature of the pathology will be overlooked. In a preliminary step, as reported by Carpenter at 2.0 T¹⁷, we observed that in rat knees at high field strength, spin echo (SE) images gave vastly better contrast than did gradient echo images [gradient recalled acquisition in the steady state (GRASS) or fast low-angle shots (FLASH)]. Therefore, using 3D SE sequences, we evaluated a variety of pulse variables (various TE and TR) and sequences to enhance contrast between cartilage, subchondral bone, and synovial fluid on the 8.5 T machine.

Accurate MR evaluation of articular cartilage requires several conditions: good spatial resolution, to reveal small cartilaginous defects; good contrast, to show changes in signal intensity in cartilage; and reliable distinction of cartilage from adjacent joint fluid and subchondral bone, to permit evaluation of the thickness and contours of the cartilage. The alterations observed at high field strength did not qualitatively affect image contrast in T1 and T2 weighted images, although many quantitative changes were observed. Duewell, *et al*¹⁹ found no qualitative differences in image contrast with a proton density sequence on a 4 T imager. As these SE images, with long TR and short or long effective TE, made on a 1.5 T machine, depict articular cartilage abnormalities in OA with reasonable accuracy, we defined a sequence with TR of 1200 ms and TE of 15 ms, which correspond to proton density weighted images. For the 3D SE sequences the variables were 1500/15 (TR/TE), 20 $\times$ 13 mm field of view, 40 sagittal images, 400 μ m slice thickness, 256 $\times$ 256 image matrix, and 4 signal average. The pixels in the frequency and phase encoding axis were 60 $\times$ 60 μ m, with a resulting spatial resolution of 400 $\times$ 60 $\times$ 60 μ m. The images were generated overnight, with an acquisition time of 12 h²⁰. In some cases similar acquisitions were obtained with chemical suppression of the fat signal (Fat Sat) SE sequences in normal rats.

Radiology. Radiographs were made immediately after MRI. Lateral and posterior radiographs of OA and normal knee joints were made using a CGR Mammomat x-ray machine with Kodak fine screens placed 60 cm below the x-ray source. The settings for the radiographs were 21 kV/60 mA (normal rat knees) or 21 kV/30 mA (OA knees). The film was developed in a processor at 32°C.

Histology. Immediately after MR study, the knees were fixed in 10% neu-

tral buffered formalin for 5 days, the decalcified (RDO solution, Eurobio) for 24 h and conventionally wax embedded. Sagittal knee joint sections (5 μ m) were stained with hematoxylin-eosin-safran (HES) and safranin O²¹.

RESULTS

Normal rat knees. As shown in Figure 1, high resolution MR images of the normal rat knee clearly showed cortical bone, calcified menisci, and patellar and cruciate ligaments as dark regions. Cartilage and periarticular soft tissues appeared in intermediate signal, whereas subcutaneous and fatty zones were seen in high signal. Median sagittal images showed the patellar ligament connecting the patella to the tibia in a straight line. In high signal, a triangular fatty zone (Hoffa's ligament) was visible in high signal just behind the patellar ligament. This high signal (Figure 2A) disappeared when Fat Sat SE sequences (Figure 2C) were performed. The cruciate ligaments were perfectly identified on the median target scans. Parasagittal images showed the entire length of the articular cartilage, the cranial and caudal horns of the meniscus, and the adjacent subchondral and trabecular bone. A well defined layer of articular cartilage about 250 μ m thick was visible in intermediate signal around the epiphysis, except at the spinal tuberosities where the cruciate ligaments are attached. Below the cartilage was a well defined dark layer corresponding to subchondral bone. The epiphyseal trabecular bone showed its classic uniform alveolar structure.

In some cases a typical trilaminar appearance of the cartilage was seen in the femoral epiphysis, tibial plateaus, and growth plates (Figure 3). The 3 laminae consisted of a superficial lamina of hyperintense signal, a thin hypointense lamina, and a deep lamina of hyperintense signal, in the articular cartilage and the growth plate. This 3 layered appearance of the articular cartilage is reduced and may appear homogeneous in signal intensity, corresponding to the "magic angle" phenomenon²². Radiographs of the normal joint showed a smooth, sharp outline of the bone. The trabecular structure was regular and uniform, extending to the edge of the bone. The calcified menisci, sesamoid bones, femoral epiphysis, and tibial plateaus were clearly visible. In histological sections of normal knees, safranin O stains the articular and epiphyseal cartilage dark pink along its length, except where it is interrupted by the insertion of the cruciate ligaments. As the proteoglycan concentration increases with the depth of the cartilage, the safranin O concentration also increased. The junction between the noncalcified and calcified articular cartilage, the so-called "tidemark," is visible as a line on stained sections of decalcified tissue. HES stains trabecular bone and compact subchondral bone red. The synovium is relatively acellular.

Rat knees with experimentally induced OA. On Day 5, MRI showed alterations of the fatty zone, which appeared to be inhomogeneous and to have shrunk. The articular cartilage still had its typical trilaminar appearance and did not yet appear to have been affected by the injection of iodoacetate.

This trilaminar aspect was observed many times in the OA knees. There was no evidence of overall cartilage thinning or bone alterations. Radiographs still showed no changes in comparison with normal knees. In histological sections, the staining of noncalcified matrix in safranin O sections was significantly less than in normal knees, corresponding to a widespread loss of proteoglycans in the articular cartilage (Figure 2). The calcified cartilage and the cartilage plate appeared relatively insensitive to proteoglycan depletion.

On Day 10, iodoacetate provoked early changes in subchondral bone, which looked irregular on MRI. Trabecular bone had kept its trabecular structure. The patella was thinner, and pushed outwards. The menisci appeared irregular, smaller, and inhomogeneous. The fatty zone just behind the patellar ligament had completely disappeared. There was no evidence of overall cartilage thinning at this stage. Radiographs showed definite subchondral erosions, narrowing of the femorotibial space. The patella was thinner. Trabecular bone still looked alveolar. In radiographs, the menisci looked thinner and had surface irregularities; these abnormalities were best seen in the lateral view. Histological sections showed complete erosion of the articular cartilage in weight bearing areas. Elsewhere, the matrix of noncalcified cartilage showed widespread loss of proteoglycans. Osteophyte formation was seen at the margins of the femoropatellar joint. The trabecular bone seen in histological sections was thinner, with a macroscopic alveolar aspect. There were no signs of inflammation in the joint cavity or the synovial tissue.

On Day 15, there was evidence on MRI of overall cartilage thinning in weight bearing areas. As shown in Figure 4, these alterations are clearly seen on parasagittal acquisitions, which showed complete loss of articular cartilage in weight bearing areas. Elsewhere, in the margin of the joint the articular cartilage was thicker, in response to the osteophytic remodeling that pushed the patella outwards. The subchondral bone looked irregular. The femoral epiphysis was heavily pitted. The trabecular bone had lost its structure, leading to large cysts seen as bright signal. The patella was thinner. The menisci appeared irregular, smaller, and inhomogeneous. The patellar ligament was thicker and broader, with a heterogeneous signal. Radiographs showed definite subchondral erosions, narrowing of the femorotibial space, sclerosis of subchondral bone. The patella was thinner, decalcified, and pushed outwards. The trabecular bone had lost its trabecular structure, and had voluminous cysts in weight bearing areas. The menisci looked thinner and less dense, and had surface irregularities. Histological sections showed a complete loss of articular cartilage in weight bearing areas. Elsewhere, the matrix of the noncalcified cartilage presented a widespread loss of proteoglycans. Voluminous osteophytes were seen at the margins of the femoropatellar joint. The trabecular bone had lost its microscopic alveolar appearance and contained epiphyseal cysts.

From Days 20 to 90, MRI showed a progressive decrease in thickness of the articular cartilage in weight bearing areas. Osteophytic remodeling at the margins of the joint gave a brighter signal than the articular cartilage. The femoral and tibial epiphyses showed considerable remodeling in the form of cysts seen as bright signal. In addition, the patellar ligament was always thicker and broader, with a heterogeneous signal. The menisci appeared irregular, smaller, and inhomogeneous. After Day 20 these abnormalities progressively worsened. Radiologically, the course of iodoacetate induced OA was characterized by erosions, narrowing of the femorotibial space, sclerosis of subchondral bone, and alterations of the menisci. As seen on MRI, the patella was thinner, and pushed outwards, and the femorotibial epiphysis was greatly deformed. Histological sections showed large osteophytes at the margins of the joint and severe cartilage erosions leading to bone exposure. No infiltration of inflammatory cells into the synovial tissue was observed.

DISCUSSION

Because of its sensitivity to differences in soft tissues, the application of MRI to view alterations of cartilage has steadily increased in recent years. The technique offers several advantages to assess the activity and progression of clinical and experimentally induced OA. In addition, the discovery and development of new drugs will rely in part upon the existence of good animal models of OA in which candidate compounds can be tested. As far as we know, this is the first study of the articular cartilage of normal rat knees in an 8.5 T MR microimager. The high field strength offers the advantages of a higher signal-to-noise ratio and higher spatial resolution. The images obtained using our standard protocol ($400 \times 60 \times 60 \mu\text{m}$) give the highest voxel resolution MR images of the rat knee reported so far. In addition, the 3D imaging offers the advantages of providing thinner slices and high resolution images of the entire joint as OA progresses, thus increasing the chance of detecting some significant feature of the pathology²³. SE sequences are widely used in imaging experimental arthritis^{16,17,23} because they provide good contrast between the different articular structures. Recently, Duewell¹⁹ confirmed the good accuracy of SE sequences at high field strength.

The SE images clearly defined the articular cartilage of the normal rat knee as a thin layer, about $250 \mu\text{m}$ thick, of intermediate signal intensity around the epiphysis, except where cruciate ligaments were attached. In some cases a typical trilaminar appearance of the cartilage was seen in femoral epiphysis, tibial plateaus, menisci, and growth plate. In articular and epiphyseal cartilage, and in the menisci, 3 laminae were visible: a superficial one of hyperintense signal, a thin one of hypointense signal, and a deep one of hyperintense signal. The trilaminar aspect of the articular cartilage disappeared for a homogeneous signal intensity due to the "magic angle" described by Berendsen, *et al*²⁴ in

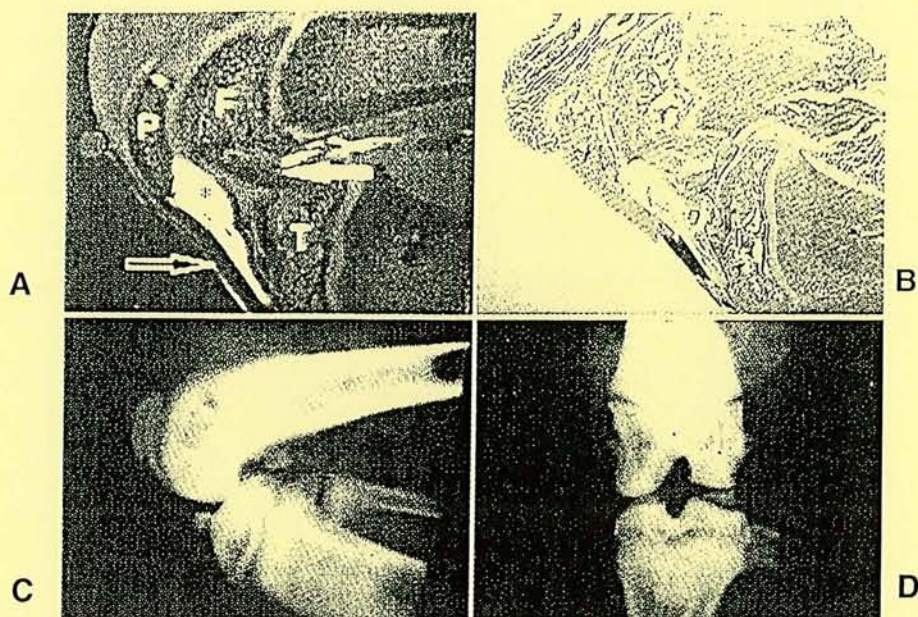


Figure 1. Normal rat knee. (A) High resolution MR images (8.5 T; resolution $400 \times 60 \times 60 \mu\text{m}$). Median sagittal image, in which the patellar ligament joining the patella to the tibia is seen as a straight line of low signal. A triangular fatty zone in high signal (Hoffa's ligament*) is visible (arrow) just behind the patellar ligament. The posterior cruciate ligament is clearly visible. (P: patella, F: femoral head, T: tibial epiphysis) (B) Corresponding histological section (HES staining). (C and D) Radiographs of the normal joint, showing a smooth, sharp outline of the bone. The calcified menisci and sesamoid bone are clearly visible.

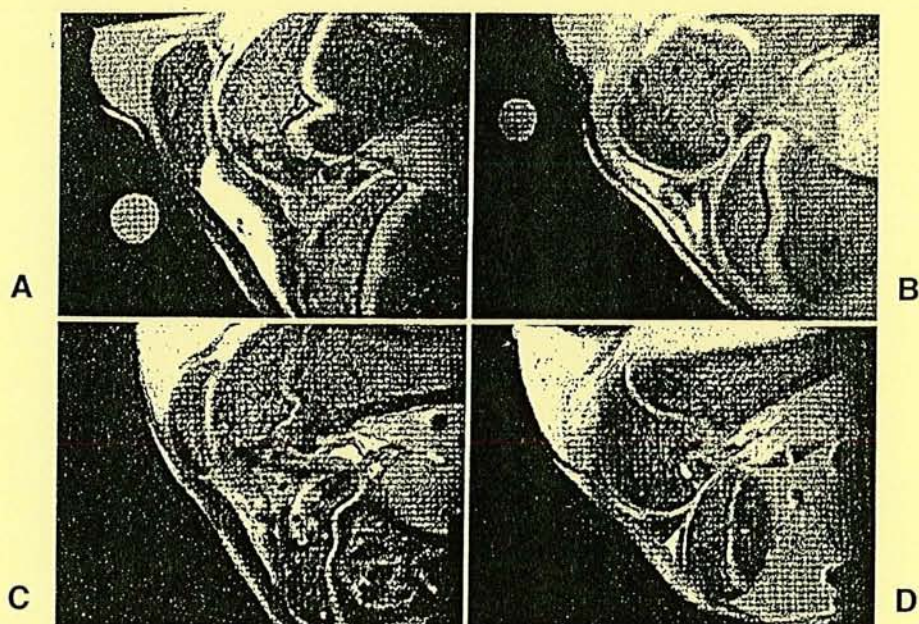


Figure 2. Normal rat knee. High resolution MR images (8.5 T; resolution $400 \times 60 \times 60 \mu\text{m}$). (A and B) Median sagittal and parasagittal images with classic spin echo sequences. (C and D) Corresponding images with Fat Sat spin echo sequences: the high signal of Hoffa's ligament is lower, permitting better evaluation of cruciate ligaments. Note on B and D the entire length of the articular cartilage and the cranial and caudal horns of the meniscus.

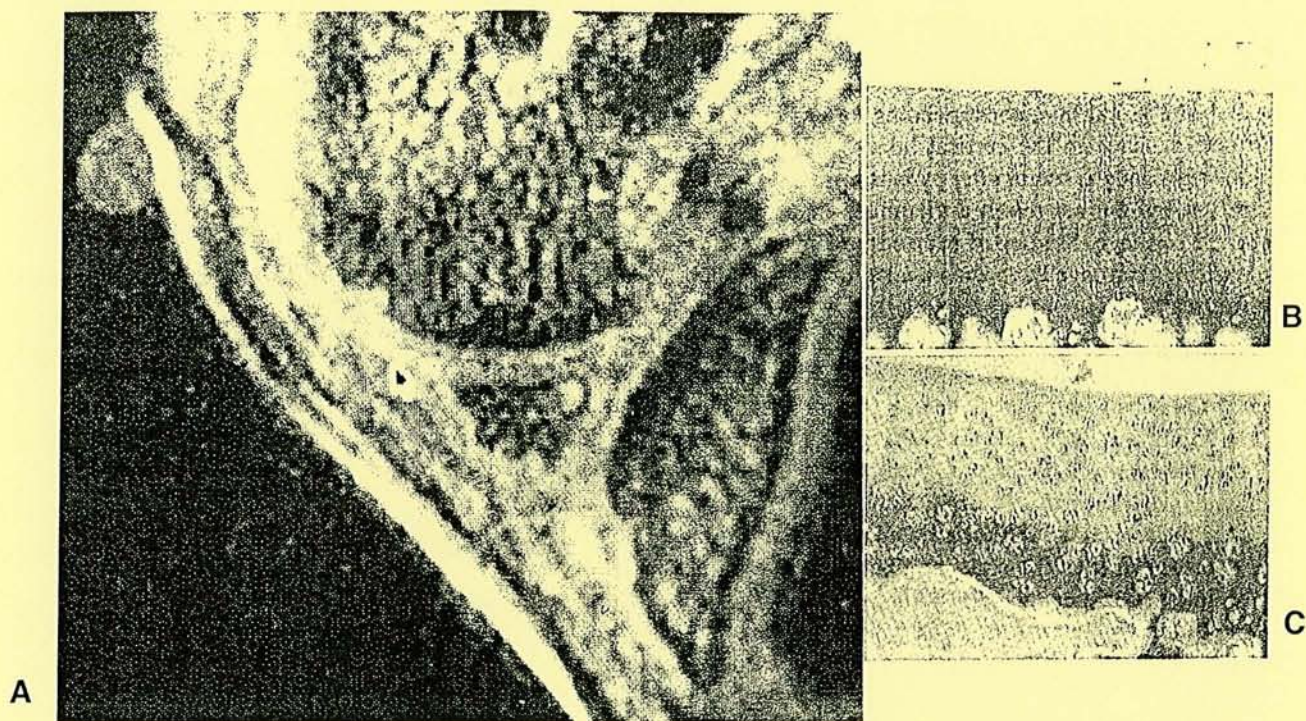


Figure 3. Trilaminar appearance of articular cartilage in the rat knee joint. (A) High resolution parasagittal MR image, in which the articular cartilage appears as a well defined layer about 250 μ m thick. Typical trilaminar appearance of the cartilage is seen in the femoral epiphysis, tibial plateaus, and growth plates, and this persists when the articular cartilage presents a net depletion of proteoglycans, as shown by loss of safranin O staining in C. (B) Median sagittal histological section. Safranin O stains the normal articular and epiphyseal cartilage dark pink along its length.

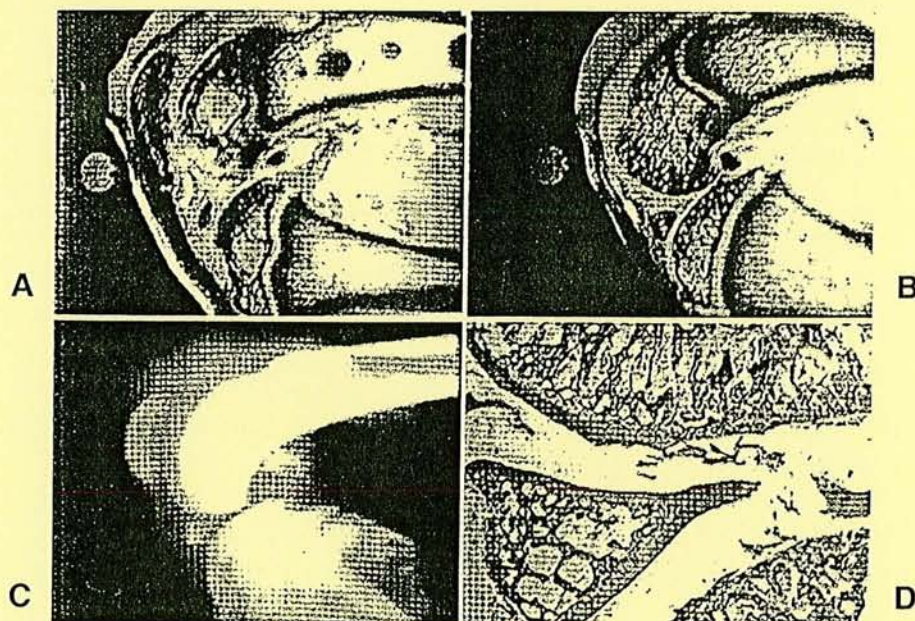


Figure 4. Rat knee on Day 15 after injection of iodoacetate. (A) Sagittal MR image showing that the patella is thinner and has been pushed outward by osteophytic remodeling. The subchondral bone looks irregular. The trabecular bone has lost its trabecular structure: its architecture is thinner and some cysts in weight bearing areas are seen as bright signal. (B) Parasagittal MR image, in which cartilage thinning is clearly visible. The menisci appear irregular, smaller, and inhomogeneous. (C) Lateral radiograph, showing clear subchondral erosions, narrowing of the femorotibial space, sclerosis of subchondral bone. The patella is thinner and pushed outward. The meniscus looks thinner than normal, with surface irregularities and a loss of density. (D) Histological section (hematoxylin & eosin) showing a complete loss of articular cartilage on weight bearing areas (right), though it is still present at the margins of the joint (left).

the tendon and Rubenstein, *et al*²⁵ in bovine cartilage. As far as we know, the laminar appearance of the articular cartilage has not previously been described in rat knee. Carpenter, *et al*¹⁶ described a bright line, corresponding to a reduced trabecular pattern, beneath the cortical bone, seen as a dark line, in the tibia and the femur after pannus formation in rats with arthritis, but did not report a trilaminar appearance of the articular cartilage. Studies of excised bovine or human normal articular cartilage have shown a laminar appearance in MR images²⁶.

There is no satisfactory biophysical explanation yet for this laminar appearance. Lehner, *et al*²⁷ attributed the differences in zonal signal intensity to the variation in water content from the surface (82%) to the depth (76%). Modl, *et al*, also noting the presence of 3 layers, concluded that the layers seen with MRI roughly corresponded to different histologic zones. Rubenstein, *et al*²⁵ offered an alternative explanation: that the effect of the collagen fibers was due to the result of interaction between the mobile protons in free water and those protons that are rigidly bound to the collagen ("dipole-dipole coupling"). Paul, *et al*²⁸ proposed that the signal intensity of cartilage was primarily determined by the proteoglycan concentration: they observed that the intensity of MR signals varied with proteoglycan concentration measured as a function of cartilage depth. In our OA model, the trilaminar appearance of the articular cartilage persisted on Day 5, whereas histological sections showed a depletion of safranin O staining in the noncalcified cartilage. This trilaminar aspect was observed many times in the animals with OA.

The effects of iodoacetate are well known and have been confirmed by various authors in several experimental models: hens²⁹, guinea pigs^{30,31}, mice³², and rats³³. This model seems useful to explore the natural course and the treatment of human disease, because it mimics some features of OA, like cartilage erosions, osteophytosis, subchondral involvement, and loss of spontaneous mobility³⁴. High resolution MR imaging also showed the course of changes not only in cartilage and bone after iodoacetate injection, but also in soft tissue. Cartilage thinning was plainly visible on parasagittal slices in weight bearing areas, and thickening of the articular cartilage at the margin in response to osteophytic remodeling was also seen. This osteophytic remodeling pushed the patella outward and appeared as a brighter signal than the articular cartilage.

MR imaging has the advantage over radiography of showing changes in Hoffa's ligament, which looked inhomogeneous and smaller than normal. The patellar ligament was thicker and broader, with an inhomogeneous signal intensity corresponding to the effects of juxtaarticular iodoacetate injection³⁵. MRI showed alterations of subchondral bone, which looked irregular. The trabecular bone kept its trabecular structure, which became progressively thinner, with voluminous cysts seen as bright signal on weight bear-

ing areas. Heavy pitting of the femoral epiphysis in the metaphyseal regions was seen. Radiography showed clearly the modifications of the limits, density of the calcified menisci, and subchondral erosions in advanced stages of OA. Radiographs also showed extensive decalcification of the knee joint, which MRI cannot do.

Most clinical and experimental studies of OA have been limited to evaluating cartilage thickness or volume³⁶ and identifying the presence of cartilage lesions. Several studies have attempted to assess the severity of OA using MR signal intensity in various cartilage abnormalities. Paul, *et al*¹⁵ reported an MRI study of cartilage degeneration in the rabbit knee caused by the intraarticular injection of papain. They found a correlation between the loss of articular cartilage proteoglycan (measured histochemically) and the decrease in cartilage thickness (measured by MRI at 1.5 T with voxel resolution $3.0 \times 0.64 \times 0.32$ mm³). The same group used 3D MRI to verify the position of a surgical implant used to deliver interleukin 1 (IL-1) into rabbit knee joints³⁷. Gahunia, *et al*¹⁴ reported abnormalities of MR signal intensity in selected regions of interest of articular cartilage and correlated these findings with histological findings.

Regions with histologically established proliferating chondrocytes or fibrillated cartilage showed bright signal intensity on MR images (TR 3000 ms; TE 15 ms) and elevated T1 and T2 relaxation time values, whereas regions of collagen condensation showed low signal intensity on such MR images and had decreased T1 and T2 relaxation time values. This author suggested that increased variability of the T1 and T2 relaxation times observed as OA progresses may be due to simultaneous occurrence of these 2 processes, that is, degeneration and repair. Because details of the relaxation mechanism in tissues, not currently understood, are presumably related to the macromolecular content of cartilage (collagen and/or proteoglycans), the orientations of collagen fibers, and the surface interactions of these fibers with water molecules, we think that study of OA in the rat knee model on an 8.5 T imager would be useful to determine changes in T1 and T2 relaxation times after iodoacetate injection. This model makes it possible to study changes of signal intensity and cartilage thickness at high spatial resolution, when the matrix cartilage is undergoing pronounced depletion of proteoglycans or chondrocytes.

Animal models of OA are important for furthering the understanding of the disease processes and their response to experimental therapies. We have shown that MR at high field strength is a sensitive imager of normal articular and abarticular rat knee structures, particularly hyaline cartilage. Some appearances of human cartilage, such as its trilaminar appearance, can also be seen in rat articular cartilage. This aspect is not clearly understood and we are investigating the effect of each suspected element (proteoglycans, collagen fibers, cells, and variations in cartilage characteristics with age) on MR images. In experimentally induced OA in rat

knees, the MR microimaging technique depicts early changes in cartilage very accurately, before lesions are apparent on radiographs; shows changes in soft tissues that are not seen on radiographs; and in the later stages shows remodeling of subchondral and trabecular bone. These MR findings can complement macroscopic and histological scoring in the evaluation of chondroprotective drugs in this experimental model of OA in rats. Iodoacetate has the advantage that it produces cartilage lesions of graded severity, according to the dose injected into the joint³⁴. We are now assessing the accuracy of the method in depicting lesions such as small cartilage erosions and edema.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Pr. Dan Furst for critical review of the manuscript, Pr. J. Floquet and Pr. B. Terlain for their participation, and S. Miller for language editing.

REFERENCES

- Collins DH, McElligott TF: Sulphate uptake by chondrocytes in relation to histological changes in osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 1960;19:318-30.
- Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L: Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg* 1971;53A:523-37.
- Mankin HJ, Johnson ME, Lippiello L, Zarins A: Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. III. Distribution and metabolism of amino sugar-containing macromolecules. *J Bone Joint Surg* 1981;63A:131-9.
- Adams ME, Wallace CJ: Quantitative imaging of osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1991;20:26-39.
- Ayral X, Dougados M, Llistrat V, et al: Chondroscopy: A new method for scoring chondropathy. *Semin Arthritis Rheum* 1993;22:289-97.
- Blackburn WD, Chivers S, Bernreuter W: Cartilage imaging in osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1996;25:273-81.
- Terrier F, Hricak H, Revel D, et al: Magnetic resonance imaging and spectroscopy of the periarticular inflammatory soft tissue changes in experimental arthritis of the rat. *Invest Radiol* 1985;20:813-23.
- Wojtys E, Wilson M, Buckwalter K, Braunstein EM, Martel W: Magnetic resonance imaging of knee hyaline cartilage and intraarticular pathology. *Am J Sports Med* 1987;15:455-63.
- Li KC, Higgs J, Aisen AM, Buckwalter KA, Martel W, McCune WJ: MRI in osteoarthritis of the hip: Gradations of severity. *Magn Reson Imaging* 1988;6:229.
- Rose PM, Demlow TA, Szumowski J, Quinn SF: Chondromalacia patellae — Fat suppressed MR imaging. *Radiology* 1994;193:437-40.
- Broderick LS, Turner DA, Renfrew DL, Schnitzer TJ, Huff JP, Harris C: Severity of articular cartilage abnormality in patients with OA: Evaluation with fast spin echo MR vs arthroscopy. *AJR* 1994;162:99-103.
- Recht MP, Kramer J, Marcelis S, et al: Abnormalities of articular cartilage in the knee: Analysis of available MR techniques. *Radiology* 1993;187:473-8.
- Braunstein EM, Brandt KD, Albrecht M: MRI demonstration of hypertrophic articular cartilage repair in osteoarthritis. *Skeletal Radiol* 1990;19:335-9.
- Gahunia HK, Lemaire C, Babyn P, Cross AR, Kessler MJ, Pritzker K: Osteoarthritis in rhesus macaques knee joint: Quantitative magnetic resonance imaging tissue characterization of articular cartilage. *J Rheumatol* 1995;22:1747-56.
- Paul PK, O'Byrne E, Blancuzzi V, et al: Magnetic resonance imaging reflects cartilage proteoglycan degradation in the rabbit knee. *Skeletal Radiol* 1991;20:31-6.
- Watson PJ, Hall LD, Carpenter TA, Tyler JA: A magnetic resonance imaging study of joint degeneration in the Guinea pig knee. *Agents Actions* 1993;(suppl 39):261-5.
- Carpenter TA, Everett JR, Hall LD, et al: High resolution magnetic imaging of arthritic pathology in the rat knee. *Skeletal Radiol* 1994;23:429-37.
- Recht MA, Resnick D: Magnetic resonance of articular cartilage: The state of the art. *J Rheumatol* 1995;(suppl 43):22:52-5.
- Duwell SH, Cekler TL, Ong K, et al: Musculoskeletal MR imaging at 4 T and at 1.5 T: Comparison of relaxation times and image contrast. *Radiology* 1995;196:551-5.
- Loeuille D, Gonord P, Guingamp C, et al: High resolution MRI of osteoarthritic rat knee (abstr). *Arthritis Rheum* 1995;38:S500.
- Rosenberg L: Chemical basis for the histological use of the safranin-O in the study of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 1971;53A:69-82.
- Recht M, Resnick D: MR imaging of articular cartilage: Current status and future directions. *AJR* 1994;163:283-90.
- Tyler J, Watson P, Koh HL, Herrod NJ, Robson M, Hall L: Detection and monitoring degeneration of osteoarthritic cartilage by MRI. *Acta Orthopaedica Scand* 1995;(suppl 266):66:130-8.
- Berendsen HJC: Nuclear magnetic resonance study of collagen orientation. *J Chem Phys* 1962;36:3297-305.
- Rubenstein JD, Kim JK, Morava-Protzner I, Stanchev PL, Henkelman RM: Effects of collagen orientation on MRI characteristics of bovine articular cartilage. *Radiology* 1993;188:219-26.
- Modl JM, Sether LA, Haughton VM, Kneeland JB: Articular cartilage: Correlation of histologic zones with signal intensity at MR imaging. *Radiology* 1991;176:853-5.
- Lehner KB, Rech H, Gmenwieser JK, Heuck AF, Lukas HP, Kohn HP: Structure, function and degeneration of bovine hyaline cartilage: Assessment with MR imaging *in vitro*. *Radiology* 1989;170:495-9.
- Paul PK, Jasani MK, Sebok D, Rakhit A, Dunton AW, Douglas FL: Variation in MR signal intensity across normal human knee cartilage. *J Magn Reson Imaging* 1993;3:569-74.
- Kalbhenn DA, Blum J: Theoretisches konzept und experimentelle bestätigung für ein neues arthrose-modell am versuchstier. *Arzneimittelforsch* 1977;27:527-31.
- Williams JM, Brandt KD: Immobilization ameliorates chemically-induced articular cartilage damage. *Arthritis Rheum* 1984;27:208-16.
- Williams JM, Thonar EJ-M: Early osteophyte formation after chemically induced articular cartilage injury. *Am J Sports Med* 1989;17:7-15.
- Van Osch GJVM, Van der Kraan PM, Van den Berg WB: *In vivo* quantification of proteoglycan synthesis in articular cartilage of different topographical areas in the murine knee joint. *J Orthop Res* 1993;11:492-9.
- Dunham J, Hoedt-Schmidt S, Kalbhenn DA: Structural and metabolic changes in articular cartilage induced by iodoacetate. *Int J Exp Pathol* 1992;73:455-64.
- Gingamp C, Gegout P, Philippe L, et al: Monoiodoacetate induced experimental osteoarthritis in the rat: Effect on cartilage metabolism and mobility (abstr). *Inflam Res* 1995;44:S230.
- Fakri L, Loeuille D, Gillet P, Grenier D, Netter P, Brigueat A: *In vivo* micro imaging study of the rat ankle at 2 tesla. *Soc Magn Res* 1995;3:1538.
- Pilch L, Stewart C, Gordon D, et al: Assessment of cartilage volume in the femorotibial joint with MRI and 3D computer reconstruction. *J Rheumatol* 1994;21:2307-19.
- Paul PK, O'Byrne E, Blancuzzi V, et al: 3D MRI of rabbit knee: Localisation of intra-articular infusion site and evaluation of pathology induced by inflammatory agents. *Soc Magn Res* 1991;1129.

Discussion

La prévention de la diminution de l'activité spontanée des rats, en réponse à l'injection intra-articulaire de MIA (0,3 mg), grâce l'injection intra-articulaire d'un anesthésique local, la xylocaïne, confirme l'origine douloureuse de cette hypomobilité. L'induction d'une douleur par l'injection intra-articulaire de MIA n'a pas été décrite à notre connaissance. La réaction d'alkylation entre les groupements thiols et le MIA conduit non seulement à l'inhibition de certaines enzymes de la glycolyse, mais également à l'oxydation du glutathion réduit et de la cystéine intracellulaires, qui sont les principaux éléments d'une défense cellulaire contre un stress oxydant. Les effets du MIA sont ainsi ceux générés par un stress oxydant.

La contribution des radicaux libres dans la genèse de l'hypomobilité consécutive à l'injection de MIA est mise en évidence par l'effet bénéfiques de l'injection intra-articulaire préventive de DMSO (2 %). Cet anti-radicalaire [Homandberg, 1996], en traitement percutané chez des patients atteints d'une gonarthrose, a par ailleurs montré des effets antalgiques significatifs [Eberhardt, 1995].

Une des premières manifestation en réponse à un stress oxydant est la diminution du potentiel de membrane de la mitochondrie : elle conduit à la libération des ions calcium dans le cytosol. L'augmentation de calcium intracellulaire est impliquée dans les phénomènes d'exocytose. Dans la synapse, elle contribue à la libération des neuropeptides. Ainsi, l'injection intra-articulaire de MIA peut conduire à la libération de neuropeptides dans la membrane synoviale particulièrement innervée. La liaison de la xylocaïne sur les récepteurs des neuropeptides empêcherait la genèse d'un potentiel d'action, inhibant ainsi la genèse de la douleur.

Cette étude met également en évidence la contribution des prostaglandines dans la perception de la douleur induite par l'injection de MIA chez le rat : le traitement par un AINS sélectif (nimésulide) ou non de COX-2 (kétoprofène) permet de moduler la perte de la mobilité des rats.

Dans un modèle de douleur inflammatoire chez le rat induite par l'injection d'adjuvant (monoarthrite), le paracétamol conduit à une inhibition de la synthèse des prostacyclines et à une diminution de l'activité des nocicepteurs [McQueen, 1991]. Dans notre modèle, le paracétamol ne montre aucun effet antalgique. Il a été montré que le paracétamol était susceptible de prévenir l'hyperalgie induite chez le rat par l'injection de formol dans la queue, lorsqu'il est administré de façon préventive. Par contre, dans cette même étude, il n'a présenté aucune propriété antalgique en traitement curatif [Bianchi, 1997]. Dans notre étude, il est possible qu'une durée de trois quart d'heure entre le traitement des animaux et l'injection intra-articulaire de MIA n'ait pas été suffisante pour mettre en évidence les effets antalgiques d'un traitement par le paracétamol.

Chapitre X

Analyse de la protéine porteuse de l'agrécan en SDS-PAGE.

L'étude de la dégradation de la protéine porteuse de l'agrécan en gel de polyacrylamide et en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) constitue la méthode la plus informative pour caractériser les différents fragments résultant d'une activité protéolytique [Vilim, 1993].

Nous avons appliqué cette technique à des échantillons de cartilage patellaire de rats, 2, 8 et 15 jours après une injection intra-articulaire de MIA (0,3 mg), et nous avons comparé les profils électrophorétiques à ceux d'un cartilage sain.

Les PG ont été extraits dans une solution de chlorure de guanidine, puis, en raison de la forte glycosylation de l'agrécan, une double digestion avec la chondroïtinase ABC et la kératanase a été réalisée. Le dosage préalable des GAG sulfatés a permis de déterminer le volume des échantillons à déposer, de telle sorte qu'ils correspondent à une quantité de 20 µg de GAG sulfatés.

1. Résultats.

L'agrécan non déglycosylé est un PG de masse moléculaire trop élevée (1 à 5 10^3 kDa) pour pénétrer dans un gel de polyacrylamide (6 %; figure X.1, piste Tnd). Après la déglycosylation enzymatique des échantillons, une bande à 300 kDa environ apparaît (figure X.1, piste Td) qui correspond à la protéine porteuse de l'agrécan.

L'injection intra-articulaire de MIA (0,3 mg/50µl) conduit dès J2 (figure X.1, piste J2d) à la disparition de la protéine de 300 kDa et à l'apparition de 2 autres, de 230 et 200 kDa environ. Le même profil électrophorétique est observé 8 jours après l'injection (figure X.1, piste J8d). A J15, plusieurs autres bandes s'ajoutent : 3 ont une masse moléculaire apparente de 260 à 300 kDa, 3 autres de 175 à 190 kDa environ, et une dernière apparaît à 125 kDa environ (figure X.1, piste J15d).

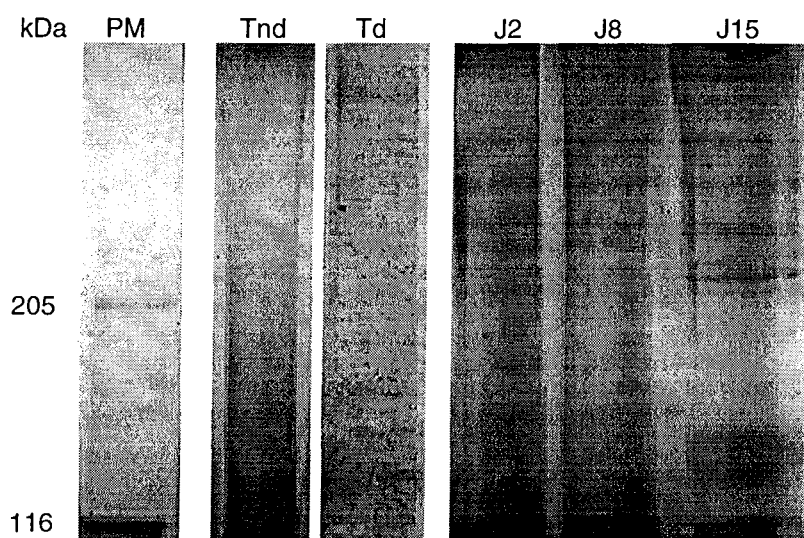


Figure X.1. Analyse en SDS-PAGE 6 % de l'agrécane extrait du cartilage patellaire du rat (GuHCl 4 M, 24 h, 4°C) puis déglycosylé (digestion enzymatique par la chondroïtinase ABC et la kératanase). L'équivalent de 20 µg de GAG sulfatés ont été déposés.

(1) : marqueurs de taille; (2) : échantillon témoin non déglycosylé; (3) : témoin avec traitement enzymatique; échantillons déglycosylés obtenus après injection intra-articulaire de 0,3 mg de MIA à J2 (4); J8 (5); J15 (6).

2. Identification des différents fragments de l'agrécane.

La mise en évidence par SDS-PAGE de l'activité protéolytique d'une enzyme particulière sur l'agrécane, ou la mise en évidence de la dégradation de l'agrécane dans des échantillons de cartilage humains ou de liquide synoviaux est largement décrite dans la littérature. Les effets de cytokines telles que l'IL-1 β ou encore des rétinoïdes ont également été étudiés [Bonassar, 1997]. Par contre, peu d'études démontrent la contribution des protéinases dans un modèle d'arthrose expérimentale chez l'animal [Wei, 1997].

L'analyse des échantillons de cartilage que nous avons obtenus après l'injection intra-articulaire de MIA (0,3 mg; J2, J8, J15) montre des profils protéiques différents, qui traduisent une dégradation de la protéine porteuse de l'agrécane de plus en plus poussée. La comparaison de nos résultats à ceux de la littérature [Nguyen, 1990; Ilic, 1992; Lark, 1995] permet de présumer de la structure des différents fragments.

Nous avons estimé la masse moléculaire apparente de la protéine porteuse de l'agrécane chez le rat à 300 kDa. D'après sa séquence, la masse réelle de cette protéine est de 220 kDa. Notre résultat pourrait s'expliquer par une déglycosylation incomplète par la chondroïtinase ABC et kératanase.

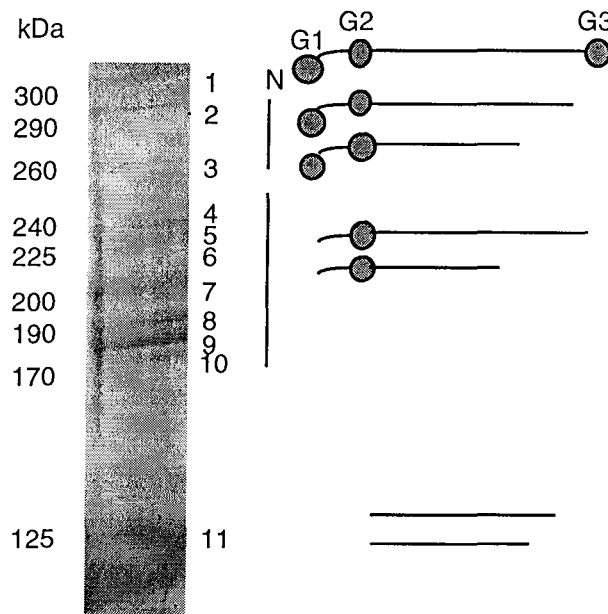


Figure X.2. Les différents sites de clivage de la protéine porteuse de l'agrécane par les protéinases matricielles.

A J2, la substitution de la protéine de 300 kDa par deux protéines de 230 et 200 kDa refléterait l'hydrolyse de l'agrécane en deux sites différents entre les domaines G1 et G2, donnant naissance à deux fragments ayant également perdu le domaine globulaire G3 (figure X.2). Les bandes apparaissant à J15, et dont les masses moléculaires sont comprises entre 240 et 175 kDa, refléteraient là aussi l'hydrolyse de la protéine entre les domaines globulaires G1 et G2 par différentes protéinases en des sites distincts, et du côté C-terminal (clivage du domaine G3). Les protéines d'une masse moléculaire inférieure correspondraient à des fragments de la protéine porteuse de l'agrécane ne comportant plus aucun domaine globulaire.

Discussion

Dans un cartilage sain, la structure de l'agrécan varie en fonction de l'âge, avec notamment une diminution de la longueur des chaînes de GAG sulfatés, des modifications de leur composition, une variabilité plus grande dans la longueur de la molécule. La proportion des agrécans capables de s'agréger à l'AH diminue [Buckwalter, 1994; Sztrolovics, 1997]. Ces modifications de la structure de l'agrécan résultent d'une altération de la synthèse de l'agrécan ainsi que d'une augmentation de la synthèse de protéinases. Dans un cartilage sain, 3 populations d'agrécan peuvent être distinguées : l'agrécan intact comportant les 3 domaines globulaires, l'agrécan débarrassé du domaine G3, ou l'agrécan débarrassé du domaine G1 [Hardingham, 1990].

Dans notre cas, l'existence d'une population unique d'agrécan s'explique par le fait que les rats soient jeunes : l'activité protéolytique qui s'exerce sur l'agrécan n'est pas suffisante pour que, dans nos conditions, plusieurs populations soient distinguées.

Au cours des pathologies articulaires inflammatoire ou dégénérative, un déséquilibre s'installe entre l'augmentation de la synthèse des différentes protéinases dans le cartilage articulaire et celle des TIMP [Martel-Pelletier, 1994]. Ce déséquilibre conduit à une augmentation de la dégradation des constituants matriciels et contribue de façon importante à la destruction du tissu [Cs-Szabo, 1995]. La dégradation de l'agrécan au cours de ces pathologies a suscité beaucoup d'intérêt : l'analyse des fragments du PG dans le liquide synovial ou le sérum, après qu'ils aient diffusé hors du cartilage, peut rendre compte de la sévérité de l'atteinte articulaire [, 1994]. A notre connaissance, peu d'études décrivent la dégradation de l'agrécan au sein du cartilage articulaire dans des modèles d'arthropathies expérimentales [Bayne, 1995; Singer, 1995].

Cette étude montre que l'injection intra-articulaire de MIA conduit rapidement à la dégradation de l'agrécan (J2). Le profil électrophorétique obtenu à J8 n'est pas différent de celui obtenu à J2 : la masse moléculaire des fragments suggère une dégradation de l'agrécan entre les domaines G1 et G2, et dans la région du domaine G3. L'agrécan perd ainsi les principaux domaines impliqués dans une interaction avec d'autres constituants matriciels, notamment l'AH. La majorité des enzymes synthétisées par les chondrocytes sont susceptibles d'hydrolyser la protéine porteuse de l'agrécan entre les domaines G1 et G2 : ce sont aussi bien les MMP, la cathepsine B, la plasmine, ou l'urokinase [Hardingham, 1995]. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de certaines MMP a permis de mettre en évidence dans un modèle *in vitro* le rôle prédominant des stromélysines dans la dégradation de la protéine porteuse de l'agrécan [Bottomley, 1997]. Trois principaux sites de clivage ont été identifiés entre les domaines G1 et G2 : TAQE/AGEG, et VSQE/LGQR, TEGE/ARGS [Ilic, 1992]. Ce dernier correspond au "site agrécanase", sur lequel

certain fragments de la fibronectine, la MMP8, et la MT-MMP1 sont actives [Fosang, 1994; Büttner, 1998].

L'augmentation du nombre de bandes à J15 est en rapport avec une atteinte beaucoup plus sévère : au delà de J8, l'évolution de l'arthrose induite par l'injection intra-articulaire de MIA chez le rat semble se précipiter. Nous observons également la réapparition de plusieurs protéines de masse moléculaire entre 300 et 260 kDa (J15, figure X.2). Elle pourraient représenter la néosynthèse de l'agrécan dans les régions non portantes au niveau de laquelle se produit l'ostéophytose. Cependant, une partie des agrécans nouvellement synthétisés sont probablement rapidement dégradés : les bandes à 290 et 260 kDa correspondent à la protéine porteuse de l'agrécan ne présentant plus le domaine G3. Ainsi, dans les régions portantes, la synthèse de l'agrécan est diminuée et sa dégradation est augmentée. A l'inverse, dans les régions les moins sollicitées, l'augmentation de l'anabolisme et la diminution de l'agrécan conduisent à une accumulation des constituants matriciels caractérisant l'ostéophytose.

La contribution de l'IL-1 β et du TNF α dans la dégradation des constituants du cartilage est connue : ce sont les principales cytokines capables d'induire l'expression des différentes protéinases, dont les MMP et l'agrécanase [Arner, 1998]. Les rétinoïdes sont des dérivés de la vitamine A qui montrent aussi des propriétés à induire la dégradation des PG du cartilage [Bonassar, 1997]. Cependant, contrairement à l'IL-1 β et au TNF α , leur implication dans la physiopathologie de l'arthrose n'a pas été montrée. A l'inverse, le TGF β antagonise les effets de l'IL-1 β [Hardingham, 1994]. La destruction du cartilage dans les régions portantes, et l'hypertrophie du tissu dans les régions les moins sollicitées met en jeu des voies distinctes, dans lesquelles l'IL-1 β et le TGF β ont des rôles essentiels [Chandrasekhar, 1993].

Chapitre XI

Apoptose chondrocytaire et arthrose

1. Hypothèses.

Une étude histologique sur les rotules après l'injection intra-articulaire d'une faible dose de MIA (0,03 mg; J3, J7, J15, J21) dans le genou des rats nous a permis de constater que des modifications de la couche de cartilage calcifié et de l'os sous-chondral précédaient une hypertrophie du cartilage articulaire (J15). Ces modifications consistent en un amincissement de la couche de cartilage calcifié, visible dès J3. Elle est réduite de près de la moitié de son épaisseur à J7 et elle est devenue presque inexistante à J15. Conjointement, nous avons constaté la formation d'une travée osseuse continue sous le cartilage (J15). Une telle condensation de l'os sous-chondral avant toute atteinte du cartilage patellaire a également été observée dans le modèle d'arthrose induite par la section du LCA (J15).

Cette condensation de l'os sous-chondral implique un mécanisme d'ossification endochondrale [Gesternfeld, 1996]. Ce processus, qui met en jeu la maturation des chondrocytes en cellules de type ostéoblastique, s'accompagne de la synthèse transitoire de collagène de type X. Un tel processus de maturation chondrocytaire a été mis en évidence dans les couches profondes du cartilage articulaire au cours des phases précoces d'une arthrose expérimentale chez le chien, et dans des échantillons de cartilage humain, dans les régions devenues ostéophytiques [Von der Mark, 1992; Walker, 1995]. Le collagène de type X n'a pas été décelé dans les couches moyennes des régions portantes. Nous avons ainsi formulé l'hypothèse selon laquelle les chondrocytes des zones non portantes ont la capacité de moduler leur phénotype vers celui d'un chondrocyte hypertrophique en réponse à un stress. Par contre, les chondrocytes des régions non portantes n'auraient pas cette aptitude, et, comme le suggérait Erlacher en 1995, s'orientent vers une mort cellulaire par apoptose.

Nous avons vérifié cette hypothèse dans le modèle d'arthrose induite par l'injection infrapatellaire d'une faible dose de MIA (0,03 mg). Nous avons comparé la synthèse des PG dans le cartilage patellaire, considéré comme un indice d'une souffrance cellulaire, aux variations de l'expression des ARNm des gènes codant pour l'IL-1 β , bax et Bcl-2. Ces paramètres ont été étudiés en fonction de l'évolution de l'arthrose expérimentale, entre J2 et J30. Nous avons également vérifié dans quelle mesure les chondrocytes montraient des signes d'apoptose par une méthode TUNEL *in situ* et par cytométrie de flux, à deux temps clés, J2 et J10.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un article, actuellement soumis à la revue "Arthritis and Rheumatism", et placé en annexe à la fin de ce chapitre. Les résultats et les conclusions de ces travaux sont résumés dans les paragraphes suivants.

2. Résultats.

L'étude de la synthèse des PG nous a permis de confirmer les résultats précédemment obtenus à la même dose de 0,03 mg de MIA : l'incorporation de ^{35}S est inhibée dans le centre de la rotule et plus élevée dans le cartilage péripatellaire. Le même type de variations transitoires est observé : l'inhibition de la synthèse des PG dans le centre de la rotule est moins importante à J6, ainsi qu'à J20 et J25. Elle est maximale à J4, entre J10 et J15, et à J30.

L'expression des ARNm de l'IL-1 β , de bax, Bcl-2 et du collagène de type X a été étudiée par RT-PCR (transcription inverse - réaction de polymérisation en chaîne) grâce à des amorces spécifiques, en raison de la faible quantité d'ARN totaux extraits du cartilage patellaire du rat. Ces 4 marqueurs sont exprimés de façon constitutive dans le cartilage patellaire chez le rat. L'expression de bax et de l'IL-1 β a été rapportée d'une part à la G3PDH, ainsi qu'au niveau d'expression du gène correspondant obtenu dans un cartilage sain, de façon à mieux apprécier les variations de l'expression de ces gènes au cours de l'arthrose expérimentale. Bcl-2 étant très faiblement exprimée dans un cartilage sain, l'expression de ce gène après l'injection intra-articulaire de MIA a simplement été rapportée à la G3PDH.

L'expression de bax dans les chondrocytes est augmentée de J2 à J20 en réponse à l'injection de MIA. Le niveau d'expression le plus élevé (x7 à x8) a été observé à J10 et à J20. Bcl-2 est fortement exprimé à J2 (x120), puis diminue de J6 à J15. Bcl-2 est à nouveau plus fortement exprimé entre J20 (x60) et J30 (x30).

L'injection intra-articulaire de MIA conduit également à une augmentation de l'expression de l'IL-1 β à J2 par rapport à son niveau d'expression dans un cartilage sain (injection intra-articulaire de sérum physiologique, x3,5). De J4 à J6, son expression est comparable à celle observée dans un cartilage sain. Elle augmente à nouveau entre J10 et J15 (x2 à x3,5 respectivement). L'IL-1 β est exprimé à un taux basal entre J20 et J25, puis son expression augmente faiblement à J30.

La cytométrie de flux a mis en évidence des taux faibles (entre 0,5 et 4%) et équivalents de chondrocytes apoptotiques entre un cartilage sain et 2 jours après l'injection intra-articulaire de MIA. La méthode TUNEL n'a pas permis de mettre en évidence de chondrocyte apoptotique ni dans le cartilage de rats témoins, ni à la suite de l'injection de MIA (J2). A l'inverse, ces deux méthodes ont permis de déceler des chondrocytes apoptotiques 10 jours après l'injection de MIA (0,03 mg; 16 à 48 % de chondrocytes apoptotiques décelés en cytométrie de flux).

3. Discussion.

L'injection intra-articulaire de MIA conduit à une pathologie dégénérative du cartilage articulaire caractérisée par une érosions du cartilage articulaire et la formation d'ostéophytes. Le handicap survenant de façon tardive à la suite de l'injection d'une dose élevée de MIA (de 0,3 à 3 mg) traduit, comme en clinique, une atteinte articulaire sévère. A l'inverse, une faible dose de MIA (0,03 mg) conduit à un processus dégénératif lent qui s'accompagne de variations successives de la synthèse des PG. Aucune diminution de la fonction articulaire n'a été observée à cette faible dose [Guingamp, 1997].

La synthèse des PG est considérée comme un indice d'une souffrance chondrocytaire. Dans le cartilage centropatellaire, et en réponse à l'injection de 0,03 mg de MIA, elle est inhibée de façon importante (jusqu'à -70% à J2 par rapport à un cartilage sain) et inconstante : à J6, l'anabolisme est diminué de façon moindre, et il est comparable à un cartilage sain à J25. Cette altération de l'activité chondrocytaire est liée à l'inhibition de certaines enzymes de la glycolyse par le MIA, conduisant à la diminution du taux intracellulaire d'ATP [Kalbhen, 1985]. Cet agent réagit également avec les groupements thiols d'autres constituants tels que la forme réduite du glutathion ou la thioredoxine. Une déplétion chimique du glutathion intracellulaire conduit à une diminution de la synthèse des PG par les chondrocytes [Habuchi, 1991]. Cet effet a été attribué à un changement de l'état redox de la cellule, qui contribue à réguler l'activité de certains facteurs de transcription [Kamata, 1999]. C'est le cas de AP-1 dont l'activité est modulée au niveau d'un résidu cystéine, et qui régule l'expression de gènes codant pour des protéines matricielles [Abate, 1990]. Cependant, ces effets du MIA sur l'état redox des chondrocytes est certainement transitoire, et il est impossible qu'il soit responsable de l'inhibition de la synthèse des PG qui persiste jusqu'à J30. La diminution de l'anabolisme peut être lié à la synthèse d'IL-1 β par les chondrocytes eux-mêmes. Cette cytokine a été largement impliquée dans l'inhibition de la synthèse des PG, et dans la physiopathologie de l'arthrose [Towle, 1997]. Dans cette étude, les variations de la synthèse des PG peuvent être reliées à l'expression de l'IL-1 β : l'anabolisme chondrocytaire est diminué lorsque l'expression de l'IL-1 β est augmentée (J2, J10, J15, J30). A l'inverse, la synthèse des PG est diminuée de façon moindre (J6), ou comparable à celle d'un cartilage sain (J25), lorsque l'expression de l'IL-1 β est faible. Ainsi, l'inhibition de l'anabolisme chondrocytaire en réponse à l'injection intra-articulaire de le genou du rat résulte en premier lieu d'une déplétion en ATP et de l'inactivation de certains facteurs de transcription de gènes codant pour des protéines matricielles. Ensuite, cette inhibition est entretenue par la synthèse de certaines cytokines telles que l'IL-1 β .

La modulation de l'état redox d'une cellule intervient également dans les phénomènes de mort cellulaires (Kamata, 1999). Le niveau d'expression des ARNm codant pour bax et Bcl-2 peut être un bon indice du devenir d'une cellule. En réponse à l'injection intra-articulaire de MIA, l'expression de bax est augmentée. Elle est maximale entre J10 et J20. Bcl-2 est également fortement exprimé à J2, J20 et J25. La cytométrie de flux et la méthode TUNEL (*in situ*, sur des coupes de cartilage patellaire) ont été utilisées pour déceler des chondrocytes apoptotiques à J2 et à J10. A ces deux temps, l'expression du gène codant pour Bcl-2 est respectivement maximale et faible, bax et l'IL-1 β sont surexprimés et la synthèse des PG est fortement diminuée. A J2, ni la méthode TUNEL ni la cytométrie de flux ne nous ont permis de déceler de cellules apoptotiques. A l'inverse, la cytométrie de flux ainsi que la méthode TUNEL ont mis en évidence des chondrocytes apoptotiques 10 jours après l'injection de MIA. La plupart des cellules apoptotiques sont localisées dans les régions portantes du cartilage patellaire, dans la couche moyenne. Dans un modèle d'arthrose induite par la section du LCA chez le chien, des chondrocytes apoptotiques ont été observés dans la couche superficielle, à proximité de la membrane synoviale [Hashimoto, 1998]. Ainsi, l'apoptose chondrocytaire est un phénomène qui existe à la fois au cours de l'arthrose chez l'homme et dans des modèles d'arthrose expérimentale chez l'animal. Cependant, il semblerait que le mode d'induction de cette arthrose expérimentale (étiologie?), l'environnement (proximité de la membrane synoviale) et les contraintes mécaniques déterminent quels chondrocytes sont condamnés.

Au cours de l'arthrose induite par l'injection intra-articulaire de MIA (0,03 mg), la comparaison des variations de la synthèse des PG avec celles de l'expression des différents gènes a permis de déterminer deux phases. La première se déroule de J2 à J6 : l'expression des ARNm codant pour Bcl-2 et la synthèse des PG varient d'une façon opposée. La forte expression de Bcl-2 constitue une adaptation chondrocytaire en réponse à la modification de l'état redox induite par le MIA, qui protège la cellule d'une mort par apoptose.

La seconde phase se déroule de J10 à J30. La synthèse des PG et l'expression de Bcl-2 évoluent de façon similaire, et leurs profils sont opposés à ceux de bax et de l'IL-1 β . Le faible niveau d'expression de Bcl-2 dans les chondrocytes lorsque celui de bax et de l'IL-1 β est élevé est associé à une mort cellulaire par apoptose. A J25, la synthèse des PG est comparable à celle d'un cartilage sain lorsque l'expression des ARNm codant pour Bcl-2 est importante. Cette surexpression de Bcl-2 dans un cartilage arthrosique a été interprétée par Erlacher [1995] comme une tentative des chondrocytes de se protéger d'une mort cellulaire par apoptose, qui pourrait contribuer à préserver l'intégrité de la matrice cartilagineuse.

Ainsi, l'arthrose expérimentale induite par l'injection intra-articulaire d'une dose faible (0,03 mg) de MIA dans le genou du rat reproduit de nombreux aspects de la pathologie humaine. Ce modèle d'arthrose peut ainsi permettre d'étudier l'efficacité de certaines molécules à moduler l'apoptose chondrocytaire et une atteinte dégénérative du cartilage articulaire.

Conclusion et perspectives

Conclusions et perspectives

L'arthrose est une des rares maladies dont l'évolution n'est pas fatale, et qui suscite pourtant un grand intérêt : 80 % de la population présentent au moins une atteinte articulaire, et, pour nombre d'entre eux, elle s'accompagne de douleurs articulaires et d'une gêne fonctionnelle parfois très invalidantes. Aux yeux de la société, l'arthrose est un problème social et économique.

Pour mieux comprendre la physiopathologie d'une affection ou déterminer la pertinence thérapeutique d'une molécule, des modèles d'étude *in vitro* ainsi que des modèles expérimentaux chez l'animal ont été développés. Une ambivalence existe au cours de l'arthrose en raison des phénomènes de destruction du cartilage et de reconstruction qui se produisent au sein d'une même articulation. De plus, nos connaissances de l'étiologie et de la physiopathologie de cette maladie sont insuffisantes. Il est donc plus aisé de déterminer la pertinence d'un modèle d'arthrose expérimentale d'après des critères morphologiques (érosions et ostéophytes). Le modèle d'arthrose consécutive à la section du LCA est le plus apprécié en raison de la similitude avec la clinique. Cependant, comme nous avons pu le constater chez le rat, la contribution des phénomènes inflammatoires dans ce modèle est importante. Si l'arthrose est davantage associée à un désordre du métabolisme énergétique des chondrocytes, l'injection intra-articulaire de MIA peut paraître satisfaisante. Cependant, cette arthrose expérimentale, si elle ne s'accompagne d'aucune manifestation inflammatoire, ne conduit à aucune altération de surface (fibrillation) du cartilage qui est si caractéristique d'une atteinte arthrosique chez l'homme. Ainsi, chaque modèle présente des similitudes et des différences par rapport à la pathologie humaine.

Ce sont les manifestations cliniques tardive (douleurs, gêne fonctionnelle) qui signent le début de la prise en charge thérapeutique des patients qui présentent une atteinte arthrosique. La télémetrie, qui permet la mesure de la mobilité spontanée du rat, nous a autorisé une approche « clinique » d'une arthrose expérimentale. L'installation progressive d'un handicap au cours de l'arthrose induite par l'injection intra-articulaire de MIA marque, comme dans la pathologie humaine, une atteinte articulaire sévère.

La survenue d'un handicap constitue ainsi un point de repère par rapport à la progression de l'arthrose expérimentale. Il paraissait ainsi facile de pouvoir évaluer la capacité de l'IRM à déceler des lésions du cartilage, ou encore de déterminer la contribution des phénomènes conduisant à la dégradation de l'agrécan au cours des phases précoces asymptomatiques.

Cependant, la progression trop rapide des lésions induites par une dose élevée de MIA ne nous a pas permis de révéler l'intérêt de l'IRM. Les travaux ultérieurs ont permis de montrer que cette technique d'imagerie permettait de détecter des modifications du cartilage en fonction de l'âge du rat. Le travail entrepris actuellement consiste à identifier le(s) paramètre(s) qui conduit (sent) à une modification du signal IRM. Il faudra ensuite montrer dans quelle mesure l'IRM est aussi performante pour détecter une atteinte du cartilage articulaire lorsque la progression de l'arthrose est plus lente (dose faible de MIA, section du LCA).

L'étude de la dégradation de l'agrécan au cours d'une arthrose qui se développe en si peu de temps permettait d'évaluer rapidement si cette technique, telle que nous l'avons développée dans le Laboratoire, était suffisamment sensible. La poursuite de ce travail consistera à déterminer la contribution de la dégradation de l'agrécan lorsque la progression de l'arthrose consécutive à l'injection de MIA est plus lente. Il nous faudra également identifier de façon plus précise les fragments de la protéine porteuse de l'agrécan.

Il faut également souligner que, et en dehors de toute relation avec l'arthrose expérimentale, la télémetrie nous a permis de définir l'injection intra-articulaire d'une dose élevée de MIA en tant que modèle de douleur (hypomobilité précoce et transitoire). Il semble d'autant plus intéressant qu'il n'y a aucune contribution de phénomène systémique (fièvre). Il pourrait s'agir d'un modèle de douleur pure, que l'on se doit de mieux caractériser, en identifiant directement les médiateurs impliqués (neuromédiateurs, cytokines, prostaglandines, radicaux libres, ...).

Enfin, l'injection d'une faible dose de MIA, qui conduit à l'installation d'un processus dégénératif du cartilage articulaire très progressif, nous a permis de reproduire une souffrance chondrocytaire aboutissant à une apoptose cellulaire. Des résultats similaires ont été obtenus sur des échantillons de cartilage humain présentant les signes d'une arthrose.

Cet aspect similaire entre la pathologie humaine et la pathologie expérimentale permet d'envisager de nouvelles voies pharmacologiques et thérapeutiques. Elles consistent à moduler l'apoptose chondrocytaire, en intervenant sur les acteurs de cette mort cellulaire, tels que les caspases. L'utilisation de peptides inhibiteurs de ces enzymes, ou encore la modulation de leur expression sont deux voies possibles. La thérapie génique apparaît comme une voie très intéressante pour un tissu tel que le cartilage en raison de sa faible densité cellulaire, et qui pourrait permettre une meilleure réparation tissulaire. C'est cette voie que nous avons privilégiée dans le cadre d'une étude en collaboration avec Steffen Gay. Quelle que soit la cible pharmacologique ou la voie permettant de l'atteindre, la thérapie devra contribuer à diminuer l'érosion du cartilage, sans pour autant exacerber le processus d'ostéophytose.

Références

Références

- Abate C, Patel L, Rauscher FJ, Curran T (1990). Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science*. 249(4973):1157-1161
- Acheson RM, Collart AB (1975). New Haven Survey of joint disease: relationship between some systemic characteristics and osteoarthritis in a general population. *Ann Rheum Dis*. 34:379-387
- Adams EM, Matyas JR, Huang D, Dourado GS (1995). Expression of proteoglycans and collagen in the hypertrophic phase of experimental osteoarthritis. *J Rheumatol*. 22(suppl 43):94-97
- Afoke NY, Byers PD, Hutton WC (1987). Contact pressure in the human hip. *J Bone Joint Surg [Br]*. 69(4):536-541
- Aigner T, Dietz U, Stöb H, von der Mark K (1995). Differential expression of collagens type I, II, III, and X in human osteophytes. *Lab Invest*. 73:236-243.
- Aigner T, Glückert K, von der Mark K (1997). Activation of fibrillar collagen synthesis and phenotypic modulation of chondrocytes in early human osteoarthritic cartilage lesions. *Osteoarthritis Cartilage*. 5(8):183-189
- Aimes RT, Quigley JP (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*. 270:4872-4876
- Altman RD, Aven A, Holmburg CE et al (1994). Capsaicin cream 0,025 % as monotherapy for osteoarthritis: a double-blind study. *Arthritis Rheum*. 23:25
- Altman RD, Lozada CJ (1998). Practice guidelines in the management of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 6(supl A):22-24
- Amin AR, Abramson SB (1998). The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Cur Opin Rheumatol*. 10(3):263-268
- Amin AR, Attur M, Patel RN, Thakker GD, Marshall PJ, Rediske J, Stuchin SA, Patel IR, Abramson SB (1997). Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide. *J Clin Invest*. 99(6):1231-1237
- Arlet J, Gédéon P (1982). Arthroses expérimentales. *Rev Rhum [Ed Fr]*. 49(2):145-152
- Arner EC, Hughes CE, Decicco CP, Caterson B, Tortorella MD (1998). Cytokine-induced cartilage proteoglycan degradation is mediated by aggrecanase. *Osteoarthritis Cartilage*. 6(3):214-228
- Arner EC, Pratta MA (1991). Modulation of interleukin-1-induced alterations in cartilage proteoglycan metabolism by activation of protein kinase C. *Arthritis Rheum*. 34(8):1006-1013
- Arner EC, Tortorella MD (1995). Signal transduction through chondrocyte integrin receptors induces matrix metalloproteinase synthesis and synergizes with interleukin-1. *Arthritis Rheum*. 38(9):1304-1314

- Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*. 61:1303-1313
- Attur MG, Patel IR, Abramson SB, Amin AR (1998). Autocrine production of IL-1B by human osteoarthritis-affected cartilage and differential regulation of endogenous nitric oxide, IL-6, prostaglandin E2, and IL-8. *Proc Assoc Am Phys*. 101(1):65-72
- Auron P, Webb AC (1994). Interleukin-1: a gene expression system regulated at multiple levels. *Eur Cytokine Netw*. 5(6):573-592
- Bailey AJ, Mansell JP (1997). Do subchondral bone changes exacerbate or precede articular cartilage destruction in osteoarthritis of the elderly? *Gerontology*. 43:296-304
- Baird A, Bohlen P (1990). Fibroblast growth factor. In *Peptide Growth Factors and their Receptors*. Sporn MB, Roberts AB Eds. Berlin, Springer. pp:369-418
- Barnard R, Haynes KM, Werther GA, Waters MJ (1988). The ontogeny of growth hormone receptors in the rabbit tibia. *Endocrinology*. 122:2562-2569
- Bayne EK, MacNaul KL, Donatelli SA, Christen A, Griffin PR, Hoerrner LA, Calaycay JR, Ayala JM, Chapman K, Hagmann W, Weidner JR, McDonnell J, Moore VL, Mumford RA, Lark W, Hutchinson NI (1995). Use of an antibody against the matrix metalloproteinase-generated aggrecan neopeptide FVDIPEN-COOH to assess the effects of stromelysin in a rabbit model of cartilage degradation. *Arthritis Rheum*. 38(10):1400-1409
- Belcher C, Fawthrop F, Bunning R, Doherty M (1996). Plasminogen activators and their inhibitors in synovial fluids from normal, osteoarthritis, and rheumatoid arthritis knees. *Ann Rheum Dis*. 55:230-236
- Benjamin M, Archer CW, Ralphs JR (1994). Cytoskeleton of cartilage cells. *Microsc Res Tech*. 28:372-377
- Bennet GA, Bauer W (1937). Joint changes resulting from patellar displacement and their relation to degenerative joint disease. *J Bone Joint Surg*. 19:667
- Benninghoff A (1925). Form und Bau der Gelenkknorpel in Ihren Beziehungen zur Funktion. Zweiter Teil. Der Aufbau des Gelenkknorpels in seinen Beziehungen zur Funktion. *Zeitschrift für Zellforschung*. 2:783-862
- Bentley G (1971). Papain-induced degenerative arthritis of the hip in rabbits. *J Bone Joint Surg*. 53B(2):324-337
- Bentley G (1974). Experimental osteoarthritis. In *Normal and osteoarthrotic articular cartilage*. Volume 1. Ali SY, Elves MW, Leaback DH Eds. Institute of Orthopaedics Publ, London. pp:259-280
- Bhaumick B, Bala RM (1991). Differential effects of insulin-like growth factors I and II on growth, differentiation and glucoregulation in differentiating chondrocyte cells in culture. *Acta Endocrinol*. 125:201-211
- Bianchi M, Panerai AE (1997). Formalin injection in the tail facilitates hindpaw withdrawal reflexes induced by thermal stimulation in the rat: effect of paracetamol. *Neurosci Lett*. 237(2-3):89-92

- Bidanet DJ, LaBaron R, Rosenberg L, Murphy-Ulrich JE, Hook M (1992). Regulation of cell substrate adhesion: effect of small galactosaminoglycan-containing proteoglycans. *J Cell Biol.* 118:1523-1531
- Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, Chen J, Van Wart H, Poole AR (1997). Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest.* 99(7):1534-1545
- Blanco FJ, Guittian R, Vasquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F (1998). Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum.* 41(2):284-289
- Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M (1995). Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol.* 146(1):75-85
- Bohanon TC, Schneider RK, Weisbrode SE (1991). Fusion of the distal intertarsal and tarsometatarsal joints in the horse using intra-articular sodium monoiodoacetate. *Equine Vet J.* 23(4):289-295
- Bonassar LS, Sandy JD, Lark MW, Plaas AH, Frank EH, Grodzinsky AJ (1997). Inhibition of cartilage degradation and changes in physical properties induced by IL-1 beta and retinoic acid using matrix metalloproteinase inhibitors. *Arch Biochem Biophys.* 344(2):404-412
- Boni M, Berlenda P, Lenzi L (1969). Experimental production of arthritis by intra-articular injection of vitamin A in rabbits. In XII^e Congrès International de Rhumatologie, Prague.
- Bottomley KM, Borkakoti N, Bradshaw D, Brown PA, Broadhurst MJ, Budd JM, Elliott L, Eysers P, Hallam TJ, Handa BK, Hill CH, James M, Lawton G, Merritt JE, Nixon JS, Röthlisberger U, Whittle A, Johnson WH (1997). Inhibition of bovine nasal cartilage degradation by selective matrix metalloproteinase inhibitors. *Biochem J.* 323(pt 2):483-488
- Boumediene K, Felisaz N, Bogdanowicz P, Galera P, Guillou GB, Pujol JP (1999). Avocado/soya unsaponifiables enhance the expression of transforming growth factor beta 1 and beta 2 in cultured articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 42(1):148-156
- Bradham DM, in der Wiesche B, Precht P, Balakir R, Horton W (1994). Transrepression of type II collagen by TGF- β and FGF in protein kinase C dependent and is mediated through regulatory sequences in the promoter and first intron. *J Cell Physiol.* 158:61-68
- Brandt K (1991). Transection of the anterior cruciate ligament in the dog. A model of osteoarthritis. *Sem Arthritis Rheum.* 21:22-32
- Brandt KD (1996). Traitement anti-inflammatoire et antalgique de l'arthrose. *Rev Prat.* 46:S41-S47
- Brandt KD, Myers SL, Burr D, Albrecht M (1991). Osteoarthritic changes in canine articular cartilage, subchondral bone, and synovium fifty-four months after transection of the anterior cruciate ligament. *Arthritis Rheum.* 34(12):1560-1570
- Brewster M, Lewis EJ, Wilson KL, Greenham AK, Bottomley KM (1998). Ro 32-3555, an orally active collagenase selective inhibitor, prevents structural damage in the STR/ORT mouse model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 41(9):1639-1644

- Briggs MD, Hoffman SMG, King LM, Olsen AS, Mohrenweiser H, Leroy JG, Mortier GR, Rimoin DL, Lachman RS, Gaines ES, Cekleniak JA, Knowlton RG, Cohn DH (1995). Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutation in the cartilage oligomeric matrix protein gene. *Nature Genet.* 10:330-336
- Brissett NC, Perkins SJ (1998). Conserved basic residues in the C-type lectin and short complement repeat domains of the G3 region of proteoglycans. *Biochem J.* 329:415-424
- Brody DT, Durum SK (1989). Membrane IL-1: IL-1 α precursor binds to the plasma membrane via a lecrin-like interaction. *J Immunol.* 143:1183
- Brown RA, Jones KL (1990). The synthesis and accumulation of fibronectin by human articular cartilage. *J Rheumatol.* 17:65-72
- Bruckner P, Van der Rest M (1994). Structure and function of cartilage collagens. *Microsc Res Tech.* 28:378-384
- Buckwalter JA, Mankin HJ (1998). Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect.* 47:477-486
- Buckwalter JA, Roughley PJ, Rosenberg LC (1994). Age-related changes in cartilage proteoglycans: quantitative electron microscopic studies. *Microsc Res Tech.* 28(5):398-408
- Burr DB, Schaffler MB (1997). The involvement of subchondral mineralized tissues in osteoarthritis: quantitative microscopic evidence. *Microsc Res Tech.* 37:343-357
- Buttke TM, Sandstrom PA (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today.* 15(1):7-10
- Büttner FH, Hughes CE, Margerie D, Lichte A, Tschesche H, Caterson B, Bartnik E (1998). Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cleaves the recombinant aggrecan substrate rAgg1mut at the 'aggrecanase' and the MMP sites. Characterization of MT1-MMP catabolic activities on the interglobular domain of aggrecan. *Biochem J.* 333(Pt 1):159-165
- Cameron M, Buchgraber A, Passler H, Vogt M, Thonar E, Fu F, Evans CH (1997). The natural history of the anterior cruciate ligament-deficient knee. Changes in synovial fluid cytokine and keratan sulfate concentrations. *Am J Sports Med.* 40(11):751-754
- Campbell IK, Piccoli DS, Roberts MJ, et al (1990). Effects of tumor necrosis factor alpha and beta on resorption of human articular cartilage and production of plasminogen activator by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 33:542-552
- Carney SL (1993). Targets for drug discovery in osteoarthritis. *DN&P.* 6(2):69-77
- Carney SL, Billingham MEJ, Caterson B, Ratcliffe A, Bayliss MT, Hardingham TE, Muir H (1992). Changes in proteoglycan turnover in experimental canine osteoarthritic cartilage. *Matrix.* 12:137-147
- Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Tardif G, Mineau F, Geng C, Pelletier JP (1996). Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum.* 39(9):1535-1554
- Carpenter TA, Everett JR, Hall LD et al (1994). High resolution magnetic imaging of arthritic pathology in the rat knee. *Skeletal Radiol.* 23:429-437

- Carrington JL, Roberts AB, Flanders KC, Roche NS, Reddi AH (1988). Accumulation, localization, and copartmentation of transforming growth factor b during endochondral bone development. *J Cell Biol.* 107:1969-1975
- Caruso I, Mantellini P, Dola E (1968). Modificazioni del PCS e CS dello cartilagine indotte nel coniglio da un omogenato di cartilagine omologo. *Reumatismo.* 20:420
- Chambers MG, Bayliss MT, Mason RM (1997). Chondrocyte cytokine and growth factor expression in murine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 5(5):301-308
- Chandrasekhar S, Harvey AK, Stack ST (1993). Degradative and repair responses of cartilage to cytokines and growth factors occur via distinct pathways. *Agent Actions.* 39(suppl):121-125
- Chapman JA (1989). The regulation of size and form in the assembly of collagen fibrils. *Biopolymers.* 228:1367-1382, 2201-2205
- Chernousov MA, Carey DJ (1993). N-syndecan (syndecan3) from neonatal rat brain binds basic fibroblast growth factor. *J BiolChem.* 268:16810-16814
- Chevalier X (1997). Upregulation of enzymatic activity by interleukin-1 in osteoarthritis. *Biomed Pharmacother.* 51(2):58-62
- Chevalier X, Claudepierre P, Groult N, Zardi L, Hornebeck W (1996b). Presence of ED-A containing fibronectin in human articular cartilage from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 23(6):1022-1030
- Chevalier X, Groult N, Emod I, Planchenault T (1996). Proteoglycan-degrading activity associated with the 40 kDa collagen-binding fragment of fibronectin. *Br J Rheumatol.* 9(7):506-514
- Chevalier X, Groult N, Hornebeck W (1996a). Increased expression of the ED-B-containing fibronectin (an embryonic isoform of fibronectin) in human osteoarthritic cartilage. *Br J Rheumatol.* 35(5):407-415
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159
- Chow G, NietfeldJJ, Knudson CB, Knudson W (1998). Antisense inhibition of chondrocyte CD44 expression leading to cartilage chondrolysis. *Arthritis Rheum.* 41(8):1411-1419
- Cicuttini FM, Spector TD (1995). Osteoarthritis in the aged. Epidemiological issues and optimal management. *Drugs Aging.* 6(5):409-420
- Cipolletta C, Jouzeau JY, Gégout-Pottie P, Presle N, Bordji K, Netter P, Terlain B (1998). Modulation of IL-1-induced cartilage injury by NO synthase inhibitors: a comparative study with rat chondrocytes and cartilage entities. *Brit J Pharmacol.* 124:
- Clancy RM, Rediske J, tang X, Nijher N, Frenkel S, Philips M, Abramson SB (1997). Outside-in signaling in the chondrocyte. Nitric oxide disrupts fibronectin-induced assembly of a subplasmalemmal actin/rho A/focal adhesion kinase signaling complex. *J Clin Invest.* 100(7):1789-1796
- Cohen GM (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 326:1-16
- Collins C, Evans RG, Ponsford F, Miller P, Elson CJ (1994). Chondro-osseous metaplasia, bone density and patellar cartilage proteoglycan content in the osteoarthritis of STR/ORT mice. *Osteoarthritis Cartilage.* 2:111-118

- Conrozier T (1998). La mort des chondrocytes articulaires : mécanismes et protection. *Presse Med.* 27(36):1859-1861
- Cosulich SC, Green S, Clarke PR (1996). Bcl-2 regulates activation of apoptotic proteases in a cell-free system. *Current Biol.* 6(8):997-1005
- Coulais Y, Marcelon G, Cross J, Guiraud R (1983). Etude d'un modèle expérimental d'arthrose. Induction et étude structurale. *Path Biol.* 31(7):577-582
- Craig RW (1995). The Bcl-2 gene family. *Sem Cancer Biol.* 6:35-43
- Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH (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, Roughley PJ, Plaas AH, Glant TT (1995). Large and small proteoglycans of osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage. *Arthritis Rhum.* 38(5):660-668
- CS-Szabo G, Melchin LI, Roughley PJ, Glant TT (1997). Changes in messenger RNA and protein levels of proteoglycans and link protein in human osteoarthritic cartilage samples. *Arthritis Rheum.* 40(6):1037-1045
- Dahlberg L, Lohmander S, Ryd L (1994). Intraarticular injections of hyaluronan in patients with cartilage abnormalities and knee pain. *Arthritis Rheum.* 37(4):521-528
- Darwish HM, DeLuca HF (1995). Recent advances in the molecular biology of vitamin D action. 321-344
- De Bri E, Reinholt FP, Mengarelli-Widholm S, Heinegard D, Svensson O (1997). Ultrastructural immunolocalization of bone sialoprotein in guinea-pig osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 5:387-393.
- Dedrick DK, Goldstein SA, Brandt KD, O'Connor BL, Goulet RW, Albrecht M (1993). A longitudinal study of subchondral bone and trabecular bone in cruciate-deficient dogs with osteoarthritis followed up for 54 months. *Arthritis Rheum.* 36(10):1460-1467
- Derendorf H, Möllmann H, Grüner A, Haack D, Gyselby G (1986). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of glucocorticoid suspensions after intra-articular administration. *Clin Pharmacol Ther.* 39:313-317
- Descalzi Cancedda F, Gentili C, Manduca P, Cancedda R (1992). Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation in culture. *J cell Biol.* 117(2):427-435
- Di Battista JA, Doré S, Martel-Pelletier J, Pelletier JP (1996). Prostaglandin E2 stimulated incorporation of proline into collagenase digestible proteins in human articular chondrocytes: identification of an effector autocrine loop involving insulin-like growth factor I. *Mol Cell Endocrinol.* 135(1):27-35
- Di Battista JA, Doré S, Morin N, He Y, Pelletier JP, Martel-Pelletier J (1997). Prostaglandin E2 stimulates insulin-like growth factor binding protein-4 expression and synthesis in cultured human articular chondrocytes: possible mediation by Ca(++)-calmodulin regulated processes. *J Cell Biochem.* 138(10):408-419
- Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Fujimoto N, Obata K, Zafarullah M, Pelletier JP (1994). Prostaglandin E2 and E1 inhibit cytokine-induced metalloprotease expression in human synovial fibroblasts. Mediation by cyclic-AMP signalling pathway. *Lab Invest.* 71(2):270-278

- Dinareello CA (1994). The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw.* 5(6):517-531
- Dodds RA, Merry K, Littlewood A, Gowan M (1994). Expression of mRNA for IL-1 β , IL-6, and TGF- β 1 in developing human bone and cartilage. *J Histochem Cytochem.* 42:733
- Dodge GR, Diaz A, Sanz-Rodriguez C, Reginato AM, Jimenez SA (1998). Effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha on the expression on the genes encoding aggrecan, biglycan, and decorin core proteins in cultured human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 41(2):273-283
- Dunham J, Hoedt-Schmidt S, Kalbhen DA (1992). Structural and metabolic changes in articular cartilage induced by iodoacetate. *Int J Exp Pathol.* 73:455-464
- Eberhardt R, Zwingers T, Hofmann R (1995). DMSO in patients with active gonarthrosis. A double-blind placebo controlled phase III study. *Fortschr Med.* 113(31):446-450
- Eggli PS, Enzicker EB, Schenk RK (1988). Quantification of structural features characterizing weight- and less-weight-bearing regions in articular cartilage: A stereological analysis of femoral condyles in young adult rabbits. *J Anat.* 222:217-227
- Eikenberry EF, Mendler M, Bügin R, Winterhalter KH, Bruckner P (1992). Fibrillar organisation in cartilage. In *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. Eds Kuettner et al. Raven Press, Ltd, New York. pp:133-149
- Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nakashima K, Mukudai Y, Boettiger D, Pacifici M, Kurisu K, Suzuki F (1997). Involvement of α 5 β 1 integrin in matrix interactions and proliferation of chondrocytes. *J Bone Miner Res.* 12(7):1124-1132
- Erlacher L, Maier R, Ullrich R, Kiener H, Aringer M, Menschik M, Graninger W (1995). Differential expression of the protooncogene bcl-2 in normal and osteoarthritic human cartilage. *J Rheumatol.* 22:926-931
- Eyre D, Wu J (1995). Collagen structure and cartilage matrix integrity. *J Rheumatol.* 22:82-85
- Fakri L, Loeuille D, Gillet P, Grenier D, Netter P, Briguet A (1995). In vivo micro imaging study of the rat ankle at 2 tesla. *Soc Magn Res.* 3:1538
- Farndale RW, Buttle DJ, Barret AJ (1986). Improved quantitation and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta.* 883:173-177
- Fässler R, Schnegelsberg PNJ, Dausman J, Shinya T, Muragaki Y, McCarthy MT, Olsen BR, Jaenisch R (1994). Mice lacking α 1 (IX) collagen develop noninflammatory degenerative joint disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:5070-5074
- Fernandez MP, Selmin O, Martin GR, Yamada Y, Pfäffle M, Deutzmann R, Mollenhauser J, von der Mark K (1988). The structure of anchorin CII, a collagen binding protein isolated from chondrocyte membrane. *J Biol Chem.* 263:5921-5925
- Finbloom DS, Lerner AC (1995). Induction of early response genes by interferons, interleukins, and growth factors by the tyrosine phosphorylation of latent transcription factors. Implication for chronic inflammatory diseases. *Arthritis Rheum.* 38(7):877-889

- Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B (1998). Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases. *Biochem Biophys Res Commun.* 251(3):824-829
- Fortier LA, Nixon AJ (1997). Distributional changes in substance P nociceptive fiber patterns in naturally osteoarthritic articulations. *J Rheumatol.* 24:524-530
- Fosang AJ, Hardingham TE (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.* 261:801-809
- Fosang AJ, Last K, Neame PJ, Murphy G, Knäuper V, Tschesche H, Hughes CE, Caterson B, Hardingham TE (1994). Neutrophil collagenase (MMP-8) cleaves at the aggrecanase site E373-A374 in the interglobular domain of cartilage aggrecan. *Biochem J.* 304:347-351
- Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG (1997). Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Internal Med.* 242:27-33
- Frizziero L, Govoni E, Bacchini P (1998). Intra-articular hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis of the knee: clinical and morphological study. *Clin Exp Rheumatol.* 16(4):441-449
- Fukumara K, Matsunaga S, Yamamoto T, Nagamine T, Ishidou Y, Sakou T (1998). Immunolocalization of transforming growth factor-beta and type I and type II receptors in rat articular cartilage. *Anticancer Res.* 18(6A):4189-4193
- Gaffen JD, Bayliss MT, Mason RM (1997). Elevated aggrecan mRNA in early murine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 319(pt 3)(4):227-233
- Gahunia HK, Lemaire C, Babyn P, Cross AR, Kessler MJ, Pritzker K (1995). Osteoarthritis in rhesus macaques knee joint: quantitative magnetic resonance imaging tissue characterization of articular cartilage. *J Rheumatol.* 22:1747-1756
- Gédéon P, Mazières B, Ficat P (1978). Un nouveau modèle d'arthrose expérimentale : la contusion du cartilage. Etude expérimentale et clinique. *Rev Rhum.* 45:401
- Gégout P, Gillet P, Chevrier D, Guingamp C, Terlain B, Netter P (1994). Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. *Life Sci.* 55(17):321-326
- Gégout-Pottie P, Philippe L, Simonin MA, Gillet P, Netter P, Terlain B (1999). Biotelemetry: an original approach to experimental models of inflammation. *Inflamm Res* (sous presse).
- Gesternfeld LC, Shapiro FD (1996). Expression of bone-specific genes by hypertrophic chondrocytes: implications of the complex functions of the hypertrophic chondrocyte during endochondral bone development. *J Cell Biochem.* 62:1-9
- Ghosh P (1993). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and chondroprotection. A review of the evidence. *Drugs.* 46(5):834-846
- Ghosh P (1994). The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease: interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid. *Clin Exp Rheumatol.* 12:75-82
- Ghosh P, Holbert C, Read R, Armstrong S (1995). Hyaluronic acid (hyaluronan) in experimental osteoarthritis. *J Rheumatol.* 22(suppl 43):155-157

- Ghosh P, Hutadilok (1996). Interactions of pentosan polysulfate with cartilage matrix proteins and synovial fibroblasts derived from patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 4(1):43-53
- Gillquist J (1990). Knee instability: its effect on articular cartilage. In *Articular cartilage and knee joint function: basic science and arthroscopy?* Ewing JW Eds. Raven Press, New York. pp:267-271
- Goldberg RL, Kolibas LM (1989). An improved method for determining proteoglycans synthesized by chondrocytes in culture. *Con Tissue Res*. 24:265-275
- Grabowski PS, Wright PK, van'T Hof RJ, Helfrich MH, Ohshima H, Ralston SH (1997). Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Brit J Rheumatol*. 36:651-655
- Gray ML, Pizzanelli AM, Grodzinsky AJ, Lee RC (1988). Mechanical and physicochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. *J Orthop Res*. 6:777-792
- Gritzka T, Fry L, Cheesman R (1973). Deterioration of articular cartilage caused by continuous compression in a moving rabbit joint. *J Bone Joint Surg*. 55(A):1698
- Grumbles RM, Shao L, Jeffrey JJ, Howell DS (1997). Nitric oxide inhibits the synthesis of type-II collagen without altering Col2A1 mRNA abundance: prolylhydroxylase as a possible target. *Biochem J*. 63(4):305-310
- Guilak F (1995). Compression-induced changes in the shape and volume of the chondrocyte nucleus. *J Biomech*. 28(12):1529-1541
- Guingamp C, Gégout-Pottie P, Philippe L, Terlain B, Netter P, Gillet P (1997). Monoiodoacetate-induced experimental osteoarthritis. A dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum*. 40(9):1670-1679
- Guirimand F, Le Bars D (1996). Physiologie de la nociception. *Ann Fr Anesth Réanim*. 15:1048-1079
- Günther M, Haubeck HD, van de Leur E, Bläser J, Bender S, Gütgemann I, Fischer DC, Tscheesche H, Greiling H, Heinrich PC, Graeve L (1994). Transforming growth factor β 1 regulates tissue inhibitor of metalloproteases-1 expression in differentiated human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 37(3):395-405
- Gustafson SB, Trotter GW, Norrdin RW, Wrigley RH, Lamar C (1992). Evaluation of intra-articularly administered sodium monoiodoacetate-induced chemical injury to articular cartilage of horse. *Am J Vet Res*. 53(7):1193-1202
- Habuchi O, Miyachi T, Kaigawa S, Nakashima S, Fujiwara C, Hisada M (1991). Effects of glutathione depletion on the synthesis of proteoglycan and collagen in cultured chondrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1093:153-161
- Haimes HB, Jimenez PA, Li Y, Shinya T, Olsen BR (1995). Overexpression of the NC4 domain of type IX collagen induces osteoarthritis in mice. *Inflamm Res*. 44 (suppl 2):S127-S128
- Haldeman KO (1938). The healing of joint fractures. Clinical and experimental study. *J Bone Joint Surg*. 20:1912

Hall AC (1999). Differential effects of hydrostatic pressure on cation transport pathways of isolated chondrocytes. *J Cell Physiol.* 178(2):197-204

Hamanishi C, Hashima M, Satsuma H, Tanaka S (1996). Protein kinase C activator inhibits progression of osteoarthritis induced in rabbit knee joints. *J Lab Clin Med.* 127:540-544

Hanglow AC, Rowan K, Lusch L, Coffey JW (1995). Degradation of bovine cartilage proteoglycan in vitro is enhanced by inhibition of nitric oxide synthase. *Inflam Res.* 44(suppl 2):S151-S152

Hardingham T, Bayliss M (1990). Proteoglycans of articular cartilage: changes in aging and in joint disease. *Sem Arthritis Rheum.* 20(3, suppl 1):12-23

Hardingham TE, Fosang AJ (1995). The structure of aggrecan and its turnover in cartilage. *J Rheumatol.* 22 (suppl 43):86-90

Hardingham TE, Muir H (1974). Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation. *Biochem J.* 139:565-581

Hardingham TE, Rayan V, Lewthwaite JC (1994). Regulation of cartilage matrix synthesis by chondrocytes. *Rev Rhum Ed Fr.* 61(9, pt 2):93S-98S

Hart DJ, Doyle DV, Spector TD (1995). Association between metabolic factors and knee osteoarthritis in women: the Chingford Study. *J Rheumatol.* 22:1118-1123

Hashimoto K, Noshiro M, Ohno S, Kawamoto T, Satakeda H, Akagawa Y, Nakashima K, Okimura A, Ishida H, Okamoto T, Pan H, Shen M, Yan W, Kato Y (1997a). Characterization of a cartilage-derived 66-kDa protein (RGD-CAP/beta ig6h3) that binds to collagen. *Biochim Biophys Acta.* 1355(3):303-314

Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M (1998a). Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 41(9):1632-1638

Hashimoto S, Setareh M, Ochs RL, Lotz M (1997b). Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 40(10):1749-1755

Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coutts RS, Lotz M (1998b). Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 41(7):1266-1274

Hasty KA, Reife RA, Kang AH, Stuart JM (1990). The role of stromelysin in the cartilage destruction that accompanies inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 33(3):388-397

Häuselmann HJ, Flechtenmacher J, Michal L, Thonar EJMA, Shinmei M, Kuettner KE, AYdelotte MB (1996). The superficial layer of human articular cartilage is more susceptible to interleukin-1-induced damage than the deeper layers. *Arthritis Rheum.* 39(3):478-488

Hauser N, Paulsson M, heinegard D, Mörgelin M (1996). Interaction of cartilage matrix protein with aggrecan. Increased covalent cross-linking with tissue maturation. *J Biol Chem.* 271(50):32247-32252

Havdrup T, Henricson A, Telhag H (1982). Papain-induced mitosis of chondrocytes in adult joint cartilage. An experimental study in full-grown rabbits. *Acta Orthop Scan.* 53:119-124

Hazell PPK, Dent C, Fairclough JA, Bayliss MT, Hardingham TE (1995). Changes in glycosaminoglycan epitope levels in knee joint fluid following injury. *Arthritis Rheum.* 38(7):953-959

Heberhardt R, Zwingers T, Hofmann R (1995). DMSO in patients with active gonarthrosis. A double-blind placebo controlled phase III study. *Forsch Med.* 113(31):446-450

Hedlund H, Hedbom E, Heinegard D, Mengarelli Widholm S, Reinholt FP, Svensson O (1999). Association of the aggrecan keratan sulfate-rich region with collagen in bovine articular cartilage. *J Biol Chem.* 274(9):5777-5781

Heinegard D, Oldberg A (1989). Structure and biology of cartilage and bone matrix non-collagenous macromolecules. *FASEB J.* 3:2042-2051

Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E (1994). Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor. *Biochem J.* 302:527-534

Hill DJ, Logan A (1992). Peptide growth factors and their interactions during chondrogenesis. *Prog Growth Factor Res.* 4:45-68

Hinek A, Reiner A, Poole AR (1987). The calcification of cartilage matrix in chondrocyte culture: studies of the C-propeptide of type II collagen (chondrocalcin). *J Cell Biol.* 104:1435-1441

Hiraki Y, Inoue H, Kondo J, Kamizono A, Yoshitake I, Shukunami C, Suzuki F (1996). A novel growth-promoting factor derived from fetal bovine cartilage, chondromodulin II. *J Biol Chem.* 271(37):22657-22662

Hiraki Y, Inoue H, Yama KI, Kamizono A, Ochiai M, Shukunami C, Iijima S, Suzuki F, Kondo J (1997). Identification of chondromodulin I as a novel endothelial cell growth inhibitor. *J Biol Chem.* 272(51):32419-32426

Hodges DJ, Lee DC, Salter CJ, Reid DG, Harper GP, Cawston TE (1994). Purification and secondary structural analysis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Biochim Biophys Acta.* 1208:94-100

Hollander AP, Pidoux I, Reiner A, Rorabeck C, Bourne R, Poole AR (1995). Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J Clin Invest.* 96:2859-2869

Holmlund A, Ekblom A, Hansson P, Lind J, Lundberg T, Theodorsson E (1991). Concentration of neuropeptides substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in synovial fluid of the human temporomandibular joint. A correlation with symptoms, signs and arthroscopic findings. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 20(4):228-231

Holmval K, Camper L, Johansson S, Kimura JH, Lundgren-Akerlund E (1995). Chondrocyte and chondrosarcoma cell integrins with affinity for collagen type II and their response to mechanical stress. *Exp Cell Res.* 221(2):496-503

Homandberg GA, Davis G, Maniglia C, Shrikhande A (1997). Cartilage chondrolysis by fibronectin fragments causes cleavage of aggrecan at the same site as found in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 13(4):450-453

Homandberg GA, Hui F, Wen C (1996). Fibronectin fragment mediated cartilage chondrolysis. I. Suppression by anti-oxidants. *Biochim Biophys Acta.* 1317(2):134-142

- Homandberg GA, Meyer R, Xie DL (1992). Fibronectin fragments cause chondrolysis of bovine articular cartilage slices in culture. *J Biol Chem.* 267:3597-3604
- Homandberg GA, Meyers R, Williams J (1993). Intra-articular injection of fibronectin fragments induces cartilage proteoglycan release. *J Rheumatol.* 20:1378-1382
- Hoyland JA, Thomas JT, Donn R, Marriott A, Ayad S, Boot-Handford RP, Grant ME, Freemont AJ (1991). Distribution of type X collagen mRNA in normal and osteoarthritic human cartilage. *Bone Miner.* 15:151-164
- Hughes CE, Büttner FH, Eidenmüller B, Caterson B, Bartnik E (1997). Utilization of a recombinant substrate rAgg1 to study the biochemical properties of aggrecanase in cell culture systems. *J Biol Chem.* 272(32):20269-20274
- Hulth A, Lindberg L, Telhag H (1970). Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report. *Acta Orthop Scand.* 41:522
- Ilic MZ, Handley CJ, Robinson HC, Mok MT (1992). Mechanism of catabolism of aggrecan by articular cartilage. *Arch Biochem Biophys.* 294(1):115-122
- Ishida O, Tanaka Y, Morimoto I, Takigawa M, Eto S (1997). Chondrocytes are regulated by cellular adhesion through CD44 and hyaluronic acid pathway. *J Bone Miner Res.* 12(10):1657-1663
- Iwamoto M, Golden EB, Adams SL, Noji S, Pacifici M (1993). Responsiveness to retinoic acid changes during chondrocyte maturation. *Exp Cell Res.* 205:213-224
- Jacenko O, Lu Valle P, Olsen BR (1993). Spondylometaphyseal dysplasia in mice carrying a dominant negative mutation in a matrix protein specific for cartilage-to-bone transition. *Nature.* 365:56-61
- Jahng JS, Lee JW, Han CD, Kim SJ, Yoo, NC (1997). Transforming growth factor-beta 1 responsiveness of human articular chondrocytes in vitro: normal versus osteoarthritis. *Yonsei Med.* 230(3):40-51
- Jasin HE (1995). Structure and function of the articular cartilage surface. *Scand J Rheumatol.* 24(suppl 101):51-55
- Johnston SA (1997). Osteoarthritis. Joint anatomy, physiology, and pathobiology. *Vet Clin North Am, Small Anim Prac.* 27(4):699-723
- Jordan M, Otterness IG, Ng R, Gessner A, Rölinghoff M, Beuscher HU (1995). Neutralization of endogenous IL-6 suppresses induction of IL-1 receptor antagonist. *J Immunol.* 154:4081-4090
- Jouzeau JY, Terlain B, Abid A, Nedelec E, Netter P (1997). Cyclo-oxygenase isoenzymes. *Drugs.* 53:563-582
- Kalbhenn DA (1985). Degenerative joint disease following chondrocyte injury. Chemically induced osteoarthritis. In *Degenerative Joints (Volume 2). Proceedings of the Second Conference on Degenerative Joint Disease.* Veys EM, Verbruggen G Eds. pp:259-309
- Kalbhenn DA, Blum U (1977). Theoretisches Konzept und experimentelle Bestätigung für ein neues Arthrose-Modell am Versuchstier. *Arzneimittel Forschung Drug Res.* 27(1):527-531
- Kamata H, Hirata H (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal.* 11(1):1-14

Kato Y, Iwamoto M (1990). Fibroblast growth factor is an inhibitor of chondrocyte terminal differentiation. *J Biol Chem.* 265(10):5903-5909

Kellgren JH (1961). Osteoarthritis in patients and in populations. *BMJ.* 1:1-6

Kellgren JH, Moore R (1952). Generalized osteoarthritis and Heberden's nodes. *BMJ.* 1:181-187

Kilkenny DM, Hill DJ (1996). Perinuclear localization of an intracellular binding protein related to the fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 is temporally associated with the nuclear trafficking of FGF-2 in proliferating epiphyseal growth plate chondrocytes. *Endocrinology.* 137(11):5078-5089

Kirsch T, Nah HD, Shapiro IM, Pacifici M (1997). Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. *J Cell Biol.* 137(5):1149-1160

Kouri JB, Arguello C, Luna J, Mena R (1998). Use of microscopical techniques in the study of human chondrocytes from osteoarthritic cartilage: an overview. *Microsc Res Tech.* 40(1):22-36

Kronenberg HM, Lee K, Lanske B, Segre GV (1997). Parathyroid hormone-related protein and Indian hedgehog control the space of cartilage differentiation. *J Endocrinol.* 154:S39-S45

Lafeber FP, van Roy HL, van der Kraan PM, van den Berg WB, Bijlisma JW (1997). Transforming growth factor-beta stimulates phenotypically changed chondrocytes in osteoarthritic human cartilage. *J Rheumatol.* 24(3):536-542

Lark MW, Gordy JT, Weidner JR, Ayala J, Kimura JH, Williams HR, Mumford RA, Flannery CR, Carlson SS, Iwata M, Sandy JD (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.* 270:2550-2556

Lang D, Knop J, Wesche H, Raffetseder U, Kurrle R, Boraschi D, Marin MU (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.* 161:6871-6877

Laurent TC, Laurent UB, Fraser JRE (1996). The structure and function of hyaluronan: an overview. *Immunol Cell Biol.* 74:A1-A7

Lawrence DA (1996). Transforming growth factor- β : a general review. *Eur Cytokine Netw.* 7(3):363-374

Lawrence JS (1975). Hypertension in relation to musculoskeletal disorders. *Ann Rheum Dis.* 34:451-456

Lawrence JS, Bremner J, Bier F (1966). Osteoarthrosis: prevalence in the population and relationship between symptoms and x-ray changes. *Ann Rheum Dis.* 25:1-24

Lehner KB, Rechl HP, Gmenwieser JK, Heuck AF, Lukas HP, Kohn HP (1989). Structure, function, and degeneration of bovine hyaline cartilage: assessment with MR imaging *in vitro*. *Radiology.* 170:495-499

Leistad L, Ostensen M, Faxvaag A (1998). Detection of cytokines mRNA in human, articular cartilage from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Scand J Rheumatol.* 24(1):61-67

Levin EG (1983). Latent tissue plasminogen activator produced by human endothelial cells in culture: evidence for an enzyme-inhibitor complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80:6804-6810

Li Y, Lacerda DA, Warman ML, Beier DR, Yoshioka H, Ninomiya Y, Oxford JT, Morris NP, Andrikopoulos K, Ramirez F (1995). A fibrillar collagen gene, *Col11a1*, is essential for skeletal morphogenesis. *Cell*. 80:423-430

Lo Y, Conquer JA, Grinstein S, Cruz TF (1998). Interleukin-1 beta induction of c-fos and collagenase expression in articular chondrocytes: involvement of reactive oxygen species. *J Cell Biochem*. 69(1):19-29

Loeser RF (1997). Growth factor regulation of chondrocyte integrins. *Arthritis Rheum*. 40(2):270-276

Loeuille D, Gonord P, Guingamp C, Gillet P, Blum A, Sauzade M, Netter P (1997). In vitro magnetic resonance microimaging of experimental osteoarthritis in the rat knee joint. *J Rheumatol*. 24:133-139

Lump ZP, Hakala BE, Mort JS, Recklies AD (1996). Modulation of the catabolic effects of interleukin-1 beta on human articular chondrocytes by transforming growth factor-beta. *J Cell Physiol*. 139(2):351-359

Luo G, Ducy P, McKee M, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G (1997). Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix Gla protein. *Nature*. 386:78-81

Luo W, Kuwada TS, Chandrasekaran L, Zheng J, Tanzer ML (1996). Divergent secretory behavior of the opposite ends of aggrecan. *J Biol Chem*. 271 (28):16447-16450

Majno G, Joris I (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol*. 146(1):3-15

Malfait AM, Verbruggen G, Veys EM, Lambert J, De Ridder L, Cornelissen M (1994). Comparative and combined effects of interleukin 6, interleukin 1 beta, and tumor necrosis alpha on proteoglycan metabolism of human articular chondrocytes cultured in agarose. *J Rheumatol*. 21:314-320

Mankin HJ, Dorfman H, Lippielle L, Zarins A (1971). Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hip. *J Bone Joint Surg*. 53-A(3):523-537

March L, Irwig L, Schwarz J, Simpson J, Chock C, Brooks P (1994). n of 1 trials comparing a non-steroidal anti-inflammatory drug with paracetamol in osteoarthritis. *BMJ*. 309(6961):1041-1045

Martel-Pelletier J, Di Battista JA, Lajeunesse D, Pelletier JP (1998). IGF/IGFBP axis in cartilage and bone in osteoarthritis pathogenesis. *Inflamm Res*. 47:90-100

Martel-Pelletier J, McCollum R, DiBattista J et al (1992). The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 35:530-540

Martel-Pelletier J, McCollum R, Fujimoto N, Obata KI, Cloutier JM, Pelletier JP (1994). Excess of metalloproteases over tissue inhibitors of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest*. 70(6):807-815

Martin JA, Buckwalter JA (1998). Effect of fibronectin on articular cartilage chondrocyte proteoglycan synthesis and response to insulin-like growth factor-I. *J Orthop Res*. 16(6):752-757

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Remy R, Xie ZH, Reed JC (1998). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med.* 187(8):1261-1271

Mason IJ (1994). The ins and out of fibroblast growth factors. *Cell.* 78:547-552

Mason RM, Goh DC (1991). Iodoacetate action on articular chondrocytes. *Biochem Soc Trans.* 19:363S

Matrisian LM (1992). The matrix degrading proteinases. *Bioessays.* 14:455-463

Matyas JR, Ehlers PF, Huang D, Adams ME (1999). The early molecular natural history of experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 42(5):993-1002

McAllindon T, Zhang Y, Hannan M, Naimark A, Weissman B, Castelli W, Felson D (1996). Are risk factors for patellofemoral and tibiofemoral knee osteoarthritis different? *J Rheumatol.* 23:332-337

McCarty MF (1998). Enhanced synovial production of hyaluronic acid may explain rapid clinical response to high-dose glucosamine in osteoarthritis. *Med Hypotheses.* 50(6):507-510

McDevitt CA, Pahl JA, Ayad S, Miller RR, Uratsuji M, Andrich JT (1988). Experimental osteoarthritic articular cartilage is enriched in guanidine-soluble type VI collagen. *Biochem Biophys Res Comm.* 157(1):250-255

McDougall S, Fu Y-H, Lowe GN, Williams A, Polendo R, Benya PD, Iido-Klein A, Fang MA, Hahn TJ (1996). Surface adhesion-mediated regulation of chondrocyte-specific gene expression in the nontransformed RCJ 3.1C5.18 rat chondrocyte cell line. *J Bone Miner Res.* 11(8):1130-1138

McKeehan WL, Wang F, Kan M (1998). The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Progress Nucleic Acid Res Mol Biol.* 59:135-176

McQueen DS, Iggo A, Birrell GJ, Grubb BD (1991). Effects of paracetamol and aspirin on neural activity of joint mechanoreceptors in adjuvant arthritis. *Br J Pharmacol.* 104(1):178-182

Meats JE, Elford PR, Bunning RAD, Russel RGG (1985). Retinoids and synovial factor(s) stimulate the production of plasminogen activator by cultured human chondrocytes. A possible role for plasminogen activator in the resorption of cartilage in vitro. *Biochim Biophys Acta,* 838:161-169, 1985

Melchiori C, Melicori R, Frizziero L, Silvestri T, Pulsatelli L, Mazzetti I, Borzi RM, Uguccioni M, Facchini A (1998). Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 41(12):2165-2174

Middleton JFS, Manthley A, Tyler J (1996). Insulin-like growth factor (IGF) receptor, IGF-I, interleukin-1 β (IL-1 β), and IL-6 mRNA expression in osteoarthritic and normal human cartilage. *J Histochem Cytochem.* 4(2):133-141

Middleton JFS, Tyler JA (1992). Upregulation of insulin-like growth factor I gene expression in the lesions of osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis.* 51:440-447

Modl JM, Sether LA, Houghton VM, Kneeland JB (1991). Articular cartilage: correlation of histologic zones with signal intensity at MR imaging. *Radiology.* 176:853-855

- Mohtai M, Smith RL, Schurman DJ, Tsuji Y, Torti FM, Hutchinson NI, Stetler-Stevenson WG, Goldberg GI (1993). Expression of 92-kD type IV collagenase/gelatinase (gelatinase B) in osteoarthritic cartilage and its induction in normal human articular cartilage by interleukin-1. *J Clin Invest.* 92:179-185
- Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J, Cloutier JM, Martel-Pelletier J (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 β . *Arthritis Rheum.* 40(9):1653-1661
- Morales TI (1997). The role and content of endogenous insulin-like growth factor-binding proteins in bovine articular cartilage. *Arch Biochem Biophys.* 343(2):164-172
- Morales TI, Roberts AB (1992). The interaction between retinoic acid and the transforming growth factors- β in calf articular cartilage organ cultures. *Arch Biochem Biophys.* 293(1):79-84
- Mörgelin M, Paulsson M, Heinegard D, Aebi U, Engel J (1995). Evidence for a spatial arrangement of hyaluronate in the central filament of cartilage proteoglycan aggregates. *Biochem J.* 307:595-601
- Moseley R Waddington R, Evans P, Halliwell B, Embury G (1995). The chemical modification of glycosaminoglycan structure by oxygen species in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1244:245-252
- Moskowitz RW, Daviss W, Sanmarco J, Martens M, Baker J, Mayor M, Burstein AH, Frankel VH (1973). Experimentally induced degenerative joint lesions following partial meniscectomy in the rabbit. *Arthritis Rheum.* 16:397
- Muir H (1995). The chondrocyte, architect of cartilage: biomechanics, structure, function and molecular of cartilage matrix macromolecules. *Bioessays.* 17(2):1039-1048
- Müller-Ladner U, Roberts CR, Franklin BN, Gay RE, Robbins PD, Evans CH, Gay S (1997). Human IL-1Ra gene transfer into synovial fibroblasts is chondroprotective. *J Immunol.* 158:3492-3498
- Murphy G, Willenbrock F, Ward RV, Cocket MI, Eaton D, Docherty APJ (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.* 283:637-641
- Murray DG (1964). Experimentally induced arthritis using intra-articular papain. *Arthritis Rheum.* 7(3):211-219
- Murrel GAC, Jang D, Williams RJ (1995). Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochim Biophys Res Commun.* 206(1):15-21
- Myers SL, Brandt KD, O'Connor BL, Visco DM, Albecht ME (1990). Synovitis and osteoarthritic changes in canine articular cartilage after cruciate ligament transection: effect of surgical hemostasis. *Arthritis Rheum.* 33:1406-1415
- Napoli JL (1996). Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin Immunol Immunopath.* 80(3):S52-S62
- Nguyen Q, Mort JS, Roughley P (1990). Cartilage proteoglycan aggregate is degraded more extensively by cathepsin L than Cathepsin B. *Biochem.* 266:569-573

Nguyen Q, Mort JS, Roughley PJ (1992). Preferential mRNA expression of prostromelysin relative to procollagenase and in situ localization in human articular cartilage. *J Clin Invest.* 89:1189-1197

Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin TT, Yu VL, Miller DK (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature.* 376:37-41

Nietfeld JJ, Duits AJ, Tilanus MGJ, van der Bosch ME, den Otter W, Capel PJA, Bijlsma JWJ (1994). Antisense oligonucleotides, a novel tool for the control of cytokine effects on human cartilage. *Arthritis Rheum.* 37(9):1357-1362

Nietfeld JJ, Wilbrink B, Helle M, van Roy JLAM, den Otter W, Swaak AJG, Huber-Bruning (1990). Interleukin-1-induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 33(11):1695-1701

Nunes I, Munger JS, Harpel JG, Nagano Y, Shapiro RL, Gleizes P-E, Rifkin DB (1996). Structure and activation of the large latent transforming growth factor- complex. *Int J Obesity.* 20(suppl 3):S4-S8

O'Keefe RJ, Crabb ID, Puzas JE, Rosier RN (1992). Influence of prostaglandins on DNA and matrix synthesis in growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res.* 7(4):397-404

Ohno O, Naito J, Iguchi T, Ishikawa H, Hirohata K, Cooke TDV (1988). An electron microscopic study of early pathology in chondromalacia of the patella. *J Bone Joint Surg.* 70-A(6):883-899

Okasaki R, Sakai A, Nakamura T, Norimura T, Suzuki K (1996). Effects of transforming growth factor beta and basic fibroblast growth factor on articular chondrocytes obtained from immobilised rabbit knee. *Ann Rheum Dis.* 139(3):181-186

Olee T, Hashimoto S, Quach J, Lotz M (1999). IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses. *J Immunol.* 162(2):1096-1100

Olney RC, Tsuchiya K, Wilson DM, Mohtai M, Maloney WJ, Schurman DJ, Smith RL (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 Met.* 81(3):1096-1103

Olney RC, Wilson DM, Mohtai M, Fielder PJ, Smith RL (1995). Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha increase insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGF-BP-3) production and IGF-BP-3 protease activity in human articular chondrocytes. *J Endocrinol.* 138(10):279-286

Olsen BR (1995): New insights into the function of collagens from genetic analysis. *Cur Opin Cell Biol.* 7:720-727

Olsen BR (1997). Molecules in focus: collagen IX. *Int J Biochem Cell Biol.* 29 (4):555-558

Osborn KD, Trippel SB, Mankin HJ (1989). Growth factor stimulation of adult articular cartilage. *J Orthop Res.* 7:35-42

Ostergaard K, Salter DM, Petersen J, Bendtzen K, Hvolris J, Andersen CB (1998). Expression of α and β subunits of the integrin superfamily in articular cartilage from macroscopically normal and osteoarthritic human femoral heads. *Ann Rheum Dis.* 57:303-308

- Otte P (1991). Basic cell metabolism of articular cartilage. Manometric studies. *Z Rheumatol.* 50:304-312
- Otterness IG, Milici AJ, Bliven ML (1993). Some factors affecting inhibition and restauration of mobility after induction of an acute arthritis in the hamster. *Agents Actions.* 40:225-227
- Pacifici M (1994). Tenascin-C and the development of articular cartilage. *Matrix Biol.* 14:689-698
- Pacifici M, Golden EB, Iwamoto M, Adams SL (1991). Retinoic acid treatment induces type X collagen gene expression in cultured chick chondrocytes. *Exp Cell Res.* 195:38-46
- Panasyuk A, Fratti E, Ribault D, Mitrovic D (1994). Effect of reactive oxygen species on the biosynthesis and structure of newly synthesized proteoglycans. *Free Radical Biol Med.* 16:157-167
- Pataki A, Rüttner JR, Abt K (1980). Age-related histochemical and histological changes in the knee-joint cartilage of C57BL10 mice and their significance for the pathogenesis of osteoarthritis. *Exp Cell Biol.* 48:329-348
- Paul KB, O'Byrne E, Blzancuzzi V et al (1991). Magnetic resonance imaging reflects cartilage proteoglycan degradation in the rabbit knee. *Skeletal Radiol.* 20:31-36
- Paul PK, Jasani MK, Sebok D, Rakhit A, Dunton AW, Douglas FL (1993). Variation in MR signal intensity across normal human knee cartilage. *J Magn Reson Imaging.* 3:569-574
- Pavasant P, Shizari T, Underhill CB (1996). Hyluronan contributes to the enlargement of hypertrophic lacunae in the growth plate. *J Cell Sci.* 109:327-334
- Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, Currie MG, Di Battista JA, Martel-Pelletier J (1998). Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum.* 41(7):1275-1286
- Pelletier JP, Martel-Pelletier J (1989). Protective effects of corticosteroids on cartilage lesions and osteophyte formation in the Pond-Nuki dog model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 32(2):181-193
- Pelletier JP, Roughley PJ, DiBattista JA, McCollum R, Martel-Pelletier J (1991). Are cytokines involved in osteoarthritic pathophysiology? *Sem Arthritis Rheum* 20(6, suppl 2):12-25
- Perrot S, Guilbaud G (1996). Pathophysiology of joint pain. *Rev Rhum.* 63(7-8):569-576
- Peyron JG (1987). Epidémiologie et génétique. In *L'arthrose, perspectives et réalités.* Simon L, Loyau G. Masson Ed. pp:14-19
- Peyron JG (1993). Intraarticular hyluronan injections in the treatment of osteoarthritis: state-of-the-art review. *J Rheumatol.* 20(suppl 39):10-15
- Philippe L, Gegout-Pottie P, Guingamp C, Bordji K, Terlain B, Netter P, Gillet P (1997). Relation between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. *Am J Phys.* 273:R1550-R1556
- Pond MJ, Nuki G (1973). Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis.* 387-388

Poole AR, Ionescu M, Swan A, Dieppe PA (1994). Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage proteoglycan aggrecan. Implication for pathogenesis. *J Clin Invest.* 94(1):25-33

Poole AR, Rosenberg LC, Reiner A, Ionescu M, Bogoch E, Roughley PJ (1996). Contents and distributions of the proteoglycans decorin and biglycan in normal and osteoarthritic cartilage. *J Orthop Res.* 14:681-689

Poole CA (1997). Articular cartilage chondrons : form, function and failure *J Anat.* 191:1-13

Pronost S, Second N, Macro M, Rédini F, Penfornis H, Jullienne A, Mooukhtar MS, Pujol JP (1995). Modulation of interleukin-1 receptor expression by transforming growth factor- β in cultured rabbit articular chondrocytes: analysis by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Osteoarthritis Cartilage.* 3:147-155

Qu Z, Huang XN, Ahmadi P, Andresevic J, Planck SR, Hart CE, Rosenbaum JT (1995). Expression of basic fibroblast growth factor in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and degenerative joint disease. *Lab Invest.* 73(3):339-346

Radin EL, Rose RM (1986). Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop Related Res.* 213:34-40

Rajpurohit R, Koch CJ, Tao Z, Teixeira CM, Shapiro IM (1996). Adaptation of chondrocytes to low oxygen tension: relationship between hypoxia and cellular metabolism. *J Cell Physiol.* 168:424-432

Re P, Valhmu WB, Vostrejs M, Howell DS, Fischer SG, Ratcliffe A (1995). Quantitative polymerase chain reaction assay for aggrecan and link protein gene expression. *Anal Biochem.* 225:356-360

Rechler MM (1997). Growth inhibition by insulin-like growth factor (IGF) binding protein 3 - what's IGF got to do with it? [editorial]. *Endocrinology.* 138:2645-2647

Reimann I (1973). Experimental osteo-arthritis of the knee in rabbits induced by alteration of the load-bearing. *Acta Orthop Scand.* 44:496

Richter C (1993). Prooxydants and mitochondrial Ca^{++} : their relationship to apoptosis and oncogenesis. *FEBS Lett.* 325(1,2):104-107

Roach HI, Erenpreisa J, Aigner T (1995). Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. *J Cell Biol.* 131(2):483-495

Ronzière MC, Ricard-Blum S, Tiollier J, Hartmann DJ, Garrone R, Herbage D (1990). Comparative analysis of collagens solubilized from human foetal, and normal and osteoarthritic adult cartilage, with emphasis on type VI collagen. *Biochim Biophys Acta.* 1038:222-230

Rosen F, McCabe G, Quach J, Solan J, Terkeltaub R, Seegmiller JE, Lotz M (1997). Differential effects of aging on human chondrocyte response to transforming growth factor β . *40(7):1275-1281*

Rubenstein JD, Kim JK, Morava-Protzner I, Stanchev PL, Henkelman RM (1993). Effect of collagen orientation on MRI characteristics of bovine articular cartilage. *Radiology.* 188:219-226

Rutishauser E, Taillard W, Friedli B (1966). Experimental studies of the non inflammatory vascular pannus (p 63). In *The European Symposium on Calcified Tissues*, Berlin, Springer Verlag.

Sakai K, Matsuno H, Tsuji H, Tohyama M (1998). Substance P receptor (NK1) gene expression in synovial tissue in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol.* 27:135-141

Salmivirta M, Elenius K, Vainio S, Hofer U, Chiquet-Ehrismann R, Thesleff I, Jalkanen M (1991). Syndecan from embryonic tooth mesenchyme binds tenascin. *J Biol Chem.* 266:7733-7739

Salter RB, Field P (1960). The effect of continuous compression on living articular cartilage. *J Bone Joint Surg.* 42:31

Salter RB, Gross A, Hall JH (1967). Hydrocortisone arthropathy. An experimental investigation. *Can Med Ass J.* 97:374

Saltis J (1996). TGF- β : receptors and cell cycle arrest. *Mol Cell Endocrinol.* 116:227-232

Scales WE, Kluger MJ (1987). Effect of anti-pyretic drugs on circadian rhythm and body temperature of rats. *Am J Physiol.* 253:R306-R313

Schaible HG, Grubb BD (1993). Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain.* 55:5-54

Schwartz ER, Leveille CR, Stevens JW, Oh WH (1981). Proteoglycan structure and metabolism in normal and osteoarthritic cartilage of guinea pigs. *Arthritis Rheum.* 24(12):1528-1539

Scott JE (1996). Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen. *Biochemistry.* 35(27):8795-8799

Serra R, Johnson M, Filvaroff EH, Laborde J, Sheehan DM, Derynck R, Moses HL (1997). Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J Cell Biol.* 139(2):541-552

Shabani F, McNeil J, Tippet L (1998). The oxidative inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) by hypochlorous acid (HOCl) is suppressed by anti-rheumatic drugs. *Free Radic Res.* 28(2):115-123

Shands AR (1931). The regeneration of hyaline cartilage in joints. An experimental study. *Arch Surg.* 22:137

Shapiro IM, Golub EE, Kakuta S, Hazelgrove J, Havery J, Chance B, Frasca P (1986). Initiation of endochondral calcification is related to changes in the redox state of hypertrophic chondrocytes. *Science.* 217(3):950-952

Shapiro IM, Lee NH (1978). The effect of oxygen, phosphoenolpyruvate and pH on the release of calcium from chondrocyte mitochondria. *Metab Bone Dis Rel Res.* 1:173-177

Shimazu A, Nah HD, Kirsch T, Koyama E, Leatherman JL, Golden EB, Kosher RA, Pacifici M (1996). Syndecan-3 and the control of chondrocyte proliferation during endochondral ossification. *Exp Cell Res.* 229:126-136

- Shimizu C, Kubo T, Hirasawa Y, Coutts RD, Amiel D (1998). Histomorphometric and biochemical effect of various hyaluronans on early osteoarthritis. *J Rheumatol.* 25(9):1813-1819
- Shingleton WD, Hodges DJ, Brick P, Cawston TE (1996). Collagenase: a key enzyme in collagen turnover. *Biochem Cell Biol.* 74:759-775
- Shingu M, Isayama T, Yasutake C, Naono T, Nobunaga M, Tomari K, Horie K, Goto Y (1994). Role of oxygen radicals and IL-6 in IL-1-dependent cartilage matrix degradation. *Inflammation.* 18(6):613-622
- Shlopov BV, Lie WR, Mainardi CL, Cole AA, Chubinskaya S, Hasty KA (1997). Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum.* 40(11):2065-2074
- Shoji h, D'Ambrosia RD, Debezies UJ (1978). Articular changes and sub-chondral bone changes in an experimental osteoarthritis model. *Surg Forum.* 29:554
- Silacci P, Dayer JM, Desgeorges A, Peter R, Manueddu C, Guerne PA (1998). Interleukin (IL)-6 and its soluble receptor induce TIMP-1 in synoviocytes and chondrocytes, and blocks IL-1-induced collagenolytic activity. *J Biol Chem.* 273(22):13625-13629
- Silbiger SM, Jacobsen VL, Cupples RL, Koski RA (1994). Cloning of cDNA s encoding human TIMP-3, a novel member of the tissue inhibitor of metalloproteinase family. *Gene (Amsterdam).* 141:293-297
- Singer II, Kwaka DW, Bayne EK, Donatelli SA, Weidner JR, Williams HR, Ayala JM, Mumford RA, Lark MW, Glant TT (1995). VDIPEN, a metalloproteinase-generated neoepitope, is induced and immunolocalized in articular cartilage during inflammatory arthritis. *J Clin Invest.* 95(5):2178-2186
- Smale G, Bendele A, Horton WE (1995). Comparison of age-associated degeneration of articular cartilage in Wistar and Fischer 344 rats. *Lab Invest.* 45(2):191-194
- Smith GN, Myers SL, Brandt KD, Mickler EA (1998). Effect of intra-articular hyaluronan injection in experimental canine osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 41(6):976-985
- Stefanovic-Racic M, Morales TI, Taskiran D, McIntyre LA, Evans CH (1996). The role of nitric oxide in proteoglycan turnover by bovine articular cartilage organ cultures. *J Immunol.* 156:1213-1220
- Stein C, Comisel K, Haimerl E, Yassouridis A, Lehrberger K, Herz A, Peter K (1991). Analgesic effect of intra-articular morphine after arthroscopic knee surgery. *N Engl J Med.* 325:1123-1126
- Steinberg JJ, Sledge CB (1991). Chondrocyte mediated cartilage degradation: regulation by prostaglandin E2, cyclic AMP and interferon alpha. *J Rheumatol.* 27(suppl):63-65
- Stockwell RA (1967). The cell density of human articular and costal cartilage. *J Anat.* 101:753-763
- Stockwell RA, Billingham MEJ, Muir H (1983). Ultrastructural changes in articular cartilage after experimental section of the anterior cruciate ligament of the dog knee. *J Anat.* 136(2):425-439

Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI (1995). Mechanism of cell surface activation of 72 kDa type IV collagenase. *J Biol Chem.* 270:5331-5338

Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsh T, Maarchetti P, Macho M, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med.* 184:1331-1341

Sutmüller M, Bruijn JA, de Heer E (1997). Collagen types VIII and X, two non-fibrillar, short chain collagens. Structure homologies, functions and involvement in pathology. *Histol Histopath.* 12:557-566

Szebenyi G, Savage MP, Olwin BB, Fallon JF (1995). Changes in the expression of fibroblast growth factor receptors mark distinct stages of chondrogenesis in vitro and during chick limb skeletal patterning. *Dev Dyn.* 204:446-456

Sztrolovics R, Alini M, Roughley PJ, Mort JS (1997). Aggrecan degradation in human intervertebral disc and articular cartilage. *Biochem J.* 326(pt 1):235-241

Takahashi K, Kubo T, Arai Y, Kitajima I, Takigawa M, Imanishi J, Hirasawa Y (1998). Hydrostatic pressure induces expression of interleukin 6 and tumor necrosis factor α mRNAs in a chondrocyte-like cell line. *Ann Rheum Dis.* 57:231-236

Takahashi K, Kubo T, Kobayashi J, Takagawa M, Arai Y (1997). Hydrostatic pressure influences mRNA expression of transforming growth factor- β 1 and heat shock protein 70 in chondrocyte-like cell line. *J Orthop Res.* 15:150-158

Tardif G, Reboul P, Pelletier JP, Geng C, Cloutier JM, Martel-Pelletier J (1996). Normal expression of type I 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):968-978

Teixeira CC, Shapiro IM, Hatori M, Rajpurohit R, Koch C (1996). Retinoic acid modulation of glutathione and cysteine metabolism in chondrocytes. *Biochem J.* 314:21-26

Thaxter RH, Mann RA, Anderson CG (1965). Degeneration of immobilized knee joints on rats. *J Bone Joint Surg.* 47A:567

Thomas JT, Ayad S, Grant ME (1994). Cartilage collagens: strategies for the study of their organisation and expression in the extra-cellular matrix. *Ann Rheum Dis.* 53:488-496

Thomas JT, Grant ME (1988). Cartilage proteoglycan aggregate and fibronectin can modulate the expression of type X collagen by embryonic chick chondrocytes cultured in collagen gels. *Biosci Reports.* 18(2):163-171

Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, Schmidt JA, Tocci M (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature.* 356:768

Thorp BH, Anderson I, Jakowlew SB (1992). Transforming growth factor-1, -2 and -3 in cartilage and bone cells during endochondral ossification in the chick. *Development.* 114:907-911

Tiku K, Thakker-Varia S, Ramachandrala A, Tikku ML (1992). Articular chondrocytes secrete IL-1, express membrane IL-1, and have IL-1 inhibitory activity. *Cell Immunol.* 140:1-20

Tortorelle MD, Burn TC, Pratta MA, Abbaszade I, Hollis JM, Liu R, Rosenfeld SA, Copeland RA, Decicco CP, Wynn R, Rockwell A, Yang F, Duke JL, Solomon K, George H, Bruckner

- R, Nagase H, Itoh Y, Ellis DM, Ross H, Wiswall BH, Murphy K, Hillman Jr MC, Hollis GF, Newton RC, Magolda RL, Trzaskos JM, Arner EC (1999). Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. 284:1664-1666
- Towle CA, Hung HH, Bonassar LJ, Treadwell BV, Mangham DC (1997). Detection of interleukin-1 in the cartilage of patients with osteoarthritis: a possible autocrine/paracrine role in pathogenesis. *Osteoarthritis Cartilage*. 5(5):293-300
- Tsuji M, Funahashi S, Takigawa M, Seiki M, Fujii K, Yoshida T (1996). Expression of c-fos gene inhibits proteoglycan synthesis in transfected chondrocyte. *FEBS Lett*. 381(3):222-226
- Tsukasaki T, Usa T, Matsumoto T, Enomoto H, Ohtsuru A, Namba H, Iwasaki K, Yamashita S (1994). Effect of transforming growth factor- β on the insulin-like growth factor-I autocrine/paracrine axis in cultured rat articular chondrocytes. *Exp Cell Res*. 215:9-16
- Tyler J, Watson P, Koh HL, Herrod NJ, Robson M, Hall L (1995). Detection and monitoring degeneration of osteoarthritic cartilage by MRI. *Acta Orthop Scand*. 66 (suppl 266):130-138
- Uebelhart D, Thonar EJ, Zhang J, Williams JM (1998). Protective effect of exogenous chondroitin 4,6-sulfate in the acute degradation of articular cartilage in the rabbit. *Osteoarthritis Cartilage*. 6(suppl A):6-13
- Van Beuningen HM, Arntz OJ, van den Berg WB (1991). In vivo effects of interleukin-1 on articular cartilage: prolongation of proteoglycan metabolic disturbances in old mice. *Arthritis Rheum*. 34(5):606-614
- Van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg WB (1994). Transforming growth factor- β 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest*. 71(2):279-290
- Van de Loo AAJ, van Beuningen HM, van Lent PLEM, van den Berg WB (1989). Direct effect of murine rIL-1 on cartilage metabolism in vivo. *Agents Actions*. 26(1/2):153-155
- Van den Berg WB (1995). Growth factors in experimental osteoarthritis: transforming growth factor β pathogenic? *J Rheumatol*. 22 (suppl 43):143-145
- Van den Berg WB, Kruysen MWM, van de Putte LBA (1982). The mouse patella assay: an easy method of quantitating articular cartilage chondrocyte function in vivo and in vitro. *Rheumatol Int*. 1:165-169
- Van der Kraan PM, de Lange J, Vitters EL, van Beuningen HM, van Osch GJVM, van Lent PLEM, van den Berg WB (1994). Analysis of changes in proteoglycan content in murine articular cartilage using image analysis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2:207-214
- Van der Kraan PM, Vitters EL, van Beuningen HM, van de Putte LBA, van den Berg WB (1990). Degenerative joint lesions in mice after a single intra-articular collagenase injection. A new model of osteoarthritis. *J Exp Path*. 71:19-31
- Van der Kraan PM, Vitters EL, van Beuningen HM, van den Berg WB (1992). Proteoglycan synthesis and osteophyte formation in 'metabolically' and 'mechanically' induced murine degenerative joint disease: an in vivo autoradiographic study. *Int J Exp Path*. 73:335-350
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 38:97-120

Van Osch GJVM, van der Kraan PM, van den Berg WB (1994). Site specific inhibition of cartilage proteoglycan synthesis in the murine knee joint. Differences between 3 metabolic stimuli. *J Rheumatol.* 21:1107-1112,

Vertel BM (1995). The ins and out of aggrecan. *Trends Cell Biol.* 5:458-464

Vertel BM, Grier BL, Schwartz NB (1994). The chondrodystrophy, nanomelia: biosynthesis and processing of the defective aggrecan precursor. *Biochem J.* 301:211-216

Vetter U, Zapf J, Heit W, Helbing G, Heinze E, Froesch ER, Teller WM (1986). Human fetal and adult chondrocytes. Effect of insulin like growth factors I and II, and growth hormone on clonal growth. *J Clin Invest.* 77:1903-1908

Vilensky JA, O'Connor BL, Brandt KD, Dunn EA, Rogers PI (1997). Serial kinematic analysis of the canine hindlimb joints after deafferentation and anterior cruciate ligament transection. *Osteoarthritis Cartilage.* 5:173-182

Vilim V, Fosang AJ (1993). Characterization of proteoglycans isolated from associative extracts of human articular cartilage. *Biochem J.* 293:165-172

Vivien D, Galera P, Lebrun E, Loyau G, Pujol JP (1990). Differential effects of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor on the cell cycle of cultured rabbit articular chondrocytes. *J Cell Physiol.* 143:534-545

Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, Nathan C (1993). Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J Exp med.* 178:605-613

Von der mark K, Kirsch T, Aigner T, Reichenberger E, Nerlich A, Weseloh G, Stöb H. The fate of chondrocytes in osteoarthritic cartilage. Regeneration, dedifferentiation, or hypertrophy? In *osteoarthritis and Cartilage* (1992). Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG, Hascall VC Eds. Raven Press, New York. pp:221-234

Von der Mark K, Kirsch T, Nerlich A, Kuss A, Weseloh G, Glückert K, Stöss H (1992). Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum.* 35(7):806-811

Von der mark, Mollenhauer J (1997). Annexin V interactions with collagen. *Cell Mol Life Sci.* 53:539-545

Walker GD, Fischer M, Gannon J, Thompson RC, Oegema TR (1995). Expression of type X collagen in osteoarthritis. *J Orthop Res.* 13:4-12

Wallis GA (1997). Bone growth: coordinating chondrocyte differentiation. *Current Biol.* 6(12):1577-1580

Warnock MG, Sharif M, Elson CJ (1994). IL-1 β at physiological concentration stimulates degradation of human articular cartilage. *Bone Miner.* 25 (suppl 1):S36

Watson PJ, Hall LD, Carpenter TA, Tyler JA (1993). A magnetic resonance imaging study of joint degeneration in the Guinea pig knee. *Agents Actions.* 39 (suppl):261-265

Webb GR, Westacott CI, Elson CJ (1997). Chondrocyte tumor necrosis factor receptors and focal loss of cartilage in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 5(6):427-437

Wei L, Svensson O, Hjerpe A (1997). Correlation of morphologic and biochemical changes in the natural history of spontaneous osteoarthritis in guinea pig. *Arthritis Rheum.* 40(11):2075-2083

Werb Z, Tremble PM, Behrendtsen O, Crowley E, Damsky CH (1989). Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J Cell Biol.* 109:877-889

Westacott CI, Sharif M (1996). Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Sem Arthritis Rheum.* 25(4):254-272

Williams CJ, Jimenez SA (1995). Heritable diseases of cartilage caused by mutations in collagen genes. *J Rheumatol.* 22 (suppl 43):28-33

Williams JA, Eugene JM, Thonar A (1989). Early osteophyte formation after chemically induced articular cartilage injury. *Am J Sport Med.* 17:7-15

Williams JM, Brandt KD (1984). Immobilization ameliorates chemically-induced articular cartilage damage. *Arthritis Rheum.* 27(2):208-216

Williams JM, Brandt KD (1985). Triamcinolone hexacetonide protects against fibrillation and osteophyte formation following chemically induced articular cartilage damage. *Arthritis Rheum.* 28(11):1267-1274

Williams JM, Felten DL, Peterson RG, O'Connor BL (1982). Effect of surgically induced instability on rat knee articular cartilage. *J Anat.* 134(1):103-109

Winterbottom N, Tondravi MM, Harrington TL, Klier FG, Vertel BM, Goetinck PF (1992). Cartilage matrix protein is a component of the collagen fibril of cartilage. *Dev Dyn.* 193:266-276

Woessner JF (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino-acid. *Biochem Biophys.* 93:440-447

Woods VL, Schreck PJ, Gesink DS, Pacheco HO, Amiel D, Akeson WH, Lotz M (1994). Integrin expression by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 37:537-544

Wright JK, Clark IM, Cawston TE, Hazleman BL (1991). The secretion of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) by human synovial fibroblasts is modulated by all-trans-retinoic acid. *Biochim Biophys Acta.* 1133:25-30

Yasuda T, Shimizu K, Nakagawa Y, Ishikawa H, Nishihara H, Nakamura T (1996). Possible involvement of RGD (Arg-Gly-Asp)-containing extracellular matrix proteins in rat growth plate chondrocyte differentiation in culture. *J Bone Miner Res.* 11(10):1430-1437

Yonezawa I, Kato K, Yagita H, Yamauchi Y, Okumura K (1996). VLA-5-mediated interaction with fibronectin induces cytokine production by human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 219:261-265

Zahir A, Freeman MAR (1972). Cartilage changes following a single episode of infarction of the capital femoral epiphyses in the dog. *J Bone Joint Surg.* 54A:125

Zanni M, Tamburro A, Rotilio D (1995). IL-1 beta and TGF-beta 1 modulate the sulfation grade of chondro-disaccharides in porcine articular cartilage: a capillary electrophoresis study. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 139(1):29-44

EVIDENCE FOR NEUROGENIC TRANSMISSION INDUCING DEGENERATIVE CARTILAGE DAMAGE DISTANT FROM LOCAL INFLAMMATION

ELVIRE DECARIS, CORINNE GUINGAMP, MIREILLE CHAT, LIONEL PHILIPPE, JOËL-PAUL GRILLASCA, AMR ABID, ALAIN MINN, PIERRE GILLET, PATRICK NETTER, and BERNARD TERLAIN

Objective. To investigate involvement of the nervous system in ipsilateral and contralateral joint inflammation.

Methods. Freund's complete adjuvant (CFA; 1 mg or 1 μ g) was injected unilaterally and the messages (a) from the hind paw to the ipsilateral and contralateral knees and (b) from one knee to the contralateral knee were analyzed. The degenerative impact of the local injury on distant cartilage was assessed using patellar proteoglycan synthesis as an indicator. Neurogenic mechanisms were blocked either by spinal cord compression or by injection of neurokinin 1 (NK-1) antagonist, or they were mimicked by intraarticular injection of substance P. The data were compared with those gathered in a model of systemic inflammation, characterized by fever and serum interleukin-6 production.

Results. After unilateral subcutaneous injection of CFA, proteoglycan anabolism decreased bilaterally. Spinal cord compression and administration of the NK-1 antagonist inhibited the response in the contralateral limb. Following 1 mg CFA subcutaneous injection, the ipsilateral response implicated both neurogenic and systemic mechanisms, whereas the nervous system alone was implicated after 1 μ g subcutaneous CFA injection. The 1 μ g CFA intraarticular injection induced

a degenerative contralateral signal, which was abolished by spinal cord compression and by pretreatment with the NK-1 antagonist. Intraarticular injection of 1 μ g CFA also induced an ipsilateral increase of anabolism, which was enhanced by spinal cord compression. Similar results were obtained after intraarticular injections of substance P. These effects were not reproduced with turpentine treatment, a systemic model, in which spinal cord compression had no effect.

Conclusion. A unilateral inflammation can induce, by neurogenic mechanisms, distal bilateral degeneration of articular cartilage, implicating involvement of neuropeptides.

Clinical observations suggest that nervous system phenomena and neuropeptides may be involved in the pathogenesis of diseases such as rheumatoid arthritis (RA), which is usually distal, bilateral, and symmetric (1). Reports of atypical unilateral RA or osteoarthritis, in which a limb paralyzed by hemiplegia (2,3) or poliomyelitis (4) is totally or partially spared by the arthritic process, suggest that the nervous system may affect the development of these diseases. More recent studies suggest that neuropeptides may play a role in the early phases of RA (5), and this contention is strengthened by the finding that the concentration of the neurotransmitter substance P is increased in the synovial fluid of patients with arthritis (6). Substance P stimulates synovocyte proliferation, induces the secretion of prostaglandin E_2 and collagenase (6), and stimulates neutrophils, lymphocytes, mast cells, and monocyte/macrophages producing various cytokines, including interleukin-1 (IL-1) (7), tumor necrosis factor α , and IL-6 (8).

Numerous experimental data reinforce these clinical results. In rats, neuropeptide levels in synovial

Supported by the Région Lorraine and by the Communauté Urbaine du Grand Nancy.

Elvire Decaris, BSc, Corinne Guingamp, BSc, Mireille Chat, PhD, Lionel Philippe, PhD, Joël-Paul Grillasca, PhD, Amr Abid, PhD, Alain Minn, PhD, Pierre Gillet, MD, PhD, Patrick Netter, MD, PhD, Bernard Terlain, PharmD: Université Henri Poincaré-Nancy I, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Address reprint requests to Patrick Netter, MD, PhD, UMR 7561 CNRS-Université Henri Poincaré-Nancy I, Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires, Faculté de Médecine, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France.

Submitted for publication December 31, 1998; accepted in revised form April 27, 1999.

fluid rose bilaterally during locally induced inflammation (9). Likewise, the expression of both substance P and calcitonin gene-related peptide (CGRP) messenger RNA (mRNA) increased bilaterally in spinal cord neurons (10,11), and in the spinal cord, the amounts of substance P and CGRP were increased at the level of an L4 vertebral lesion (12,13). No such changes were seen at the L3 level, suggesting that the contralateral response does not result from a systemic action (14). Neuropeptides may also participate in the pathogenesis of algodystrophy, in which injury of the autonomic nervous system is associated with pathologic changes in distant soft tissues and bones (15).

A local inflammation can produce degenerative articular effects from a distance, through systemic or cellular transmission pathways. We wished to investigate whether, in rats, such degenerative effects, estimated by assaying cartilage anabolism, can also be propagated through neurogenic pathways. We therefore studied, in rats that did and rats that did not have spinal cord injury that would interrupt neural transmission of any signal, (a) the response in both knees to a subcutaneous injection of an inflammatory agent into 1 hind paw, and (b) the response in the contralateral knee to an intraarticular injection through the infrapatellar ligament. The degenerative effect of a local injury on distant articular cartilage was evaluated by assessing the synthesis of patellar proteoglycan (PG), used as a major index of cartilage metabolism. The expression of IL-1 β mRNA in synovial membrane was also quantified, because this interleukin is a proinflammatory cytokine considered to be the key mediator of anabolism decrease (16,17).

We experimented along these lines using various models in Wistar rats, since this strain mounts a milder arthritogenic response to Freund's complete adjuvant (CFA) than do Lewis rats. Initially, we used CFA containing 1 mg *Mycobacterium tuberculosis*. This classic inflammatory agent, in contrast with others such as turpentine (18), has a partially systemic effect. In a variant of this model, we administered a very low dose of CFA (1 μ g), which produced local inflammation but no fever. The contribution of substance P was studied by injecting it unilaterally at various doses into the knee. We also administered an antagonist to the neurokinin 1 (NK-1) receptor (19,20). The results were compared with those obtained by injecting turpentine, which is known to have predominantly systemic effects (21,22).

MATERIALS AND METHODS

Animals. Experiments were performed on male Wistar rats weighing 150–175 gm (Charles River, Saint-Aubin-lès-

Elbeuf, France). Rats were housed in individual cages with free access to standard laboratory food and water. The room was kept on a 12 hour/12 hour light/dark cycle (light-on period 6:00 AM–6:00 PM) with controlled temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$). Our local ethics committee approved the experimental protocols. Guidelines for laboratory procedures were followed at all times.

Spinal cord injury. Spinal cord injuries were produced using the extradural balloon compression method as described by Khan and Griebel (23). Animals were anesthetized with intraperitoneal ketamine hydrochloride (50 mg/kg) and acepromazine (1.25 mg/kg). Spinal cord injury was produced 1 cm upon the L4 lumbar vertebra, using a model 12-060-2F Fogarty arterial embolectomy balloon catheter (Baxter, Irvine, CA) to produce cord compression. The maximum air capacity of the balloon is 0.2 ml. The distal tip of the catheter is soft and short and positioned accurately, and the catheter held in place manually. After a partial dorsal laminectomy, the deflated balloon catheter was inserted for 1 cm above the site of the partial laminectomy, on the dorsal surface of the spinal cord. The balloon was inflated with a manual air compressor to a pressure of 2 bar, was held in place for 3 minutes, and then was deflated and removed from the spinal canal.

The rats were housed individually and their bladders were expressed manually once daily, beginning on the day of the operation. They were all kept for 5 days after the surgery, because 2 days were needed for recovery from surgery, and the longest experimental time used for any was 72 hours. The rats were killed 6, 12, 24, 48, or 72 hours after the inflammation-inducing injection ($n = 6$ per group). Comparisons were made with untreated controls and controls given injections of inflammation-inducing agents but whose spinal cords were not injured ($n = 6$ in each of these groups). Another control group ($n = 11$) was subjected only to spinal cord compression, in order to evaluate any changes resulting from the lack of movement.

Induction of inflammation. Inflammation was induced by unilateral injection (at hour 0) of CFA, an emulsion of heat-killed *M. tuberculosis* H37 RA (Difco, Detroit, MI) in sterile mineral oil (paraffin oil, NaCl 0.9%, Tween 80), either subcutaneously into the hind paw or intraarticularly through the infrapatellar ligament. Various doses of CFA were used (1 μ g and 1 mg in 100 μ l for subcutaneous injections and 1 μ g in 50 μ l for intraarticular injections). The contribution of substance P (a gift from Dr. S. Moussaoui, Rhône Poulenc-Rorer, France) was determined by injecting this agent (0.2 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 10 μ g, and 20 μ g, in 50 μ l isotonic saline) unilaterally into the joint at hour 0. For purposes of comparison with a systemic inflammation, some rats were given a unilateral subcutaneous injection of 100 μ l turpentine (at hour 0).

Administration of antagonist to NK-1 receptor. LY303870 [(R)-1-[N-(2-methoxybenzyl) acetylamino]-3-(1H-indo-3-yl)-2-[N-(2-(4-(piperidin-1-yl) piperidin-1-yl) acetyl) amino] propane], synthesized at Rhône Poulenc-Rorer, France, was a gift from Dr. V. Fardin (Rhône Poulenc-Rorer). This nonpeptide NK-1 receptor antagonist (19,20) was administered intraperitoneally at a dose of 20 mg/kg body weight in 0.1N HCl/0.9% NaCl (1/15) 24 hours and 12 hours before induction of inflammation ($n = 6$ each in the LY303870-treated group, the untreated control group, and the excipient-treated group).

Measurement of body temperature. In order to estimate the systemic contribution to inflammation, body temperature was recorded hourly using battery-operated biotelemetric transmitting devices (1.8 cm in diameter, 4.5 gm; Mini-Mitter, Sunriver, OR) implanted intraperitoneally under sterile conditions (24,25). Six rats were housed in individual plastic cages kept on the biotelemetry receiver plates. After a 5-day period of adaptation following the implantation of the transmitter, the rats' body temperatures were measured every hour. The value for each animal was normalized to that of the night before the injection day, and therefore, each animal served as its own control.

Measurement of edema. After subcutaneous injection, the degree of edema was determined by plethysmography in 6 rats. After intraarticular injection, the width of the knee joint (± 0.01 mm) was measured with an Oditest caliper (26). For all experiments, the swelling was expressed as the percentage change relative to the change in 6 untreated control rats.

IL-6 assay. Blood samples were collected in sterile tubes by cardiac puncture and centrifuged, and serum was stored at -20°C until testing. Samples ($n = 6$) were assayed for their ability to support the proliferation of an IL-6-dependent B9 cell line, as described previously by us (27). Results were expressed as arbitrary units (AU) per milliliter; 1 AU/ml produced half-maximal cell proliferation, and the detection limit was 2.5 AU/ml.

Cartilage anabolism. PG synthesis was assessed *ex vivo* by measuring the incorporation of $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ in the patella (26,28). Rats were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride (50 mg/kg) and acepromazine (1.25 mg/kg) and killed by cervical dislocation. Both patellae were carefully dissected out and were incubated for 3 hours with $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (0.6 $\mu\text{Ci/ml}$; Amersham, Les Ulis, France). After decalcification, the central area of the patellae was sampled with a 2 mm-diameter biopsy punch (Stiefel, Nanterre, France). The amount of ^{35}S -sulfate incorporated, considered a reliable measure of the amount of newly synthesized sulfated glycosaminoglycan, was counted by liquid scintillation spectrometry. For cartilage anabolism studies, rats were killed 6, 12, 24, 48, or 72 hours after induction of the local inflammation ($n = 6$ per group).

Expression of IL-1 β mRNA. IL-1 β mRNA from rat synovium was assayed using a quantitative multistandard reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) method that takes advantage of both IL-1 β and G3PDH sequence conservation between animal species (29). This protocol allowed us to normalize the amounts of IL-1 mRNA with respect to those of G3PDH mRNA in each sample. For amplification of IL-1 β , the direct primer extended from nucleotides 181 to 202 and the reverse primer from nucleotides 879 to 859, in accordance with the rat sequence (GenBank accession no. M98820). For amplification of G3PDH, the direct primer extended from nucleotides 50 to 72 and the reverse primer from nucleotides 863 to 841, in accordance with the rat sequence (GenBank accession no. M17701). Each amplification product was then distinguished by restriction site polymorphism: *Avr* II digested the rat IL-1 β products into 2 fragments (643 and 57 basepairs), while the mouse products remained uncut. A similar difference in pattern of restriction sites was used to differentiate G3PDH products: a single *Hind* III

restriction site (producing 643- and 171-bp fragments) was present in mice, but not in rats.

Amplification products were quantitated after electrophoresis and analysis of ethidium bromide-stained gels. Results are expressed as the ratio ($\text{IL-1}\beta_{\text{rat}}/\text{G3PDH}_{\text{rat}}$): ($\text{G3PDH}_{\text{mouse}}/\text{IL-1}\beta_{\text{mouse}}$), in AU. For RT-PCR studies, rats were killed 6, 12, 24, 48, or 72 hours after induction of inflammation ($n = 6$ per group).

Statistical analysis. After a global comparison by analysis of variance, the different groups were compared using Fisher's *t*-test. *P* values less than 0.05 were considered significant. Statistical analysis was performed on experimental data only, not on percentages.

RESULTS

We first confirmed that in control rats, cartilage anabolism was the same in the 2 patellae and that IL-1 β mRNA was not expressed in synovium. We also verified that spinal cord compression alone had no effect on PG anabolism in patellar cartilage from hour 0 to hour 72. Thus, the changes observed in the joints during the experiments were not artifacts due to the lack of movement caused by the paraplegia.

Effects of unilateral subcutaneous injection of CFA (1 mg) (mixed model). After subcutaneous injection of CFA at 1 mg, there was significant edema of the injected paw (Figure 1C), accompanied by fever and production of serum IL-6 (Figures 1A and B), with a peak of fever at hour 8 and a return to normal body temperature by hour 12. PG anabolism was decreased by 15–46% in both patellae from hour 6 to hour 72, and IL-1 β mRNA was detected in the synovial membranes of both knees. Interruption of the spinal cord totally abolished the contralateral response, but did not affect the 25% decrease in PG anabolism in the ipsilateral patella at hour 6 (Figure 2B). No further significant variation of cartilage anabolism was detected in the patellae of animals with spinal cord injury (Figure 2B). IL-1 mRNA was not expressed after spinal cord compression.

Effects of unilateral subcutaneous or intraarticular injection of CFA (1 μg) (neurogenic model). The smaller dose of CFA was chosen from among several doses tested (1 mg, 100 μg , 10 μg , and 1 μg) because it did not cause fever (which is a major indicator of a systemic response) but it did produce mild local inflammation (data not shown). Given subcutaneously, this dose produced edema of the ipsilateral hind paw (Figure 1C) but no fever (Figure 1A) or serum IL-6 (Figure 1B). Despite the absence of these typical systemic effects, the cartilage of both knee joints was damaged: PG synthesis was significantly decreased (by 25–42%) for 72 hours.

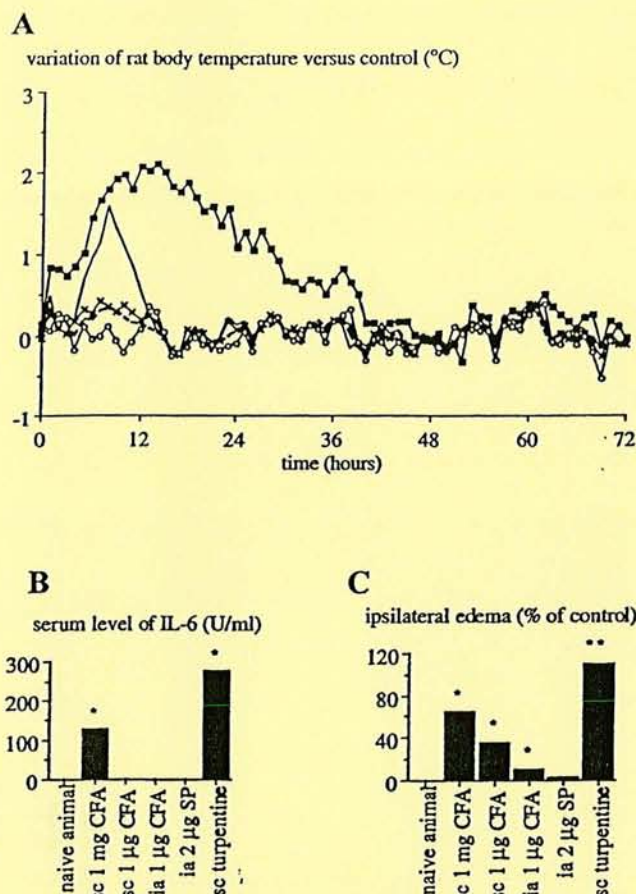


Figure 1. Effects of unilateral injection of an inflammatory agent on systemic (A and B) and local (C) inflammatory phenomena in rats. **A**, Variation of body temperature versus pretreatment levels (each rat used as its own control) (mean $\pm$ SD pretreatment temperature $37.42 \pm 0.18^{\circ}\text{C}$). Body temperature was measured biotelemetry (see Materials and Methods) after injection of Freund's complete adjuvant (CFA) either subcutaneously (sc) at 1 mg (dashed line) or 1 μg (solid line) or intraarticularly (ia) at 1 μg (times signs), or of substance P (SP) (2 μg intraarticularly) (open circles) or turpentine (100 μl subcutaneously) (closed squares). **B**, Levels of interleukin-6 (IL-6) in serum (characterizing the systemic response), as judged by the ability to support the proliferation of the IL-6-dependent B9 cell line at hour 24. **C**, Edema (expressed as a percentage of measurements in untreated control rats) ipsilateral to the injection site. Values are the means ($n = 6$ animals in each group). * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.0001$, versus untreated controls).

IL-1 β mRNA was detected in both synovial membranes (Figure 3A). Spinal cord injury totally abolished these effects on the cartilage of both knees (Figure 3B) as well as the expression of IL-1 mRNA (data not shown).

When injected intraarticularly into a knee joint, 1 μg CFA produced edema in the injected knee (Figure 1C), but no fever (Figure 1A) or IL-6 (Figure 1B). In the

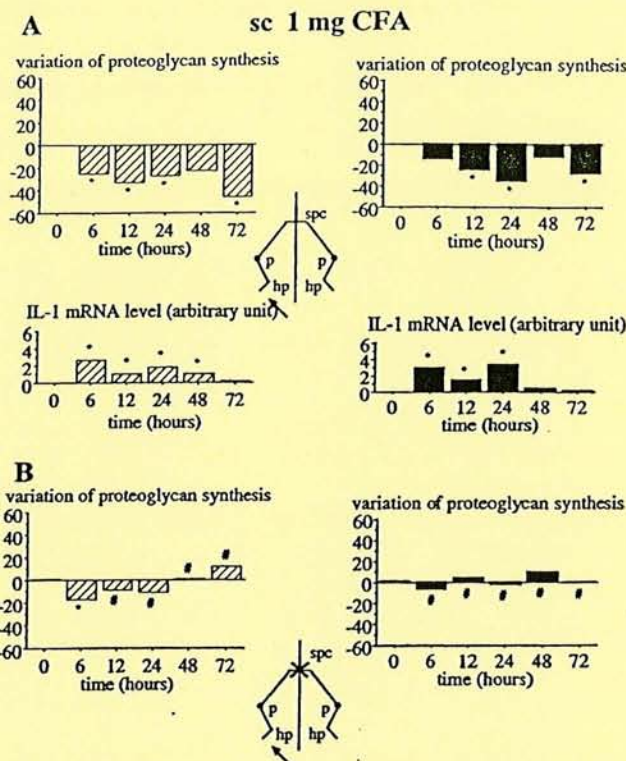


Figure 2. Effects of unilateral subcutaneous (sc) injection of 1 mg Freund's complete adjuvant (CFA) on proteoglycan synthesis in patellar cartilage of rats (as a percentage of values in untreated controls; mean $\pm$ SD $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ incorporation in control patellae 609.02 ± 0.54 cpm) and on interleukin-1 (IL-1) mRNA expression in synovium. **A**, Rats with intact spinal cords. **B**, Rats after spinal cord compression. Hatched bars show the ipsilateral response; solid bars show the contralateral response. Arrows on diagrams of supine rats indicate the site of injection: spc = spinal cord; p = patella; hp = hind paw; times sign indicates spinal cord compression. Values are the means ($n = 18$ untreated rats, 11 compression controls, 6 rats undergoing injection without compression, and 6 rats undergoing injection with compression). * = $P < 0.05$ versus untreated controls; # = $P < 0.05$ versus rats that underwent injection without spinal cord injury.

contralateral limb, patellar PG anabolism was decreased by 22–38% and synovial IL-1 β mRNA was enhanced (Figure 4A); these effects were not seen in the contralateral knees of the rats with injured spinal cords (Figure 4B). Ipsilaterally, PG anabolism decreased slightly at first but returned to normal by hour 24 (Figure 4A). The interruption of the nervous pathway induced a significant ipsilateral increase of PG synthesis, by up to 53% (Figure 4B). The expression of IL-1 mRNA was abolished after spinal cord injury in both synovial membranes (data not shown).

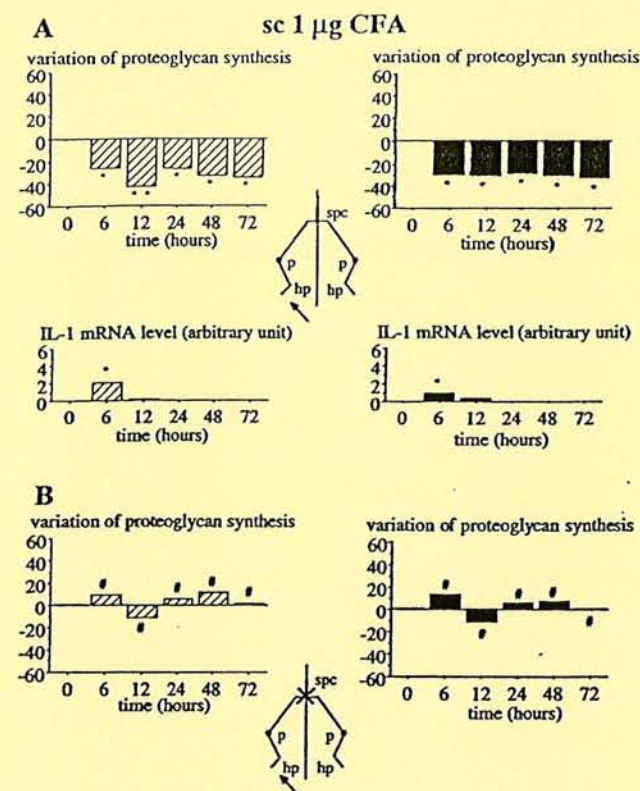


Figure 3. Effects of unilateral subcutaneous injection of 1 μ g CFA on proteoglycan synthesis in patellar cartilage of rats (as a percentage of values in untreated controls; mean $\pm$ SD $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ incorporation in control patellae 609.02 ± 0.54 cpm) and on IL-1 mRNA expression in synovium. **A**, Rats with intact spinal cords. **B**, Rats after spinal cord compression. Hatched bars show the ipsilateral response; solid bars show the contralateral response. Arrows on diagrams of supine rats indicate the site of injection. Values are the means ($n = 18$ untreated rats, 11 compression controls, 6 rats undergoing injection without compression, and 6 rats undergoing injection with compression) * = $P < 0.05$ versus untreated controls; ** = $P < 0.0001$ versus untreated controls; # = $P < 0.05$ versus rats that underwent injection without spinal cord injury. See Figure 2 for definitions and explanations.

Effects of unilateral intraarticular injection of 2 μ g substance P. Substance P was administered by unilateral intraarticular injection through the infrapatellar ligament, and the contribution of this agent to the inflammatory process was evaluated. In preliminary tests, the effect of substance P (at doses ranging from 0.2 μ g to 20 μ g, and evaluated 24 hours after the unilateral injection) had varied with the dose, ranging from no effect (with 0.2 μ g) to a significant increase in the ipsilateral patella after injection of 20 μ g. A 0.2- μ g dose of substance P did not induce variation in cartilage anabolism, whereas an injection of 1 μ g induced a

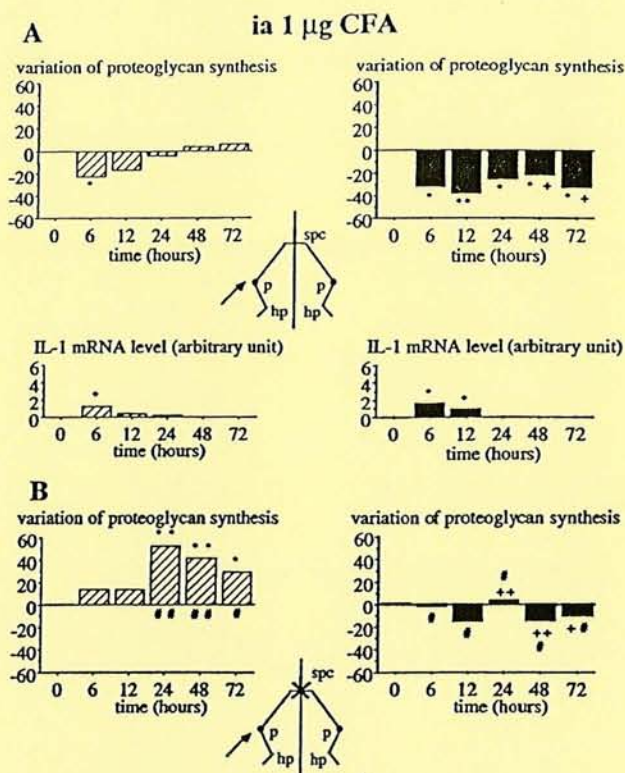


Figure 4. Effects of unilateral intraarticular (ia) injection of 1 μ g CFA on proteoglycan synthesis in patellar cartilage of rats (as a percentage of values in untreated controls; mean $\pm$ SD $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ incorporation in control patellae 609.02 ± 0.54 cpm) and on IL-1 mRNA expression in synovium. **A**, Rats with intact spinal cords. **B**, Rats after spinal cord compression. Hatched bars show the ipsilateral response; solid bars show the contralateral response. Arrows on diagrams of supine rats indicate the site of injection. Values are the means ($n = 18$ untreated rats, 11 compression controls, 6 rats undergoing injection without compression, and 6 rats undergoing injection with compression). * = $P < 0.05$ versus untreated controls; ** = $P < 0.0001$ versus untreated controls; # = $P < 0.05$ versus rats that underwent injection without spinal cord injury; ## = $P < 0.0001$ versus rats that underwent injection without spinal cord injury; + = $P < 0.05$, contralateral side versus ipsilateral side; ++ = $P < 0.001$, contralateral side versus ipsilateral side. See Figure 2 for other definitions and explanations.

significant (16%) decrease in PG synthesis in the ipsilateral patella but had no effect on the contralateral side. A larger dose (2 μ g) induced a significant (17–24%) decrease in PG anabolism in both patellae. Injections of both 10 μ g and 20 μ g substance P induced a significant (18–29%) bilateral increase in cartilage anabolism in the 2 patellae. For the experiments reported here, the 2- μ g dose of substance P was used, since it produced the same changes as those induced by CFA injections and by intraarticular injection of IL-1 (26).

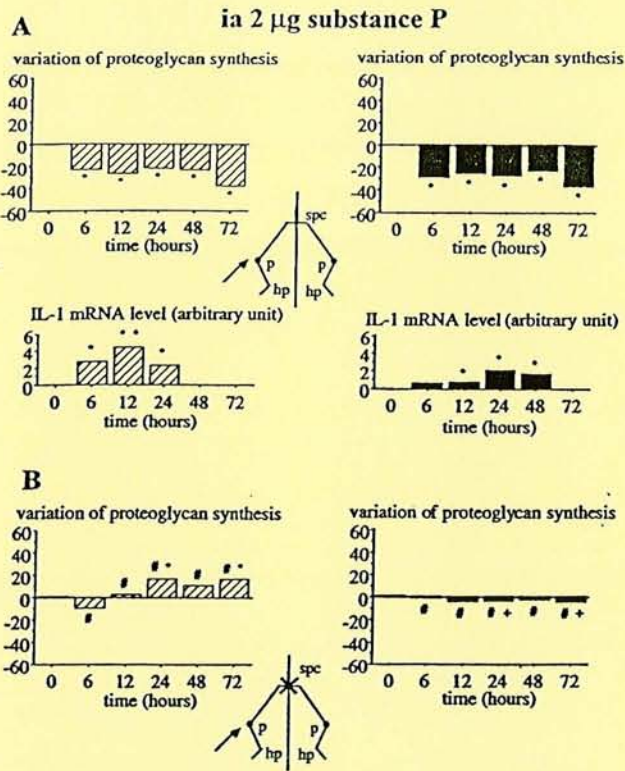


Figure 5. Effects of unilateral intraarticular (ia) injection of 2 μ g substance P on proteoglycan synthesis in patellar cartilage of rats (as a percentage of values in untreated controls; mean $\pm$ SD $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ incorporation in control patellae 609.02 ± 0.54 cpm) and on IL-1 mRNA expression in synovium. **A**, Rats with intact spinal cords. **B**, Rats after spinal cord compression. Hatched bars show the ipsilateral response; solid bars show the contralateral response. Arrows on diagrams of supine rats indicate the site of injection. Values are the means ($n = 18$ untreated rats, 11 compression controls, 6 rats undergoing injection without compression, and 6 rats undergoing injection with compression). * = $P < 0.05$ versus untreated controls; ** = $P < 0.0001$ versus untreated controls; # = $P < 0.05$ versus rats that underwent injection without spinal cord injury; + = $P < 0.05$, contralateral side versus ipsilateral side. See Figure 2 for other definitions and explanations.

Substance P at the 2- μ g dose induced neither edema nor (judging from the absence of fever [Figure 1A] and serum IL-6 [Figure 1B]) a typical systemic inflammation. PG synthesis was decreased by 22–38% in both patellae, from hour 6 to hour 72, with a bilateral increase in the expression of IL-1 β mRNA in synovial membranes (Figure 5A) that was absent after spinal cord compression. When the spinal cord was injured, the contralateral response was abolished. Ipsilaterally, the presence of substance P alone after spinal cord compression

induced a 16% increase in PG anabolism from hour 24 to hour 72 (Figure 5B).

Effects of pretreatment with NK-1 antagonist on CFA-induced modifications in PG anabolism. To confirm that substance P contributes to the transmission of a cartilage-degenerative signal, LY303870, a nonpeptide NK-1 antagonist, was administered 24 hours and 12 hours before the induction of inflammation. First, we showed that the administration of neither the antagonist nor its excipient (0.1N HCl/0.9% NaCl [1/15]) had any significant effect on PG synthesis (a 7% increase after LY303870 administration and a 3.5% increase after excipient administration, in comparison with untreated controls). Then the effects of LY303870 on CFA-induced modifications were studied at hour 24 after a unilateral injection of CFA, given either subcutaneously (1 mg or 1 μ g) or intraarticularly (1 μ g).

In all cases, preadministration of the excipient before CFA injection had no effect on the patellar PG anabolic modifications induced by the injection of CFA alone (Figure 6). Damage to contralateral joint cartilage, seen after subcutaneous injection of 1 mg or 1 μ g CFA or intraarticular injection of 1 μ g CFA, was prevented by pretreatment with the NK-1 receptor antagonist. In contrast, the pretreatment did not significantly affect the decrease in ipsilateral PG anabolism observed after subcutaneous injection of the larger dose of CFA (Figure 6A). This is in accordance with observations in the spinal cord compression experiments. The decrease in ipsilateral PG synthesis observed after subcutaneous injection of the smaller dose of CFA (1 μ g) was totally prevented by preadministration of LY303870 (Figure 6B). Finally, administration of intraarticular CFA after pretreatment with LY303870 induced an increase in PG anabolism (Figure 6C), as was also seen in the spinal cord compression experiments.

Effects of unilateral subcutaneous injection of turpentine (systemic model). Injection of turpentine induced significant edema in the injected hind paw (Figure 1C) and the classic systemic signs of inflammation, i.e., increased body temperature (Figure 1A) and increased serum production of IL-6 (Figure 1B). The fever peaked at hour 8 and persisted until hour 38. Cartilage anabolism in the patellae was significantly decreased 24 hours after injection, both ipsilaterally (by 47%) and contralaterally (by 37%) (both $P < 0.05$ compared with untreated controls). IL-1 β mRNA was expressed in both synovial membranes (ipsilaterally 1.79 AU, contralaterally 1.55 AU; both $P < 0.0001$ compared with untreated controls). Interruption of nerve transmission pathways from the ipsilateral to the contralateral

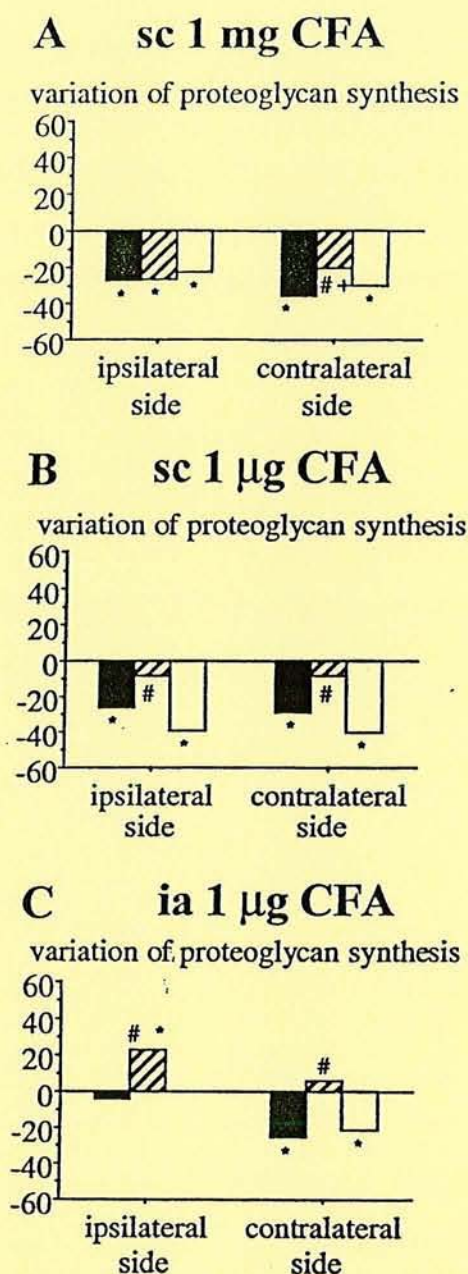


Figure 6. Effect of LY303870, a nonpeptide neurokinin 1 (NK-1) receptor antagonist, on CFA-induced modification of proteoglycan synthesis at hour 24. LY303870 was administered to rats 24 hours and 12 hours before unilateral subcutaneous injection of CFA at 1 mg (**A**) or 1 μ g (**B**) or intraarticular injection of CFA at 1 μ g (**C**). Solid bars = CFA; hatched bars = LY303870 + CFA; open bars = excipient + CFA. Values are the means ($n = 6$ for each experimental condition). * = $P < 0.05$ versus untreated controls; # = $P < 0.05$ versus CFA injection without NK-1 antagonist pretreatment; + = $P < 0.05$, contralateral side versus ipsilateral side). See Figure 1 for definitions.

paw by spinal cord compression changed neither the decrease in PG anabolism induced by prior turpentine injection (ipsilaterally by 44%, contralaterally by 29%; both $P < 0.05$ compared with untreated controls) nor the expression of IL-1 mRNA in synovium (ipsilaterally 1.83 AU, contralaterally 1.69 AU; both $P < 0.0001$ compared with untreated controls).

DISCUSSION

The notion of the involvement of the nervous system in inflammation, called neurogenic inflammation, is widely accepted by researchers and clinicians alike (6,30–32). It is well established that a local inflammation can induce neurogenically mediated effects both near the site of inflammation (such as plasma leakage and edema of the knee [26,33–35]) and distant from it (such as pain [36,37] or the enhancement of the spinal expression of various early genes, including *fos*, *jun*, and *krox-24* [38,39]). However, there has previously been no evidence available to suggest that a local inflammatory process can promote preliminary signs of degeneration at a distance, through the mediation of the nervous system. In this study in rats, we have found that the nervous system is involved in ipsilateral and contralateral joint inflammation induced by a unilateral, suboptimal, nonsystemic dose of a proinflammatory stimulus, that is, a dose low enough to produce inflammation without producing systemic effects as judged by our criteria (elevated body temperature and the production of serum IL-6 [40], a proinflammatory cytokine leading to the production of acute-phase protein [41]).

Unilateral subcutaneous injection of CFA at either of the doses used (1 mg or 1 μ g) led to local inflammation, characterized by edema, and to reduced PG anabolism in both patellae. The effects of the lower dose were nonsystemic, as shown by the absence of a febrile response and of IL-6 production. Since the contralateral PG response was abolished in rats whose spinal cord had been previously compressed, we conclude that the nervous system contributed to the contralateral changes seen in the uninjured rats. Furthermore, with the lower dose of CFA (1 μ g), given subcutaneously, both ipsilateral and contralateral changes implicated the nervous system, since blocking of nervous transmission by spinal cord compression abolished both responses. In contrast, we have found evidence that with CFA injected subcutaneously at a dose of 1 mg, both neurogenic and systemic mechanisms participate in the transmission of the signal for cartilage degeneration, since compression of the spinal cord had

no effect on the changes observed prior to hour 6 but abolished the effects seen after hour 12.

The changes in cartilage anabolism brought about by unilateral intraarticular injection of the smaller dose of CFA were different from those seen after subcutaneous injection: cartilage anabolism in the ipsilateral patella decreased significantly 6 hours after the injection, and a tendency for this effect to be reversed later was noted. Similarly, spinal cord compression abolished the contralateral response to a unilateral 1- μ g intraarticular injection of CFA. At the injected site, the disruption of the nervous system induced an increase of PG anabolism 24 hours later. This result unambiguously demonstrates that the nervous system regulates PG synthesis in the ipsilateral and contralateral articular cartilage.

The contribution of substance P, a well-known mediator of neurogenic inflammation (42), to the degenerative process was studied using 2 different strategies. First, we administered unilateral intraarticular injections of various doses to establish a dose-response relationship. At the highest doses (10 μ g and 20 μ g), PG synthesis was increased in both patellae 24 hours after the injection. This finding is consistent with other reports (43). For our experiments, we chose the dose of 2 μ g, which induced a decrease in patellar PG anabolism in both patellae equivalent to that obtained with CFA injection and with intraarticular IL-1 injection (26). The unilateral intraarticular injection of 2 μ g substance P induced a decrease of PG anabolism in both patellae as early as 6 hours after injection, lasting throughout the 72 hours of observation. In this model, spinal cord compression inhibited contralateral changes and increased ipsilateral patellar PG synthesis 24 hours after the injection. These latter results suggest that substance P is implicated in the transmission of the degenerative signal induced in our experimental models.

In order to confirm the role of NK-1 receptor in CFA models, we administered LY303870, a nonpeptide NK-1 receptor antagonist (19,20), prior to the assays. Under our experimental conditions, PG synthesis results were similar to those obtained with spinal cord compression experiments, confirming the NK-1 dependence in the transmission of modifications to the ipsilateral and, in particular, contralateral cartilage. All of these conclusions were strengthened in studies using turpentine, a known systemic disease model (18,21,44), since we found that in this model, unlike the model with CFA, spinal cord compression had no effect on the decrease in PG synthesis in ipsilateral and contralateral patellae.

The cartilage-degenerative effects of unilateral

CFA injection, characterized by decreased PG anabolism, may be due to the induction of IL-1, among other cytokines. In fact, in each model used in this study, IL-1 mRNA was expressed in synovial membranes, but the expression was abolished after spinal cord compression. Nevertheless, this phenomenon appears complex because the interruption of the nervous signal (paraplegia) can invert some results, probably through the induction of other cytokines such as transforming growth factor β or through the intraarticular production of a high level of neuropeptides, as suggested by the substance P dose-response curve.

All of our results suggest that a unilateral local inflammation can act on articular cartilage from a distance to produce bilateral degeneration that depends on the agent, the dose, and the injection site. Among possible initial processes, this phenomenon depends on neurogenic mechanisms, which have already been shown to have a role in the transmission of pain (45,46) and the formation of edema (47,48). This phenomenon is demonstrated in our study by the spinal cord compression experiments, in which either the response was blocked or its symmetry modified. Moreover, administration of an NK-1 receptor antagonist, LY303870, demonstrated the involvement of substance P, among other neuropeptides, in this phenomenon.

The decrease in patellar cartilage anabolism observed in this study probably resulted from a message transmitted from one knee to the second knee by sensory afferents, as proposed by Levine et al (45). In contrast, the transmission of excitation of peripheral nerve fibers from one paw to the other probably involves *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors at the spinal level (49–51). This hypothesis is supported by the results of a study in which the signal for degenerative changes was eliminated after a preventive daily intrathecal administration of 100 nmoles phencyclidine, a nonpeptide NMDA receptor antagonist, during 5 days (Decaris E et al: manuscript in preparation). In conclusion, we have found that a unilateral local inflammatory stress can provoke bilateral degenerative cartilage damage, as evaluated by a decrease in patellar PG anabolism, and that this degenerative message is transmitted by the nervous system.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge Dr. S. Moussaoui, Rhône Poulenc-Rorer, France, for the generous gift of substance P and for her helpful comments. We are also grateful to Dr. J. M. Stutzmann and his collaborators from Rhône

Poulenc-Rorer for help in the spinal cord compression methodology, and to Dr. V. Fardin, Rhône Poulenc-Rorer for providing the LY303870 (synthesized by Dr. D. Achard, Rhône Poulenc-Rorer). We thank Ms. S. Miller for correcting the English text.

REFERENCES

- Kidd BL, Mapp PI, Blake DR, Polak JM. Neurogenic influences in arthritis. *Ann Rheum Dis* 1990;49:649-52.
- Thompson M, Bywaters EGL. Unilateral rheumatoid arthritis following hemiplegia. *Ann Rheum Dis* 1962;21:370-7.
- Segal R, Avrahami E, Lebdinski E, Habut B, Leibovitz A, Gil I, et al. The impact of hemiparalysis on the expression of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:2249-56.
- Glick EN. Asymmetrical rheumatoid arthritis after poliomyelitis. *BMJ* 1967;3:26-9.
- Matucci-Cerinic M, McCarthy G, Lombardi A, Pignone A, Partsch G. Neurogenic influences in arthritis: potential modification by capsaicin. *J Rheumatol* 1995;22:1447-9.
- Matucci-Cerinic M, Kontinen Y, Generini S, Cutolo M. Neuropeptides and steroid hormones in arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1998;10:220-35.
- Singh VK. Neuropeptides as native immune modulators. *Prog Drug Res* 1995;45:9-15.
- Turnbull AV, Pitossi FJ, Lebrun J-J, Lee S, Meltzer JC, Nance DM, et al. Inhibition of tumor necrosis factor- α action within the CNS markedly reduces the plasma adrenocorticotropin response to peripheral local inflammation in rats. *J Neurosci* 1997;17:3262-73.
- Bileviciute I, Lundeberg T, Ekholm A, Theodorsson E. Bilateral changes of substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide- and neuropeptide Y-like immunoreactivity in rat knee joint synovial fluid during acute monoarthritis. *Neurosci Lett* 1993;153:37-40.
- Ahmed M, Bjurholm A, Schultzberg M, Theodorsson E, Kriebel A. Increased levels of substance P and calcitonin gene-related peptide in rat adjuvant arthritis: a combined immunohistochemical and radioimmunoassay analysis. *Arthritis Rheum* 1995;38:699-709.
- Amann R, Sirinathsinghji DJS, Donnerer J, Liebmann I, Schugoli R. Stimulation by nerve growth factor of neuropeptide synthesis in the adult rat in vivo: bilateral response to unilateral intraplantar injections. *Neurosci Lett* 1996;203:171-4.
- Minami M, Kuraishi Y, Kawamura M, Yamaguchi T, Masu Y, Nakanishi S, et al. Enhancement of preprotachykinin A gene expression by adjuvant-induced inflammation in the rat spinal cord: possible involvement of substance P-containing spinal neurons in nociception. *Neurosci Lett* 1989;98:105-10.
- Mapp PI, Terenghi G, Walsh DA, Chen ST, Cruwys SC, Garrett N, et al. Monoarthritis in the rat knee induces bilateral and time-dependent changes in substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord. *Neuroscience* 1993;57:1091-6.
- Leslie TA, Emson PC, Dowd PM, Woolf CJ. Nerve growth factor contributes to the up-regulation of growth-associated protein 43 and preprotachykinin A messenger RNAs in primary sensory neurons following peripheral inflammation. *Neuroscience* 1995;67:753-61.
- Berthelot JM, Glemarec J, Guillot P, Maugars Y, Prost A. Algodynia (reflex sympathetic dystrophy syndrome) and causalgia: novel concepts regarding the nosology, pathophysiology, and pathogenesis of complex regional pain syndromes: is the sympathetic hyperactivity hypothesis wrong? *Rev Rhum Engl Ed* 1997;64:481-91.
- Dayer J-M, Burger D. Interleukin-1, tumor necrosis factor and their specific inhibitors. *Eur Cytokine Netw* 1994;5:563-71.
- Arend WP, Dayer J-M. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor α in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;38:151-60.
- Geisterfer M, Richards C, Baumann M, Fey G, Gwynne D, Gauldie J. Regulation of IL-6 and the hepatic IL-6 receptor in acute inflammation in vivo. *Cytokine* 1993;5:1-7.
- Gitter BD, Burns RF, Howbert JJ, Waters DC, Threlkeld PG, Cox LM, et al. Pharmacological characterization of LY303870: a novel, potent and selective nonpeptide substance P (neurokinin-1) receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:737-44.
- Radhakrishnan V, Iyengar S, Henry JL. The nonpeptide NK-1 receptor antagonists LY303870 and LY306740 block the responses of spinal horn neurons to substance P and to peripheral noxious stimuli. *Neuroscience* 1998;83:1251-60.
- Cooper AL, Brouwer S, Turnbull AV, Luheshi GN, Hopkins SJ, Kunkel SL, et al. Tumor necrosis factor- α and fever after peripheral inflammation in the rat. *Am J Physiol* 1994;267:R1431-6.
- Luheshi GN, Strefferl A, Turnbull AV, Dascombe MJ, Brouwer S, Hopkins SJ, et al. Febrile response to tissue inflammation involves both peripheral and brain IL-1 and TNF- α in the rat. *Am J Physiol* 1997;272:R862-8.
- Khan M, Griebel R. Acute spinal cord injury in the rat: comparison of three experimental techniques. *Can J Neurol Sci* 1983;10:161-5.
- Kozak W, Conn CA, Kluger MJ. Lipopolysaccharide induces fever and depressed locomotor activity in unrestrained mice. *Am J Physiol* 1994;266:R125-35.
- Guingamp C, Gegout-Pottie P, Philippe L, Terlain B, Netter P, Gillet P. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum* 1997;40:1670-9.
- Gegout P, Gillet P, Chevrier D, Guingamp C, Terlain B, Netter P. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. *Life Sci* 1994;55:PL321-6.
- Philippe L, Gegout-Pottie P, Guingamp C, Bordji K, Terlain B, Netter P, et al. Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. *Am J Physiol* 1997;273:R1550-6.
- Van den Berg WB, Kruisjes MWM, van de Putte LBA. The mouse patella assay. *Rheumatol Int* 1982;1:165-9.
- Khiri H, Reynier P, Peyrol N, Leriche B, Torresani J, Plannet R. Quantitative multistandard RT-PCR assay using interspecies polymorphism. *Mol Cell Probes* 1996;10:201-11.
- Louis SM, Russell NJW, Jamieson A, Dockray GJ. The role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP) in neurogenic inflammatory responses in the rat. *Regul Pept* 1988;22:416.
- Louis SM, Johnstone D, Millest AJ, Russell NJW, Dockray GJ. Immunization with calcitonin gene-related peptide reduces the inflammatory response to adjuvant arthritis in the rat. *Neuroscience* 1990;39:727-31.
- Oaklander AL, Romans K, Horasek S, Stocks A, Hauer P, Meyer RA. Unilateral postherpetic neuralgia is associated with bilateral sensory neuron damage. *Ann Neurol* 1998;44:789-95.
- Bowden JJ, Garland AM, Balik P, Lefevre P, Grady EF, Vigna SR, et al. Direct observation of substance P-induced internalization of neurokinin 1 (NK1) receptors at sites of inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:8964-8.
- Jansco N, Jansco-Gabor A, Szolcsanyi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol* 1967;31:138-51.
- Scott DT, Lam FY, Ferrell WR. Acute inflammation enhances substance P-induced plasma protein extravasation in the rat knee joint. *Regul Pept* 1992;39:227-35.

36. Lombard MC, Weil-Fugazza J, Ries C, Allard M. Unilateral joint inflammation induces bilateral and time-dependent changes in neuropeptide FF binding in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord: implication of supraspinal descending systems. *Brain Res* 1999;816:598-608.
37. Grubb BD. Peripheral and central mechanisms of pain. *Br J Anaesth* 1998;81:8-11.
38. Lanteri-Minet M, De Pommery J, Herdegen T, Weil-Fugazza J, Bravo R, Menerey D. Differential time course and spatial expression of Fos, Jun and Krox-24 proteins in spinal cord of rats undergoing subacute or chronic somatic inflammation. *J Comp Neurol* 1993;333:223-35.
39. Buritova J, Honore P, Besson JM. Ketoprofen produces profound inhibition of spinal c-Fos protein expression resulting from an inflammatory stimulus but not from noxious heat. *Pain* 1996;67:379-89.
40. Lennie TA, McCarthy DO, Keesey RE. Body energy status and the metabolic response to acute inflammation. *Am J Physiol* 1995;269:R1024-31.
41. Lewis EJ, Bishop J, Aspinall SJ. A simple inflammation model that distinguishes between the actions of anti-inflammatory and anti-rheumatic drugs. *Inflamm Res* 1998;47:26-35.
42. Laduron P. L'inflammation neurogénique. In: Russo-Marie F, Peltier A, Polla BS, Libbey J, editors. *L'inflammation* Paris: 1998. p. 172-85.
43. O'Byrne EM, Blancuzzi V, Wilson DE, Wong M, Jeng AY. Elevated substance P and accelerated cartilage degradation in rabbit knees injected with interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Arthritis Rheum* 1990;33:1023-8.
44. Ma QP, Woolf CJ. Basal and touch-evoked fos-like immunoreactivity during experimental inflammation in the rat. *Pain* 1996;67:307-16.
45. Levine JD, Dardick AJ, Roizen MF, Helms C, Basbaum AI. Contribution of sensory afferents and sympathetic efferents to joint injury in experimental arthritis. *J Neurosci* 1986;6:3423-9.
46. Aanonsen LM, Wilcox GL. Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and sigma agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;243:9-19.
47. Liu H, Manthly PW, Basbaum AI. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. *Nature* 1997;386:721-4.
48. Liu X, André D, Puizillout J-J. Substance P post-synaptically potentiates glutamate-induced currents in dorsal vagal neurons. *Brain Res* 1998;804:95-104.
49. Schaible HG, Grubb BD. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain* 1993;55:5-54.
50. Kontinen YT, Kemppinen P, Segerberg M, Hukkanen M, Rees R, Santavirta S, et al. Peripheral and spinal neural mechanisms in arthritis, with particular reference to treatment of inflammation and pain. *Arthritis Rheum* 1994;37:965-82.
51. Bileviciute I, Stenfors C, Theodorsson E, Lundberg T. Unilateral injection of calcitonin gene-related peptide (CGRP) induces bilateral edema formation and release of CGRP-like immunoreactivity in the rat hindpaw. *Br J Pharmacol* 1998;125:1304-12.

Commentary

Biotelemetry: an original approach to experimental models of inflammation

P. Gegout-Pottie, L. Philippe, M.-A. Simonin, C. Guingamp, P. Gillet, P. Netter and B. Terlain

UMR 7561, CNRS – Université Nancy I, Faculté de Médecine, Avenue de la Forêt de Haye, BP 184, F-54505 Vandœuvre Les Nancy, France,
Fax +33 3 83 59 26 21, e-mail: netter@facmed.u-nancy.fr

Received 13 March 1998; returned for revision 26 June 1998; returned for final revision 24 August 1998; accepted by R. Day 23 October 1998

Abstract. Biotelemetry is a new biological technology which evaluates continuous spontaneous locomotor activity and body temperature in rodents. The telemetry system comprises a transmitter implanted in the peritoneal cavity of the rodent, and a receiver placed beneath the animal's cage. The receiver detects the radio waves and the activity of the rodents as counts which are registered in the computer system, and the adapter detects the calibrated body temperature. First, we showed that biotelemetric studies of different species (rats, guinea pigs, mice and gerbils) provide substantial information about their circadian rhythms. Second, using the most common examples employed in pharmacology of inflammation (hyperthermia, arthritis, ischemia-reperfusion and so on) biotelemetry has helped us to clarify the pathophysiological significance of the parameters of temperature and mobility in several experimental models in rodents.

Key words: Temperature – Locomotor activity – Rodents – Inflammation

Introduction

Although the pharmacological targets of inflammation are multiple (cyclooxygenases [1], cytokines [2] and their inhibitors [3] or their antagonists [4, 5], neuropeptides [6], cytoplasmic and membrane receptors [7], transduction signals [8], enzymatic systems regulating tissue integrity [9], etc.), *in vivo* pharmacological studies to establish the validity of these targets are still for the most part the classic ones, as regards both experimental models and the parameters used [10]. Continuous quantitative monitoring of spontaneous

locomotor activity and body temperature by biotelemetry is a new concept which complements the standard approaches [11], considerably enriching information derived from assessment of paw edema, arthritic or histological scores and so on.

With this in mind, the newly developed telemetry system, using implanted transmitters, provides a unique opportunity to study body temperature and spontaneous locomotor activity in freely moving conscious rodents over variable periods [12]. Such an original approach makes it possible to evaluate the effects of painful, inflammatory, degenerative, or immune dysfunction processes on the joint function on the one hand, and thermoregulation of the animals studied, particularly in rats and mice, without the stress of handling on the other.

Telemetry thus mimics a clinical approach and changes in physical activity and/or central temperature could be considered as quality-of-life (QOL) measures: it is a fact that measurements of walking time have been an integral part of the clinical assessment of arthritis [14] and algofunctional indexes. Furthermore, biotelemetry takes into account, in a quantitative way, key-indexes widely used for measurements of QOL in rheumatology, e.g. mobility, functionality, pain (influence of drugs) and inflammation (fever) without the influence of handling animals.

In addition, this pharmacological approach allows us to investigate kinetics and duration of effect in acute or in chronic inflammatory phases. The efficacy of new presumed antirheumatic drugs and their influence on degenerative joint process can be evaluated by the assessment of locomotor handicap, joint pain [13] and febrile response in rats. Finally, by coupling simultaneously the study of loss of mobility due to pain (neurogenic transmission, and/or inflammation, and/or dysfunction) and the febrile response inherent to the inflammatory response, biotelemetry may allow us to discriminate articular pain from joint inflammation. For example, intra-articular injection of zymosan or carrageenan induces a febrile response and loss of mobility due to acute synovitis, whereas iodoacetate injected similarly causes an apyretic loss of mobility, due to a pure joint pain, without histological signs of synovial inflammation.

Supported by grants from Region Lorraine, Communauté Urbaine du Grand Nancy, Fondation Lorraine pour la Recherche Médicale and Association pour la Recherche contre le Cancer.

Correspondence to: P. Netter

Description of the telemetry system

The telemetry system comprises a transmitter implanted in the peritoneal cavity of the rodent, and a receiver placed beneath the animal's cage. The transmitters consist of sensors or lead wires connected to electronic amplifiers. The amplified signal is used to modulate radio frequency waves which radiate from the animal. The receiver detects the radio waves and reconstructs the original amplified signal. The signals from the transmitter, which include the body temperature and locomotor activity of the animals, are relayed by a consolidation matrix (BCM100 consolidation matrix multiplexes the data from 8 receivers) into a peripheral processor connected to a personal computer (Fig. 1).

The transmitter (model VM-HF disc, Mini-Mitter or model TA10TA-F20 Data Sciences International) implanted in the animal weighs respectively 4.5 and 3.8 grams and has a diameter of 1.8 and 1.75 cm. The receiver (Physiotel Receiver, model RLA 1020, Data Sciences International) detects the radio waves and the activity of the rodents as counts which are registered in the computer system, and the adapter detects the calibrated body temperature. Unlike body temperature, the activity counts are not calibrated, but all the receivers have the same sensitivity. All transmitters work on the same wavelength, and animals are therefore housed singly.

Other configurations are possible, depending on the organ system being studied (mainly cardiovascular and neurological), the parameter being measured (such as heart rate, arterial blood pressure, ECG, EEG, or thirst), and the size of the animals. In the configuration used for the study of models of inflammation in rodents, the frequency of each transmitter, which varies with the ambient temperature, is converted into central temperature according to a conversion algorithm. Each animal's mobility is evaluated by the number of impulses per unit time, each impulse being generated by the animal's movement relative to the antenna beneath its cage. In addition, especially in hamsters, joint function can be evaluated in other ways, such as by measuring the distance it runs per day in its exercise wheel, and the wheel's mean speed [14, 15].

Experimental procedures

In order to create conditions as nearly physiological as possible for telemetry and to avoid causing stress to the animal a thermoregulated room is necessary (22°C–23°C), with 12D:12L cycle (lights on from 06:00–18:00) [16]. Animals have free access to water and standard laboratory food to avoid the influence of anorexic behaviour on locomotor activity [17]. The experiment (particularly for studies of the acute phase of inflammation) must be planned so that the beginning of the dark period (corresponding to the beginning of the animal's nocturnal activity) coincides with the pharmacological effect being observed.

The experimental plan has 3 stages after calibration of the transmitters for the study of rodents' temperature (37–40°C).

1. The rodents are anaesthetized intraperitoneally with mixture of ketamine hydrochloride (50 mg/kg) and acepromazine (1.25 mg/kg). Hair is removed from the abdominal area and the rodents are surgically operated on under sterile conditions; the peritoneal cavity is opened by incisions of the skin and the muscle layers. The sterilized transmitters are implanted and the skin and muscles layer closed with non resorbable silk sutures.
2. The rodents are housed in individual plastic cages that are kept on the receiver plates. After the operation, animals are allowed at least 5–6 days for recovery prior to the experimental study where motor activity and body temperature are continuously assessed at different intervals.
3. The experimental phase consists of measures of locomotor activity and body temperature in rodents under various conditions.

The parameters and animals studied

Biotelemetric studies of different species (rats, guinea pigs, mice and gerbils) provide substantial information about their circadian rhythms. First, a normal rat's activity and temperature vary considerably between day-time [18] [period of

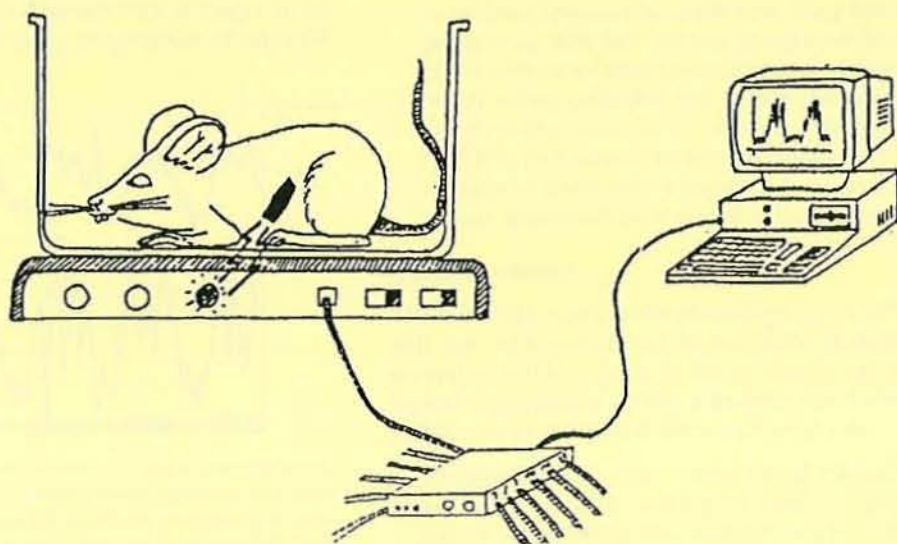


Fig. 1. Organization of a telemetry unit; a transmitter is implanted intraperitoneally in the rat and a receiver is placed beneath the rat's cage. Data (12 cages) are transmitted to a matrix and fed into a personal computer and then integrated with purpose made software.

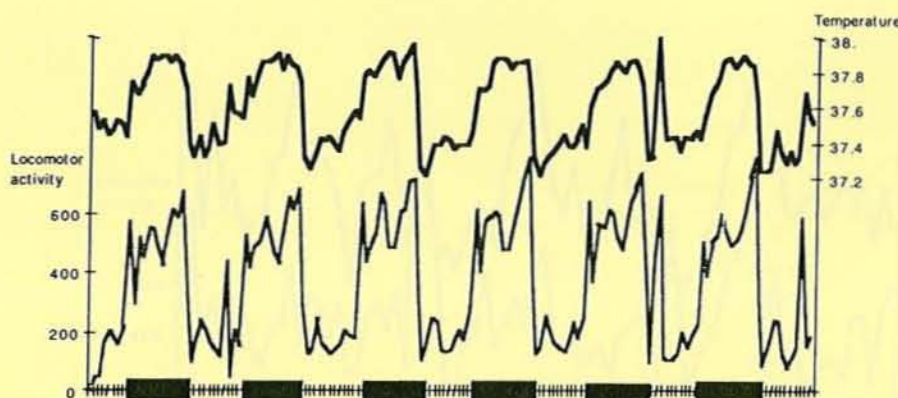


Fig. 2. Normal circadian variation of body temperature ($^{\circ}\text{C}$) and locomotor activity (counts/hour) in Wistar rats (180 g, Charles River Laboratories). Each point is the mean of 2 observations of 40 conscious rats. For the sake of clarity, standard deviations have not been depicted. Dark bars represent light off period (5:30 p.m. – 5:30 a.m.). Light on 5:30 a.m. – 5:30 p.m.

light: low activity and normal temperature, about $37\text{--}37.2^{\circ}\text{C}$] and night-time [period of darkness: high activity and high temperature, about $37.8\text{--}38^{\circ}\text{C}$]. The day-time temperature is usually 1°C lower than the nocturnal temperature, reflecting the rat's widely recognised circadian rhythm (Fig. 2). This regular diurnal cycle is reached from the fourth day after surgical transmitter implantation and this period of recuperation should therefore always be instituted before the experiment is started.

The rat's environment is also important, as simply changing the litter temporarily modifies the rat's spontaneous mobility, especially during the day-time loss of mobility phase which represents the 'exploratory phase'. This phenomenon, which is well known in psychopharmacology [19, 20], lasts about 45 min and provokes hypermobility, which is accompanied by stress and a transitory rise in temperature. The same thing happens when the animals themselves or their neighbors are handled in any way (during force-feeding, weighing, or parenteral injections for example), which may necessitate conditioning of the animals during the acclimatization stage.

Mice are also nocturnal animals (Fig. 3) and show some diurnal variation in activity and temperature. While the rat's diurnal cycle is strictly defined and stops immediately with the light, the period of mice's hyperactivity is longer in our experimental conditions. The body temperature of mice fol-

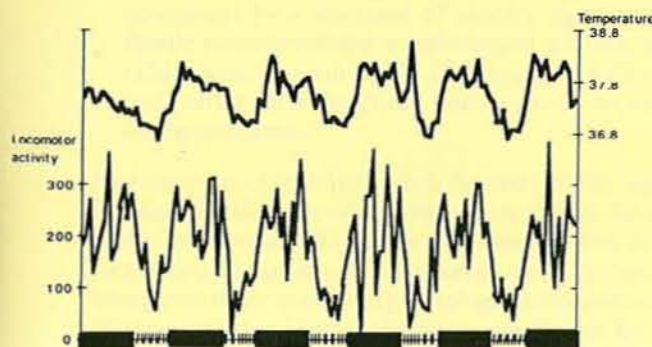


Fig. 3. Normal rhythm in body temperature ($^{\circ}\text{C}$) and locomotor activity (counts/hour) in CD1 mice (20 g, Charles River, Laboratories). Each point is the mean of 2 observations of 8 conscious mice during 6 days. For the sake of clarity, standard deviations have not been depicted. Dark bars represent light-off period (5:30 p.m. – 5:30 a.m.). Light-on 5:30 a.m. – 5:30 p.m.

lowed the same pattern with the same quantitative variations (37°C during the light period and 38°C during darkness).

On the other hand, the study of locomotor activity and temperature in gerbils (Fig. 4) and guinea pigs (Fig. 5) demonstrates that any circadian rhythm is obvious. Locomotor activity is highly irregular and sometimes shows large variations. Normal temperatures in guinea pigs are higher and vary between 39°C and 39.8°C , therefore temperature of gerbils are similar to the temperature of rats. These significant variations in temperature and activity, along with the absence of a diurnal cycle in gerbils and guinea pigs, make their biotelemetric studies more difficult to interpret.

Analysis of results

To quantify the biotelemetric changes, as well as the influence of drugs, data continuously generated by a telemetry system capable of reliably collecting and storing vast amounts of data can be compared with different control values [21]:

- individual control values (collected at the end of the equilibration phase), each animal serving as its own control;
- collective values from a control group of animals subjected to similar experimental conditions. They can also be compared to an 'absolute' control group in order to follow the effect of external phenomena or manipulation stress.
- initial values collected just before the stage of pharmacological treatment (at T0) such as a dose-effect study of NSAIDs, or a kinetic study of an antipyretic effect during an induced fever, which assumes that control and experimental values will be obtained in the same experiment.

Basal parameters

The use of telemetry in the pharmacology of inflammation is still not widespread and is not fully understood. Using several examples, we here try to clarify the pathophysiological significance of the parameters of temperature and mobility in experimental arthropathies in rats.

- Temperature can be measured during the nocturnal or the day-time phase, where different regulation pathways interfere; it is interesting that a NSAID such as indomethacin lowers the nocturnal temperature of a normal rat without significantly changing its day-time temperature.

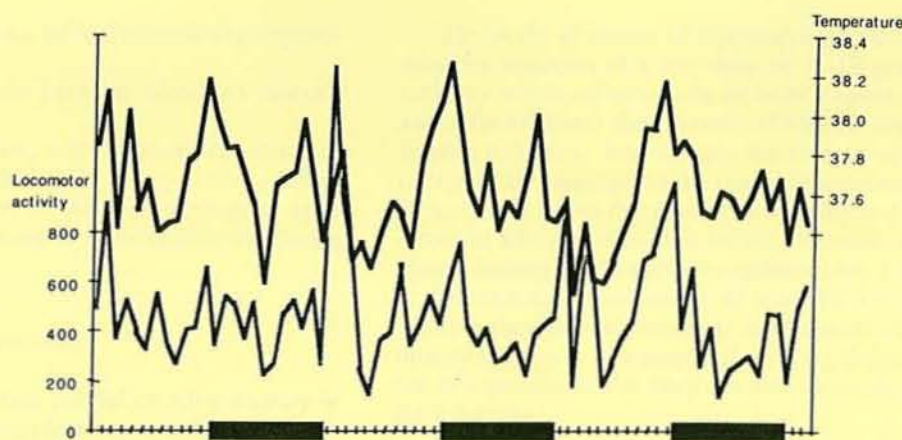


Fig. 4. Normal rhythm in body temperature (°C) and locomotor activity (counts/hours) in gerbils (Rj/MON, 70 g, CERJanvier). Each point is the mean of 10 conscious gerbils during 3 days. For the sake of clarity, standard deviations have not been depicted. Dark bar represents lights off period: 5:30 p.m.–5:30 a.m. Light on 5:30 a.m.–5:30 p.m. No evident circadian rhythm is noticed in gerbils.

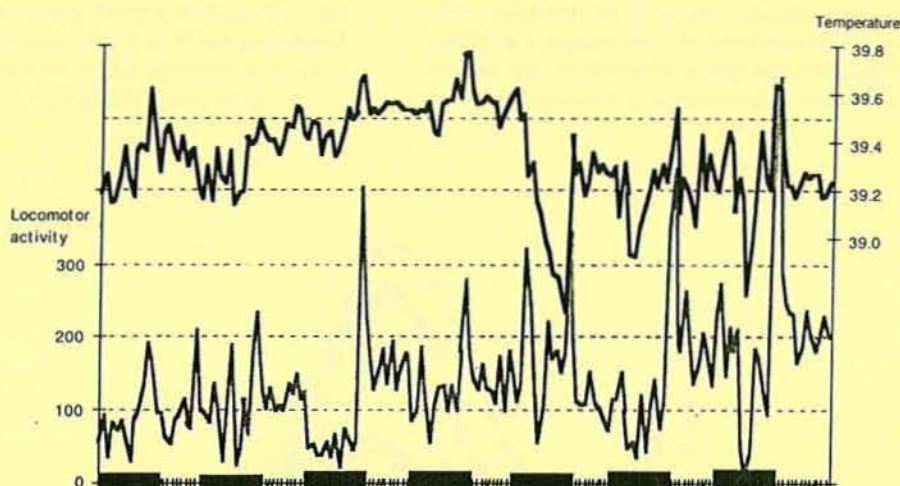


Fig. 5. Normal rhythm in body temperature and locomotor activity in guinea pigs (Hartley, 170 g, Charles River Laboratories). Each point is the mean of 18 conscious guinea pigs during 7 days. For the sake of clarity, standard deviations have not been depicted. Dark bar represents lights off period: 5:30 p.m.–5:30 a.m. Light on 5:30 a.m.–5:30 p.m. Note that guinea pigs' body temperature (39.2°C) is higher than in rats.

– The nocturnal phase (06:00 h–18:00 h) is to some extent characterized by an increase in the rats' temperature related to an increase in mobility. Hyperthermia accompanied by a decrease of activity signifies that the febrile process reflects a pathological process, probably inflammatory or infectious. Conversely, anaesthesia or a toxic effect (of a drug) can lead to severe hypomobility and hypothermia.

Measurement of mobility, which depends greatly upon joint function, is also affected by many other factors that must be taken into account. Thus, the circadian rhythm of the rat means that its spontaneous nocturnal mobility can be only interpreted in the context of physiological locomotor activity. However, its day-time exploratory activity can be used to evaluate the impact of stress. So, biotelemetric studies are dependent on the time of day when experiments are carried out.

Whichever parameter is chosen – spontaneous or provoked mobility – the locomotor activity of the rat can be influenced by various other factors:

- local, articular, periarticular, neurophysiological, or circulatory changes related, for example, to painful, inflammatory, or degenerative processes;
- a systemic reaction, to some extent related to an inflammatory or dysimmune reaction, provoking sleep or drowsiness, fever, cachexia, or stress, such as the general and central effects of the cytokines involved in the inflammatory process [interleukin 1 (IL-1) [22], tumor necrosis factor (TNF) [23], interleukin 6 (IL-6), interferons, etc.];
- pharmacodynamic effects, whether beneficial or harmful, principal or ancillary, of the drugs used (dose-effect relation), which can ameliorate or aggravate hypomobility. Thus whereas an anti-inflammatory drug can ameliorate hypomobility due to arthritis of the knees, a psychotropic drug can affect locomotor function through its sedative [24] or stimulant properties [25, 26].

Interpretation of the results thus requires that many elements be taken into account, including the following:

- the animal studied and the nature of the model used, as well as the pathological process that the model is intended

to reproduce (inflammation, pain, dysimmunity, degenerative joint disease, etc.);

- the degree of concordance between decreased mobility and hyperthermia.
- the route of administration, whether local, for example, intra-articular (knee, ankle, etc.) or systemic (oral or parenteral); and the nature of the pharmacological agent (whether it is pain-producing or inflammation-producing or both).

Nature of the inflammatory response

The animals' response, whether painful or inflammatory or both, varies distinctly with the phlogistic agent used and the injection site. Thus the effect of carrageenan will depend on the site of injection, intraperitoneal, subcutaneous, or intra-articular. The use of pro-inflammatory mediators such as IL-1 (Fig. 6) or TNF could be more complex to analyze. For example in rats, IL-1 has as many central effects [27, 28] (fever, drowsiness, loss of appetite, etc.) as it has peripheral effects (chemotaxis, inflammation at the injection site, etc.) or mixed effects (induction of PGE2 [29], pain, etc.).

The study of routes of administration shows that intra-articular injection of a low dose of IL-1 β provokes hypomobility which reflects more its local articular action (pain and inflammation) than central effects on drowsiness and feeding behaviour. Interestingly, the study of effects of IL-1, continuously administered by intraperitoneal minipump for 7 days, clearly shows that decreased mobility and degenerative effect on articular structures remain, whereas central effects (fever, feeding behaviour) are regulated after 3 days (Fig. 7).

Telemetric measurements of temperature and mobility, whether they are of interest as components of the inflammatory process or as a means of studying drugs, can thus be put into practice under very diverse circumstances, such as the following:

- after injection of a mediator, e.g. a pro-inflammatory cytokine (IL-1 α , IL-1 β , TNF α);
- after injection of a cytokine inducer: endotoxin, Poly IC, muramyl dipeptide, etc;
- after induction of an acute inflammatory process, either local (carrageenan- or zymosan-induced edema) or systemic (by the use of brewer's yeast) and even chronic (Freund's complete adjuvant, subcutaneous or intra-articular).

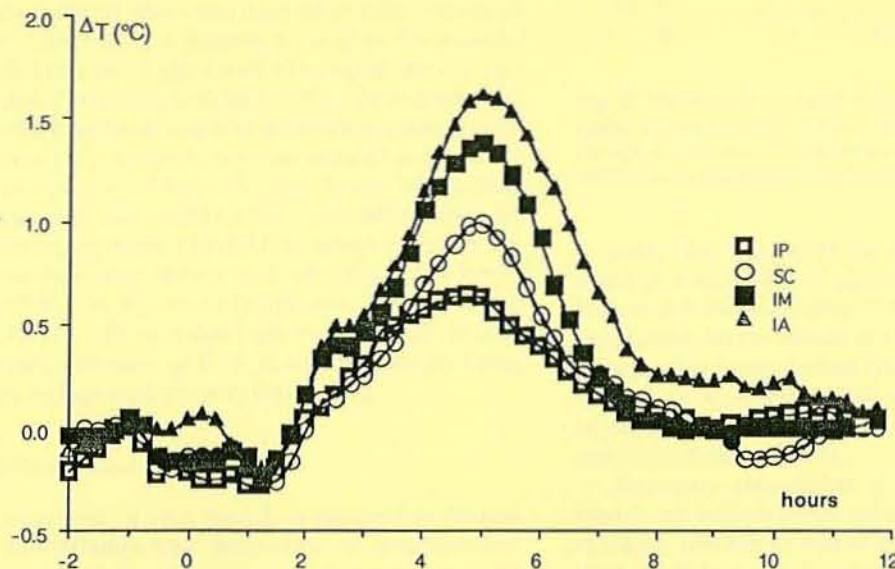


Fig. 6. Kinetic profile of febrile response (nocturnal temperature) after parenteral injections of 500 ng of human recombinant IL-1 β (IP, intraperitoneal; SC, subcutaneous; IM, intramuscular; IA, intra-articular). Values ($n = 6$ rats/group) are recorded each 15' and expressed as differences in body temperature just before the experiment began (personal communication).

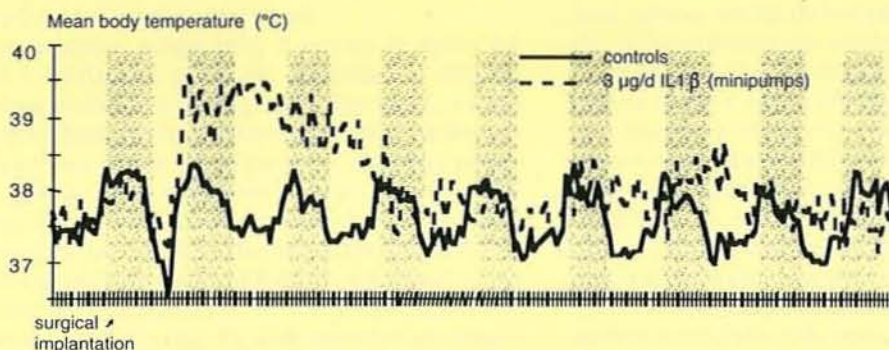


Fig. 7. Effects of continuous administration over 8 days of human recombinant Interleukin-1 β (3.0 μ g/day by Alzet's osmotic minipumps) on body temperature. Grey and white bands represent respectively lights-off and lights-on period. Data are means ($n = 4$ in two groups). A downregulation of fever is present 3 days after IL-1 β perfusion. (*Inflammation Research* 1995; 44: S256).

Telemetry and experimental models of inflammation

In the pharmacology of inflammation, *in vivo* experimentation can help to achieve extremely diverse goals: analysis of the various phases of a model, or verification of mediator effects (e.g. IL-1) or of antagonistic effects [30] with respect to a target and the antagonist's efficacy, or drug effects in a given experimental model. In each case, telemetry provides pertinent information, while permitting at the same time the use of traditional parameters (edema, body weight, arthritic score, etc). This is particularly useful for the study of mediators or the effects of anti-inflammatory drugs (in terms of kinetics and potency), in the classic models such as carrageenan or zymosan-induced edema, hyperthermia induced by brewer's yeast or turpentine, and experimental arthritides like adjuvant or type II collagen induced arthritides among others.

Models of hyperthermia

The use of telemetry in experimental thermoregulation can help to clarify the mechanisms of the febrile reaction, as well as the mediators involved [31], by verification of the effects of various antagonists [32] or of endogenous feedback [33, 34]. Thus a drug's kinetics, duration of effect, maximum effect, area under the (effects) curve, and dose-effect relations can all be evaluated. This makes it possible to analyse the animals' response both to the particular action of an agent and as a function of the site of injection, without handling the animals [35], which is not the case for example of measuring repeated colonic temperature [36]. A febrile reaction induced in the rat by subcutaneous injection of brewer's yeast is one of the most widely used models: this model makes it possible to study the effects of increasing doses of NSAIDs, which increases the C_{max} in a dose-dependent fashion and with longer and longer duration of effect. The injection of turpentine oil into rodents, as well as LPS [37, 38], provokes high fever, possibly in relation to its potent induction of IL-6, this effect possibly being modulated by endogenous glucocorticoids [39].

Models of inflammation

The use of numerous *in vivo* models is required to demonstrate the anti-inflammatory properties of antirheumatic drugs, particularly if the action on a precise target is to be verified. Thus for example, in a model of inflammation induced by IL-1, the drug effect can be verified in that model, as its predictive value regarding a particular disease process has previously been established, e.g. carrageenan-induced edema and adjuvant-induced arthritis, etc.

During carrageenan edema [40], it is easy to detect the influence of a NSAID on phlogistic response and simultaneously on fever, both being prostaglandin-dependent parameters. On the other hand, study of the arthritic score in adjuvant-induced polyarthritis allows identification of a primary phase, corresponding to the acute inflammatory phase, which can be crudely distinguished from an immunological phase, considered to be secondary. Telemetric monitoring of the rodents for 30 days leads to improved definition of the different phases of the arthritic process [41]. Inspection of the temperature and mobility curves reveals 4 phases (Fig. 8), with quite distinct characteristics of fever and handicap: the local acute inflammatory

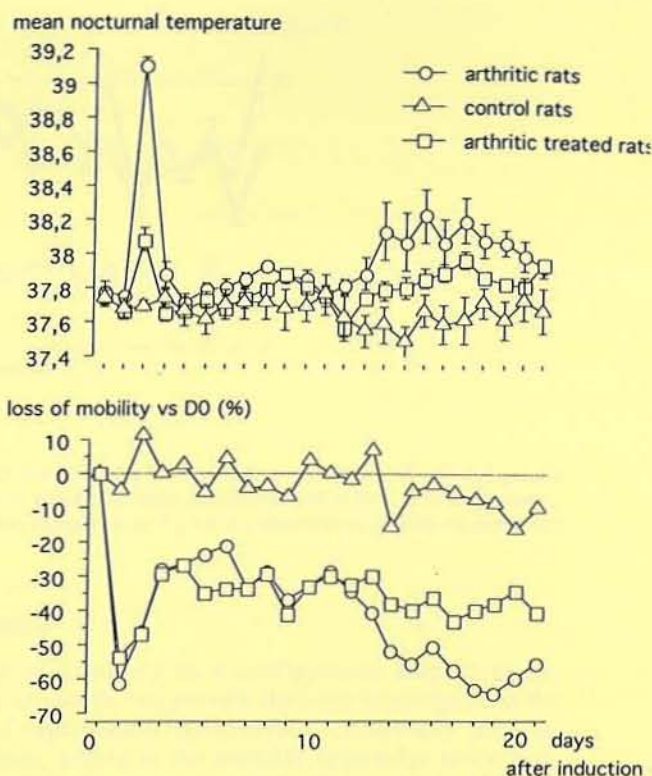


Fig. 8. Variation of nocturnal body temperature and locomotor activity during adjuvant arthritis in Lewis rats; data are means $\pm$ SE ($n = 6$). Note the biphasic response of both parameters and the beneficial effect ($p < 0.05$, ANOVA) of nimesulide (5 mg/kg/day given orally from D0 to D21).

response (day 1 to day 3), the silent phase (day 4 to day 9), the systemic immunological phase (day 10 to day 13) and the established arthritic phase (day 14 to day 28). In this way, telemetry can distinguish the effects of drugs and other factors on these phases, other issues such as drug dosage, mode of delivery and timing of administration, and whether the drug has preventive or curative properties, either on febrile response or loss of mobility can be evaluated.

Telemetry also makes it possible to use experimental models of inflammation other than the classic ones – for example, models in which inflammation is induced in the joint itself (e.g. IL-1, carrageenan, zymosan, turpentine), with obvious physiopathological significance for inflammatory or even degenerative arthritides. The contribution of telemetry in this circumstance is all the greater if the usual parameters in these models are limited to measurements of knee edema, which do not provide much information about the various phenomena involved.

NSAIDs and paracetamol, both powerful antipyretics, are known to have very different anti-inflammatory properties and telemetry clearly confirms this difference. After injection of IL-1 in rats, NSAIDs (such as ketoprofen) diminish both IL-1-dependent locomotor handicap and IL-1 induced fever, and the effects are dose-dependent. In contrast, paracetamol exerts mainly antipyretic properties. This drug exerts only a modest effect on the handicap, and only at the highest subtoxic dose (300 mg/kg/d given orally) – so high as to be useless in predicting the actual benefits of using paracetamol as an anti-inflammatory drug.

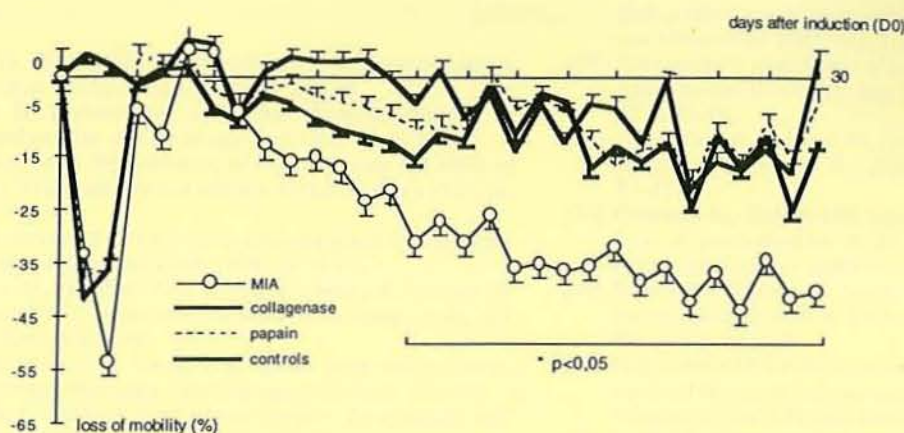


Fig. 9. Effects of intra-articular injection (day 0) in both knees of monoiodoacetate (MIA 0.3 mg/50 μ l), collagenase (3 mg/50 μ l) and papain (1 mg/50 μ l) versus saline (controls; 50 μ l) on spontaneous nocturnal activity in normal Wistar rats. Data are means $\pm$ SEM ($n = 12$ in each group). Statistical significance of differences from the control group as determined by ANOVA comparisons; * $p < 0.05$. Note that no febrile response was detected throughout the experiment.

Model of osteoarthritis

Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease in which the articular cartilage is progressively remodelled (narrowing of the joint space, subchondral cysts) and affected joints undergo cicatricial remodelling (condensation of subchondral bone and osteophytosis). In humans, OA comprises an initial, silent phase, followed by a symptomatic phase that proceeds to handicap and pain. Telemetry is also very powerful in experimental models of OA, particularly for identifying the chronology of the appearance of such handicap.

Among the various experimental models of OA applicable to rats, it is well established that injection of iodoacetate into rats' knees provokes a rapid joint disease with many histological and biochemical similarities to OA [42]. Biotelemetric study of the animals (Fig. 9) shows a transitory primary loss of mobility related to the pain secondary to intra-articular injection, followed by a gradually appearing handicap that mimics osteoarthritic joint disease (pain and loss of function) [43]. This process is purely degenerative, because no hyperthermia appears during the OA course, suggesting an absence of local or systemic inflammatory reaction. Other models, like papain-, or collagenase-induced OA in rats (Fig. 9), as well as anterior cruciate ligament section do not provoke a similar secondary loss of mobility under our experimental conditions.

Model of ischemia reperfusion

In the model in which the rat's hind paw undergoes local hypoxia and is then reperfused, many mediators can be generated, such as free radicals, cytokines, nitric oxide and adhesion molecule receptors [44]. The model can be produced by applying a tourniquet to the knee or the ankle and releasing it after 1 to 3 h. A telemetric study of the animals during the ischemic and reperfusion phases reveals an initial stress-induced hyperthermia and transitory hypermobility (inherent to pain), followed by a hypoactive phase, the degree of which is relative to the duration of the hypoxia. Study of analgesic or anti-inflammatory drugs under these conditions may provide substantial evidence about their therapeutic potential.

Conclusion

The use of telemetry in a configuration adapted to experimental models can provide the basis for progress in the study of experimental inflammation, particularly joint inflammation, adding to the available knowledge about anti-inflammatory drugs and new molecules with new pharmacological targets. Biotelemetry will make finer monitoring of the pathophysiological mechanisms that contribute to the inflammatory and degenerative reactions, e.g. with knock-out models in mice [45] or transgenic animals, providing continuous data about both central and peripheral functions. Studies of animal locomotion [46] will also greatly contribute to classical pharmacology [47] and toxicology [48], and is a unique tool in assessing experimental models of articular pain (inflammatory and/or degenerative), as well as neurological diseases, such as experimental auto-immune encephalomyelitis (in which telemetry detects transient acute hypomobilities and remnant phenomena) in a more comprehensive and seemingly clinically relevant way.

Implantable telemetry compared to the conventional methods, has a number of advantages such as elimination of stress from tethers, handling, restraint and human contact, as well as elimination of the influence of disturbed emotional state and sleep. Furthermore, maintenance is not required once telemetry devices are implanted. The method allows for automated continuous monitoring for days, weeks, or months. Measurements are free from the effect of anesthesia and data obtained by telemetry do not contain 'cable' or 'commutator' artifacts common in tether systems.

Our studies revealed that rats and mice are the most useful for biotelemetric monitoring especially due to their regular circadian rhythm. Furthermore, biotelemetry enhances the value of *in vivo* experimentation by allowing minimal constraints of the animals being studied and more ethical and rational use of the animals studied. Finally, the technique has rich potential, as regards both the technology itself and the experimental model in which it is used, permitting new pharmacological and pathophysiological concepts to be addressed and explored.

References

- [1] Bahkle YS, Botting RM. Cyclooxygenase 2 and its regulation in inflammation. *Mediat Inflamm* 1996; 5: 305-23.
- [2] Feldman M, Brennan FM, Maini RM. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 397-400.
- [3] Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effect of IL-1 and TNF α in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 151-60.
- [4] Debets R, Savelkoul HFJ. Cytokine antagonists and their potential therapeutic use. *Immunol Today* 1994; 15: 455-8.
- [5] McKinnon M, Proudfoot AEI, Wells TNC, Solary R. Strategy for the discovery of cytokine receptor antagonists. *Drugs, News and Perspect* 1996; 9: 389-98.
- [6] Scott DG, Lam FY, Ferrel WR. Acute joint inflammation. Mechanism and Mediators. *Gen Pharmacol* 1994; 25: 1285-96.
- [7] Rose John S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors. *Biochem J* 1994; 300: 281-90.
- [8] Bankers Fullright JL, Kalli KR, McKean DJ. IL-1 signal transduction. *Life Sci* 1996; 59: 61-83.
- [9] Poole AR, Alini M, Hollander AP. Cellular biology of cartilage degradation. In: Mechanism and models in rheumatoid arthritis, Henderson, Edwards and Pettipher, editors. Academic Press, 1995: 163-204.
- [10] Otterness IG, Bliven ML. Laboratory models for testing non-steroidal anti-inflammatory drugs. In: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Lombardino Ed, 1985: 112-252.
- [11] Mukherje A, Hale VG, Borga O, Stein R. Predictability of the clinical potency of NSAIDs from the preclinical pharmacodynamics in rats. *Inflamm Res* 1996; 45: 531-40.
- [12] Scales W, Kluger MJ. Effect of antipyretic drugs on circadian rhythm in body temperature of rats. *Am J Physiol* 1987; R306-13.
- [13] Seymour PA, Larson DL, Browne RG. The effect of piroxicam on locomotor activity in rats with adjuvant arthritis. *Drug Dev Res* 1986; 7: 165-72.
- [14] Bliven ML, Eskra JD, Otterness IG. Limitation of activity in an acute model of arthritis; effect of drug treatment. *Inflamm Res* 1997; 6: 491-5.
- [15] Ebihara S, Mano N, Kuroki N, Komuro G, Yoshimura T. Vitamin B12 affects non-photic entrainment of circadian locomotor activity rhythms in mice. *Brain Res* 1996; 727: 31-9.
- [16] Russel JC, Epling WF. Light-induced suppression of the rat circadian system. *Am J Physiol* 1995; 268: R1111-6.
- [17] Russel JC, Epling WF, Pierce D, Amy RM, Boer DP. Induction of prolonged running by rats. *Am J Physiol* 1987; 63: 2549-53.
- [18] Bauer MS. Irradiance responsiveness and unequivocal type I phase responsiveness of rat circadian activity rhythms. *Am J Physiol* 1992; 263: R1110-4.
- [19] Sandi C, Venero C, Guaza C. Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats. *Eur J Neurosci* 1996; 8: 794-800.
- [20] Jackson HC, Nutt DJ. Effects of benzodiazepine receptor inverse antagonists on locomotor activity and exploration in mice. *Eur J Pharmacol* 1992; 21: 199-203.
- [21] Terlain B, Planche M, Gillet P, Drelon E, Gegout P, Chevrier D, et al. Méthodes téléométriques et modèles expérimentaux. In: Actualités en Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires. 3rd ed. Paris: Masson, 1993: 49-53.
- [22] Opp MR, Obal F, Krueger JM. IL-1 alters rat sleep: temporal and dose related effects. *Am J Physiol* 1991; 260: R52-8.
- [23] Kapas L, Hong L, Cady AB, Opp MR, Postlewaite AE, Seyer JM, et al. Somnogenic, pyrogenic and anorectic activities of TNF- α and TNF- α fragments. *Am J Physiol* 1992; 263: R708-15.
- [24] Ferguson SA, Paule MG. Effect of chlorpromazine and diazepam on time-estimation behaviour and motivation in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 53: 115-22.
- [25] Peal SM, Glick SD. Prolonged antagonism of morphine-induced locomotor stimulation by kappa-opioid agonists: enhancements by prior morphine exposure. *Neurosci Lett* 1996; 212: 5-8.
- [26] Gillies DM, Mylecharane EJ, Jackson DM. Effect of 5HT3 receptor selective agents on locomotor activity in rats following injection into the nucleus accumbens and the ventral tegmental area. *Eur J Pharmacol* 1996; 303: 1-12.
- [27] Shimomura Y, et al. Effect of peripheral administration of recombinant human IL-1 on feeding behavior in the rat. *Life Sci* 1990; 47: 2185-92.
- [28] Dascombe MJ, Rothwell NJ, Sagay BO, Stock MJ. Pyrogenic and thermogenic effects of IL-1 β in the rat. *Am J Physiol* 1989; 256: E7-11.
- [29] Otterness IG, Golden HW, Seymour PA, Eskra JD, Daumy GO. Role of prostaglandins in the behavioral changes induced by murine interleukin-1-alpha in the rat. *Cytokine* 1991; 3: 333-8.
- [30] Bluthé RM, Dantzer R, Welley KW. IL-1-mediated behavioural but not metabolic effects of tumor necrosis factor α in mice. *Eur J Pharmacol* 1991; 281-3.
- [31] Feng J, Price M, Cohen J, Satinof E. Prostaglandin fevers in rats: regulated change in body temperature or change in regulated body temperature. *Am J Physiol* 1989; 26: R695-9.
- [32] Smith BK, Klueger MJ. Human IL-1 receptor antagonist partially suppresses LPS fever but not plasma levels of IL-1 in Fisher rats. *Am J Physiol* 1992; R653-5.
- [33] Long NG, Otterness I, Kunkel SL, Vander AJ, Kluger MJ. Roles of IL-1 β and TNF in lipopolysaccharide-induced fever in rats. *Am J Physiol* 1990; R724-8.
- [34] Long N, Morimoto A, Nakamori T, Murakami N. Systemic injection of TNF-alpha attenuates fever due to IL-1 β and LPS in rats. *Am J Physiol* 1992; 263: R987-91.
- [35] Watanabe T, Morimoto A, Murakami N. Threshold dose of interleukin-1 β for induction of an ACTH response is higher than of a febrile response. *Pflügers Arch* 1991; 419: 629-31.
- [36] Watanabe T, Morimoto A, Murakami N. ACTH response in rats during biphasic fever induced by interleukin 1. *Am J Physiol* 1991; 261: R1104-8.
- [37] Morrow LE, McClellan J, Conn CA, Kluger MJ. Glucocorticoids alter fever and IL-6 responses to psychological stress and to lipopolysaccharide. *Am J Physiol* 1993; 264: R1010-6.
- [38] Kozak W, Conn CA, Kluger MJ. Lipopolysaccharide induces fever and depresses locomotor activity in unrestrained mice. *Am J Physiol* 1994; 35: R125-35.
- [39] Coelho MM, Souza GEP, Pela IR. Endotoxin-induced fever is modulated by endogenous glucocorticoid in rats. *Am J Physiol* 1992; 32: R423-7.
- [40] Winter CA, Risely OA, Nuss CW. Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 111: 544-7.
- [41] Philippe L, Gegout-Pottie P, Guingamp C, Terlain B, Netter P, Gillet P, et al. Relations between functional, inflammatory and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. *Am J Physiol* 1997; 273: R1550-6.
- [42] Loeuille D, Gonord P, Guingamp C, Gillet P, Blum A, Sauzade M, et al. In vitro magnetic resonance microimaging of experimental osteoarthritis in the rat knee joint. *J Rheumatol* 1997; 24: 133-9.
- [43] Guingamp C, Gegout-Pottie P, Philippe L, Terlain B, Netter P, Gillet P. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis. A dose-response study of loss of mobility: morphology and biochemistry. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1670-9.
- [44] Oyanagui Y, Sato S. Inhibition by nivaldipine of ischemic and carrageenan paw edema as well as superoxide radical production from neutrophils and xanthine oxidase. *Arzneim Forsch Drug Res* 1991; 41: 469-74.
- [45] Chai Z, Gatti S, Toniatti C, Poli V, Bartfai T. IL-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 β : a study on IL-6-deficient mice. *J Exp Med* 1996; 183: 311-6.
- [46] Allen WH. Animals and their models do their locomotions. *Bio-science* 1995; 45: 381-3.
- [47] Volke V, Soosaar A, Koks S, Basrin M, Mannisto PT, Vasar E. Nitric oxide mediates caerulein-induced suppression of locomotor activity. *Neuropeptides* 1996; 30: 323-6.
- [48] Gong W, Neill BN, Justice JB. Locomotor response to novelty does not predict cocaine place reference conditioning in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 53: 191-6.

17. Aug. 1998

Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats

LIONEL PHILIPPE, PASCALE GEGOUT-POTTIE, CORINNE GUINGAMP, KARIM BORDJI, BERNARD TERLAIN, PATRICK NETTER, AND PIERRE GILLET

Laboratoire de Pharmacologie and Unité de Recherches Associée Centre National de la Recherche Scientifique 1288, Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires, Faculté de Médecine, Université Henri Poincaré Nancy I, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Philippe, Lionel, Pascale Gegout-Pottie, Corinne Guingamp, Karim Bordji, Bernard Terlain, Patrick Netter, and Pierre Gillet. Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. *Am. J. Physiol.* 273 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 42): R1550–R1556, 1997.—We assessed the time-course of adjuvant arthritis (AA) in Lewis rats, using biotelemetry to monitor the rat's spontaneous locomotor activity and body temperature, and studied the evolution of the arthritic index, circulating concentrations of inflammation-promoting cytokines, cartilage proteoglycan synthesis, and the effect of indomethacin as a cyclooxygenase inhibitor to evaluate prostaglandin (PG) contribution in AA. The injection of complete Freund's adjuvant on day 0 (D0) induced a marked, transient loss of locomotor activity (D1–D4; initial phase) and then a second phase of hypomobility peaking on D15 and thereafter irreversible (D16–D20; arthritic phase). Fever peaked first on D1 and again between D13 and D17. The primary hyperthermia was associated with increases in plasma interleukin-6 and tumor necrosis factor- α concentrations and seemed to be partly PG dependent. Proteoglycan synthesis inhibition in the patellar cartilage increased gradually, spreading from the injected paw to the contralateral paw. It was corrected on D20 by preventive and curative indomethacin treatments. Indomethacin also greatly relieved hypomobility during the systemic phase of AA (D10–D15). The combination of information about cartilage metabolism, body temperature, locomotor activity, and cytokine in this study permits analysis of analgesic, antipyretic, anti-inflammatory, and chondroprotective properties of drugs in the various phases of AA. Thus, using a new methodology, we have discriminated the different phases of the disease and confirmed the symptomatic and systemic inhibitory effect of indomethacin on fever, activity, and cartilage metabolism.

proteoglycan synthesis; locomotor activity; indomethacin; experimental model

more difficult to assess. Biotelemetry provides a useful and original index of function by allowing, without stress, continuous evaluation of the rat's spontaneous mobility (34), especially in experimental models of arthritis, and also permits the simultaneous measurement of body temperature as an index of inflammation (24).

Adjuvant arthritis (AA) of rats is a widely used experimental model because in many respects it mimics arthritis in humans. This T cell dysimmune-mediated disease is one of the most important pharmacological models of rheumatoid arthritis and is commonly used to select classic nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (6). The model is also used to evaluate pain (11) and to elucidate immunological phenomena relating to the arthritic process, antigen presentation, and various cellular aspects (18). However, few studies have assessed the degeneration of articular cartilage in AA and little is known about the effect of NSAIDs on such degeneration (6) as a pertinent index of their putative chondroprotective potencies.

Therefore, we have used biotelemetry to characterize continuously changes in locomotor activity, used as a "clinical-like" index of articular function, and in body temperature during AA. We also wished to shed light on these biotelemetrically measured changes by use of classic measures such as the clinical index, plasma concentrations of inflammation-promoting cytokines [interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α)]. We also assessed the preventive and curative effect of indomethacin (30) as a prostaglandin inhibitor on the original parameters developed hereafter (spontaneous mobility, body temperature, and proteoglycan anabolism). We have promoted this original clinical-like approach in classic AA to provide evidence about the chronological course of underlying pathological mechanisms that induce articular dysfunction, either reactional (primary response vs. the phlogistic agent) or dysimmune, through the arthritic process from the injected paw to the other joints (secondary response).

MATERIALS AND METHODS

Laboratory animals. Male Lewis rats (Charles River) weighing 180–200 g were housed in individual cages with free

ARTICULAR HANDICAP is currently assessed in patients with arthritis on the basis of, for example, joint tenderness, articular and functional indexes (Lee, Ritchie, Health Assessment Questionnaire, etc.), and/or clinical examination. Such assessment by the patients themselves and the clinicians provides a sensible estimate of joint impairment. In animals, the severity of the arthritic disease is classically evaluated from the arthritic score or paw volume, but locomotor handicap is

access to standard laboratory diet and drinking water. They were kept in a 12:12-h light-dark cycle (lights on 6:00 AM to 6:00 PM) in a temperature-controlled room ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). One hundred fifty-four rats were used for these studies: four groups for the assessment of locomotor activity ($n = 6/\text{group}$), fever ($n = 6/\text{group}$), and cartilage anabolism ($n = 5/\text{group}$ for each time point) and two groups for the measure of arthritic score ($n = 10$) and cytokine levels ($n = 5/\text{group}$ for each time point).

Induction of polyarthritis with complete Freund's adjuvant. Arthritis was induced [on day 0 (D0)] by a single subcutaneous injection (100 μl) of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco Laboratory, Detroit, MI) suspended in sterile mineral oil (10 mg/ml) (paraffin oil; NaCl 0.9%; Tween 80) into the right hindpaw. The contralateral hindpaw of the adjuvant-sensitized rats and both hindpaws of control rats were injected with a sterile saline solution (100 μl).

Arthritic score. Clinical lesions were assessed by scoring each paw from 0 (no sign) to 4 (severe signs), yielding a maximum score of 16 per animal (D0 to D18). Scoring was based on the severity and extent of erythema, the swelling of periarticular tissues, and the enlargement and distortion of the joints. A sensitized animal was considered to have arthritis when at least one noninjected paw was inflamed.

Biotelemetry. Body temperature and locomotor activity were monitored between 6:00 PM and 6:00 AM (dark cycle) and recorded from D0 (nocturnal control data) to D20 using battery-operated biotelemetry devices (Mini-Mitter, model VMFH) implanted intraperitoneally (25). Complete Freund's adjuvant (CFA) was injected between 9:00 AM and 10:00 AM, just after the recording of nocturnal control data. D1 includes the first dark cycle after the adjuvant injection. The activity index is expressed as a percentage of mean nocturnal activity relative to the control mean nocturnal activity (D0), with a negative percentage representing the percentage of activity lost (16).

Cartilage proteoglycan synthesis. As we previously described (15), cartilage metabolism was studied through proteoglycan synthesis of patellae (37). The rats were killed, and the patellae were dissected and incubated for 3 h at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere in 2 ml of RPMI-N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid-bicarbonate medium (Sigma) supplemented with L-glutamine, penicillin, streptomycin, and 2.5 $\mu\text{Ci Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (Amersham) per patella. At the end of the incubation period, the patellae were washed with saline and fixed overnight in 0.5% cetylpyridinium chloride (Sigma) in phosphate-buffered Formalin. After decalcification in 5% formic acid (Sigma), the patellae could be easily punched out from the surrounding tissue with a 2-mm biopsy punch (Stiefel). Each patella was solubilized in Soluene 350 (Packard), and its ^{35}S content, a reliable measure of the sulfated glycosaminoglycan content, was measured by liquid scintillation counting (Hionic Fluor, Packard).

IL-6 and TNF- α assays. Blood samples were collected in sterile tubes by cardiac puncture and centrifuged, and the plasma was stored at -20°C until testing. The samples were assayed for their ability to support the proliferation of the IL-6-dependent B9 cell line, as previously described (1). Results were expressed as units per milliliter; 1 U/ml produced half-maximal cell proliferation. Plasma TNF- α was measured by enzyme-linked immunosorbent assay for rat TNF- α (kit from Genzyme).

Treatment with indomethacin. Indomethacin (Indocid, Merck Sharp & Dohme-Chibret, France) was given daily (subcutaneously at a dose of $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) to the adjuvant-injected rats in an attempt to either prevent (D0 to D20) or cure (D15 to D20) the arthritis. Indomethacin effect was

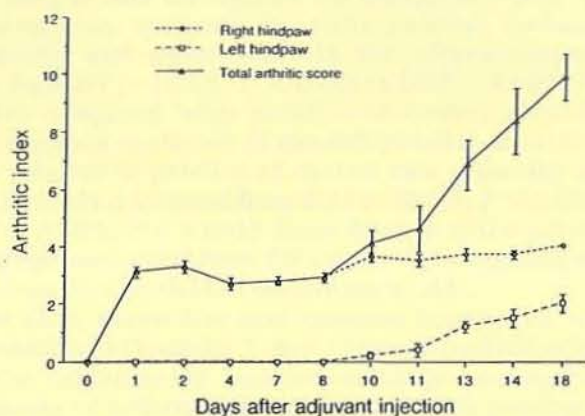


Fig. 1. Variation of arthritic score of right injected hindpaw, left contralateral hindpaw, and all forepaws and hindpaws (total arthritic score) during adjuvant arthritis. Data are means $\pm$ SE ($n = 10$).

studied comparing indomethacin-treated AA rats to AA rats that received saline (untreated AA rats).

Statistical analysis. Results are presented as means $\pm$ SE. AA indomethacin (preventive and curative)-treated rats, AA untreated rats, and control rats were compared using a two-way analysis of variance test for biotelemetry data, with $P < 0.01$ taken as the level of significance. The significance of differences in proteoglycan synthesis data between groups was calculated using Student's unpaired two-tailed t -test, with $P < 0.05$ taken as the level of significance.

RESULTS

Clinical examination of the arthritic process. As shown in Fig. 1, an increase in the clinical score of the right hindpaw 24 h after adjuvant injection reflected severe local inflammation and swelling. In this initial inflammatory phase, the arthritic index of the right hindpaw peaked on D2 (score 3.3 ± 0.2). During the systemic phase, beginning on D10, the arthritic index of the (noninjected) left hindpaw rose slightly from zero (score 0.2 ± 0.1 on D10). From D10, rats were affected in all four paws, with the arthritic index increased until the end of the experiment (total score 9.8 ± 0.8 on D18).

Variation of spontaneous activity and body temperature in arthritic rats. A biotelemetry unit constantly recorded the spontaneous locomotor activity and the body temperature of the unrestrained rats. There was a large, transient febrile response (Fig. 2A) during local, acute inflammation, with a peak on D1 ($38.9 \pm 0.1^\circ\text{C}$) followed by a return to the control level on D3. During the systemic phase of the arthritic response, from D10, a second bout of fever peaked on D15 ($38.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$). Then the body temperature fell toward normal levels until the end of the experiment ($38.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ on D20).

"Preventive" treatment with indomethacin (subcutaneous administration of $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ from D0 to D20) of adjuvant-injected rats diminished the first bout of fever ($38.4 \pm 0.1^\circ\text{C}$ on D1) and totally abolished the second peak ($38.1 \pm 0.1^\circ\text{C}$ on D15) observed in untreated arthritic rats. Immediately on its administration, indomethacin "curative" treatment (the same dose administered by the same route, but from D15 to D20) abolished the second bout of fever ($37.8 \pm 0.1^\circ\text{C}$ on D16) observed in untreated arthritic rats.

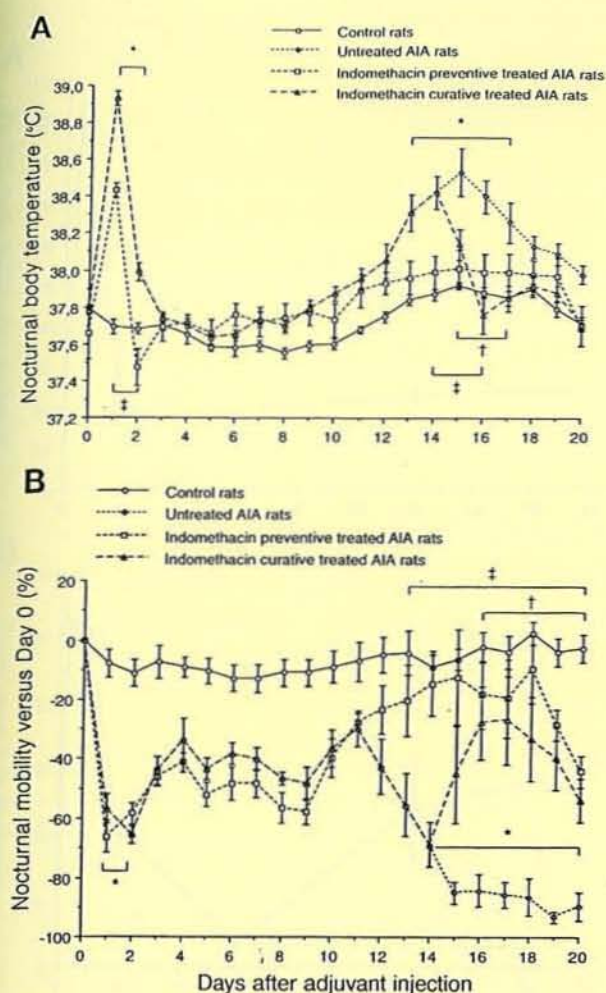


Fig. 2. Variation of nocturnal body temperature (A) and locomotor activity (B) during adjuvant arthritis. Effects of indomethacin [$3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$] preventive from day 0 (D0) to D20 and curative (from D15 to D20) treatments. Data are means $\pm$ SE ($n = 6$). * $P < 0.001$ for untreated adjuvant-induced arthritis (AIA) rats vs. control rats; † $P < 0.01$ for indomethacin-preventive treated AIA rats vs. untreated AIA rats; ‡ $P < 0.01$ for indomethacin curative-treated AIA rats vs. untreated AIA rats.

Nocturnal spontaneous locomotor activity (Fig. 2B) decreased greatly from D1 to D2 during the local acute inflammatory phase, reaching its lowest level for this phase ($-65.5 \pm 2.9\%$) on D2, and then, between D5 and D9, remained steady to an intermediate level. Then a marked loss of mobility appeared gradually from D12 until D15 and settled irreversibly until D20 (maximum hypomobility $-93.2 \pm 2.0\%$ on D19).

Preventive treatment with indomethacin did not affect the first hypomobility low point (most severe hypomobility $-66.3 \pm 5.4\%$ on D1), but it totally abolished the marked loss of mobility from D12 until the end of the experiment compared with untreated arthritic rats. Curative treatment with indomethacin markedly lessened hypomobility in arthritic rats during its administration period.

Variations in proteoglycan cartilage anabolism during AA. We studied proteoglycan synthesis in the central part of the cartilage of both patellae in arthritic

and control rats throughout the experiment (Fig. 3A). Proteoglycan synthesis in right patellae decreased gradually and significantly in the adjuvant-injected rats from D7 (-19.2% , $P < 0.01$) to D20 (-42.9% , $P < 0.001$) compared with patellae of control rats. The proteoglycan synthesis of the left patellar of arthritic rats relative to patellae of control rats gradually and significantly decreased from D14 (-22.5% , $P < 0.05$) to D20 (-37.0% , $P < 0.001$). Thus damage to the patellar cartilage was noted from D7 on the right injected side and from D14 on the left contralateral side.

On D20, preventive and curative treatments with indomethacin ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) have beneficial effects on the inhibition of patellar cartilage proteoglycan synthesis of arthritic rats compared with patellae of untreated arthritic rats (Fig. 3B).

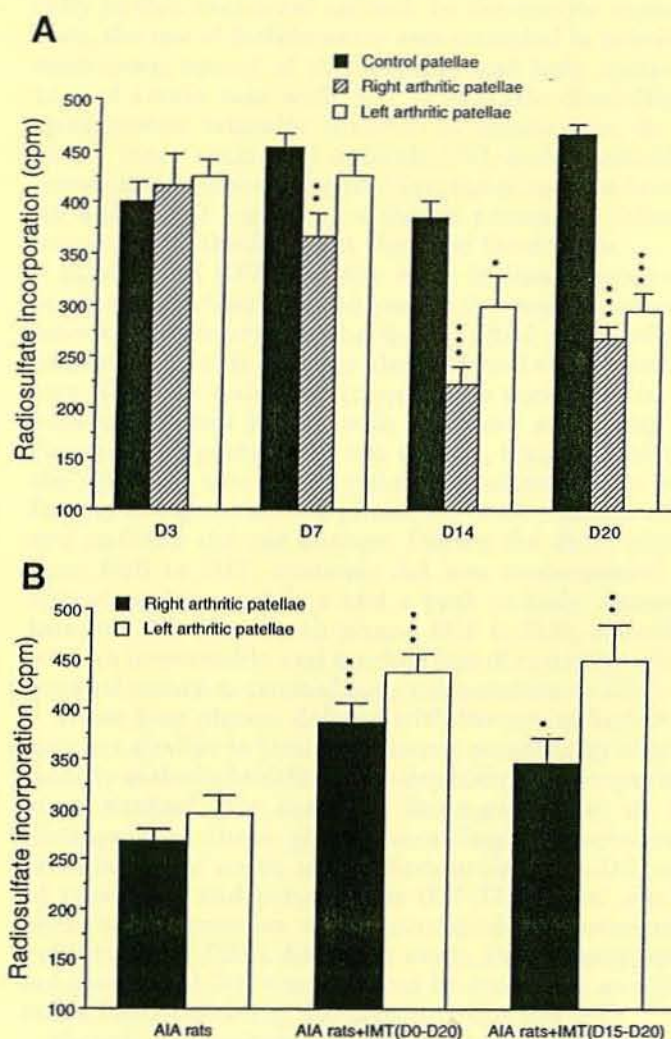


Fig. 3. Variation of patellar (right and left) proteoglycan synthesis during adjuvant arthritis. Data are means $\pm$ SE ($n = 5$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ for (right and left) arthritic patellae vs. control patellae (A). On D20, effects of indomethacin (IMT, $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) preventive (from D0 to D20) and curative (from D15 to D20) treatments on proteoglycan patellar synthesis. Data are means $\pm$ SE ($n = 5$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ for (right and left) arthritic patellae of untreated rats vs. (right and left) arthritic patellae of indomethacin-treated rats (B). cpm, Counts/min.

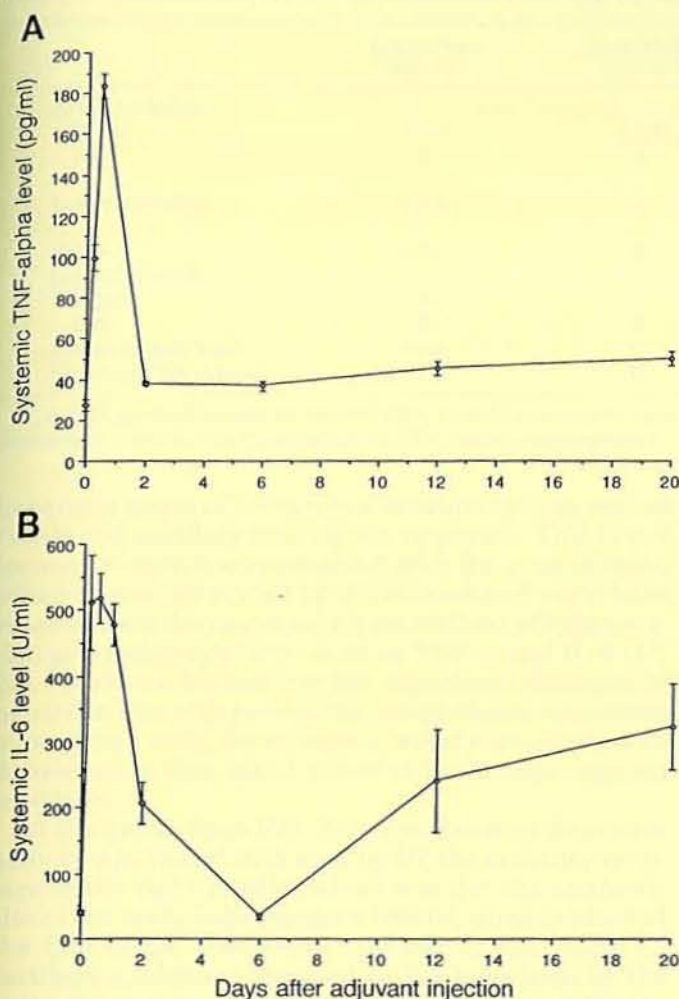


Fig. 4. Variation of systemic tumor necrosis factor (TNF)- α (A) and interleukin (IL)-6 (B) level during adjuvant arthritis. Data are means $\pm$ SE ($n = 5$).

Variation of plasma TNF- α and IL-6 concentrations in AA rats. In the plasma of control rats (D0), a basal TNF- α concentration (27.5 ± 2.7 pg/ml) was observed (Fig. 4A). The systemic TNF- α concentration had significantly increased by 6 h after adjuvant injection, peaked at 12 h (183.5 ± 6.3 pg/ml), returned to near control concentrations on D2 (38.0 ± 1.3 pg/ml), and increased slightly until D20 (50.2 ± 3.3 pg/ml).

A basal systemic IL-6 concentration (40.0 ± 5.0 IU/ml) was observed in control rats (Fig. 4B). The systemic IL-6 concentration in adjuvant-injected rats increased by 6 h after injection, peaked at 12 h (517.5 ± 37.1 IU/ml), returned to control concentrations by D6 (35.0 ± 5.0 IU/ml), and then rose to 323.3 ± 66.4 IU/ml by D20.

DISCUSSION

In the present study, biotelemetry was used to study the effect of developing AA on nocturnal body temperature and spontaneous locomotor activity of the experimental rats. In fact, we have observed that this technique permits the quantification of the effect of developing AA on these original parameters accurately

and continuously under less stressful conditions versus more classical indexes such as clinical score or cytokine profile. In addition, the course of the disease from the injected paw (primary response) to the contralateral paw (secondary dysimmune process) was assessed via patellar cartilage metabolism, as previously studied in other experimental arthritides (15, 37). In the view of the results reported here, these original parameters appear mostly prostaglandin dependent with regard to the beneficial influence of indomethacin on the course of the disease.

Biotelemetry has only been used previously in rats with AA mainly to assess diurnal sleep disturbance (20). The few previous reports of changes in mobility during AA have been of observed behavior (8, 13), of exploratory phenomena, or of actimetry using infrared and photocells during daytime (9, 21, 34, 35) paradoxically in this nocturnal animal. In the results reported here, the use of biotelemetry was extended to provide a continuous record of the mobility and body temperature of Lewis rats with AA, to evaluate disability of spontaneous articular function by means that do not stress these nocturnal animals (33), and to establish correlations between original functional indexes (mobility and fever) and a more classic parameter (clinical score) during the different phases of the disease.

Injection of CFA into the right hindpaw induced a marked hyperthermia and greatly decreased locomotor activity characterizing the 4-day initial phase of AA. Interestingly, this phase is also observed with biotelemetry when the induction procedure is performed in the base of the tail either with complete or incomplete Freund's adjuvant (data not shown), thus minimizing the crippling role of induction procedure in the paw. During the quiet second phase, D5 to D9, temperature and mobility did not change. During the third phase, from D10 to D15, systemic AA was accompanied by deepening hypomobility and a peak in body temperature at D15. The fourth phase, D16 to D20, coincided with an irreversible and marked loss of mobility, with a gradual return to normal body temperature on D20.

These four phases defined with the use of biotelemetry are similar to those previously reported by others, usually with slight differences depending on the parameters studied. For example, Baumgartner et al. (5) distinguished three phases according to biochemical criteria: one of acute, local inflammation (D1–D4), one of remission and prearthritis (D7–D12), and one of chronic inflammation with periartthritis and osteogenic activity (D15–D28). As in our study, the primary, local reaction (until D3) was followed by secondary swelling (after D10), reflecting the arthritic response (31).

Various parameters, clinical index, plasma cytokine concentrations (IL-6, IL-1 β , and TNF- α), proteoglycan anabolism in the patellar cartilage, and the effect of indomethacin on the time course of the disease, were studied to elucidate the mechanisms underlying the four phases (Table 1). The initial, transient hypomobility could be attributed to an acute phlogistic response due to paw inflammation, as shown by the arthritic index, and the related pain, which is known to be an

Table 1. Evolution of different parameters during various phases of adjuvant-induced arthritis in Lewis rats

	Initial Phase (D0-D4)	Quiet Phase (D5-D9)	Systemic Phase (D10-D15)		Arthritic Phase (D16-D20)	
Arthritic index						
Right	+++	+++	+++		+++	
Left	0	0	+		++	
			D10-D12	D13-D15		
Loss of mobility	+++	+	+	+++	+++	
			D10-D12	D13-D15	D16-D18	D19-D20
Fever	+++	0	+	+++	++	+
Loss of anabolism						
Right	0	+	++		+++	
Left	0	0	+		+++	
Systemic IL-6 level	+++	0	++		++	
Systemic TNF- α level	+++	0	+		+	

D, day; 0, no modification vs. control rats; +, mild increase vs. control rats; ++, important increase vs. control rats; +++, very important increase vs. control rats; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor.

important cause of limitation of mobility (21), as well as febrile and ancillary somnogenic responses. This loss of locomotor activity corresponded with the peak of fever, which was accompanied by drowsiness and could have resulted from the increased concentrations of inflammation-promoting cytokines such as TNF- α and IL-6 (19, 23). As shown by the low but significant decrease of hyperthermia with preventive indomethacin treatment in arthritic rats, fever seems weakly prostaglandin dependent in this initial phase at the dosage regimen used here.

In the quiet phase (D5-D9), spontaneous locomotor activity was raised, although by D7 the articular cartilage of the right patella, which was not the anatomic site of the main inflammatory lesions, already showed the first slight alterations. Apparently the defect in cartilage anabolism observed in the knee joint in the quiet phase was not yet sufficient to affect articular joint function. For this purpose, biotelemetric studies provide an interesting tool because they permit the evaluation of all articular joint disabilities (reflecting joint lesion) and also ankle damages, because distal joints are mainly affected in this experimental disease. In contrast, anabolism of patellar cartilage is an interesting, accurate, quantitative, and validated tool (15, 37) and an alternative to autoradiography to study cartilage *ex vivo*. In addition, no anatomic chondral entity of the ankle is so easily removable. Moreover, this technique is more sensitive than classical (14) and new imaging techniques (6) in assessing chondral degeneration. The absence of fever in this phase coincided with the low plasma concentrations of proinflammatory cytokines (IL-6, TNF- α), although the arthritic score of the injected paw remained elevated.

In the systemic phase (D10-D15), all the parameters studied indicated deterioration. Loss of mobility as well as fever became maximal and seemed strongly prostaglandin dependent, as reflected by the beneficial effect of preventive and curative indomethacin (3 mg/kg). In our experimental conditions, hyperthermia was closely associated with systemic release of IL-6, which is known as a circulating endogenous pyrogen (23), and may have peaked between D12 and D20 in agreement with previous reports (3, 22, 30). Interestingly, the

plasma concentration of IL-6 and the body temperature paralleled each other throughout the course of the disease.

The marked hypomobility, which was reversible by treatment with indomethacin, might have been induced by articular degenerative phenomena as reflected by the clinical index and the marked inhibition of proteoglycan synthesis. Indeed, we observed a dramatic decrease in proteoglycan anabolism in both knees from D14, reflecting systemic cartilage alterations and probably corresponding to the maximal hypomobility. In AA, the decrease in cartilage proteoglycan synthesis was time and site dependent, spreading from the injected paw to the contralateral paw. Furthermore, proinflammatory cytokines such as IL-1 β , TNF- α , and IL-6 have been implicated in the chondral degenerative process, causing a decrease of cartilage anabolism matrix and an increase in the production of metalloproteases such as collagenase and stromelysin (4, 7).

During the arthritic phase (D16-D20), the body temperature returned to basal levels, although plasma concentrations of IL-6 were quite high. Fever seemed to have been downregulated by the end of the experiment. Maximal and irreversible hypomobility reflects severe degenerative damages at various sites (knee, ankle, hip, and wrist) and impairment of these joints. All of these matrix changes, inflammatory processes, and painful reactions disturb joint articular function and contribute to a loss of spontaneous mobility. The multiplicity of changes makes it difficult to assess the pathological events leading to functional disability. Interestingly, indomethacin treatment significantly improved cartilage proteoglycan synthesis in both knees, with total recovery in the noninjected knee. This marked improvement of cartilage metabolism after indomethacin treatment is certainly correlated with the disappearance of hypomobility characterizing joint impairment in the two last phases of AA.

Surprisingly, unlike IL-6 and TNF- α , in our experimental conditions IL-1 β did not vary in its plasma concentration (Cytoscreen Immunoassay kit IL-1 β rat, BioSource International) during AA (data not shown). Nevertheless, our results are in complete agreement with those reported during lipopolysaccharide (LPS)-

induced inflammation in the rat air pouch, demonstrating that if IL-1 and IL-6 significantly increased in the pouch, only IL-6 was increased in the circulation (28, 29). In addition, no changes in circulating IL-1 are reported in febrile rats injected with turpentine (25). These data suggest that IL-1 mediates fever through release of IL-6 in the circulation (2, 10, 26). Initial circulating high levels or TNF- α are also consistent with those reported with intraperitoneal injection of LPS by the same authors (peak at 1.5 h). Therefore we could offer the hypothesis that 1) changes in IL-1 β concentration were too weak to be detected in rat sera by our method, 2) that the concentration of IL-1 β could not increase in this model (systemically) (32), or 3) that IL-1 β production was only local, with only ancillary repercussions in sera (12, 17, 27). Systemic concentrations of proinflammatory cytokines weakly reflected intra-articular concentrations, but intra-articular IL-1 β , TNF- α , and IL-6 are well known to be involved in cartilage destruction, especially in the inhibition of proteoglycan anabolism (37) and in the increased synthesis of matrix metalloprotease and the decreased synthesis of metalloprotease enzyme-inhibitors (38).

The plasmatic cytokine profile of IL-6 reported here is similar to those published by others (3, 22, 36). Our original contribution was to demonstrate in AA the biphasic response: IL-6 peak occurs very early within the primary phase and is thus not usually detected. IL-6 appears as an early plasmatic indicator of systemic response to adjuvant, and plasmatic increasing of IL-6 appears necessary for pyrogenicity in both primary and secondary responses during AA.

In addition, inhibition of systemic production of IL-6 by treatment with NSAIDs is well documented (3, 22, 36) and accounts for the fact that cyclooxygenase-derived PG mediates IL-6 production. Data concerning TNF are more complex to analyze, because we have only observed an increase in plasmatic levels during the first phase. One hypothesis might be that, during the primary response, TNF and IL-1 are produced at the site of induction and cause release of IL-6 into the circulation and ancillary fever. During the secondary dysimmune process, with regard to the data recently published in this model [mRNA in arthritic paw (3)], IL-6 appears a more prominent and PG-dependent parameter than TNF. These data may reflect the better response to indomethacin during the secondary phase involving mostly IL-6 than during the primary response involving both IL-6 and TNF (non-PG dependent) at the circulating level.

Perspectives

Taken together, the comparative study of the parameters provided a great deal of information. Variations in parameters reflecting function (spontaneous locomotor activity), inflammation (body temperature, arthritic score, systemic TNF- α , and IL-6 concentrations), and degeneration (cartilage anabolism) were not always obviously interrelated in the different AA phases. This new approach to the assessment of AA can advance our understanding of the relations among functional impair-

ment, inflammatory signs, and chondral degeneration in arthritic rats. Although much work is still needed to verify the respective contributions of IL-1-, TNF-, and PG-related local processes and the relations among all the various parameters, either reactional (primary response) or immunological (secondary response), the relative cytokines (IL-1, IL-6, and/or TNF) and prostaglandin dependencies of each parameter remain to be established as a potential target for antirheumatic drugs.

Nevertheless this approach, looking at spontaneous locomotor activity, body temperature, proteoglycan cartilage anabolism, systemic concentrations of inflammation-promoting cytokines, and other experimental parameters, can be used in the classic experimental models to study the respective anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, and chondroprotective effects of classic antiarthritic drugs at the various stages of the disease (reflecting articular, systemic and central components). This approach also allows experimental "clinical-like" studies of the properties of new drugs with an impact on the inflammatory cytokine-related versus prostaglandin-dependent phenomena, giving a clearer idea of a drug's antirheumatic potential due to improvement of mobility impairment and modulation of chondrodegenerative processes in arthritis.

Thanks are due to Mrs. Meriem Koufany and Stephanie Etienne for technical assistance, to Michel Thiery for taking good care of the animals, and to Suzanne Miller for proofreading the draft of this article.

This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (CRE 930910), Région Lorraine, and Rhône-Poulenc-Rorer.

Address for reprint requests: P. Nèttier, Laboratoire de Pharmacologie and URA CNRS 1288, Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires, ave de La Forêt de Haye, BP 184, Faculté de Médecine, Université Henri Poincaré Nancy I, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

Received 24 February 1997; accepted in final form 14 July 1997.

REFERENCES

1. Aarden, L. A., E. R. De Groot, O. L. Schaap, and P. M. Lansdorp. Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 17: 1411-1416, 1987.
2. Alheim, K., Z. Chai, G. Fantuzzi, H. Hasanvan, D. Malinowsky, E. Di Santo, P. Ghezzi, C. A. Dinarello, and T. Bartfai. Hyperresponsive febrile reactions to interleukin (IL) 1 α and IL-1 β and altered brain cytokine mRNA and serum cytokine levels in IL-1 β -deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2681-2686, 1997.
3. Anderson, G. D., S. D. Hauser, K. L. McGarity, M. E. Bremer, P. C. Isakson, and S. A. Gregory. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J. Clin. Invest.* 97: 2672-2679, 1996.
4. Arend, W. P., and J. M. Dayer. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 33: 305-315, 1990.
5. Baumgartner, W. A., F. W. J. Beck, A. Lorber, C. M. Pearson, and M. W. Whitehouse. Adjuvant disease in rats: biochemical criteria for distinguishing several phases in inflammation and arthritis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 145: 625-630, 1974.
6. Borah, B., M. D. Francis, K. Hovancik, J. T. Boyce, and N. M. Szeverenyi. A quantitative one-dimensional magnetic resonance imaging technique in adjuvant arthritis: the assessment of disease progression and indomethacin efficacy. *J. Rheumatol.* 22: 855-862, 1995.

7. Breennan, F. M. Role of cytokines in experimental arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 97: 1-3, 1994.
8. Calvino, B., M. O. Crepon Bernard, and D. LeBars. Parallel clinical and behavioural studies in adjuvant arthritis in the rat: possible relationship with chronic pain. *Behav. Brain Res.* 24: 11-29, 1987.
9. Castell, M., A. Diez Nogra, T. Cambras, M. Ribot, C. Castellote, and J. Queralt. Alterations of motor activity circadian rhythm in rats with adjuvant arthritis. *Pain* 33: 379-383, 1988.
10. Chai, Z., S. Gatti, C. Toniatti, V. Poli, and T. Bartfai. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 β : a study on IL-6-deficient mice. *J. Exp. Med.* 183: 311-316, 1996.
11. Colpaert, F. C., T. Meert, P. DeWitte, and P. Schmitt. Further evidence validating adjuvant arthritis as an experimental model of chronic pain in the rat. *Life Sci.* 31: 67-75, 1982.
12. Connolly, K. M., V. J. Stecher, and L. Kent. Examination of interleukin-1 activity, the acute phase response, and leukocytes subpopulations in rats with adjuvant-induced arthritis. *J. Lab. Clin. Med.* 111: 341-347, 1988.
13. De Castro Costa, M., J. Gybels, R. Kupers, and J. Van Hees. Scratching behaviour in arthritic rats a sign of chronic pain or itch. *Pain* 29: 123-131, 1987.
14. Esser, R. E., A. R. Hildebrand, R. A. Angelo, L. M. Watts, M. D. Murphey, and L. E. Baugh. Measurement of radiographic changes in adjuvant-induced arthritis in rats by quantitative image analysis. *Arthritis Rheum.* 38: 129-138, 1995.
15. Gegout, P., P. Gillet, B. Terlain, and P. Netter. Zymosan-induced arthritis in the rat. II. Effect of anti-inflammatory drugs. *Life Sci.* 56: 389-394, 1995.
16. Gegout, P., C. Guingamp, L. Philippe, S. Melik-Parsadaniantz, C. Cipolletta, P. Gillet, B. Kerdelhué, B. Terlain, and P. Netter. Effects of continuous administration of IL1 β with osmotic pumps in rats (Abstract). *Inflamm. Res.* 44: S256, 1995.
17. Haynes, D. R., S. J. Gadd, M. W. Whitehouse, G. Mayrhofer, and B. Vernon-Roberts. Complete prevention of the clinical expression of adjuvant-induced arthritis in rats by cyclosporin-A and lobenzarit: the regulation of lymph node cell populations and cytokine production. *Inflamm. Res.* 45: 159-165, 1996.
18. Hirschelmann, R., and R. Schade. Regulation of acute phase reaction in rat adjuvant arthritis. *Agents Actions* 19: 335-336, 1986.
19. Kettelhut, I. C., and A. L. Goldberg. Tumor necrosis factor can induce fever in rats without activating protein breakdown in muscle or lipolysis in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 81: 1384-1389, 1988.
20. Landis, C. A., C. R. Robinson, and J. D. Levine. Sleep fragmentation in the arthritic rat. *Pain* 34: 93-99, 1988.
21. Larsen, J. J., and J. Arnt. Reduction in locomotor activity of arthritic rats as parameter for chronic pain: effect of morphine, acetylsalicylic acid and citalopram. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 57: 345-351, 1985.
22. Leisten, J. C., W. A. Gaarde, and W. Scholz. Interleukin-6 serum levels correlate with footpad swelling in adjuvant-induced arthritic Lewis rats treated with cyclosporin A or indomethacin. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 56: 108-115, 1990.
23. Le May, L. G., A. J. Vander, and M. J. Kluger. Role of interleukin-6 in fever in rats. *Am. J. Physiol.* 258 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 27): R798-R803, 1990.
24. Leon, L. R., C. A. Conn, M. Glaccum, and M. J. Kluger. IL-1 type I receptor mediates acute phase response to turpentine, but not lipopolysaccharide, in mice. *Am. J. Physiol.* 271 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 40): R1668-R1675, 1996.
25. Long, N. C., I. Otterness, S. L. Kunkel, A. J. Vander, and M. J. Kluger. Role of interleukin-1 β and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats. *Am. J. Physiol.* 259 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 28): R724-R728, 1990.
26. Luheshi, G. N., A. Stefferl, A. V. Turnbull, M. J. Dascombe, S. Brouwer, S. J. Hopkins, and N. J. Rothwell. Febrile response to tissue inflammation involves both peripheral and brain IL-1 and TNF- α in the rat. *Am. J. Physiol.* 272 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 41): R862-R868, 1997.
27. Melik-Parsadaniantz, S., E. Batsché, P. Gegout-Pottie, B. Terlain, P. Gillet, P. Netter, and B. Kerdelhué. Effects of continuous infusion of interleukin 1 β on corticotropin-releasing hormone (CRH), CRH receptors, proopiomelanocortin gene expression and secretion of corticotropin, β -endorphin and corticosterone. *Neuroendocrinology* 65: 53-63, 1997.
28. Miller, A. J., S. J. Hopkins, and G. N. Luheshi. Sites of action of IL-1 in the development of fever and cytokine responses to tissue inflammation in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 120: 1274-1279, 1997.
29. Miller, A. J., G. N. Luheshi, N. J. Rothwell, and S. J. Hopkins. Local cytokine induction by LPS in the rat air pouch and its relationship to the febrile response. *Am. J. Physiol.* 272 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 41): R857-R861, 1997.
30. Mukherjee, A., V. G. Hale, O. Borga, and R. Stein. Predictability of the clinical potency of NSAIDs from the preclinical pharmacodynamics in rats. *Inflamm. Res.* 45: 531-540, 1996.
31. Owen, R. T. Adjuvant induced polyarthritis—an overview. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 2: 199-204, 1980.
32. Phadke, K., D. G. Carlson, B. D. Gitter, and L. D. Butler. Role of interleukin-1 and interleukin-2 in rat and mouse arthritis models. *J. Immunol.* 136: 4085-4091, 1986.
33. Scales, W. E., and M. J. Kluger. Effects of antipyretic drugs on circadian rhythm in body temperature in rats. *Am. J. Physiol.* 253 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 22): R306-R313, 1987.
34. Selph, J. L., V. M. Boncek, F. E. Soroko, T. M. Harris, and F. R. Cochran. The pharmacologic evaluation of locomotor activity versus inflammatory parameters in rat adjuvant arthritis. *Agents Actions* 39: 201-203, 1993.
35. Seymour, P. A., D. A. Larson, and R. G. Browne. The effect of piroxicam on locomotor activity in rats with adjuvant arthritis. *Drug Dev. Res.* 7: 165-172, 1986.
36. Thiesen-Popp, P., H. Pape, and R. Muller-Peddinghaus. Interleukin-6 (IL-6) in adjuvant arthritis of rats and its pharmacological modulation. *Int. J. Immunopharmacol.* 14: 565-571, 1992.
37. Van de Loo, F. A. J., L. A. B. Joosten, P. L. E. M. van Lent, O. J. Arntz, and W. B. van den Berg. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor α , and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. *Arthritis Rheum.* 38: 164-172, 1995.
38. Yamada, H., T. Kikuchi, O. Nemoto, K. Obata, H. Sato, M. Seiti, and M. Shinmei. Effects of indomethacin on the production of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by human articular chondrocytes. *J. Rheumatol.* 23: 1739-1743, 1996.

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

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

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

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

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

Introduction

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

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

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

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

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

Methods

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

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

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

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

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

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

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

In vitro ^{35}S incorporation in patellar cartilage. A proteoglycan synthesis assay was performed as described by Van Den Berg [12] with some modifications. Briefly, after the rats had been killed, the patellae from the arthritic joints and the saline-injected control joints were dissected leaving as little non-cartilaginous tissue around the cartilage as possible. The patellae were incubated for 3 h at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere in 2.5 ml of a medium consisting of RPMI Hepes and RPMI- HCO_3 supplemented with penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), L-glutamine (2mM) (Sigma, St Louis, MO, USA) and 2.5 μCi ^{35}S -sulfate per patella (Radiochemical Centre, Amersham, UK). At the end of the incubation period, the patellae were washed with saline at 4°C and fixed overnight in 0.5% cetylpyridinium chloride in phosphate-buffered formalin. After decalcification in 5% formic acid, the patellae could be easily punched out from the surrounding tissue with a biopsy punch (Stiefel, 2 mm diameter). After solubilization in Soluene, the ^{35}S content of each patella (both the punched-out and the peripheral patellae), which is a reliable measure of the sulfated GAG content, was measured by liquid scintillation counting (Hionic Fluor, Packard).

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

Results

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

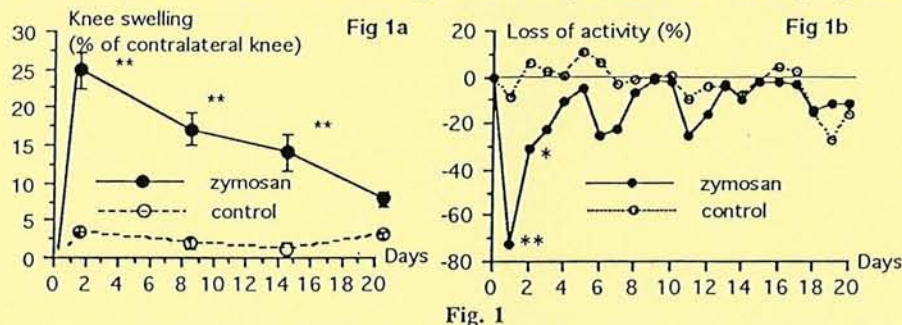


Fig. 1

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

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

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

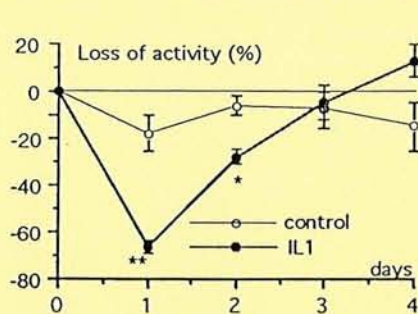


Fig. 2

Locomotor activity after *ia* injection with 1 μ g of IL1 β in both knees. Control rats received equal volume of RPMI-HSA. Results are expressed as mean $\pm$ SEM ($n=8$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (Student's *t* test).

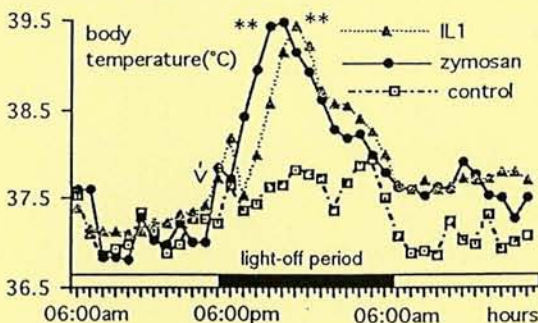


Fig. 3

Effects of *ia* injections (at arrow) into rat's knee joints of zymosan (2 mg), IL1 (1 μ g) and saline at 5:00 pm on temperature. Values are means ($n=8$) of body temperature recorded every hour via biotelemetry devices. For sake of clarity error bars have not been depicted. ** $p<0.01$ (Student's *t* test).

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

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

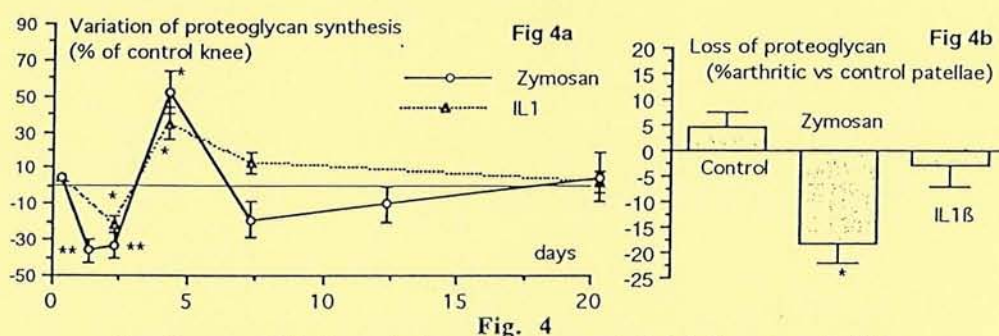


Fig. 4
Cartilage metabolism during zymosan- and IL1-induced arthritides

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

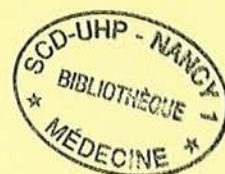
Fig 4b. Cartilage proteoglycan loss 20 days after IL1 (1 μg) and zymosan (2 mg) *ia* challenges. The GAG content of the patellae was measured by the 1.9 DMB assay. Patellar cartilage proteoglycan content is expressed as % of GAG in the right arthritic knee ($n=10$ for each batch) relative to that in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

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

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

Discussion

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



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

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

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

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

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

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

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

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

ACKNOWLEDGMENTS

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

REFERENCES

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

Nom : GUINGAMP
Prénom : Corinne

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en BIOLOGIE ET SANTÉ

Spécialité : SCIENCES DU MÉDICAMENT

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 22 juillet 1999

Le Président de l'Université

