



HAL
open science

Etude de l'interaction entre 14-3-3 epsilon et CD13/APN dans la communication os/cartilage au cours de l'arthrose

Meriam Nefla

► **To cite this version:**

Meriam Nefla. Etude de l'interaction entre 14-3-3 epsilon et CD13/APN dans la communication os/cartilage au cours de l'arthrose. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT: 2016PA066285 . tel-01497645

HAL Id: tel-01497645

<https://theses.hal.science/tel-01497645>

Submitted on 29 Mar 2017

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

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

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Présentée par

Meriam NEFLA

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de thèse :

**Etude de l'interaction entre 14-3-3 ϵ et CD13/APN dans la
communication os/cartilage au cours de l'arthrose**

Soutenue le 27 septembre 2016 devant le jury composé de :

Pr. Francis BERENBAUM

Pr. Bruno FEVE

Pr. Frédéric MALLEIN-GERIN

Pr. Rik Lories

Dr. David MOULIN

Dr. Eric HAY

Dr. Sylvie BABAJKO

Directeur de thèse

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examinatrice

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Professeur *Bruno Fève* de m'avoir accueillie au sein de l'unité UMR_938 du CDR St-Antoine et d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

Je remercie les Pr. *Frédéric Mallein-Gerin* et *Rik Lories* d'avoir accepté avec spontanéité la fonction de rapporteur. Je les remercie sincèrement de l'intérêt qu'ils portent à nos travaux.

Je remercie également les Dr. *David Moulin*, *Eric Hay* et *Sylvie Babajko* d'avoir accepté la fonction d'examineur pour ce travail et pris le temps de lire ce manuscrit. Leurs expertises me seront précieuses.

Je remercie *Francis Berenbaum* de m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir initiée à la recherche dans le domaine de l'arthrose. Je le remercie également pour la confiance qu'il m'a accordée et ses conseils précieux durant ce travail de thèse.

Je remercie chaleureusement *Claire Jacques* pour toutes les connaissances qu'elle m'a permises d'acquérir durant ces trois années. Je lui suis également reconnaissante de m'avoir assurée un encadrement rigoureux tout au long de ces années de thèse, tout en me donnant la possibilité de trouver par moi-même mon cheminement personnel. C'est sincèrement elle qui m'a fournie d'emblée le code de ma démarche. Elle a toujours été pour moi le "manager" inlassable. Je la remercie bien évidemment pour sa disponibilité, son humour et ses qualités humaines. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie sincèrement *Laure Sudre*, pour sa sympathie, son aide et ses conseils durant ces années. Merci pour tous les temps partagés au bureau mais aussi à l'animalerie et durant les expériences du Biacore !

Je remercie également tous les autres membres de l'équipe, passés et présents, *Marie-Charlotte Laiguillon* pour son encadrement sur la paillasse au début de ma thèse mais aussi *Danièle Citadelle*, *Alice Courties*, *Florent Eymard*, *Xavier Houard*, *Maria Luisa Perez-Lozano*, *Audrey Pigenet*, *Jéremie Sellam*, *Carlos Vaamonde-Garcia* et *Sandy Van Eegher* pour leur gentillesse, leur aide et pour tous les bons moments partagés ensemble.

Je tiens à remercier également *Gwenaëlle André-Leroux* de l'unité de Microbiologie Structurale de l'Institut Pasteur et de l'unité de « Mathématiques et Informatique Appliquées du Génome à l'Environnement » de l'INRA, pour sa bienveillance et son aide précieuse pour les études *in silico*.

Mes remerciements vont également à *Tatiana Ledent* ainsi que tous les personnels de l'animalerie de centre de recherche Saint-Antoine pour leur aide durant les expériences *in vivo* et leur gentillesse.

Je tiens à remercier également tous les membres de l'équipe d'*Isabelle Limon* et d'*Yves le Bouc* pour leur gentillesse et leur sympathie.

Merci également à Anissa, Marion, Sabine et Cindy pour leur bonne humeur et l'ambiance agréable qu'elles ont créée durant cette dernière année de thèse.

Je remercie infiniment ma famille qui m'a procurée tous les moyens possibles pour me mettre sur le chemin de l'amour de l'éducation et de la science. A mes parents, qui malgré la distance ont toujours su être présents pour moi. Merci pour votre amour, vos conseils et votre soutien. Merci également à mes chers frères, ma chère sœur et son mari qui m'ont constamment encouragée et soutenue tout au long de mes années d'étude.

Enfin, mes remerciements ne seraient pas complets sans mentionner toutes les personnes qui m'ont accompagnée et soutenue tout au long de mes années d'étude. Je pense plus particulièrement à mes oncles et mes tantes qui m'encouragent sans répit pour réaliser mes ambitions.

Une pensée particulière à mon oncle *Touhami* qui n'a cessé de m'aider à me surpasser pour atteindre mes objectifs. Malgré ton absence, tu resteras toujours gravé dans ma mémoire !

Un immense merci à tous mes amis pour leurs encouragements et leur confiance quant à l'aboutissement de cette thèse. Un grand merci à *Awatef* pour sa patience et son aide dans la mise en page de ce manuscrit !

Je ne peux pas oublier à la fin mes chers petits neveux *Bilel, Youssef, Firas, Omar, Taki* et le petit *Karim* qui auront peut être un jour l'envie de lire cette thèse. Merci pour l'amour que vous me témoignez toujours !

Résumé

Etude de l'interaction entre 14-3-3ε et CD13/APN dans la communication os/cartilage au cours de l'arthrose

L'arthrose est la pathologie articulaire la plus fréquente, caractérisée notamment par une destruction progressive du cartilage articulaire et impliquant une communication anormale entre l'os sous-chondral et le cartilage. Le remodelage excessif et l'altération phénotypique des cellules du tissu osseux, au cours de l'arthrose, perturberaient la communication biochimique entre les deux tissus. Cette altération permet la transmission de signaux osseux anormaux favorisant ainsi la dégradation du cartilage. Récemment, notre équipe a identifié la protéine 14-3-3ε, comme un médiateur soluble sécrété par l'os, sous l'effet d'un stress mécanique. Ce médiateur est capable d'altérer l'homéostasie du cartilage en stimulant l'expression des métalloprotéases matricielles (MMP), impliquées dans la dégradation du cartilage. CD13/APN, identifié à la surface des fibroblastes comme récepteur potentiel de 14-3-3σ, pourrait représenter le récepteur de 14-3-3ε à la surface des chondrocytes et assurer ainsi la réception et la transmission de son signal.

L'objectif de ce travail de thèse est de mieux comprendre les interactions biochimiques délétères existant entre l'os et le cartilage au cours de l'arthrose, en étudiant le rôle de CD13/APN, en tant que récepteur de 14-3-3ε mais aussi en tant qu'enzyme aminopeptidase N (APN) dans les chondrocytes.

Tout d'abord, l'expression de CD13/APN a été mise en évidence dans les chondrocytes articulaires murins et humains. Son invalidation, par la stratégie de siRNA, réduit significativement l'effet catabolique chondrocytaire induit par 14-3-3ε. Les chondrocytes murins et humains possèdent une activité APN mais elle n'est pas modifiée en présence de 14-3-3ε. L'invalidation de CD13/APN par des anticorps bloquants, n'ayant aucun effet sur son activité APN, montre que la diminution de l'expression et de la libération de MMP malgré la stimulation des chondrocytes par 14-3-3ε est bien due à la suppression de la fonction récepteur de CD13/APN et non à la suppression de son activité enzymatique.

Ensuite, nous avons mis en évidence la présence d'une interaction directe entre 14-3-3ε et CD13/APN grâce à la technologie SPR (Surface Plasmon Resonance) et le système Biacore. En utilisant 14-3-3ε marquée à la biotine, nous avons montré que 14-3-3ε est capable de se lier à la surface des chondrocytes via CD13/APN. Il était indispensable ensuite d'identifier les motifs impliqués dans cette interaction. Nous avons donc eu recours aux études de modélisation *in silico* qui ont permis d'identifier le résidu Y582 phosphorylé appartenant à la séquence E⁵⁷⁹FNYVW⁵⁸⁴ de CD13/APN, comme résidu indispensable pour sa liaison à 14-3-3ε.

Enfin, le rôle de 14-3-3ε dans l'établissement des lésions arthrosiques a été évalué *in vivo*. L'injection intra-articulaire de cette protéine chez la souris semble être capable d'altérer l'intégrité de la surface du cartilage articulaire. L'implication de CD13/APN dans cet effet a été étudiée *in vivo*, en injectant 14-3-3ε chez des souris invalidées pour CD13/APN ou en stimulant par 14-3-3ε des chondrocytes déficients pour CD13/APN. Nos résultats préliminaires ne permettent pas de distinguer clairement la différence entre les lésions du cartilage induites par 14-3-3ε chez les souris CD13^{-/-} et celles induites chez les souris sauvages. Cependant, la déficience en CD13/APN chez la souris semble réduire l'effet de 14-3-3ε sur la surexpression chondrocytaire de MMP.

La réalisation de ce travail de thèse a donc permis une meilleure compréhension des interactions biochimiques délétères existant entre l'os et le cartilage au cours de l'arthrose. Ainsi, la protéine 14-3-3ε pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique et/ou un nouveau biomarqueur de l'arthrose et son interaction avec CD13 pourrait également être ciblée dans cette maladie.

Mots clés : arthrose - cartilage - os sous-chondral - 14-3-3ε - CD13/APN

Abstract

Study of interaction between 14-3-3 ϵ and CD13/APN in bone /cartilage communication during osteoarthritis

Osteoarthritis (OA) is the most common joint disease, characterized by a progressive destruction of articular cartilage and involving abnormal communication between subchondral bone and cartilage. Excessive remodeling and phenotypic alteration of bone cells, during osteoarthritis, would disrupt biochemical communication between the two tissues, allowing the transmission of abnormal bone signals that promote cartilage breakdown. Recently, our team has identified the protein 14-3-3 ϵ as a soluble mediator secreted by bone, in response to mechanical stress. This mediator is able to alter the homeostasis of cartilage by stimulating the expression of matrix metalloproteases (MMP) involved in cartilage degradation. CD13/APN, identified on the surface of fibroblasts as a potential receptor of 14-3-3 σ , could represent also the receptor of 14-3-3 ϵ on the surface of chondrocytes and thus ensure the reception and transmission of its signal. The aim of this work was to better understand the existing deleterious biochemical interactions between bone and cartilage in OA, by studying the role of CD13/APN, as a receptor of 14-3-3 ϵ but also as an enzyme aminopeptidase N (APN) in chondrocytes. First, the expression of CD13 / APN has been demonstrated in murine and human articular chondrocytes. Its invalidation, using the siRNA strategy, reduces significantly the catabolic effect induced by 14-3-3 ϵ in chondrocytes. Murine and human chondrocytes possess APN activity, unchanged in the presence of 14-3-3 ϵ . Invalidation of CD13 / APN by blocking antibodies, without any effect on its APN activity, shows that the decrease in the expression and release of MMP despite the stimulation of chondrocytes by 14-3-3 ϵ is due to the abolition of the receptor function of CD13/APN and not to the abolition of its enzymatic activity.

Then, we have revealed the presence of a direct interaction between 14-3-3 ϵ and CD13/APN through the SPR (Surface Plasmon Resonance) and the Biacore system. Using biotin-labeled 14-3-3 ϵ , we have shown that 14-3-3 ϵ is able to bind to the surface of chondrocytes in a manner that is dependent on CD13/APN. It was then necessary to identify the putative motifs involved in this interaction. We therefore used *in silico* modelling studies which have identified the phosphorylated residue Y582, belonging to the E⁵⁷⁹FNYVW⁵⁸⁴ sequence of CD13/APN, as a critical residue for its binding to 14-3-3 ϵ .

Finally, the role of 14-3-3 ϵ in establishing OA lesions was evaluated *in vivo*. Intra-articular injection of this protein in mice seems to alter the integrity of the articular cartilage surface. The involvement of CD13/APN in this effect was studied *in vivo* by injecting 14-3-3 ϵ in mice invalidated for CD13/APN or by stimulating deficient chondrocytes for CD13/APN by 14-3-3 ϵ . Our preliminary results do not allow us to distinguish clearly the difference between cartilage damage induced by 14-3-3 ϵ in CD13 - /- mice and those induced in wild-type mice. However, the deficiency in CD13/APN seems to reduce 14-3-3 ϵ effect on overexpression of MMP in mice chondrocytes.

Thus, this thesis work allows a better understanding of the existing deleterious biochemical interactions between bone and cartilage in OA. Taking together, these data designate 14-3-3 ϵ as a novel protein to be explored in OA either for therapeutic or for prognostic purposes and its interaction with CD13 could be a novel target in OA.

Key word: osteoarthritis – cartilage - subchondral bone - 14-3-3 ϵ - CD13/APN

Abréviations

2D-DIGE	2-dimensional differential in-gel electrophoresis
ACL	ligament croisé antérieur
ACPA	anti-citrullinated protein antibodies
ACTL	section du ligament croisé antérieur
ADAMTS	a disintegrin and a metalloproteinase with a thrombospondin motif
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AGG	Aggrécane
ANOVA	One-way analysis of variance
APN	aminoperptidase N
APNi	aminopeptidase N inhibitor
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
bFGF	basic fibroblast growth factor
BML	bone marrow lesions
BMP	bone morphogenetic protein
Ca	Calcium
CD-RAP	cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein
CHARMM	Chemistry at HARvard Molecular Mechanics
COL2A1	collagène de type II
COL11A2	collagène de type XI a2
COMP	cartilage oligomeric protein
CRP	protéine C réactive
DEAE	Diéthylaminoéthyle
DMEM	Dubbecco's modified Eagle's medium
DMM	déstabilisation du ménisque median
DMP	dental mineral protein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinases
GAG	Glycosaminoglycanes
GAPDH	glyceraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase

GDF5	facteur de croissance de la différenciation 5
Glu	L-glutamine
HAM F12	HAM's nutrient mixtures F-12
HGF	hepatocyte growth factor
HCMV	cytomégalovirus humain
HCoV	coronavirus humain
HMGB1	High mobility group box 1
HPRT	hypoxanthine phosphoribosyltransferase
HPLC	high performance liquid chromatography
ICAT	isotope coded affinity tag
IFN	Interferon
IGF	insulin growth factor
IL	Interleukine
IMC	indice de masse corporelle
IRM	imagerie par résonance magnétique
IRS	Insulin receptor substrate
iTRAQ	isobaric tag for relative and absolute quantification
JNK	Jun N-terminal kinase
K	lysine (Lys)
LCR	liquide céphalo-rachidien
LDH	lactate déshydrogénase
Leu	Leucine
LMTL	ligament ménisco-tibia latéral
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEC	matrice extracellulaire cartilagineuse
MMP	métalloprotéases matricielles
MMTL	ligament ménisco-tibia median
Msx2	Msh homeobox homolog-2
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NLS	nuclear localisation sequence
OMERACT	Outcome Measures in Rheumatology
OPG	Ostéoprotégérine

OMS	organisation mondiale de la santé
OxPAPC	1-palmytoyl-2arachidonyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine oxydé
PAL	phosphatase alcaline
PBS	phosphate buffered saline
PDB	Protein Data Bank
PFA	Paraformaldéhyde
PGE2	prostaglandine E-2
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PK	protein kinase
PR	polyarthrite rhumatoid
PS	penicillin streptomycine
PTG	prothèse totale de genou
PTH	Parathormone
R	arginine (Arg)
RANK	receptor activator of nuclear factor kB
RANK-L	receptor activator of nuclear factor kB Ligand
RECK	Reversion-inducing Cysteine-rich protein with kazal motifs
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RT-qPCR	Reverse Transcription et PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative
Runx	runt-domain transcription factor
RU	resonance unit
SDK1	sphingosine dependent protein kinase 1
SEM	Standard Error of the Mean
siRNA	small interfering RNA
SOST	Sclérostine
Sox 9	sex determining region Y – box 9
SPR	surface plasmon resonance
SVF	sérum de veau fœtal
TGF	transforming growth factor
TIMP	tissue inhibitors of metalloproteinase
TNF	tumour necrosis factor
tPa	tissue-type plasminogen activator
TRAP	tartrate resistant acid phosphatase

uPa	urokinase-type plasminogen activator
Val	Valine
VEGF	vascular endothelial growth factor
WT	wild-type
Y	Tyrosine

Table des matières

Avant-propos	19
Données bibliographiques.....	23
A. L'articulation : structure et fonction.....	25
1. Structure globale	25
2. Cartilage articulaire	26
2.1. Structure et composition du cartilage articulaire	26
2.2. Organisation du cartilage articulaire :	29
2.3. Homéostasie du cartilage articulaire.....	30
3. Os sous-chondral	32
3.1. Structure et Fonction.....	32
3.2.1. La matrice osseuse	34
3.2.2. Les cellules osseuses	34
B. L'arthrose	38
1. Définition, prévalence et incidence.....	38
2. Facteurs de risque	41
3. L'arthrose est une maladie multi-tissulaire.....	43
4. Modèles animaux arthrosiques.....	46
5. Tissus articulaires arthrosiques	48
5.1. Cartilage articulaire arthrosique	48
5.1.1. Modifications macroscopiques et histologiques.....	48
5.1.2. Modifications matricielles	50
5.1.3. Modifications cellulaires.....	51
5.1.4. Rôle des enzymes protéolytiques dans la dégradation du cartilage.....	52
5.2. L'os sous-chondral arthrosique	58
5.2.1. Caractéristiques de l'os sous-chondral arthrosique.....	58
5.2.2. Effet du stress mécanique sur l'os sous-chondral	64
6. Communication entre l'os sous-chondral et le cartilage: rôle dans l'arthrose.....	65
6.1. Mise en évidence des interactions entre os sous-chondral et cartilage au cours de l'arthrose	66
6.1.1. Lien entre le remodelage osseux et la dégradation du cartilage	66
6.1.2. Lien entre la formation des œdèmes médullaires, des kystes sous-chondraux et des ostéophytes et la dégradation du cartilage.....	67

6.2.	Interactions mécaniques entre os et cartilage.....	68
6.3.	Interactions biochimiques entre os et cartilage.....	69
6.4.	Modèles d'étude de la communication os/cartilage.....	70
6.4.1.	Modèles de co-culture directe ostéoblastes/chondrocytes	70
6.4.2.	Modèle de co-culture indirecte ostéoblastes/chondrocytes	71
6.5.	Structures impliquées dans la communication biochimique entre os et cartilage.....	75
6.6.	Médiateurs identifiés dans la communication os/cartilage	79
C.	Les protéines 14-3-3	84
1.	Structure.....	85
2.	Fonctions intracellulaires	88
3.	Régulation.....	91
4.	Implications pathologiques	91
5.	Les protéines 14-3-3 extracellulaires	92
5.1.	Mécanisme de sécrétion des protéines 14-3-3.....	93
5.2.	Les fonctions des protéines 14-3-3 sécrétées	95
D.	CD13/APN.....	98
1.	Structure et mécanismes d'action.....	98
1.1.	Structure :.....	98
1.2.	Mode d'action	101
1.3.	Fonctions biologiques.....	102
1.3.1.	Fonction enzymatique.....	103
1.3.2.	Fonction de récepteur et de transduction du signal	106
2.	Implications pathologiques :	109
2.2.	CD13/APN : une cible thérapeutique	113
2.2.1.	Anticorps bloquants et inhibiteurs pharmacologiques:.....	113
2.2.2.	Modèles <i>in vivo</i> de CD13/APN : Souris invalidées pour CD13/APN	115
	Interaction entre CD13/APN et 14-3-3ϵ (Etudes <i>in vitro</i>).....	121
	Article : "The pro-inflammatory cytokine 14-3-3ϵ is a ligand of CD13 in cartilage"	133
	Injection intra-articulaire de 14-3-3ϵ chez les souris WT et CD13$^{-/-}$ (Etudes <i>in vivo</i>)...	151
A.	Objectifs	153
B.	Matériels et méthodes	153
1.	Animaux.....	153

2. Culture primaire et stimulation de chondrocytes articulaires provenant de souriceaux CD13 -/- ou de souriceaux WT	154
3. Extraction-RT-qPCR	155
4. Injection intra-articulaire de 14-3-3ε aux souris	156
5. Analyses histologiques	157
6. Tests statistiques	157
C. Résultats	158
1. Phénotype des souris CD13-/-	158
2. Etude de l'expression de MMP-13, après stimulation par 14-3-3ε, dans les chondrocytes articulaires provenant des souris CD13-/-	159
3. Evaluation de l'effet de l'injection intra-articulaire de 14-3-3ε chez les souris WT	160
4. Evaluation de l'effet de l'injection intra-articulaire de 14-3-3ε chez les souris CD13 -/-	163
Discussion	167
A. Interaction directe entre 14-3-3ε et CD13/APN <i>in vitro</i>	169
B. Rôle de 14-3-3ε dans un modèle murin : Injection intra-articulaire <i>in vivo</i>	171
C. Les protéines 14-3-3 sécrétées dans les pathologies articulaires humaines : nouveaux biomarqueurs ?	173
D. 14-3-3ε serait-elle une nouvelle alarmine sécrétée au cours de l'arthrose?	175
Revue: "The danger from within: alarmins in arthritis"	177
Conclusions et perspectives	221
Références	229

Table des figures et tableaux

Figure 1: Structure et organisation d'une articulation saine : exemple de l'articulation du genou.	25
Figure 2 : Composition du cartilage articulaire visualisée sur une coupe histologique.	26
Figure 3 : Photographie d'un chondrocyte en microscopie électronique.	27
Figure 4 : Schéma représentatif de la composition du cartilage articulaire en couche.	30
Figure 5 : Représentation de l'équilibre entre anabolisme et catabolisme au sein du cartilage articulaire.	31
Figure 6 : Schéma représentatif de l'organisation de l'os sous-chondral.	33
Figure 7 : Représentation schématique des cellules de la lignée ostéoblastique et de leur localisation.	36
Figure 8 : Représentation schématique des cellules de la lignée ostéoclastique.	37
Figure 9 : Radiographies des articulations les plus touchées par l'arthrose.	39
Figure 10: Classification radiologique de la sévérité de la gonarthrose selon l'index composite Kellgren-Lawrence.	40
Figure 11 : Modifications des tissus de l'articulation au cours de l'arthrose.	44
Figure 12 : La physiopathologie de l'arthrose.	45
Figure 13: Le modèle murin d'arthrose DMM.	47
Figure 14 : coupes histologiques d'articulations murines de genoux, colorées à la Safranin O et au Vert Lumière.	48
Figure 15 : Altération de l'homéostasie du cartilage articulaire au cours de l'arthrose.	49
Figure 16: Coupe histologique d'un cartilage sain (panel gauche) et d'un cartilage arthrosique (panel droit).	50
Figure 17: Régulation de l'expression, de la sécrétion et de l'activité des MMP.	57
Figure 18 : Radiographie de genou arthrosique.	59
Figure 19 : Radiographie d'une articulation arthrosique.	61
Figure 20 : Schéma du modèle murin de communication os/cartilage.	73
Figure 21 : Présentation du système Flexercell.	74
Figure 22: Modifications structurales de l'unité os/cartilage au cours de l'arthrose.	76
Figure 23 : Les micro-fissures ostéochondrales.	77
Figure 24 : Coup histologique montrant un canal vasculaire franchissant la jonction ostéochondrale dans le cas d'une arthrose humaine.	78

Figure 25 : Analyse iTRAQ des milieux conditionnés d'ostéoblasts/ostéocytes et Schéma du tag iTRAQ®.....	82
Figure 26 : Résultats obtenus à partir des analyses de sécrétomique différentielle,	83
Figure 27 : Structure des protéines 14-3-3.	86
Figure 28 : Comparaison structurelle des sept isoformes humaines de protéines 14-3-3.	87
Figure 29 : Modes d'action des protéines 14-3-3 sur leurs protéines cibles.	90
Figure 30 : Schéma de la biogenèse et de la libération des exosomes.	94
Figure 31 : Modèle schématique de la structure tridimensionnelle de CD13/APN humain	99
Figure 32 : Les changements conformationnels possibles de CD13/APN associés à la liaison du substrat.	101
Figure 33 : Les changements conformationnels de CD13/APN	102
Figure 34 : Schéma du dosage de l'activité enzymatique aminopeptidase N	124
Figure 35 : Schéma d'une réflexion totale d'une lumière polarisée monochromatique engendrant une onde évanescente.	126
Figure 36 : Sensor Chip CM5.....	127
Figure 37 : Principe de la résonance plasmonique de surface (SPR) et le profil du sensorgramme.....	128
Figure 38 : Création des souris CD13 ^{-/-}	153
Figure 39 : Analyse des produits de PCR des souris après leur séparation sur un gel d'agarose 1.5%.....	154
Figure 40 : Isolation, culture et stimulation des chondrocytes murins.....	155
Figure 41 : Comparaison des poids des souris CD13 ^{-/-} et des souris WT.....	158
Figure 42 : Phénotype ostéo-articulaire des souris CD13 ^{-/-} en comparaison avec les souris WT.....	159
Figure 43 : Effet de la protéine 14-3-3 ϵ sur l'expression de MMP-13 dans les chondrocytes CD13 ^{-/-}	160
Figure 44 : Modifications histologiques après l'injection intra-articulaire de 14-3-3 ϵ aux souris WT.....	162
Figure 45 : Modifications histologiques après l'injection intra-articulaire de 14-3-3 ϵ aux souris CD13 ^{-/-} para rapport aux souris WT.....	164
Figure 46 : Détection de la protéine 14-3-3 ϵ dans le liquide synovial (A) et le milieu conditionné d'os arthrosique humain(B).....	174
Figure 47 : Rôle de 14-3-3 ϵ et de CD13/APN dans la communication os/cartilage au cours de l'arthrose.....	223

Figure 48 : Effet des anticorps bloquants anti-TLR2 et anti TLR4 sur l'expression de MMP-3 et MMP-13 dans les chondrocytes articulaires murins en réponse à la protéine 14-3-3ε.....	226
Figure 49 : Effet d'un inhibiteur pharmacologique (OxPAPC) sur l'expression de MMP-3 et MMP-13 dans les chondrocytes articulaires murins en réponse à la protéine 14-3-3ε.....	227
Tableau 1 : Les différents phénotypes cliniques de l'arthrose.....	43
Tableau 2 : Score semi-quantitatif OARSI.....	47
Tableau 3 : Les protéases impliquées dans la dégradation de la matrice du cartilage.....	53
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des isoformes des protéines 14-3-3 détectées dans les milieux extracellulaires.....	97
Tableau 5 : Liste des substrats clivés par l'activité Aminopeptidase N.....	105
Tableau 6 : Protocole d'amplification par qPCR.....	156
Tableau 7 : Amorces utilisées (S : Sens ; AS: Anti-sens) pour la qPCR.....	156

Avant-propos

L'arthrose est une pathologie dégénérative de l'articulation caractérisée notamment par la dégradation du cartilage en réponse à des facteurs mécaniques et biochimiques. Cette pathologie, dont les manifestations cliniques sont des douleurs et une gêne fonctionnelle, est la pathologie articulaire la plus fréquente et une des principales causes d'handicap dans le monde (Roman-Blas et al. 2016). Elle est estimée représenter la plus grande cause d'invalidité dans la population générale en 2030 (Thomas et al. 2014). Ses principaux facteurs de risque étant le vieillissement et la surcharge mécanique (obésité), l'arthrose représente un problème de santé publique majeur qui devrait s'intensifier dans les années à venir. S'il existe à l'heure actuelle des moyens pour soulager la douleur et limiter la gêne fonctionnelle, aucun traitement spécifique, n'est capable d'arrêter ou de ralentir la progression de la maladie (Roman-Blas et al. 2016). De plus, le diagnostic précoce de la maladie, avant le développement des altérations fonctionnelles et structurelles de l'articulation, nécessite l'identification puis la détection chez les patients de biomarqueurs spécifiques et sensibles (Bay-Jensen et al. 2016, Mobasher et Henrotin 2016).

L'arthrose a longtemps été décrite comme une pathologie du cartilage articulaire uniquement, due à l'usure de ce tissu. Cependant, il est à présent admis que cette pathologie est la conséquence d'un remodelage anormal de tous les tissus de l'articulation. La dégradation du cartilage, l'inflammation de la membrane synoviale et les changements de l'os sous-chondral sont impliqués dans l'initiation et la progression de la maladie (Wei et Bai 2016). De nombreuses données indiquent aussi qu'au cours de l'arthrose, les atteintes des différents tissus sont étroitement liées suggérant que tous les tissus sont capables d'interagir ensemble. L'os sous-chondral et son interaction avec le cartilage articulaire sont de plus en plus impliqués dans la physiopathologie de cette maladie (McAlindon 2015, Osterberg et al. 2016). Plusieurs médiateurs solubles produits par les deux tissus peuvent passer d'un compartiment à un autre, affectant ainsi l'homéostasie du tissu voisin. Ces médiateurs peuvent jouer un rôle puissant dans l'initiation et/ ou la progression de l'arthrose. Une meilleure compréhension de cette communication pourrait ainsi aider à développer un diagnostic précoce de la maladie et à améliorer les stratégies thérapeutiques existantes.

Pour étudier le rôle de la communication entre os et cartilage au cours de l'arthrose, notre équipe a établi un modèle de compression cyclique des ostéoblastes murins qui mime un stress mécanique observé au cours de l'arthrose. L'analyse des milieux conditionnés d'ostéoblastes grâce à la technique de sécrétomique différentielle iTRAQ, a permis à notre

équipe d'identifier la protéine 14-3-3 ϵ comme médiateur de cette communication (Priam et al. 2013). Au niveau chondrocytaire, ce médiateur est capable d'induire un phénotype catabolique (notamment via la sécrétion de MMP-3 et-13) proche de celui observé au cours de l'arthrose. 14-3-3 ϵ appartient à la famille des protéines 14-3-3 (7 isoformes connues) qui participent à des nombreux processus intracellulaires primordiaux mais également à une fonction de messenger extracellulaire récemment décrite.

Afin de mieux comprendre la communication os/cartilage dans la physiopathologie de l'arthrose, ce travail de thèse s'est consacré à étudier le rôle de la protéine 14-3-3 ϵ , identifier son récepteur à la surface des chondrocytes articulaires et étudier le rôle de leur interaction dans le développement de lésions arthrosiques.

Données bibliographiques

A. L'articulation : structure et fonction

1. Structure globale

Une articulation se compose de deux os en regard, recouverts à leurs extrémités de cartilage articulaire, tissu conjonctif élastique. Il assure la lubrification des surfaces de contact entre les deux extrémités osseuses, permettant ainsi leur glissement l'une contre l'autre (**Figure 1**).

Les deux épiphyses osseuses du tibia et du fémur sont reliées en périphérie par la capsule articulaire, tissu conjonctif fibreux assurant la stabilité de l'articulation. Ce tissu est doublé par les ligaments, les tendons et les muscles de l'articulation et délimite avec les surfaces cartilagineuses la cavité articulaire. Cette dernière est tapissée par la membrane synoviale, composée des synoviocytes, capable de sécréter le liquide synovial qui permet de nourrir et de lubrifier le cartilage (Blalock 2015).

Au niveau des épiphyses du tibia et du fémur, se trouvent les ménisques qui sont des structures fibrocartilagineuses développées notamment dans l'articulation du genou. Ils jouent un rôle important dans la stabilité des articulations, la répartition des contraintes et l'amortissement de l'articulation (Blalock 2015). Par conséquent, une déstabilisation du ménisque peut entraîner une augmentation des contraintes mécaniques subies par l'articulation et une perte de l'intégrité du cartilage articulaire.

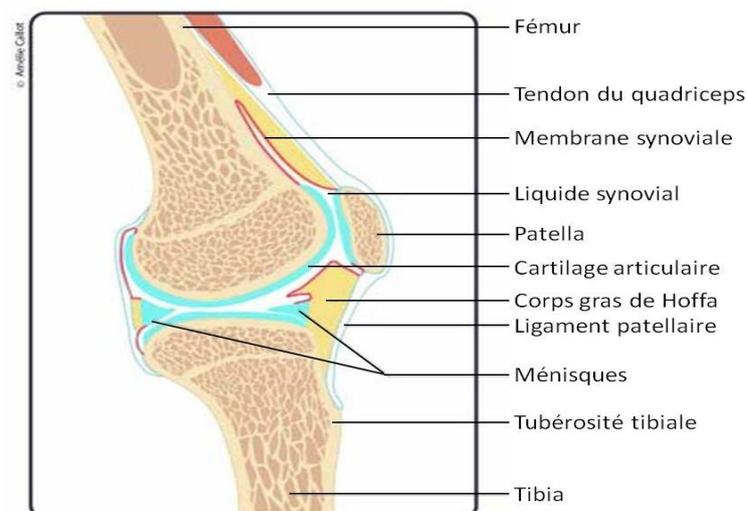


Figure 1: Structure et organisation d'une articulation saine : exemple de l'articulation du genou.

Les différents tissus de l'articulation sont étroitement interdépendants et liés entre eux par une communication constante afin d'assurer la mobilité de notre squelette et l'amortissement des contraintes mécaniques liées aux mouvements.

2. Cartilage articulaire

2.1. Structure et composition du cartilage articulaire

Le cartilage est un tissu conjonctif hautement spécialisé. Il recouvre les deux extrémités osseuses d'une articulation afin de leur permettre de glisser l'une contre l'autre avec un minimum de frictions. Chez l'homme, son épaisseur varie selon l'articulation, de 2 à 4 mm pour la hanche contre 6-7 mm pour le genou. Il permet, grâce à sa structure originale et ses propriétés viscoélastiques, d'amortir et de distribuer les chocs mécaniques appliqués sur l'articulation (Zhang et al. 2015).

Contrairement à la plupart des tissus, il est ni vascularisé ni innervé. Il se compose majoritairement d'une matrice extracellulaire (95%) et d'une unique population cellulaire, les chondrocytes (Zhang et al. 2015) (**Figure 2**).

Son architecture et sa composition sont strictement réglés par les chondrocytes en réponse à des changements chimiques et mécaniques (Glyn-Jones et al. 2015).

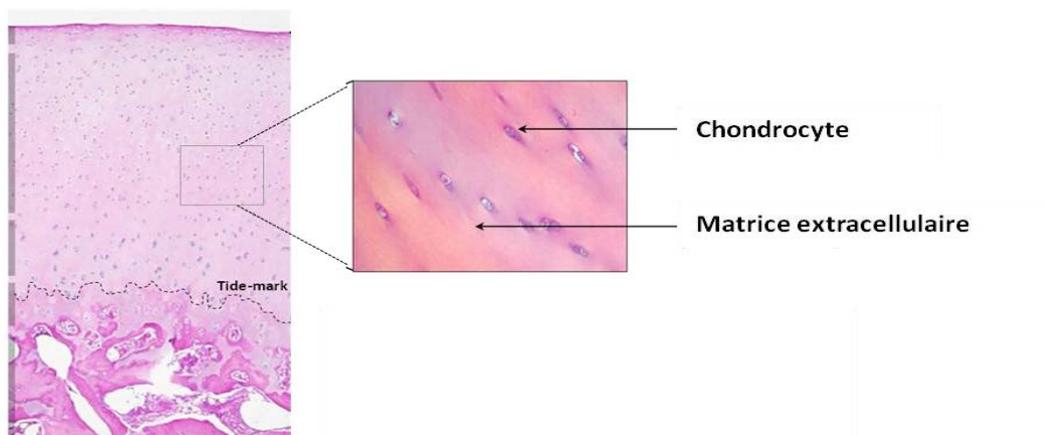


Figure 2 : Composition du cartilage articulaire visualisée sur une coupe histologique.

❖ Les chondrocytes

Les chondrocytes sont des cellules résidentes du cartilage articulaire de 10 à 30 µm de diamètre représentant environ 2% du volume total du cartilage articulaire (He et al. 2014). Leur forme, nombre et taille varient en fonction de la zone du cartilage (Sophia Fox et al. 2009). Ils sont généralement arrondis ou polygonaux sauf aux limites des tissus où ils peuvent être aplatis (Archer et Francis-West. 2003). Ils dérivent des cellules souches mésenchymateuses au cours du développement embryonnaire. Le facteur de transcription Sox9 est l'un des premiers marqueurs exprimés lors de cette différenciation. Il est indispensable pour l'expression du collagène de type II ainsi que d'autres protéines spécifiques de la matrice (COL11A2 et CD-RAP) (Goldring et al. 2006).

Les chondrocytes sont isolés au sein de la matrice extracellulaire. En raison de l'absence de vascularisation au sein du cartilage, ils sont en conditions d'hypoxie (Murphy et al. 2009). Sans apport direct des nutriments par des vaisseaux sanguins ou lymphatiques, les chondrocytes dépendent principalement du métabolisme anaérobie (Sophia Fox et al. 2009). Malgré cet isolement, les chondrocytes possèdent tous les organites nécessaires pour assurer l'homéostasie du tissu (

Figure 3).

L'oxygène et les nutriments proviennent de la capsule articulaire, la membrane synoviale et l'os sous-chondral (Houard et al. 2013).

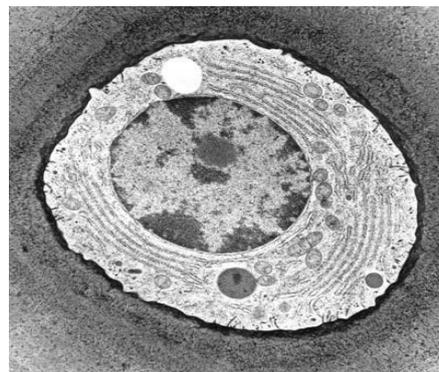


Figure 3 : Photographie d'un chondrocyte en microscopie électronique.

On peut observer un noyau, un réticulum endoplasmique, un appareil de golgi et des mitochondries. Source : www.master-biomed.ethz.ch/education/bio_courses.

Dans les conditions physiologiques, les chondrocytes maintiennent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des composants de la matrice extracellulaire, régulant de cette manière l'intégrité structurelle et fonctionnelle du cartilage (Musumeci et al. 2011, Houard et al. 2013). Ils jouent aussi un rôle dans la mécano-transduction permettant de modifier leur métabolisme en réponse aux modifications physico-chimiques dans le microenvironnement (Abramson et Attur. 2009). Ils détectent les contraintes mécaniques et les changements dans la MEC, essentiellement par des récepteurs pour les composants de la MEC. Les récepteurs aux intégrines, par exemple sont capables de répondre aux stimuli mécaniques ou inflammatoires entraînant une régulation positive des protéases matricielles (aggrécases et collagénases) (Houard et al. 2013).

❖ **La matrice extracellulaire cartilagineuse :**

La matrice extracellulaire cartilagineuse (MEC) se compose majoritairement d'eau (60-80% du poids total), des fibres du collagène (~15%), de protéoglycanes (~9%) et des glycoprotéines (~5%) (Zhang et al. 2015) :

- **Les collagènes** représentent le composant le plus abondant de la MEC. Le collagène de type II représente 90 à 95% de l'ensemble des collagènes. On retrouve aussi les collagènes de types I, IV, V, VI, IX et XI avec une proportion mineure mais qui assurent la stabilisation de réseau des collagène de type II (Sophia Fox et al. 2009). L'ensemble de ces collagènes forment un réseau tridimensionnel qui confère au tissu sa résistance et sa rigidité face aux déformations (Aigner, Sachse et al. 2006).
- **Les protéoglycanes** sont des protéines fortement glycosylées constituées d'un noyau protéique auquel s'attachent plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) de façon covalente (He et al. 2014). L'aggrécane est le protéoglycane le plus abondant possédant plus de 100 chaînes de chondroïtine sulfate et de kératane sulfate. Il est caractérisé par sa capacité à interagir avec l'acide hyaluronique par le biais de protéines de liaison (Sophia Fox et al. 2009). L'aggrécane avec l'acide hyaluronique contribuent à la lubrification et la viscoélasticité du tissu (Dudhia 2005). Le cartilage articulaire contient d'autres protéoglycanes tels la décorine, le biglycane et la fibromoduline caractérisées par leur capacité d'interagir avec le collagène (Sophia Fox et al. 2009).

- **Les glycoprotéines**, comme la fibronectine sont aussi présentes dans la MEC. Elles sont capables de se fixer aux collagènes et aux protéoglycanes (Bosman et Stamenkovic 2003) permettant ainsi d'augmenter la résistance du tissu.
- **Les protéines non collagéniques** comme COMP (cartilage oligomeric protein) existent dans la MEC. Cependant, leurs fonctions restent mal connues. Malgré cela, COMP est utilisé actuellement comme un biomarqueur sanguin, urinaire et synovial reflétant la dégradation du cartilage (Valdes et al. 2014, Hunter et al. 2007).

L'ensemble des composants de la MEC contribuent à la rétention d'eau, indispensable pour maintenir les propriétés mécaniques de la matrice (Sophia Fox et al. 2009).

2.2. Organisation du cartilage articulaire :

Le cartilage articulaire est organisé en différentes couches en fonction de leur composition et leurs propriétés mécaniques (**Figure 4**) :

- ❖ **La couche superficielle** représente environ 10 à 20% de la hauteur du cartilage. C'est la couche en contact avec le liquide synovial et responsable de la protection des autres couches profondes du cartilage contre les forces de cisaillement engendrées lors du mouvement, grâce à sa richesse en fibres de collagènes (principalement de type II et IX). Cette couche contient un grand nombre de chondrocytes aplatis (Sophia Fox et al. 2009).
- ❖ **La couche moyenne ou de transition** représente 40 à 60% du volume total du cartilage. Elle contient des protéoglycanes et des fibres plus épaisses de collagènes organisées dans un réseau entrecroisé et non orienté. Les chondrocytes de cette couche sont de forme sphérique et en faible densité. Fonctionnellement, cette zone est la première ligne de résistance aux forces de compression (Sophia Fox et al. 2009).
- ❖ **La couche profonde** représente 30 % de la totalité du cartilage. Elle assure une plus forte résistance aux forces de compression, grâce à sa composition. Elle est riche en protéoglycanes et en fibres de collagènes dispersées perpendiculairement à la surface articulaire. Les chondrocytes y sont typiquement disposés en colonnes parallèles aux fibres de collagène (Sophia Fox et al. 2009).

- ❖ **La couche calcifiée** représente 5 à 10% de la hauteur du cartilage. Elle est séparée de la couche profonde par la tide-mark, front de calcification du cartilage, et permet l'ancrage du cartilage à l'os sous-chondral. Les chondrocytes de cette couche sont hypertrophiques.

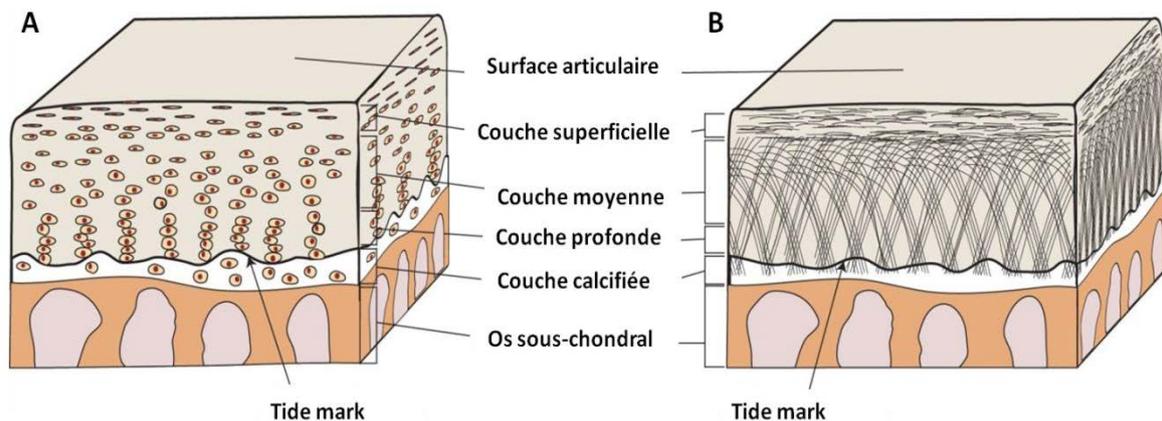


Figure 4 : Schéma représentatif de la composition du cartilage articulaire en couche.

(A) La disposition des chondrocytes en fonction de la profondeur des couches. (B) La disposition des fibres de collagène en fonction de la profondeur des couches. Adapté de (Zhang et al. 2015).

2.3. Homéostasie du cartilage articulaire

L'homéostasie du cartilage est assurée par le renouvellement de sa matrice dépendant du turnover des molécules qui la composent. La demi-vie de collagène de type II est estimée à plusieurs centaines d'années (Eyre et al. 2006). Ce n'est pas le cas des protéoglycanes dont la demi-vie est plus courte, son renouvellement est donc hautement régulé par les chondrocytes. L'homéostasie de la MEC est assurée par le maintien de l'équilibre entre la dégradation des différentes macromolécules et leur remplacement par des produits nouvellement synthétisés. Sa dégradation est assurée par la synthèse des enzymes protéolytiques, comme les métalloprotéases matricielles (MMP).

La physiologie des chondrocytes et le renouvellement de la matrice peuvent être influencés par de nombreux facteurs environnementaux, y compris la composition de la matrice, des médiateurs solubles (les facteurs de croissance et des cytokines) et des facteurs biophysiques

engendrés par un stress mécanique appliqué sur l'articulation (Wilusz et al. 2014). Le chondrocyte est responsable de ce renouvellement (Sherwood et al. 2014). Il maintient l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme afin de maintenir l'homéostasie du cartilage (Figure 5).

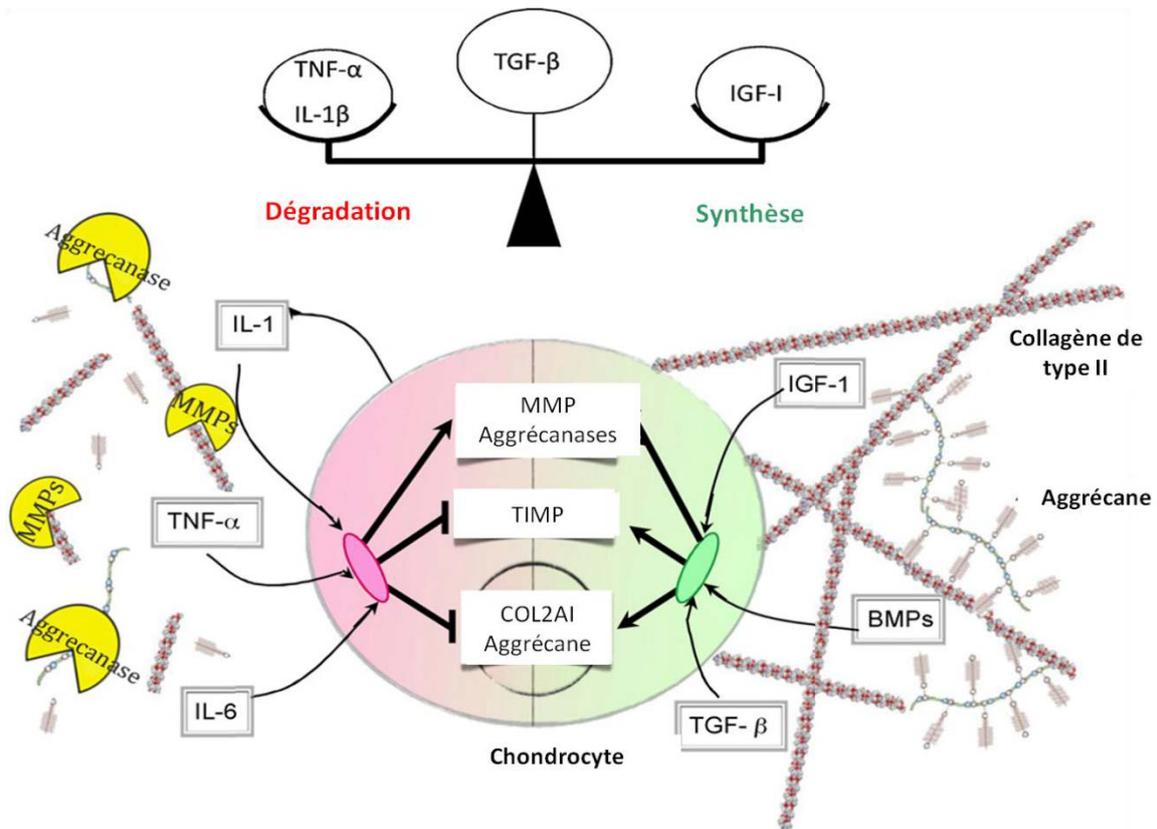


Figure 5 : Représentation de l'équilibre entre anabolisme et catabolisme au sein du cartilage articulaire.

Pour s'adapter aux différents stress (mécaniques et biochimiques) environnementaux, le chondrocyte sécrète des facteurs anaboliques (IGF-1, BMP, TGF- β) et pro-cataboliques (IL-1 β , TNF α , IL-6) qui régulent la synthèse et la dégradation des composants de la MEC. Adapté de (Demoor et al. 2012).

Quand il est soumis à un stress mécanique, le cartilage articulaire acquiert un phénotype viscoélastique. Cette capacité mécanique est liée à la composition de la MEC, notamment l'eau (Mow et al. 1984), les protéoglycanes et les fibres de collagène (Hayes et Bodine. 1978).

Le mouvement, lorsqu'il est cyclique et modéré, est bénéfique pour le cartilage. Il permet de maintenir le métabolisme du cartilage intact. En effet, lorsqu'une contrainte physique est exercée, le cartilage se déforme et la pression de l'eau augmente immédiatement. Ceci provoque l'expulsion des molécules d'eau hors de la MEC. Lorsque la pression est levée, l'eau rentre de nouveau dans le cartilage en apportant l'oxygène et les nutriments nécessaires pour le tissu. En revanche, un stress mécanique de forte intensité, excessif ou statique sera délétère pour le cartilage (Gosset et al. 2006).

3. Os sous-chondral

3.1. Structure et Fonction

L'os est un tissu conjonctif minéralisé constituant l'endosquelette des vertébrés. Il assure des fonctions vitales pour l'organisme. Tout d'abord, l'os joue un rôle mécanique important en protégeant les organes vitaux et en assurant un rôle de soutien grâce à sa solidité et ses propriétés mécaniques. D'autre part, il assure une fonction métabolique importante du fait de son rôle dans le stockage de plus de 90% du calcium et du phosphate de l'organisme. Enfin, il assure une fonction hématopoïétique. Il contient la moelle osseuse, le lieu de fabrication des cellules sanguines.

L'ensemble de ces fonctions est assuré par le dynamisme du tissu osseux. En effet, celui-ci est en perpétuel renouvellement et, tout au long de la vie, l'os va se remodeler pour répondre aux besoins de l'organisme et aux différentes contraintes environnementales (Caetano-Lopes et al. 2007).

L'os sous-chondral correspond à la partie osseuse sur laquelle se repose le cartilage articulaire. Cet os se compose de deux parties distinctes : la plaque osseuse sous-chondrale et l'os trabéculaire sous-chondral (**Figure 6**) lui permettant d'assurer ses fonctions métaboliques et mécaniques.

La plaque osseuse sous-chondrale est la zone située entre le cartilage articulaire et l'os trabéculaire sous-chondral. Elle est composée de l'os cortical qui est très dense, vascularisé et constitué de structures cylindriques orientées selon l'axe de l'os. Ces structures permettent à la plaque osseuse de résister de manière efficace aux contraintes mécaniques (Madry et al. 2010).

L'os trabéculaire sous-chondral est situé sous la plaque osseuse pour constituer le reste de l'épiphyse. Il est constitué d'un réseau de travées osseuses entourées de tissu adipeux et de

moelle osseuse. Ces travées sont orientées en réponses aux contraintes mécaniques exercées sur l'articulation. Cette structure originale confère à l'os trabéculaire sa résistance ainsi que sa flexibilité (Madry et al.2010).

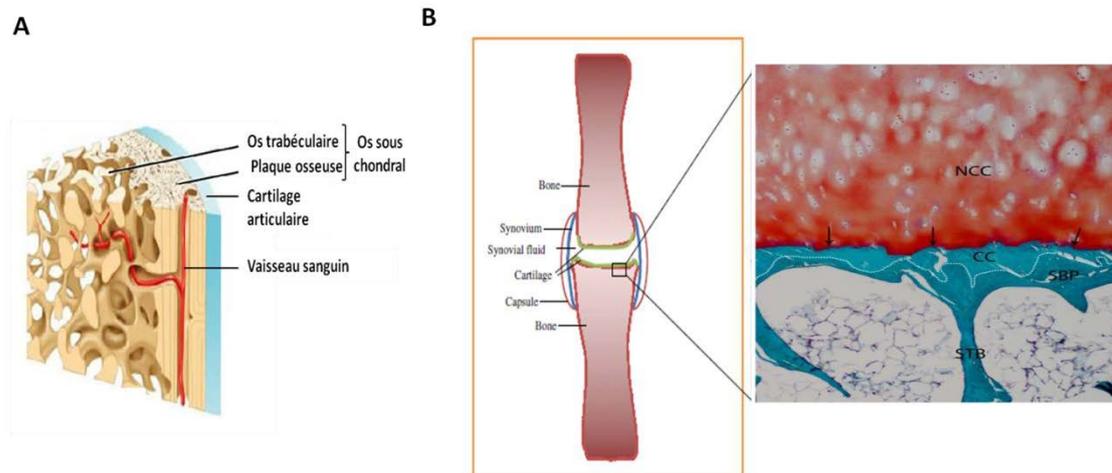


Figure 6 : Schéma représentatif de l'organisation de l'os sous-chondral.

(A) Le cartilage articulaire se repose sur l'os sous chondral constitué de la plaque osseuse et l'os trabéculaire. (B) une coupe histologique montrant la limite entre le cartilage calcifié et la plaque osseuse sous-chondrale marquée par le « ciment line ». CC: cartilage calcifié, NCC: cartilage non calcifié, SBP: plaque osseuse sous-chondrale, STB: os trabéculaire sous-chondral. Les flèches indiquent la tide mark, la ligne en pointillé indique le « ciment line ». Adapté de (Midlandtechnical) et (Suri et Walsh 2012, Li et al. 2013).

L'os sous-chondral joue un rôle plus important que le cartilage dans l'amortissement des chocs subis par l'articulation. Il est capable d'absorber jusqu'à 30% des contraintes contre 5% pour le cartilage (Radin et Rose 1986) en raison de sa plus forte résistance et flexibilité en comparaison avec le cartilage (Choi et al. 1990). Il assure également une partie des apports nutritifs des couches profondes du cartilage grâce à son réseau vasculaire (Imhof et al. 2000).

3.2.Composition

L'os sous-chondral se compose d'une matrice extracellulaire minéralisée, dont la formation et la résorption, sont assurées par la lignée ostéoblastique et ostéoclastique respectivement.

3.2.1. La matrice osseuse

La matrice osseuse se divise en deux phases :

❖ La phase minérale :

C'est la partie majeure de la matrice osseuse (70%). L'hydroxyapatite (phosphate de calcium cristallisé) représente le composant principal de cette phase. Il est disposé dans les espaces inter-fibrillaires. Elle constitue une réserve majeure en éléments minéraux pour l'organisme. Elle contient 99% de calcium, 85% de phosphore et entre 40 et 60% de sodium et de magnésium (Bonucci 2012).

❖ La phase organique :

Elle représente 30% de la matrice totale. Elle est constituée majoritairement de collagène de type I (90%) mais aussi des collagènes de type V, VIII et XII qui confèrent à l'os sa résistance à l'étirement. Elle contient également des glycosaminoglycanes (acide hyaluronique, chondroïtine sulfate et héparane sulfate), des protéoglycanes et des protéines non collagéniques (ostéocalcine, ostéonectine, biglycane, décorine, thrombospondines...) impliquées dans l'organisation matricielle et le processus de minéralisation (Bonucci 2012, Perrier 2010).

3.2.2. Les cellules osseuses

Au niveau de l'os sous-chondral, on distingue deux catégories de cellules. On trouve les cellules de la lignée ostéoblastique (cellules ostéoformatrices), responsables de la synthèse de la matrice osseuse et les cellules de la lignée ostéoclastique (cellules ostéorésorbantes) participant à la résorption de la matrice.

❖ La lignée ostéoblastique :

Les cellules de cette lignée sont d'origine mésenchymateuse ; elles proviennent de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses par l'activation des facteurs de transcription Runx2 (Ducy et al. 1997) et Msx2 (Bendall et Abate-Shen 2000). Les cellules de cette lignée sont mécano-sensibles permettant la sensibilisation de l'os au stress mécanique.

Elles sont capables de convertir les signaux mécaniques en signaux biochimiques via les processus de mécano-transduction (Sanchez et al. 2009).

Il existe plusieurs types de cellules de cette lignée en fonction de leur stade de maturation (**Figure 7**) :

- **Les pré-ostéoblastes** sont des cellules allongées, issues de la division des cellules localisées dans la moelle osseuse. Il s'agit de l'unique type cellulaire de la lignée ostéoblastique capable de proliférer (Blair et al. 2007). Ces cellules expriment la phosphatase alcaline nécessaire pour la formation osseuse et la synthèse du collagène de type I.
- **Les ostéoblastes matures** sont des cellules de forme cubique formant un tapis de cellules jointives (par disposition pseudo-épithéliale) qui communiquent entre elles par des structures appelées jonctions gap. Leur membrane plasmique renferme en abondance la phosphatase alcaline. Quant à leur cytoplasme, il contient de nombreux organites (appareil de golgi très développé et un réticulum endoplasmique granulaire abondant) leur permettant d'assurer leur fonction de synthèse. Les ostéoblastes sont capables de synthétiser le collagène de type I mais aussi un grand nombre de protéines matricielles. Ils secrètent également des cytokines, hormones, facteurs de croissances et molécules solubles (Ostéoprotégérine [OPG], Receptor Activator of Nuclear factor k B Ligand [RANKL]) qui régulent la résorption osseuse (Lloyd et al. 2008). Une fois la synthèse de la matrice ostéoïde terminée, le devenir des ostéoblastes matures peut se faire selon 3 voies ; **1**) la mort par apoptose **2**) la différenciation en ostéocytes ou **3**) la mise au repos sous forme de cellules bordantes.
- **Les ostéocytes** sont des ostéoblastes différenciés, entièrement emmurés par la MEC osseuse minéralisée. 10 à 30 % des ostéoblastes deviennent des ostéocytes (Franz-Ondendaal et al. 2006). Un ostéocyte se caractérise par l'expression de DMP-1 (dental mineral protein 1) (Feng et al. 2003), MEPE (Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein) (Nampei et al. 2004) et SOST (sclérostine) (Van Bezooijen et al. 2004). Les ostéocytes siègent dans des structures appelées ostéoplastes et communiquent entre elles grâce à leurs prolongements cytoplasmiques. Ces cellules communiquent de la même façon avec les ostéoblastes et les cellules bordantes. Elles sont fusiformes, de taille plus petite et avec moins d'organites que les ostéoblastes. Malgré leur activité métabolique limitée par rapport à celle des ostéoblastes, ces

cellules participent au maintien de la matrice osseuse et contribuent au maintien de l'homéostasie de la calcémie. Les ostéocytes sont mécano-sensibles et jouent par conséquent un rôle clé dans le contrôle du remodelage osseux, en réponse au stress mécanique (Heino et al. 2009).

- **Les cellules bordantes**, issues de la différenciation des ostéoblastes, sont appelées aussi "ostéoblastes au repos". Elles sont aplaties, allongées et pauvres en organites, formant une couche cellulaire qui tapisse la surface osseuse. En réponse aux signaux de l'environnement, ces cellules quiescentes sont capables de se différencier en ostéoblastes actifs (Dobing et Turner 2011).

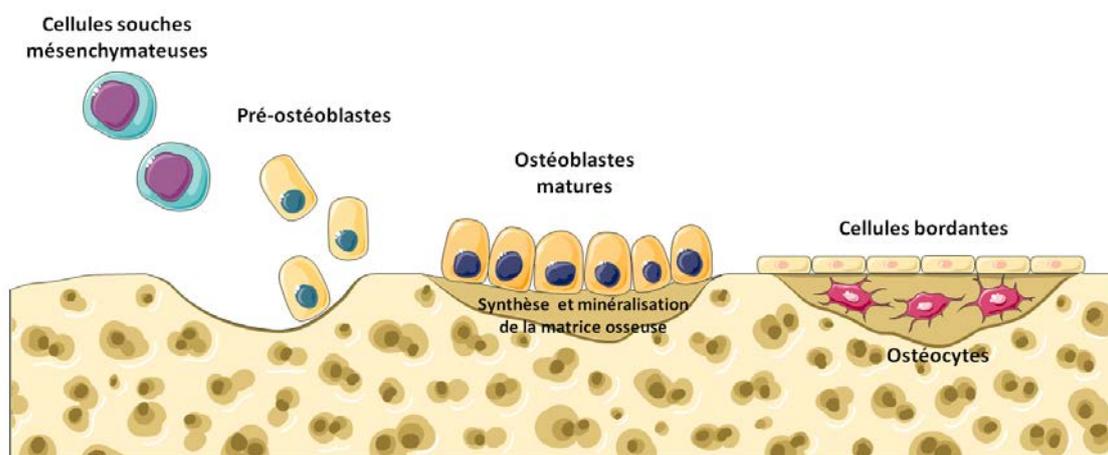


Figure 7 : Représentation schématique des cellules de la lignée ostéoblastique et de leur localisation.

Cette lignée se compose de pré-ostéoblastes provenant des cellules souches mésenchymateuses, des ostéoblastes matures, des ostéocytes et des cellules bordantes.
Source : Servier Medical Art.

❖ La lignée ostéoclastique :

Les cellules de cette lignée sont d'origine hématopoïétique. Elles dérivent des précurseurs mononucléés (monocytes/macrophages). Cette différenciation est dépendante de M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) et de RANK-L, deux facteurs indispensables pour l'expression des gènes impliqués dans le développement des ostéoclastes matures comme la TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) et la cathepsine K (Boyle et al. 2003). Il s'agit des

cellules volumineuses (environ 100µm de diamètre), hautement mobiles, capables de se déplacer sur la surface osseuse d'un site de résorption à un autre. Elles sont responsables de la résorption du tissu osseux participant ainsi à son renouvellement continu. L'ostéoclaste mature, dont la membrane est sous forme de bordure en brosse, adhère à la surface osseuse en délimitant un compartiment spécialisé entre sa membrane et l'os. Dans ce compartiment, des protons (H⁺) sont déversés permettant la dissolution de la phase minérale osseuse. Des enzymes protéolytiques (TRAP, Cathepsine K et certaines MMPs) sont aussi libérées amenant à la dégradation de la MEC et la résorption de ses composants. La zone érodée de tissu osseux laissée après la résorption est appelée « lacune de Howship » (**Figure 8**). Une fois la résorption terminée, les ostéoclastes meurent par apoptose (Boyle et al. 2003).

Les activités des cellules de deux lignées ostéoblastiques et ostéoclastiques sont liées. Elles communiquent ensemble via le système OPG/RANK/RANK-L afin de réguler le remodelage osseux (Lloyd et al. 2008).

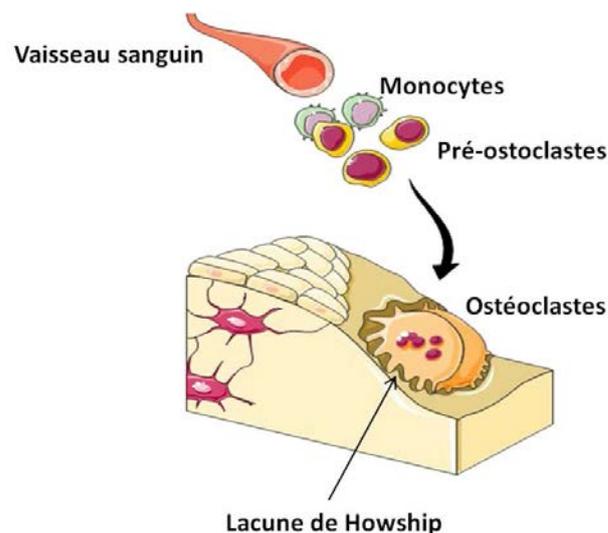


Figure 8 : Représentation schématique des cellules de la lignée ostéoclastique.

Les monocytes se différencient en ostéoclastes de manière dépendante du système OPG/RANK/RANK-L qui assurent la résorption de la matrice ostéoïde dans une structure appelée la lacune de Howship. Source : Servier Medical Art.

B. L'arthrose

1. Définition, prévalence et incidence

L'arthrose est la pathologie articulaire la plus fréquente dont l'incidence augmente avec l'âge et dans les pays développés ou en développement (Palazzo 2016). L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 10% à 15% des adultes âgés de plus de 60 ans souffrent d'une arthrose symptomatique avec un pourcentage plus élevé chez les femmes que les hommes (18% versus 9.6%). Chez 80% de ces patients, l'arthrose entraîne des difficultés de mouvements et pour 25%, elle est responsable d'une incapacité à effectuer les activités de la vie quotidienne, faisant donc de cette maladie une cause majeure d'handicap chez les sujets âgés.

D'après les chiffres de la société française de rhumatologie, 9 à 10 millions personnes souffrent d'arthrose en France. Chaque année, 140 000 prothèses de hanche et 40 000 prothèses de genou sont réalisées. 13,4 millions de consultations annuelles sont faites par les rhumatologues (Sellam 2016). Elle présente donc clairement un problème de santé publique majeur.

L'arthrose se caractérise principalement par une dégradation progressive du cartilage articulaire et se manifeste par des douleurs et une perte de la mobilité articulaire qui impactent de manière importante la qualité de vie des patients (Martel-Pelletier et Pelletier 2010).

Aujourd'hui, cette maladie n'est plus considérée comme une pathologie dégénérative due à une simple usure du cartilage mais à un remodelage anormal de tous les tissus de l'articulation (Loeser et al. 2012).

Elle est définie par l'OMS comme étant :

« La résultante de phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral. Ce déséquilibre peut être provoqué par de multiples facteurs : génétiques, congénitaux, métaboliques ou traumatiques. L'arthrose touche tous les tissus de l'articulation diarthrodiale et se manifeste par des modifications morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques de la matrice cartilagineuse conduisant à un ramollissement, une fissuration, une ulcération et une perte du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral associée à la formation d'ostéophytes et de kystes sous-chondraux. Quand elle devient symptomatique, l'arthrose

entraîne douleur et raideur articulaire, un éventuel épanchement articulaire avec des degrés variables d'inflammation locale ».

L'arthrose peut se manifester au niveau de toutes les articulations mais elle se développe notamment au niveau du genou (gonarthrose), de la hanche (coxarthrose), des doigts (arthrose digitale) et de la colonne vertébrale (arthrose rachidienne) (**Figure 9**).



Figure 9 : Radiographies des articulations les plus touchées par l'arthrose.

Radiographies des sites les plus touchés par l'arthrose par ordre de prévalence. Les radiographies permettent d'observer le pincement de l'interligne articulaire d'une gonarthrose (arthrose du genou), d'une arthrose digitale, d'une coxarthrose (arthrose de la hanche) et d'une arthrose rachidienne. Les articulations portantes sont les plus touchées.

Son diagnostic repose sur un examen clinique associé à des radiographies de l'articulation concernée. Les radiographies permettent de mettre en évidence une condensation de l'os sous-chondral due à un remodelage osseux, une formation d'ostéophytes (excroissances osseuses recouvertes du cartilage) et une perte du cartilage se traduisant par un pincement de l'interligne articulaire qui est le signe radiologique caractéristique de cette maladie (**Figure10**).

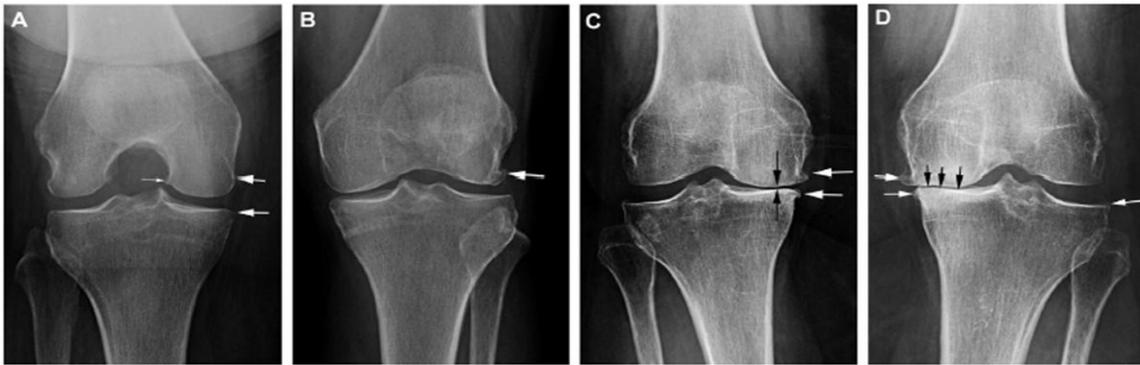


Figure 10: Classification radiologique de la sévérité de la gonarthrose selon l'index composite Kellgren-Lawrence.

Cette classification prend en compte à la fois la formation des ostéophytes et le pincement de l'interligne articulaire. **(A)** Stade 1: ostéophytes de signification douteuse (Flèches blanches). **(B)** Stade 2: ostéophyte net sans modification de l'interligne articulaire. **(C)** Stade 3: ostéophyte net (Flèches blanches) et diminution de l'interligne articulaire (Flèches noires). **(D)** Stade 4: pincement sévère de l'interligne articulaire (flèches noires) en plus des ostéophytes (flèches blanches). Adapté de (Hayashi et al. 2015).

Actuellement, il n'existe pas de traitements qui permettent de stopper ou retarder la progression de la pathologie vers une destruction totale du cartilage (Rannou et al. 2010, Roman-Blas et al. 2016, Bay-Jensen et al. 2016). Il existe toutefois des approches pharmacologiques (anti douleurs) et non pharmacologiques (les orthèses, l'exercice, le régime et l'éducation des patients) ayant uniquement des effets symptomatiques et visant à soulager la douleur et la raideur de l'articulation endommagée afin d'améliorer la stabilité de genou (Sanchez et al. 2010). La solution unique pour les patients, qui ne peuvent plus supporter la douleur avec des graves lésions de genou et une incapacité à marcher, est la pose de prothèse (genou ou hanche) permettant de remplacer temporairement (15 à 20 ans) l'articulation touchée, récupérer une bonne mobilité du genou, soulager la douleur et reprendre une marche normale. Néanmoins, cette opération n'est pas sans risque (infections, descellement précoce, etc.) et 20% des patients conservent des douleurs chroniques alors même que l'intervention s'est déroulée sans complications.

2. Facteurs de risque

Les facteurs de risque aboutissant au développement de l'arthrose sont multiples :

L'âge est l'un de ces facteurs, étant donné que le processus de vieillissement implique une diminution significative du nombre de chondrocytes dans le cartilage articulaire par apoptose, ce qui est en corrélation directe avec le degré des lésions du cartilage (Zamli et Sharif. 2011). En outre, avec l'âge, les chondrocytes perdent leur capacité à renouveler la matrice extracellulaire du cartilage (Aigner et al. 2007).

L'obésité est aussi un facteur de risque majeur de l'arthrose. Des études ont montré que le risque augmente de 15% par point d'indice de masse corporelle (IMC) supplémentaire (Sellam et Berenbaum 2011) et qu'une réduction de poids de 5 kg est capable de diminuer de 50% le risque de développer une arthrose du genou (Pazzalo et al. 2016, Christensen et al. 2007). L'obésité est également associée à l'arthrose de la main (Grotle et al. 2008). Ainsi, son impact n'est pas expliqué uniquement par le stress mécanique excessif subi par les zones portantes mais aussi par voie métabolique entre l'obésité et l'arthrose.

Les traumatismes articulaires, en particulier au niveau des genoux, peuvent conduire également à une apparition précoce de l'arthrose, suite à une rupture du ligament croisé antérieur, par exemple, ou une atteinte méniscale (Allen et Golightly. 2015).

Une activité intense et répétitive est l'un des facteurs qui peuvent induire ces lésions articulaires suite à une sollicitation excessive des articulations (Allen et Golightly 2015). Elle favorise l'apparition des lésions microscopiques menant au développement d'une arthrose (Maetzel et al. 1997).

Le sexe est également impliqué. En effet, le développement d'arthrose est plus fréquent chez les femmes après la ménopause que chez les hommes suggérant un rôle hormonal (Srikanth et al. 2005). Ceci peut être expliqué aussi par d'autres facteurs tels que la différence de la structure des os et des ligaments ainsi que la diminution du volume du cartilage chez les femmes par rapport aux hommes (Johson et al. 2014, Musumeci et al. 2015).

Les facteurs génétiques peuvent également intervenir dans l'apparition de l'arthrose. De nombreuses études épidémiologiques ont révélé un caractère familial dans l'arthrose des

doigts et des genoux (Valdes et al. 2007). Différentes études ont mis en évidence la présence de plus de 80 mutations de gènes impliquées dans le développement de l'arthrose parmi lesquels on peut citer les gènes codant pour le récepteur de la vitamine D, insulin-like growth factor 1(IGF-1), collagène de type 2 et le facteur de croissance de la différenciation 5 (GDF5) (Musumeci et al. 2015, Palotie et al. 1989, Evangelou et al. 2009).

D'autres facteurs peuvent également être à l'origine d'une arthrose comme les troubles de l'architecture des membres de la jambe qui peuvent augmenter les contraintes mécaniques dans le compartiment interne du genou (Chapple et al. 2011), la densité osseuse élevée et la faiblesse musculaire (Neogi et zhang. 2013).

La diversité de ces facteurs de risque, fait qu'on considère aujourd'hui, qu'il existe plusieurs phénotypes d'arthroses. Bien qu'elles entraînent les même conséquences, les mécanismes physiopathologiques y aboutissant sont bien distincts: on ne peut plus parler aujourd'hui d' « une » mais « des » arthroses (**Tableau 1**). L'identification de phénotypes cliniques d'arthrose pourrait permettre de définir différents groupes homogènes de patients. Les traitements actuels ou futurs, préventifs ou curatifs, pourraient ainsi être adaptés à chaque sous-groupe.

	Post-traumatique	Métabolique	Viellissement	Génétique	Douleur
Age	jeune (<45 ans)	âge moyen (45–65 ans)	vieux (>65 ans)	variable	variable
Cause principale	Stress mécanique	Stress mécanique, adipokines, hyperglycémie, déséquilibre œstrogène/progestérone	AGE, sénescence chondrocytaire	Gène associé	Inflammation, changements osseux, perception aberrante de la douleur
Site principal	Genou, pouce, cheville, épaule	Genou, main, généralisé	Hanche, genou, main	Main, hanche, colonne vertébrale	Hanche, genou, main
Intervention	Protection des articulations, stabilisation articulaires, prévention des chutes, interventions chirurgicales	Perte de poids, contrôles glycémique et lipidique, hormonothérapie substitutive	Aucune intervention spécifique, briseurs des AGE, sRAGE	Aucune intervention spécifique, thérapie génique	Analgésiques, anti-inflammatoires

Tableau 1: Les différents phénotypes cliniques de l'arthrose.

AGE : produits avancés de glycation, sRAGE : récepteur solubles aux AGE (Bijlsma et al.2011).

3. L'arthrose est une maladie multi-tissulaire

Ces dernières années, la vision des processus physiopathologiques menant à l'arthrose s'est profondément modifiée. Pendant plusieurs années, l'arthrose a été considérée comme une pathologie dégénérative concernant uniquement le cartilage. Cependant, il est aujourd'hui clairement démontré que l'arthrose est une maladie progressive de l'articulation dans son ensemble impliquant le cartilage, l'os sous-chondral, la membrane synoviale, les ménisques et les muscles (Brandt et al. 2006). Les changements pathologiques observés dans les articulations arthrosiques comprennent la dégradation du cartilage articulaire mais aussi une condensation de l'os sous-chondral, la formation d'ostéophytes, des degrés variables d'inflammation synoviale, une atteinte des ligaments et des ménisques ainsi qu'une hypertrophie de la capsule articulaire (Loeser et al. 2012) (**Figure 11**). L'arthrose est donc une pathologie multi-tissulaire complexe qui conduit à terme à la destruction du cartilage et aux symptômes connus par les patients (douleur, gonflement, raideur, gêne fonctionnel...).

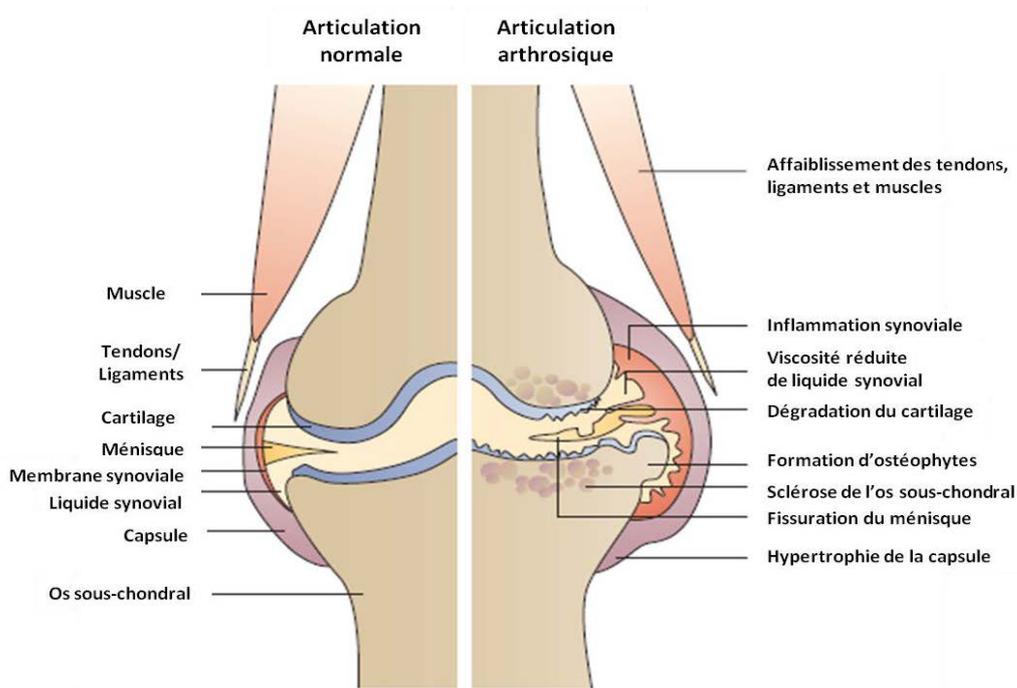


Figure 11 : Modifications des tissus de l'articulation au cours de l'arthrose.

Adapté de (Wieland et al.2005).

Les débris de dégradation du cartilage libérés dans la cavité synoviale sont captés par la membrane synoviale. Cette dernière devient le siège d'un infiltrat inflammatoire et synthétise alors des médiateurs pro-inflammatoires et des protéases matricielles qui agissent sur le cartilage et l'os sous-chondral. Cette rétroaction constitue un cercle vicieux conduisant à la dégradation lente et progressive du cartilage et l'altération des structures adjacentes (Sellam et Berenbaum 2010, Bijlsma et al. 2011) (**Figure 12**).

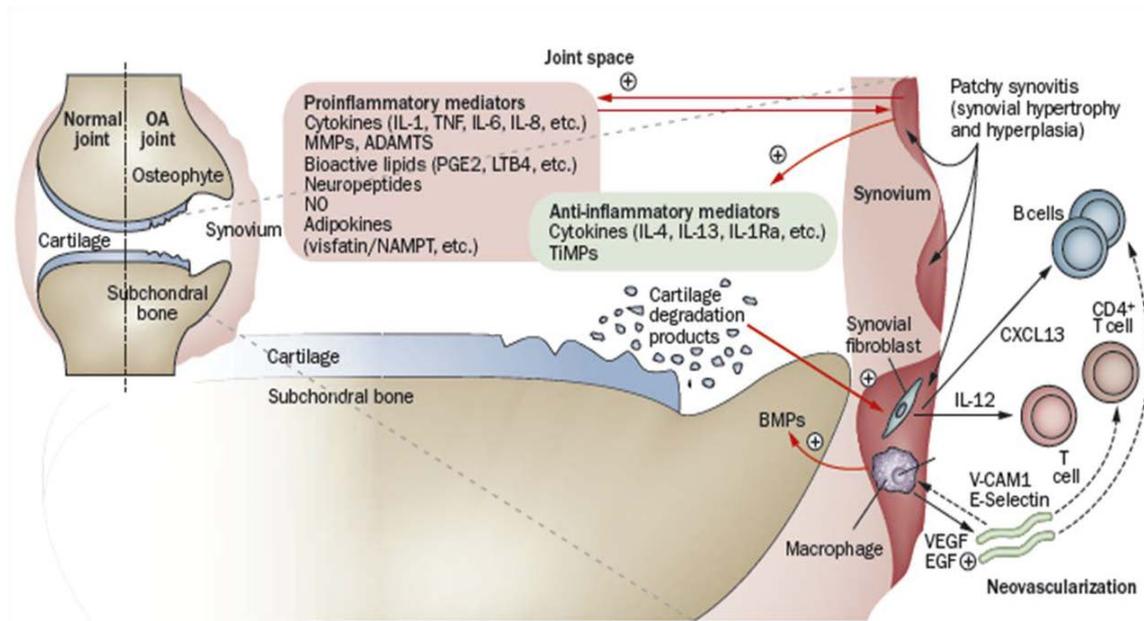


Figure 12 : La physiopathologie de l'arthrose.

Les produits de dégradation du cartilage qui sont libérés dans la cavité articulaire sont phagocytés par les cellules synoviales, aboutissant à l'amplification de l'inflammation synoviale. Les cellules synoviales activées produisent des médiateurs cataboliques et pro-inflammatoires qui conduisent à une production excessive des enzymes protéolytiques, responsables de la dégradation du cartilage, créant ainsi une boucle de rétroaction positive. La réponse inflammatoire est amplifiée par les cellules synoviales activées et des lymphocytes T et B recrutés. Pour contrecarrer cette réponse inflammatoire, la membrane synoviale et le cartilage peuvent produire des cytokines anti-inflammatoires. Des médiateurs sécrétés par la membrane synoviale peuvent contribuer également à la formation d'ostéophytes. ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs), BMP (bone morphogenetic protein), CXCL13 (CXC chemokine ligand 13), EGF (endothelial growth factor), IL (interleukin), IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist), LTB4 (leukotriene B4), MMP (matrix metalloproteinase), NAMPT (nicotinamide phosphoribosyl transferase also called visfatin), NO (nitric oxide), NGF (nerve growth factor), OA (osteoarthritis), PGE2 (prostaglandin E2), TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase), TNF (tumor necrosis factor), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), VEGF (vascular endothelial growth factor) (Sellam et Berenbaum 2010).

De nombreuses études ont mis en évidence qu'au cours de l'arthrose, les altérations des différents tissus sont des processus étroitement liés (Martel-Pelletier et Pelletier 2010) suggérant ainsi que tous les tissus sont capables de communiquer entre eux. Parmi tous ces tissus, l'os sous-chondral semble décisif de la progression de la maladie (Kwan Tat et al. 2010). Son rôle dans la dégradation du cartilage est actuellement de plus en plus étudié. En effet, de nombreuses modifications sont observées dans l'os sous-chondral arthrosique

(sclérose, remodelage, formation d'ostéophytes et apparition des kystes). Certains de ces changements représentent les premiers signes de l'arthrose (Lories et Luyten 2012).

Aujourd'hui, il est admis que l'os et le cartilage forment une unité fonctionnelle interconnectée (Lories et Luyten 2012). En effet, des études *in vitro* et *ex vivo* mettent en évidence une communication entre les deux tissus, ce qui suggère une interdépendance des événements se produisant dans les deux compartiments et conduisant à la destruction articulaire (Findlay et Atkins 2014, Li et al. 2013).

4. Modèles animaux arthrosiques

Reproduire la maladie chez l'animal est cruciale pour acquérir une meilleure compréhension de processus arthrosique et des lésions associées.

Les petits animaux (souris, rats, lapin et cobayes) sont le plus souvent utilisés pour des raisons de coût, de facilité de manipulation et de logement. Les modèles animaux de grande taille (mouton, chien, chèvres, chevaux) montrent plus de similarités avec l'homme en terme de morphologie du cartilage et d'anatomie de l'articulation permettant donc de fournir plus de données cliniquement pertinentes. Cependant, ces modèles sont relativement coûteux et présentent des problèmes éthiques importants avec des grandes difficultés de manipulation.

Parmi ces modèles, ce sont les souris qui sont les plus utilisées en raison de facilité de gestion et de faibles coûts. La possibilité d'induire des modifications génétiques (knock-out, knock-in...) rend les modèles de souris extrêmement utiles pour reproduire l'arthrose (Thysen et al. 2015). Les souris de souche C57BL6, BALB/c et STR/ort sont les plus utilisées pour étudier l'arthrose car elles développent spontanément la maladie (Stoop et al. 1999, Kyostio-Moore et al. 2011).

L'arthrose induite chez la souris peut être obtenue par différentes approches telles que les injections intra-articulaires de iodoacétate, collagénase ou papaine (Guzman et al. 2003, Van der Kraan et al. 1989), les modifications génétiques (Mutations dans les gènes de la matrice extracellulaire ou surexpression des protéases matricielles) (Hu et al. 2006) et la chirurgie par section du ligament croisé antérieur (ACLT) (Stoop et al. 2000) ou par déstabilisation du ménisque médial (DMM) (Glasson et al. 2007).

Ce dernier est le modèle murin d'arthrose de référence au niveau international. Il consiste à déstabiliser le ménisque médial par section du ligament ménisco-tibial médial chez la souris (**Figure 13**). Cet acte altère la stabilité mécanique de l'articulation du genou et engendre un stress mécanique excessif sur l'articulation du genou induisant des lésions du cartilage

proches de celles observées dans l'arthrose humaine (Glasson et al. 2007). De plus, c'est le modèle idéal permettant d'étudier la douleur associée aux lésions arthrosiques (Miller et al.2012, Fang et Beier.2014).

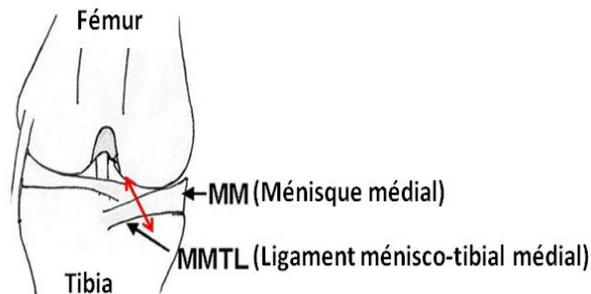


Figure 13: Le modèle murin d'arthrose DMM.

Ce modèle est obtenu par section du ligament ménisco-tibial médial chez la souris (indiquée par la flèche rouge). Adapté de (Glasson et al. 2007).

Les lésions induites chez ce modèle apparaissent après 4 à 8 semaines. Elles sont évaluées sur des coupes histologiques de genoux de souris colorées à la Safranine O et vert lumière, en se basant sur le score OARSI détaillé dans le **tableau 2** (Glasoon et al. 2010).

Niveau	Dommages arthrosiques
0	Normal
0.5	Perte du Safranin O sans changements structuraux
1	Petites fibrillations sans perte du cartilage
2	Fentes verticales jusqu'à la couche immédiatement au-dessous de la couche superficielle du cartilage et une certaine perte de la lamina de surface
3	Fentes verticales/ érosion du cartilage qui s'étend jusqu'à <25% vers le cartilage calcifié
4	Fentes verticales/ érosion du cartilage qui s'étend jusqu'à 25-50% vers le cartilage calcifié
5	Fentes verticales/ érosion du cartilage qui s'étend jusqu'à 50-75% vers le cartilage calcifié
6	Fentes verticales/ érosion du cartilage qui s'étend jusqu'à >75% vers le cartilage calcifié

Tableau 2 : Score semi-quantitatif OARSI.

Ce score permet d'évaluer les lésions articulaires sur des coupes histologiques de genoux de souris DMM (Glasson et al. 2010).

Les altérations histologiques observées sur les coupes tissulaires de genoux des souris DMM apparaissent dès 4 semaines et s'intensifient jusqu' à 8 semaines après l'opération (**Figure 14**).

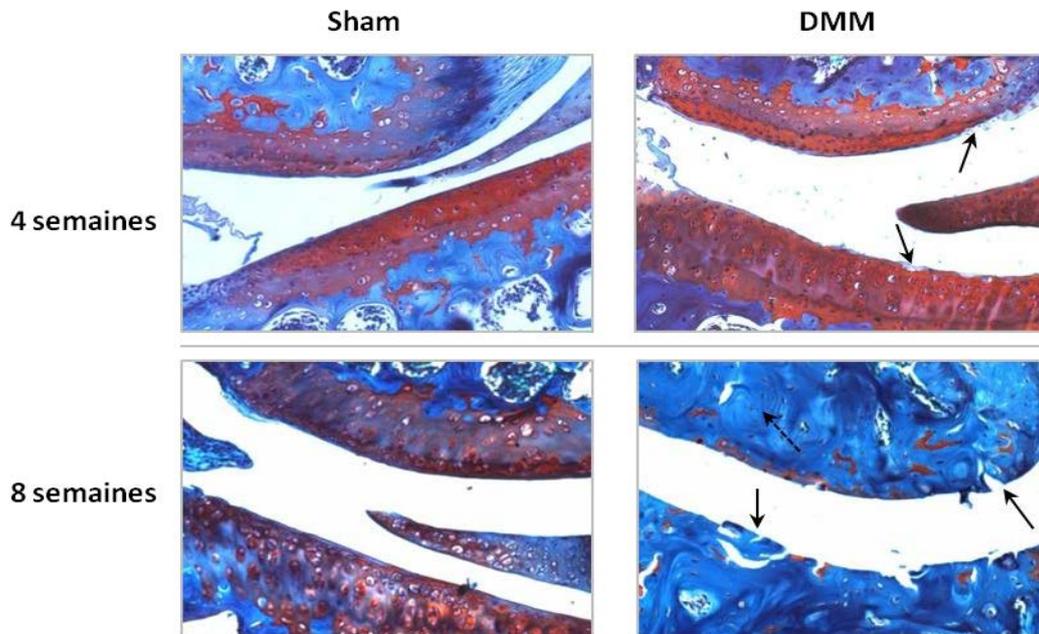


Figure 14 : coupes histologiques d'articulations murines de genoux, colorées à la Safranin O et au Vert Lumière.

La coupe montre les différences de dégradation du cartilage entre les souris Sham (non opérées) et les souris DMM à 4 et 8 semaines post-opératoire (collection personnelle).

5. Tissus articulaires arthrosiques

5.1. Cartilage articulaire arthrosique

L'arthrose se caractérise principalement par une dégradation lente et progressive du cartilage articulaire. Elle s'y manifeste par des modifications à la fois histologiques, cellulaires et matricielles.

5.1.1. Modifications macroscopiques et histologiques

L'excès du stress sur le cartilage, qu'il soit de nature mécanique ou biochimique altère la fonction du chondrocyte favorisant un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des composants matriciels (Goldring et al. 2007). Ainsi, le cartilage perd son aspect blanc, lisse et translucide. Aux premiers stades, il devient rugueux et des microfissures apparaissent au

niveau de la couche superficielle. Progressivement, les lésions s'agrandissent jusqu'à la mise à nu de l'os sous-chondral au stade le plus avancé de la maladie (Aigner et Sachse. 2006) (**Figure 15**).

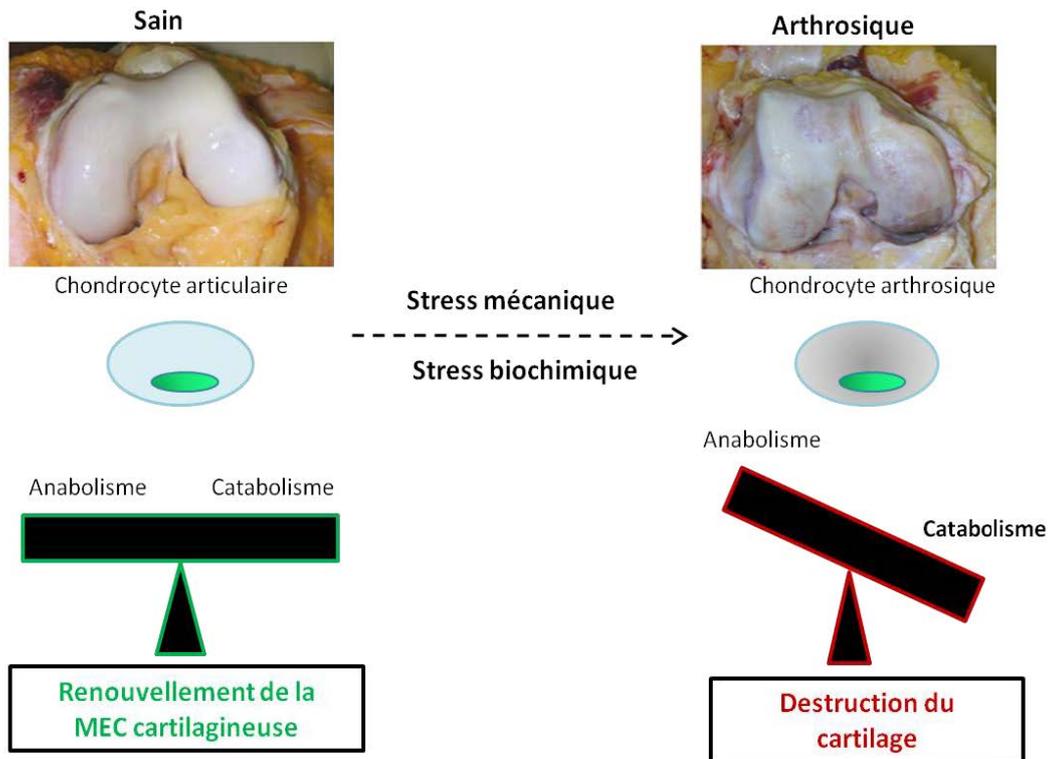


Figure 15 : Altération de l'homéostasie du cartilage artulaire au cours de l'arthrose.

Au niveau histologique, le processus arthrosique se manifeste par l'augmentation de la calcification du cartilage se traduisant par une avancée du cartilage calcifié et un dédoublement de la tide-mark. Parallèlement, le cartilage calcifié subit une pénétration vasculaire (apparition de canaux vasculaires) à partir de l'os sous-chondral (Houard et al. 2013). On observe également des fissurations, une érosion marquée du tissu et une formation d'amas cellulaires appelés « clusters », typiques du cartilage arthrosique (**Figure 16**).

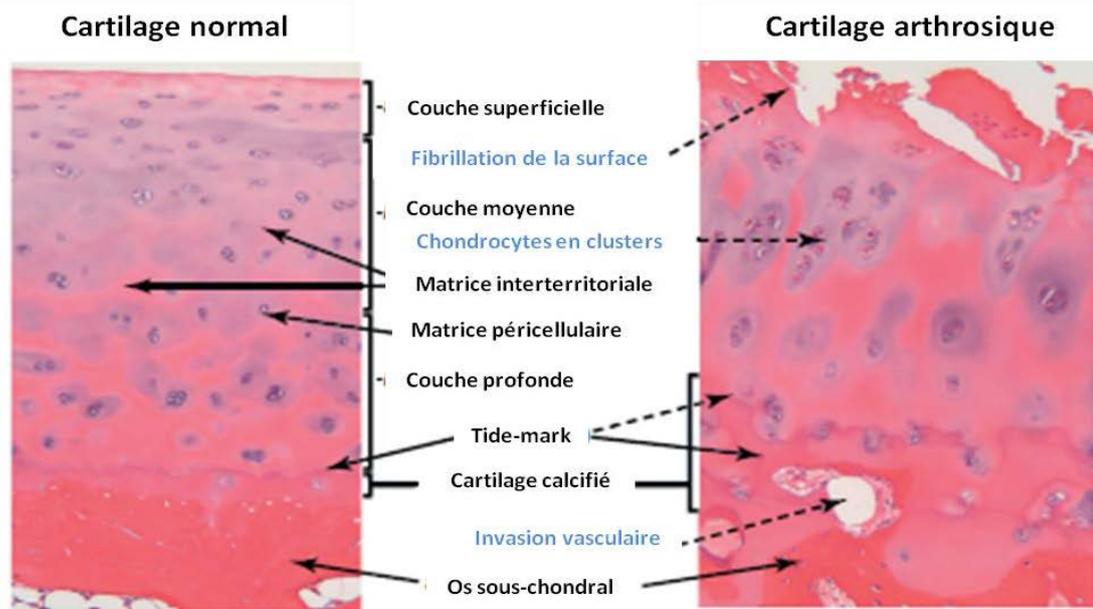


Figure 16: Coupe histologique d'un cartilage sain (panel gauche) et d'un cartilage arthrosique (panel droit).

Adapté de (Goldring et Marcu 2012).

L'ensemble de ces modifications observées dans le cartilage arthrosique est du à la fois aux altérations matricielles et cellulaires.

5.1.2. Modifications matricielles

La dégradation du cartilage articulaire et la perte de sa fonction biomécanique sont en grande partie dues à la destruction et la perte de molécules composant la MEC. La diminution de la quantité des protéoglycanes (principalement l'aggrécane), est le changement majeur observé dès les premiers stades de la dégradation du cartilage. La désorganisation du réseau collagénique est aussi une caractéristique majeure de la dégénérescence du cartilage (Aigner et Sachse. 2006). La déstabilisation du réseau des collagènes est due à une diminution de synthèse de collagène de type II et une dégradation de collagènes pré-existants (Heijink et al. 2011). Ces changements se produisent initialement à la surface du cartilage articulaire contribuant à une augmentation de la teneur en eau et une altération de ses propriétés mécaniques (Goldring et al. 2007).

La diminution du taux des composants de la MEC est due à la libération accrue, par les chondrocytes, d'enzymes protéolytiques comme les protéases matricielles (MMP) et les

aggrécanases (ADAMTS) (Aigner et Sachse. 2006) qui jouent un rôle primordial dans le processus arthrosique.

En dehors des altérations des composants du cartilage, une expression des molécules qui ne sont pas présents dans le cartilage articulaire normal, comme la tenascine, les collagènes de type IIA (théoriquement embryonnaire) et III, peut aussi être observée (Aigner et Sachse. 2006). Au niveau des zones profondes du cartilage, le taux de collagène X augmente également autour des « clusters » de chondrocytes et serait, associé au processus de calcification (Girkontaite et al. 1996).

5.1.3. Modifications cellulaires

Le chondrocyte est le seul type cellulaire présent dans le cartilage articulaire et il est donc responsable à la fois de la synthèse et de la dégradation de la MEC (Goldring et al. 2007). Il est le senseur de l'homéostasie du cartilage. Ainsi, toute modification de son phénotype peut entraîner un déséquilibre de la balance anabolisme/catabolisme.

Au cours de l'arthrose, les chondrocytes, qui sont quiescents dans les articulations normales, subissent un changement phénotypique et deviennent des cellules activées, caractérisées par une prolifération cellulaire, une formation de « clusters », et une augmentation de la production à la fois des protéines de la matrice et des protéases dégradant les composants matriciels (Goldring 2012).

On observe également une hypertrophie chondrocytaire caractérisée par la production de la métalloprotéase matricielle MMP13, le collagène de type X et la phosphatase alcaline (Abramson et Attur 2009, Sandell et Aigner 2001) contribuant à la dégradation de collagène de type II (par MMP-13) et au processus de l'ossification endochondrale observés au cours de l'arthrose (Abramson et Attur. 2009). Ces changements dans la composition et la structure du cartilage articulaire contraignent les chondrocytes à produire des facteurs cataboliques impliqués dans la dégradation du cartilage (Xia et al. 2014).

Au cours de l'arthrose, les chondrocytes peuvent aussi subir une dédifférenciation et réacquérir certaines caractéristiques des stades précoces de développement. Ils expriment ainsi des collagènes atypiques comme les collagènes de type I, IIA (qui est normalement embryonnaire) et III (Sandell et Aigner 2001).

L'un des mécanismes associés à l'arthrose est l'apoptose chondrocytaire. En effet, une forte corrélation a été établie entre l'apoptose et la sévérité des lésions de la MEC (Musumeci et al. 2001). La survie des chondrocytes est médiée par les intégrines, responsables de la connexion

des différents composants de la MEC aux protéines intracellulaires du cytosquelette (Musumeci et al. 2013). Ainsi, la perte de cette adhésion suite à la dégradation de la MEC entraîne l'apoptose des chondrocytes.

Enfin, les chondrocytes arthrosiques produisent et répondent aux différents médiateurs inflammatoires (cytokines et chémokines) présents dans les tissus articulaires et dans le liquide synovial (Goldring et al. 2007). Au cours de l'arthrose, des débris de dégradation du cartilage sont captés par la membrane synoviale, qui va s'activer et libérer des médiateurs pro-inflammatoires (interleukines tels IL-1, IL-6, IL-8, TNF α , PGE2 et radicaux libres...) (Sellam et Berenbaum. 2010). Ces différents médiateurs agissent par la suite sur le cartilage et stimule les chondrocytes à produire des protéases et des médiateurs inflammatoires (Abramson et Attur. 2009). Les chondrocytes dans le cartilage arthrosique, en particulier ceux qui sont en « clusters », expriment des récepteurs aux cytokines et chémokines (Berenbaum 2004). Un cercle vicieux se met ainsi en place conduisant à l'aggravation du phénotype catabolique des chondrocytes.

La plupart des études suggère que les changements phénotypiques majeurs sont initialement observés au niveau de la zone superficielle dès le premier stade de la maladie (Aigner et Sachse. 2006) induisant ainsi les modifications matricielles observées au cours de la maladie.

5.1.4. Rôle des enzymes protéolytiques dans la dégradation du cartilage

L'arthrose est caractérisée par une perte progressive de la matrice du cartilage articulaire, sous l'action des enzymes protéolytiques qui dégradent les protéines matricielles. De nombreuses protéases sont synthétisées et secrétées par les chondrocytes pour dégrader la MEC (**Tableau 3**).

Métalloprotéases matricielles (MMP)	Collagénases : MMP-1, MMP-8 et MMP-13 Gélatinases : MMP-2 et MMP-9 Stromélysines : MMP-3, MMP-7, MMP-10 et MMP-11 De type membranaire : MMP-14
Aggrécanases (ADAMTS)	ADAMTS-4 (Aggrécanase 1) ADAMTS-5 (Aggrécanase 2)
Autres protéases	Elastases Cathepsines Protéases du système de coagulation

Tableau 3: Les protéases impliquées dans la dégradation de la matrice du cartilage (Hedbom et Hauselmann 2002).

Parmi ces enzymes, ce sont notamment les métalloprotéases matricielles (MMP) et les aggrécanases qui jouent un rôle prépondérant dans la dégradation du cartilage au cours de l'arthrose (Houard et al. 2013).

❖ Les métalloprotéases matricielles (MMP) :

Les métalloprotéases matricielles forment une famille d'endoprotéinases jouant un rôle important dans les remodelages tissulaires. Elles partagent un domaine catalytique contenant un site de fixation au zinc, un domaine auto-inhibiteur possédant un résidu cystéine responsable de la régulation de la catalyse et un domaine hémopexine attaché à leur C-terminal et assurant l'interaction protéine-protéine. Elles jouent un rôle important dans les remodelages tissulaires en clivant les liaisons peptidiques internes (Page-McCaw et al. 2007, Zeng et al. 2015).

Cette famille des protéases est composée de 23 formes différentes divisées en 6 groupes (collagénases, gélatinases, stromélysines, matrylisines, de type membranaire (MT-MMP) et autres) (Snoek-van Beurden et Von den Hoff. 2005) . Tous ces groupes présentent une activité catalytique contre les composants de la MEC y compris les collagènes, les protéoglycanes et les glycoprotéines de la matrice (Shlopov et al. 1997).

De nombreuses études ont montré qu'elles jouent ainsi un rôle clé dans la dégradation du cartilage au cours de l'arthrose (Billinghurst et al. 1997, Sholpov et al. 1997). En outre, leurs concentrations ont été montrées augmentées dans le liquide synovial des patients arthrosiques par rapport aux sujets sains (Clark et al. 1993, Ishiguro et al. 1999).

Parmi plusieurs MMPs existantes, l'implication de MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -11, -13 et -14 a été particulièrement étudiée dans la dégradation du cartilage. Leur expression a été montrée élevée et en association avec le niveau de dégradation de la MEC (Tetlow et al. 2001, Aigner et Sachse. 2006, Smith. 1999).

MMP-1 (collagénase-1) est capable de dégrader le collagène de type II. Son expression est augmentée durant les stades précoces d'arthrose dans un modèle d'arthrose établi chez le chien (ACLT) (Fernandes et al. 1998). Une méta-analyse a montré que cette enzyme matricielle est augmentée dans le liquide synovial des patients arthrosiques par rapport aux sujets sains (Zeng et al. 2015). Cependant, son expression génique a été montrée diminuée dans le cartilage humain arthrosique par rapport au cartilage sain (Kevorkian et al. 2004).

MMP-2 (gélatinase-A) est capable de dégrader le collagène de type I, IV, V, VII et X ainsi que d'autres molécules bioactives (Galasso et al. 2012). Son taux sérique a été montré augmenté chez les patients arthrosiques par rapport aux sujets sains (Zeng et al. 2015). Elle est exprimée de façon constitutive dans le cartilage articulaire sain mais son expression est augmentée dans le cartilage arthrosique (Duerr et al. 2004) au cours des stades tardifs (Aigner et Zien. 2001).

MMP-3 (Stromélysine-1) clive les protéoglycanes. Elle est fortement exprimée dans le cartilage arthrosique, cependant son expression diminue au cours des stades tardifs de la maladie (Troeborg et Nagase. 2012). Son expression varie en fonction du stade de la maladie. En effet, certaines études la définissent comme marqueur des stades précoces et montrent qu'elle intervient dans l'initiation de la dégradation du cartilage (Aigner et Zien. 2001). Le taux de cette enzyme dans le sérum et le liquide synovial du lapin a été trouvé corrélé avec le niveau de sévérité des lésions du cartilage (Chu et al. 2015). Son implication dans le processus arthrosique a été confirmée dans un modèle d'arthrose spontanée chez la souris, où l'inactivation de MMP-3 protège contre la dégradation du cartilage (Blom et al. 2007). Cette enzyme participe aussi à l'activation des autres MMP telle MMP-1 (Ra et Parks. 2007).

MMP-7 (Matrilysine) est fortement exprimée dans le cartilage arthrosique comparé au cartilage sain (Tao et al. 2015). Cette expression est corrélée à la sévérité des lésions du cartilage évaluées par le score histologique de Mankin (Smith. 1999). Sa concentration sérique est aussi augmentée chez les patients arthrosiques (Tao et al. 2015).

MMP-8 (Collagénase neutrophile ou collagénase-2) est également capable de cliver le collagène de type II mais aussi les collagènes de type I, III, et d'autres composants matriciels (Nakki et al. 2015). Elle semble jouer un rôle au cours de l'arthrose même si elle n'est pas l'enzyme majeure. L'augmentation de son expression dans le cartilage arthrosique est associée à un clivage accru de collagène de type II dans le cartilage arthrosique (Billinghurst et al. 1997) suggérant son rôle dans la destruction du cartilage.

MMP-9 (Gélatinase-B) possède une activité protéolytique contre les collagènes de type IV, V, VII et X ainsi que d'autres molécules (Galasso et al. 2012). Son expression est augmentée (Kevorkian et al. 2004) et corrélée avec l'invasion vasculaire (Galasso et al. 2012) au cours du processus arthrosique. Son taux dans le sérum et dans le liquide synovial est également augmenté chez les patients arthrosiques par rapport aux sujets sains (Zeng et al. 2015).

MMP-11 (stromélysine-3) est impliqué dans la dégradation du cartilage pendant les stades tardifs de l'arthrose au cours desquels son expression augmente (Aigner et Zien. 2001). Cependant son rôle dans l'arthrose est peu étudié.

MMP-13 (Collagénase-3) est la collagénase primaire clivant le collagène de type II au cours de l'arthrose (Billinghurst et al. 1997, Aigner et Sachse. 2006). Son expression est fortement augmentée au cours de l'arthrose (Sholpov et al. 1997, Reboul et al. 1996). Son taux dans le liquide synovial des patients arthrosiques est élevé et corrélé avec la sévérité de la pathologie (Ozler et al. 2015). L'expression conditionnelle de MMP-13 dans le cartilage de souris (souris transgéniques avec expression de MMP-13 sous le contrôle du promoteur de collagène de type II), induit la dégradation spontanée du cartilage (Neuhold et al. 2001). De plus, des souris invalidées pour MMP 13 sont protégées des lésions cartilagineuses dans un modèle d'arthrose (Little et al. 2009).

MMP-14 (MMP de type membranaire) est capable de cliver l'aggrécane mais d'activer surtout d'autres MMP comme MMP-13 et MMP-2 (Dreier et al. 2004, Imai et al. 1997). Son

expression est augmentée dans le cartilage humain arthrosique et corrélée à l'activité de MMP-2 (Imai et al. 1997).

La production et l'activité de ces MMP sont régulées à plusieurs niveaux (**Figure 17**) et par plusieurs facteurs tels les cytokines. Leur production par les chondrocytes est stimulée par les cytokines pro-cataboliques telles que $Il-1\beta$ et $TNF-\alpha$ (Tetlow et al. 2001). Leur expression est régulée par le facteur de transcription AP-1 (activator protein- 1), en aval des voies de signalisation intracellulaires telles que les MAP (mitogen-activated protein) kinases (Kook et al. 2011, Kumar et al. 2009). Leur activation se produit par clivage protéolytique du pro-peptide inactif des MMP. Ce processus fait intervenir plusieurs cascades enzymatiques (Stamenkovic 2003). Les MMP peuvent être activées aussi par d'autres MMP, c'est le cas MMP-3 qui active pro-MMP-1, pro-MMP-7 et pro-MMP13 (Ra et Parks. 2007, Troeberg et al. 2012).

L'activité des MMP est régulée également par des inhibiteurs endogènes tels que l' $\alpha 2$ macroglobuline et les TIMP (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) (Page-McCaw et al. 2007). Les MMP sont fortement inhibées par les 4 TIMP (TIMP-1, -2, -3 et -4). TIMP-3 est l'inhibiteur central de la dégradation du cartilage (Troeberg et al. 2012) dont le taux protéique diminue dans le cartilage arthrosique (Morris et al. 2010). En effet, un traitement par TIMP-3 mais pas avec TIMP-1 ou TIMP-2, bloque la dégradation du cartilage (Gendron et al. 2003). De plus, son invalidation chez la souris induit la dégradation du cartilage (Sahebjam et al. 2007).

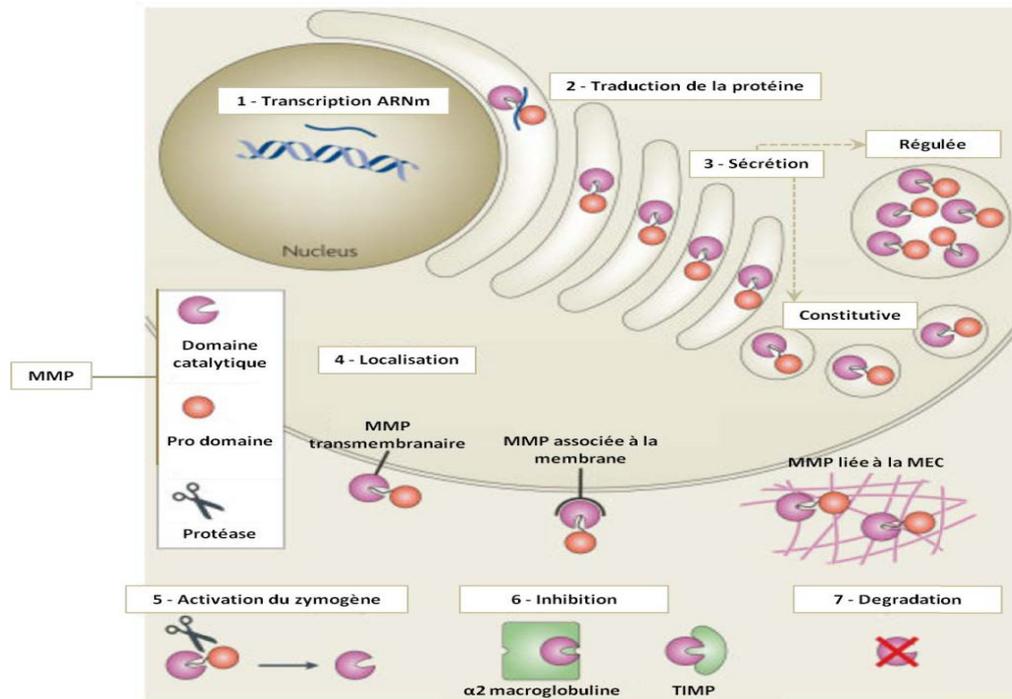


Figure 17: Régulation de l'expression, de la sécrétion et de l'activité des MMP.

L'activité des MMP est régulée à différents niveaux : (1) la transcription, (2) la traduction, (3) la sécrétion, (4) la localisation, (5) le clivage du pro-domaine, (6) l'inhibition, (7) la dégradation (Page-McCaw et al. 2007).

❖ Les agréganases (ADAMTS) :

Les ADAMTS (a desintegrin and a metalloproteinase with a thrombospondin motif) sont des métalloprotéases zinc-dépendantes qui dégradent l'aggrécane et qui possèdent plusieurs domaines modulant la spécificité et l'activité de leurs substrats (Troeborg et al. 2012).

ADAMTS-4 et ADAMTS-5 sont considérées comme les enzymes majeures responsables du clivage pathologique de l'aggrécane (Troeborg et al. 2012). Leur expression est augmentée au cours de l'arthrose (Xia et al. 2014).

La double invalidation des ADAMTS-4 et ADAMTS-5 protège contre la dégradation du cartilage dans un modèle murin d'arthrose (Sahebjam et al. 2007). Cependant, d'autres études ont montré qu'un modèle murin d'arthrose invalidé uniquement pour ADAMTS-4 développe la pathologie de façon similaire aux souris contrôles (Glasson et al. 2004). Cependant, l'invalidation d'ADAMTS-5 protège les souris contre le développement de l'arthrose (Stanton et al. 2005) suggérant que ADAMTS-5 représente l'aggrécane majeure chez la souris

(Bondeson et al. 2007). Il est suggéré qu'ADAMTS-4 pourrait contribuer à la dégradation du cartilage chez d'autres espèces que la souris y compris l'homme (Troeborg et al. 2012).

Dans le cartilage et la membrane synoviale, ADAMTS-5 est exprimée constitutivement alors qu'ADAMTS-4 est induite par les médiateurs pro-inflammatoires (Il-1, TNF- α ...) (Bondeson et al. 2007). Quant à leur inhibition, elle est également assurée par les TIMP (Xia et al. 2014).

L'expression et la sécrétion des MMP et des aggrecanases sont des événements majeurs de la dégradation du cartilage. L'induction de ces protéases chondrocytaires est donc finement régulée par un réseau complexe de cytokines et de facteurs de croissance.

5.2. L'os sous-chondral arthrosique

Aujourd'hui, il est clairement démontré que l'os sous chondral est un acteur clé des mécanismes conduisant aux lésions arthrosiques (Funk-brentano et Cohen-Solal. 2015). Des changements affectant la structure mais aussi l'activité et le phénotype des cellules sont observés au niveau de l'os sous-chondral arthrosique. Plusieurs de ces modifications ont lieu non seulement pendant la phase finale de la maladie, mais également aux stades précoces, éventuellement avant la dégradation du cartilage. Cette constatation a conduit à la suggestion que l'os sous-chondral pourrait initier les lésions du cartilage au cours de l'arthrose (Bijlsma 2011).

Les lésions osseuses observées au cours de l'arthrose sont principalement le remodelage osseux excessif, la sclérose de la plaque osseuse sous-chondrale, l'activation cellulaire, la formation des ostéophytes, des œdèmes médullaires et des kystes sous-chondraux.

5.2.1. Caractéristiques de l'os sous-chondral arthrosique

❖ Remodelage osseux :

En réponse aux stimuli mécaniques et biochimiques, l'équilibre entre la formation de l'os et sa résorption, assuré respectivement par les ostéoblastes et les ostéoclastes, est altéré au cours de l'arthrose.

De nombreuses études suggèrent que le remodelage excessif de l'os sous-chondral apparaît précocement au cours de l'arthrose (Kwan Tat et al. 2010). Dieppe et ses collègues étaient les premiers à proposer la scintigraphie osseuse comme marqueur prédictif des modifications structurales observées dans l'arthrose (Dieppe et al. 1993). Ceci a été confirmé ultérieurement

par des études montrant que les patients à risque de développer une gonarthrose post-traumatique présentent un remodelage osseux excessif visualisé par scintigraphie (Buckland-Wright et al. 2000).

Au cours des stades précoces de la pathologie, il semble qu'une hyperactivité osseuse soit en faveur d'une résorption associée à un défaut de minéralisation. En effet, la plupart des modèles expérimentaux sont cohérents et montrent une augmentation précoce dans la résorption osseuse suivie dans les étapes ultérieures par une augmentation de la formation osseuse (Funck-brentano et Cohen-Solal. 2015).

- **Sclérose de l'os sous-chondrale** : Le remodelage osseux altéré au cours de l'arthrose se traduit structurellement par une augmentation du volume osseux en raison d'une synthèse accrue de la masse ostéoïde. Ceci conduit à une rigidité mécanique et une sclérose sous-chondrale (Li et Aspden 1997) Cette sclérose se définit macroscopiquement par un épaississement de la plaque sous-chondrale, observable par radiographie (**Figure 18**). Il s'agit de l'un des changements caractéristiques de l'arthrose et l'un des mécanismes induisant l'aggravation de la pathologie en augmentant le stress sur le cartilage sus-jacent (Radin et Rose 1986).

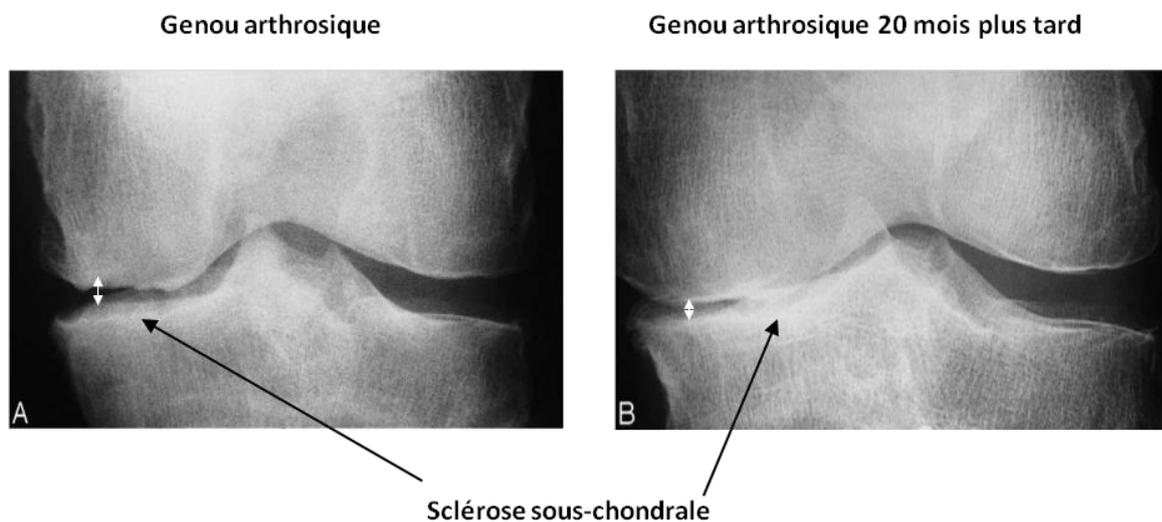


Figure 18 : Radiographie de genou arthrosique.

Cette radiographie montre l'évolution de la sclérose de la plaque osseuse sous-chondrale accompagnée du pincement de l'interligne articulaire (double flèche en blanc). Adapté de (Buckland-Wright 2004).

De nombreuses études suggèrent une augmentation de l'activité des cellules de l'os sous-chondral arthrosique. Les ostéoclastes sont impliqués au cours des premières étapes de l'arthrose puis les ostéoblastes/ostéocytes participent aux étapes ultérieures (Funck-brentano et Cohen-Solal. 2015).

La condensation de l'os sous-chondral observée par radiographie suggère un rôle important joué par les ostéoblastes dans la synthèse de la MEC osseuse. En effet, un taux sérique élevé d'ostéocalcine, un marqueur des ostéoblastes et de la formation osseuse, a été détecté chez des patients atteints d'arthrose digitale (Gevers and Dequeker 1987). Plus récemment, une étude a montré que les ostéoblastes acquièrent un phénotype scléreux en réponse au stress mécanique (Sanchez et al. 2012)

- **Activation des ostéoblastes :** Les ostéoblastes changent leurs phénotypes au cours de l'arthrose. Ils deviennent scléreux en augmentant la synthèse de certains facteurs de croissance (IGF, TGF β 1), cytokines (IL-6, IL-8), enzymes (MMP, phosphatase alcaline, uPa [urokinase]), protéines matricielles (ostéocalcine, ostéopontine) et médiateurs lipidiques (PGE2) qui jouent un rôle régulateur dans le remodelage osseux (Wei et Bai 2016, Sanchez et al. 2008, Sharma et al. 2013, Hilal et al. 1998).

Une forte expression de collagène de type I par les ostéoblastes est observée au cours de l'arthrose avec une production plus importante de collagène de type I α 1 que celle de I α 2 (Bailey et al. 2002). Ces changements altèrent la qualité du tissu osseux par désorganisation des fibres de collagènes amenant à une diminution de la résistance et à une minéralisation anormale de l'os (Couchourel et al. 2009). Cette même étude montre que le défaut de minéralisation est lié à une production anormale de TGF β 1 par les ostéoblastes. En effet, des taux élevés de TGF β 1 sont produits par les ostéoblastes arthrosiques associés à une minéralisation atténuée. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'augmentation de la production de TGF β 1 par les ostéoblastes arthrosiques est responsable de la production anormale de collagènes de type I et éventuellement de l'architecture anormale de l'os sous-chondral.

L'IGF-1 est aussi l'un des facteurs de croissance parmi les plus importants sécrétés par les ostéoblastes et régulant la formation osseuse. Il est l'un des acteurs des changements observés au cours de l'arthrose (Lajeunesse et Reboul 2003). En effet, les ostéoblastes de l'os sous-chondral arthrosique produisent des taux élevés d'IGF-1 qui pourrait favoriser l'accumulation de la substance ostéoïde et par conséquent la sclérose de l'os sous-chondrale (Massicotte et al. 2006).

Toutes ces sécrétions suggèrent une hyperactivité anabolique des ostéoblastes de l'os sous-chondral, provoquant ainsi de nombreux changements structuraux observés au cours de l'arthrose incluant la sclérose de la plaque sous-chondrale mais aussi la formation des ostéophytes.

❖ **Formation des ostéophytes :**

Les ostéophytes sont des excroissances osseuses recouvertes de structures fibrocartilagineuses qui apparaissent aux bords de l'articulation. Il s'agit de l'une des principales caractéristiques radiologiques de l'arthrose (**Figure 19**). Ils peuvent se former au début du développement de l'arthrose et peuvent être observés avant même le pincement de l'interligne articulaire. Ils peuvent avoir un impact clinique significatif en étant une source de douleurs et de dysfonctionnement chez les patients (Van der Kraan et Van den Berg 2007).



Figure 19 : Radiographie d'une articulation arthrosique.

On peut observer des ostéophytes développés (flèches en blanc). Adapté de (Hayashi et al. 2015).

Leur développement est dû à la prolifération des cellules souches du périoste (membrane recouvrant l'os). Ces cellules vont se différencier en chondrocytes hypertrophiques. Cette hypertrophie est suivie par une ossification endochondrale et un dépôt osseux. Des cellules dérivées de la membrane synoviale et de l'os pourraient participer aussi au développement définitif des ostéophytes (Van der Kraan et Van den Berg 2007). Il a été montré chez des modèles animaux d'arthrose que la formation des ostéophytes est accompagnée par une hyperplasie osseuse et par une pénétration des vaisseaux sanguins dans les couches profondes

du cartilage. Ils peuvent également se former suite à un défaut de réparation des fractures produites au niveau de la périphérie de l'os sous-chondral (Gilberston 1975).

La production locale des facteurs de croissance y compris TGF- β et BMP est impliquée dans ce processus (Zoricic et al. 2003, Blaney-Davidson et al. 2007). Plus particulièrement, TGF- β est un inducteur puissant des ostéophytes (Scharstuhl et al. 2002). Son injection au niveau intra-articulaire chez es modèles animaux était capable d'induire la formation des ostéophytes (Bakker et al. 2001). Il est à noter que des données cliniques ont montré que des niveaux élevés d'IGF-1 sont associés à la croissance des ostéophytes. En outre, son expression dans les ostéophytes a été bien montrée chez des modèles animaux (Van der Kraan et Van den Berg 2007). Un autre facteur de croissance dont l'expression a été détectée dans les ostéophytes est le bFGF (basic fibroblast growth factor) (Menkes et Lane 2004).

Le rôle des ostéophytes dans l'arthrose est très discuté. Il a été rapporté qu'il existe une corrélation entre leur présence et les douleurs arthrosiques (Boegard et al. 1998). Cependant, il était également suggéré qu'ils jouent un rôle protecteur pour l'articulation plutôt que de contribuer à la progression de la pathologie (Van der Kraan et Van den Berg 2007). En effet, il a été montré qu'ils assurent la stabilité de l'articulation en cas d'une gonarthrose (Pottenger et al. 1990) et qu'ils limitent le pincement de l'interligne articulaire de l'articulation de la hanche (Perry et al. 1972).

❖ Formations d'œdèmes médullaires et kystes sous-chondraux

-Les œdèmes médullaires : sont des lésions osseuses mises en évidence pour la première fois par Wilson et ses collègues en utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Ces lésions correspondent radiologiquement à la diminution de l'intensité du signal de la moelle osseuse en T1 et son augmentation en T2. T1 et T2 sont des séquences d'observation différentes en IRM (Wilson et al. 1988).

Le terme œdèmes médullaires regroupe un nombre d'anomalies histologiques caractérisées par une nécrose osseuse, une fibrose de la moelle osseuse et un infiltrat des cellules inflammatoires (Zanetti et al. 2000).

L'origine de ces lésions reste mal connue. Le stress mécanique excessif induit par la densité osseuse élevée (Lo et al. 2005) et la fragilisation du réseau trabéculaire (Roemer et al. 2010) pourrait être à l'origine de ces œdèmes médullaires. La moelle osseuse nécrosée est

remplacée par la suite par du tissu conjonctif fibreux qui altère progressivement l'os trabéculaire sous-chondral (Martig et al. 2007).

Ces atteintes sont fréquemment détectées à l'IRM dans les articulations arthrosiques et ont été trouvées associées à des symptômes cliniques et à la progression structurelle de la maladie (Funck-brentano et Cohen-Solal. 2015). Une étude a montré que ces lésions au niveau des genoux arthrosique sont associées aux douleurs (Zhang et al. 2011). L'un des mécanismes proposés reliant les œdèmes médullaires avec la douleur est la présence des microfissures et des canaux vasculaires qui facilitent la croissance des nerfs sensoriels (Funck-brentano et Cohen-Solal 2015, Mapp et Walsh 2012).

De plus, il a été montré que leur présence est associée à une augmentation de la perte du cartilage de la même région. En effet, le volume de ces œdèmes est positivement corrélé à la perte du cartilage et au pincement de l'interligne articulaire (Roemer et al. 2009).

De nombreuses études ont montré que les patients ayant un œdème de l'os sous-chondral avaient plus de symptômes arthrosiques (Sellam 2016). En outre, une étude de cohorte américaine (Multicenter Osteoarthritis Study), a montré que la présence d'un œdème médullaire osseux chez des patients asymptomatiques mais présentant des facteurs de risque à leur entrée dans l'étude ont un risque augmenté de voir apparaître des douleurs au genou durant la période de suivi (Javaid et al. 2010) illustrant ainsi l'idée que ces lésions sont prédictives à l'apparition des symptômes de l'arthrose.

-Les kystes sous-chondraux: apparaissent avec les œdèmes médullaires. Il a été suggéré qu'il existe une relation étroite entre les deux phénomènes et que les œdèmes médullaires sont des lésions pré-kystiques précoces (Carrino et al. 2006).

Il s'agit des lésions cavitaires de l'os sous-chondral trabéculaire qui peuvent être détectées par IRM. Ces cavités contiennent des fragments d'os nécrotiques et sont bordées par une paroi fibreuse (Pouders et al. 2008).

Il a été rapporté que les kystes sous-chondraux sont présents chez 75% des patients arthrosiques (Raynauld et al. 2008). Ils sont associés aux douleurs, aux atteintes structurelles de l'os sous-chondral et à la dégénérescence du cartilage (Chen et al. 2015). Une corrélation a été établie récemment entre les kystes sous-chondraux et l'inflammation synoviale dans les stades tardives de l'arthrose suggérant que l'inflammation synoviale pourrait être due aux anomalies sous-chondrales et non uniquement à la destruction du cartilage (Yusup et al. 2015).

Le remodelage osseux est l'une des causes qui pourraient contribuer à la formation de ces kystes (Carrino et al. 2006, Pouders et al. 2008). En effet, le stress mécanique pourrait favoriser un afflux liquidien provenant du réseau vasculaire osseux ou du liquide synovial qui remplit les cavités des kystes (Tanamas et al. 2010). De plus, il a été montré par une étude récente que les kystes sous-chondraux colocalisent avec les zones caractérisées par un remodelage osseux excessif (Chen et al. 2015).

5.2.2. Effet du stress mécanique sur l'os sous-chondral

Le stress mécanique joue un rôle clé dans le maintien d'une articulation saine. Des données à la fois cliniques et expérimentales chez l'animal indiquent qu'une activité physique légère ou modérée est une intervention non pharmacologique recommandée pour prévenir et soulager les symptômes de l'arthrose (Ko et al. 2013). Cependant, un stress mécanique excessif pourrait avoir des effets délétères sur l'homéostasie articulaire.

En effet, comme mentionné précédemment, le stress mécanique joue un rôle important dans l'apparition des lésions osseuses qui se caractérisent par une sclérose osseuse sous-chondrale, la formation des œdèmes médullaire, de kystes sous-chondraux et des ostéophytes. Il a été suggéré qu'un stress mécanique excessif pourrait entraîner des microfractures de l'os trabéculaire sous-chondral (Abramson et Attur. 2009) qui serait à l'origine de la sclérose sous-chondrale (Fazzalari et al. 1998). Il a été suggéré également qu'il pourrait induire des changements dans le contour et la hauteur de l'os sous-chondral appelés « attrition » (Loeser et al. 2012).

Des études *in vivo* ont confirmé ces effets délétères en montrant qu'un stress mécanique appliqué sur les genoux de souris dans des modèles animaux est capable d'altérer la structure sous-chondrale en favorisant la formation des ostéophytes, l'augmentation de la masse osseuse et la sclérose (Ko et al. 2013, Poulet et al. 2015).

En réponse à une stimulation mécanique, les ostéoblastes peuvent s'activer en exprimant des cytokines, des facteurs de croissance et des enzymes de dégradation, comme les chondrocytes. En effet, l'application d'une compression cyclique sur des ostéoblastes stimule la production de VEGF et de FGF-2, impliqués dans l'angiogénèse et le remodelage osseux (Dumas et al. 2009, Motokawa et al. 2005, Li et Hughes-Fulford 2006). Une étude *in vitro* a montré également que la compression des ostéoblastes, prélevés à partir de calvaria de souris induit une production d'IL-6 et de PGE2 par activation des voies Ca^{++} , ERK-1/2 et NF- κ B

(Sanchez et al. 2009). La même étude a montré que la compression de ces ostéoblastes réduit le ratio OPG/RANKL et augmente la production des MMP, favorisant la résorption osseuse. Plus récemment, une compression cyclique des ostéoblastes humains a montré les mêmes effets mentionnés ci-dessus et a induit l'expression des gènes impliqués dans la sclérose osseuse. Les auteurs suggèrent que la compression accélère le remodelage osseux, conduisant à une accumulation de la matrice ostéoïde hypominéralisée et que la formation des os est secondaire à la résorption osseuse et à la sécrétion des facteurs de croissance piégés dans cette matrice (Sanchez et al. 2012).

Ainsi, les différentes modifications de l'os sous chondral initiées par le stress mécanique semblent interagir entre elles, ce qui aggrave les lésions osseuses.

6. Communication entre l'os sous-chondral et le cartilage: rôle dans l'arthrose

La communication os/cartilage, que ce soit biologique ou mécanique crée une unité étroite et fonctionnelle entre les deux tissus qui permet d'assurer le maintien, la fonction et l'homéostasie articulaire (Findlay et Atkins 2014, Zhang et al.2012). En effet, l'os et le cartilage sont des structures très dynamiques et porteuses qui supportent la charge et modifient leur métabolisme en fonction des contraintes mécaniques en faisant varier leurs caractéristiques biomécaniques (Zhang et al.2012). Le changement des propriétés mécaniques ou biologiques de l'un peut modifier l'état de l'autre. Ainsi, les altérations liées au remodelage de l'os sous-chondral pourrait contribuer au développement d'un environnement biomécanique défavorable et aggraver la détérioration du cartilage articulaire (Goldring et Goldring 2007).

Les changements observés dans le cartilage et l'os sous-chondral sont médiés par les cellules de ces deux compartiments dont le rôle principal est de maintenir l'intégrité et la fonction de ces tissus. Ainsi, en réponse à un environnement mécanique et/ou biochimique altéré au cours de l'arthrose, les cellules fonctionnent différemment et présentent un profil d'expression génique différent suggérant un effet direct de ces influences externes. Les changements cellulaires dans un compartiment pourraient influencer les cellules de l'autre compartiment. (Findlay et Atkins 2014).

Ainsi, tous les facteurs induits par un stress mécanique et activant les ostéoblastes pourraient agir directement sur le cartilage ou changer les propriétés mécaniques de l'os sous-chondral qui pourrait à son tour avoir des effets néfastes sur le cartilage (Sanchez et al. 2012).

Inversement, le remodelage de l'os sous-chondral pourrait résulter de l'augmentation des charges suite à la perte de l'intégrité du cartilage (Glyn-Jones 2015). Cette communication entre l'os et le cartilage pourrait aggraver le processus pathologique. Ainsi, l'émergence des nouveaux concepts mettent les interactions tissulaires au cœur de la physiopathologie de l'arthrose et considèrent que l'os et le cartilage forment une unité fonctionnelle (Imhof et al. 2000, Lories et Luyten 2010, Sharma et al. 2013).

Les propriétés mécaniques de cette unité fonctionnelle os/cartilage peuvent être altérées par des changements dans leurs compositions et structures induits par une altération biologique, un remodelage osseux ou une dégradation du cartilage. Quand ces changements sont irréversibles, des réponses biologiques peuvent être déclenchées par le mécanisme de mécano-transduction via lequel les cellules convertissent les forces mécaniques en signaux biologiques. Par conséquent, un cercle vicieux entre les changements biologiques et mécaniques se met en place aboutissant à l'initiation et/ou la progression de l'arthrose (Zhang et al. 2012).

6.1. Mise en évidence des interactions entre os sous-chondral et cartilage au cours de l'arthrose

De nombreuses données soulignent clairement les relations étroites existant entre les modifications du cartilage et de l'os sous-chondral au cours de l'arthrose. Une signalisation directe existerait entre les deux compartiments (Imhof et al. 2000; Pan et al. 2009; Clark and Huber 1990). Ces deux structures sont couplées fonctionnellement soit par la répartition des charges communes ou par l'échange des médiateurs solubles (Pan et al. 2012)

De nombreuses modifications au niveau de l'os sous-chondral tels que le remodelage osseux, la formation des oedèmes médullaires, des kystes et des ostéophytes ont été trouvée corrélées aux modifications du cartilage articulaire confirmant ainsi l'idée que les anomalies structurelles de l'os sous-chondral sont liées au développement de l'arthrose.

6.1.1. Lien entre le remodelage osseux et la dégradation du cartilage

Au cours de l'arthrose, le remodelage osseux peut altérer les propriétés mécaniques et biochimiques du cartilage induisant ainsi sa dégénérescence.

Une étude réalisée chez des patients atteints de gonarthrose a montré qu'un remodelage osseux excessif est prédictif du pincement de l'interligne articulaire (Dieppe et al.1993). En outre, divers modèles expérimentaux d'arthrose ont montré que le remodelage osseux

pourrait avoir un impact direct sur la gravité des lésions du cartilage (Funck-brentano et al. 2012, Belido et al. 2010, Kadri et al. 2010).

En effet, l'inhibition du remodelage osseux chez des modèles animaux d'arthrose par administration des substances spécifiques tels que l'alendronate chez le rat (Hayami et al. 2004), l'OPG chez la souris (Kadri et al. 2008) ou la calcitonine chez le lapin (Papaioannou et al. 2007) et le chien (El Hajjaji et al. 2004), a réduit la sévérité des lésions du cartilage. Ces études suggèrent ainsi qu'une inhibition du remodelage osseux pourrait protéger contre la dégradation du cartilage, mettant en évidence le lien et la relation causale entre les deux processus au cours de l'arthrose.

Il est suggéré aussi que la sclérose sous-chondrale est liée à la dégradation du cartilage, non seulement en modifiant les propriétés mécaniques de l'os sous-chondral mais aussi en sécrétant des facteurs biochimiques qui affecte le métabolisme du cartilage (Sanchez et al. 2012).

Plusieurs études sur des modèles d'arthrose spontanée ou induite par chirurgie supportent l'idée que la sclérose de l'os sous-chondral précède la perte de l'intégrité du cartilage durant l'arthrose (Radin et Rose 1986, Pastoureau et al. 2003, Anderson-MacKenzie et al. 2004). En plus, il a été montré récemment que la sclérose de l'os sous-chondral engendrée par le stress mécanique est encore plus accentuée dans les régions sous-jacentes des lésions du cartilage (Poulet et al. 2015).

Toutes ces données mettent en évidence l'influence du remodelage osseux sur le cartilage sus-jacent et illustrent ainsi l'idée qu'il existe un lien fonctionnel et mécanique entre l'os sous-chondral et le cartilage.

6.1.2. Lien entre la formation des œdèmes médullaires, des kystes sous-chondraux et des ostéophytes et la dégradation du cartilage

De même que le remodelage osseux, il existe une corrélation entre les autres lésions osseuses sous-chondrales et la perte du cartilage. En effet, la corrélation entre la taille des kystes sous-chondraux et des œdèmes médullaires, dans le compartiment médial, augmente au cours de temps avec l'importance de la perte du cartilage (Raynauld et al. 2008) suggérant un lien entre les deux processus.

De plus, il a été montré que l'absence des œdèmes médullaires était associée à une diminution de risque de perte du cartilage, alors que, la progression ou le développement des nouveaux

œdèmes étaient associés à un risque plus élevé de développer des lésions du cartilage (Van der Kraan et Van den Berg 2007). Ces lésions ont été observées régulièrement en relation avec des altérations du cartilage dans la même région (Hunter et al. 2006, Baranayay et al. 2007, Guymer et al. 2007). De même, des grades élevés de lésions du cartilage semblent être associées à une prévalence plus élevée et un plus grand volume des œdèmes médullaires (Kijowski et al. 2006). D'autres études effectuées également chez l'homme montrent que la présence des œdèmes médullaires est prédictive des pertes du cartilage et d'un risque accru de développer une gonarthrose (Wluka et al. 2009) et l'identifient comme un facteur de risque de la détérioration du genou arthrosique (Felson et al. 2003).

Concernant les ostéophytes, bien que leur formation ne soit pas tout à fait corrélée aux lésions du cartilage, la perte du cartilage, traduite par un rétrécissement de l'espace articulaire, est rapportée comme étant fortement associée à la présence des ostéophytes (Van der Kraan et Van den Berg 2007)

L'ensemble de ces données établit le lien entre les modifications observées au niveau de l'os sous-chondral avec celles observées dans le cartilage au cours de l'arthrose. Ainsi, la communication entre les deux tissus semble être l'un des acteurs centraux de l'initiation et de la progression de l'arthrose.

6.2. Interactions mécaniques entre os et cartilage

Le cartilage articulaire et l'os sous-chondral forment une unité biomécanique dont le rôle est d'amortir les contraintes mécaniques appliquées sur l'articulation. De nombreuses études suggèrent que les deux structures agissent en concert avec des fonctions mécaniques complémentaires (Zhang et al. 2012).

En effet, l'altération des propriétés mécaniques de l'os sous-chondral se répercute sur les capacités d'amortissement de l'articulation et donc du cartilage (Rogers et al. 2004, Goldring et Goldring 2010). On peut citer l'exemple d'une mutation pour le collagène de type I chez la souris, à l'origine d'une fragilité osseuse, qui aboutit à une dégradation progressive du cartilage (Blair-Levy et al. 2008). En outre, une altération de la forme de l'os sous-chondral chez l'homme par aplatissement ou par dépression de sa surface a été rapportée comme étant associée à la sévérité des lésions du cartilage adjacent (Neogi et al. 2009).

Au cours de l'arthrose, l'épaississement de la plaque osseuse sous-chondrale pourrait entraîner une augmentation des contraintes mécaniques appliquées sur le cartilage. Ce stress mécanique excessif altère le métabolisme du cartilage et entraîne sa dégradation progressive

(Radin et Rose 1986, Radin et al. 1970). Ceci est confirmé par des analyses de corrélation montrant que l'épaisseur du cartilage est en corrélation négative avec l'épaisseur de la plaque osseuse sous-chondrale et positive avec sa porosité (Hamann et al. 2013).

Les dommages du cartilage eux même pourraient accélérer le remodelage osseux et la sclérose en modifiant les propriétés mécaniques de l'articulation (Stok et al. 2009). Une étude *in vivo* indique qu'une sclérose peut être induite en utilisant un modèle de stress mécanique transitoire sous un cartilage intact et que les régions du cartilage altérées sous l'effet des charges appliquées, pourrait accentuer cette sclérose (Poulet et al. 2015). D'autres résultats obtenus après un stress mécanique appliqué pendant 6 semaines sur les articulations des souris indiquent que les sites anatomiques de l'épaississement sous-chondral correspondent aux régions de l'amincissement du cartilage, suggérant que chaque tissu répond aux contraintes mécaniques locales et aux changements réciproques de l'autre tissu (Ko et al. 2013). Il est suggéré que la progression de la sclérose de l'os dans la plaque osseuse sous-chondrale pourrait entraîner une dégradation du cartilage qui conduit à son tour à un épaississement du cartilage calcifié contribuant ainsi à promouvoir davantage la sclérose osseuse (Henrotin et al. 2012).

Des observations cliniques confirment cette association mécanique entre les lésions du cartilage et la sclérose de l'os sous-chondral s'accompagnant de l'augmentation de la densité minérale osseuse dans les hanches et les genoux de patients arthrosiques (Buckland-Wright 2004).

L'ensemble de ces résultats soutiennent donc le concept selon lequel l'os sous-chondral et le cartilage sus-jacent forment une unité mécanique et que l'initiation et la progression de la dégénérescence du cartilage implique une rupture de l'équilibre mécanique entre ces deux structures. L'intégrité mécanique du cartilage et sa résistance aux différents stress ne dépendent donc pas uniquement de la composition biochimique de sa MEC, mais aussi de son interaction avec l'os sous-chondral (Hamann et al. 2013).

6.3. Interactions biochimiques entre os et cartilage

De nombreuses données mettent en évidence la présence, en conditions basales, d'une interaction biochimique entre l'os et le cartilage via un réseau de molécules solubles permettant de maintenir l'articulation intacte. En effet, des études réalisées chez des modèles animaux suggèrent qu'en conditions physiologiques, des nutriments provenant de l'os pourraient nourrir le cartilage par l'intermédiaire de structures qui connectent les deux tissus (Malinin et Ouellette 2000, Imhof et al. 1999, Sharma et al. 2013).

De plus, des études réalisées *in vivo* et *ex vivo* ont montré que plusieurs molécules provenant de l'os sous-chondral peuvent diffuser vers le cartilage articulaire humain à travers le cartilage calcifié (Lories et Luyten 2010). En effet, la courte distance de diffusion et la perméabilité du cartilage calcifié suggèrent que des cytokines et nombreux substrats sont capables de diffuser entre l'os et le cartilage (Zhang et al. 2012) assurant ainsi une communication biochimique entre les deux tissus. Des expériences réalisées sur des explants bovins montrent également que l'os sous-chondral influence la survie des chondrocytes durant la période de la culture (Amin et al. 2009).

Ainsi, le remodelage osseux excessif observé chez les patients arthrosiques et dans des modèles animaux a conduit à émettre l'hypothèse que divers médiateurs solubles pourraient être libérés lors de ce processus pour atteindre le cartilage articulaire et lancer un cercle vicieux entre les tentatives de réparation par les deux tissus conduisant éventuellement à la progression de l'arthrose (Pan et al. 2012).

In vivo, deux modèles animaux d'arthrose différents (spontanée ou DMM) ont confirmé la possibilité de diffusion des petites molécules entre l'os et le cartilage et ceci en quantifiant la diffusion du sodium fluorescent (sodium fluorescein) (376Da) de l'os vers le cartilage (Pan et al. 2012).

Sur des explants humains, il a été montré que la conductance hydraulique du cartilage articulaire et de la plaque osseuse sous-chondrale augmente avec la progression de l'arthrose pour faciliter la diffusion des molécules entre les deux tissus (Hwang et al. 2008).

6.4. Modèles d'étude de la communication os/cartilage

L'interaction biochimique entre os et cartilage a été étudiée en utilisant différents modèles de communication établis *in vitro*, afin de déterminer son rôle dans l'arthrose. Ces modèles diffèrent entre les études : soit par culture des ostéoblastes en présence des chondrocytes (co-culture directe) soit par stimulation des chondrocytes par le milieu conditionné des ostéoblastes (co-culture indirecte).

6.4.1. Modèles de co-culture directe ostéoblastes/chondrocytes

La première étude réalisée a montré que la co-culture des cellules dérivées d'os arthrosique avec des explants du cartilage induit la perte des protéoglycanes, alors que les cellules dérivées d'os sain n'ont aucun effet (Westacott et al. 1997). Ces résultats suggèrent que des médiateurs solubles sont libérés par les ostéoblastes arthrosiques capables d'induire la dégradation du cartilage.

Des études plus récentes montrent que les chondrocytes cultivés en billes d'alginate en présence d'ostéoblastes présentant un phénotype sclérotique produisent moins d'aggrégane et montrent une expression augmentée de MMP-3 et MMP-13 (Sanchez et al. 2005). Les médiateurs produits par ces ostéoblastes inhibent l'expression chondrocytaire de SOX9, du collagène de type II et du récepteur à l'hormone parathyroïde induisant donc leur différenciation hypertrophique (Sanchez et al. 2005).

Un autre modèle de co-culture, entre les chondrocytes et les ostéoblastes subissant un stress mécanique excessif et répétitif, a montré une différenciation plus marquée vers un phénotype hypertrophique que celle obtenue avec des ostéoblastes non stressés. Suite à cette co-culture, l'expression chondrocytaire de MMP-1, MMP-3 et MMP-13 est augmentée alors que celle de protéoglycanes et du collagène est diminuée. Ceci fournit une explication sur l'initiation et la progression de l'arthrose dans un environnement altéré dû aux contraintes mécaniques et aux échanges biologiques (Lin et al. 2010).

L'ensemble de ces résultats montrent qu'en présence des ostéoblastes scléreux ou ayant subi un stress mécanique, les chondrocytes changent de phénotype et deviennent hypertrophiques et/ou cataboliques. Ceci suggère la possibilité d'une interaction biochimique entre les deux tissus capable d'induire un changement phénotypique des chondrocytes qui pourrait amplifier le processus pathologique au cours de l'arthrose.

6.4.2. Modèle de co-culture indirecte ostéoblastes/chondrocytes

❖ Co-culture ostéoblastes/chondrocytes humains arthrosiques :

Un modèle de co-culture indirecte a mis en évidence l'effet des molécules secrétées par les ostéoblastes arthrosiques sur le phénotype chondrocytaire. En effet, les milieux conditionnés des ostéoblastes arthrosiques utilisés pour stimuler les chondrocytes augmentent l'expression chondrocytaire de protéases matricielles MMP-2, MMP-3, MMP-9, ADAMTS-5 et ADAMTS-4 (Prasad et al. 2012). Ceci suggère que des médiateurs solubles sont secrétés par les ostéoblastes et favorisent l'acquisition d'un phénotype catabolique des chondrocytes.

❖ Modèle de communication intégrant des aspects mécaniques et biochimiques: un nouveau modèle de communication os/cartilage :

Comme il a été mentionné précédemment, le stress mécanique joue un rôle clé dans le développement de l'arthrose et il est l'un des acteurs centraux des altérations osseuses au

cours de cette pathologie. En effet, les études présentées précédemment montrent que le stress mécanique appliqué sur les ostéoblastes induit la sécrétion des médiateurs inflammatoires (IL-6 et PGE2) (Sanchez et al. 2009) et des facteurs de croissance (Dumas et al. 2009, Motokawa et al. 2005, Li et Hughes-Fulford 2006). Il favorise également l'acquisition d'un phénotype scléreux (Sanchez et al. 2012) qui semble jouer à son tour un rôle dans l'altération de l'interaction biochimique entre os et cartilage (Sanchez et al. 2005).

L'ensemble de ces données suggère donc que le stress mécanique pourrait jouer un rôle majeur dans la mise en place d'une communication biochimique altérée entre l'os et le cartilage au cours de l'arthrose, en favorisant le passage des médiateurs solubles de l'os vers le cartilage.

Pour répondre à cette hypothèse, notre équipe a établi un modèle de communication entre os et cartilage (**Figure 20**). Ce modèle consiste à comprimer de façon cyclique des ostéoblastes/ostéocytes murins grâce au système Flexercell (**Figure 21**). Les milieux conditionnés de ces cellules comprimées ont été utilisés pour stimuler des chondrocytes articulaires murins (Priam et al. 2013).

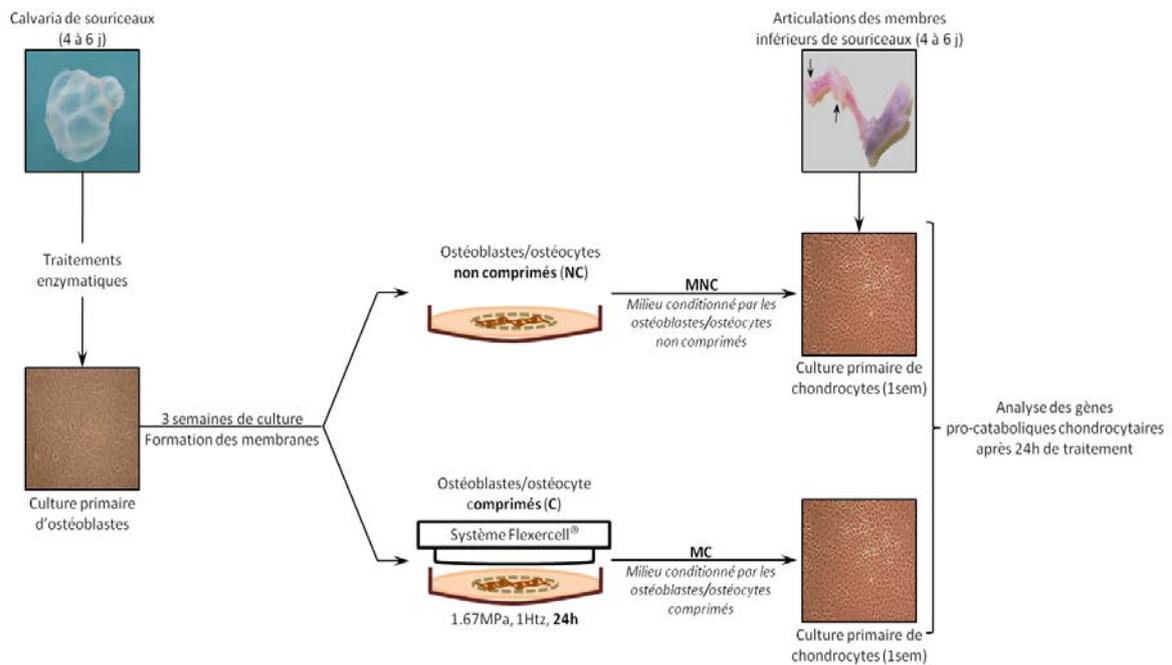
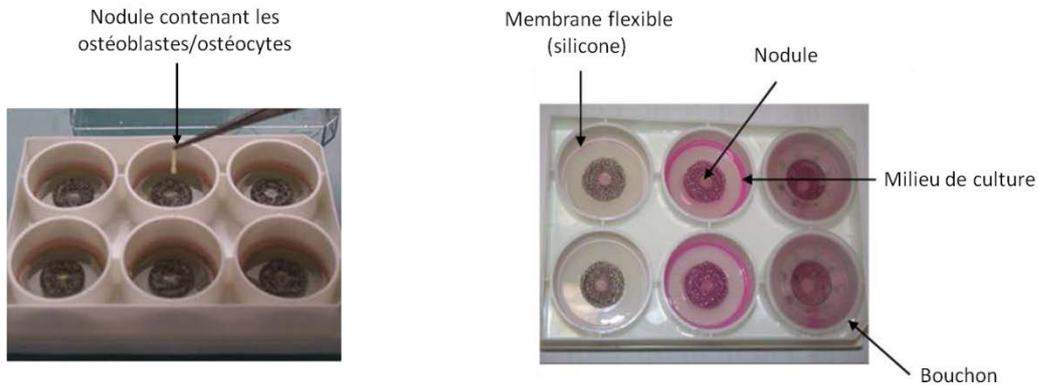
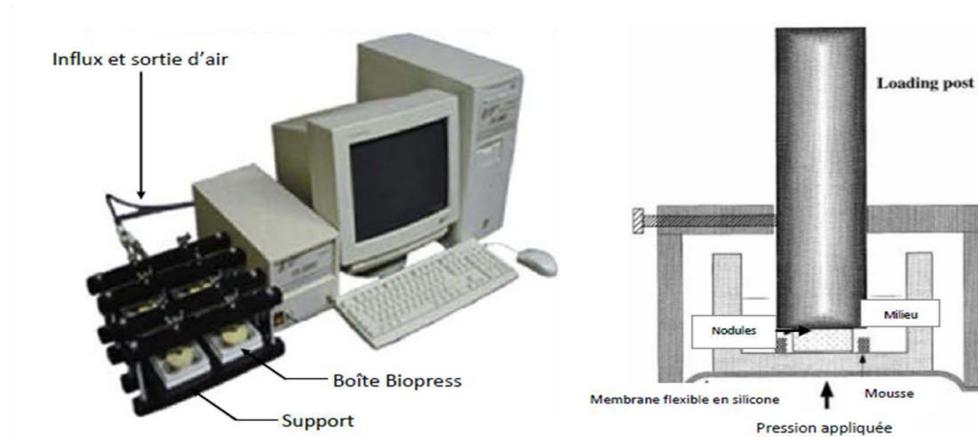


Figure 20 : Schéma du modèle murin de communication os/cartilage.

Les ostéoblastes sont isolés de la calvaria de souriceaux nouveaux (âgés de 5 à 6 jours) par digestion enzymatique et cultivés durant 3 semaines. Durant ces 3 semaines les cellules se différencient et synthétisent une matrice extracellulaire dans laquelle elles sont enchâssées, formant des nodules. Ces nodules osseux contenant les cellules sont comprimés (1,67 MPa – 1Hz) ou non pendant 24h grâce au système Flexercell. Puis les milieux conditionnés des ostéoblastes non comprimés et comprimés ont été utilisés pour stimuler les chondrocytes articulaires. Après 24h de ce traitement, les surnageants, les protéines et les ARN des chondrocytes sont récupérés afin d’analyser l’expression des gènes impliqués dans la dégradation du cartilage.

Les paramètres de compression utilisés ont été définis par une étude préalable (Sanchez et al. 2009) montrant que la compression des ostéoblastes à une intensité de 1,67 MPa et à une fréquence de 1Hz représente un stress délétère pour les cellules induisant la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires. Il a été vérifié par le test de viabilité (test MTT) et de cytotoxicité (dosage de la LDH) que ce type de stress pendant 24h n’engendre pas une mort cellulaire.

(A) Disposition des nodules osseux dans les boîtes Biopress**(B) Flexercell Compression Plus FX 4000-C****Figure 21 : Présentation du système Flexercell.**

(A) Les nodules osseux formés après 3 semaines de culture des ostéoblastes/ostéocytes sont placés dans des puits de boîtes Biopress contenant du milieu de culture (milieu CO₂ indépendant supplémenté par de pénicilline et de streptomycine). **(B)** Les boîtes sont ensuite fermées par des bouchons et insérées dans le support du Flexercell, puis dans une étuve à 37°C (sans injection de CO₂). L'ordinateur contrôle l'intensité et la fréquence du flux d'air envoyé. L'air se répartit sous les boîtes et déforme la membrane flexible comprimant ainsi l'échantillon contre le bouchon.

Les résultats obtenus, suite à ces expériences, ont montré que la stimulation des chondrocytes par les milieux conditionnés d'ostéoblastes comprimés augmente l'expression génique ainsi que la sécrétion de MMP-3 et MMP-13. Cette stimulation induit également l'expression des aggrecanases ADAMTS-4 et ADAMTS-5. Parallèlement, l'expression de TIMP-2 et -3 mais

pas celle de TIMP-1 est diminuée en réponse aux milieux conditionnés comprimés. Ceci suggère que les milieux conditionnés des ostéoblastes comprimés stimulent l'expression des protéases matricielles et diminuent l'expression de leurs inhibiteurs naturels, favorisant ainsi l'activité de ces enzymes. Enfin, ces milieux conditionnés diminuent de façon dépendante l'expression des composants matriciels ; l'aggrécane et le collagène de type II, suggérant une synthèse matricielle altérée (Priam et al. 2013).

Les résultats obtenus à partir de ce modèle mettent en évidence le rôle joué par le stress mécanique dans l'altération de l'interaction biochimique entre os/cartilage. Cette altération se traduit par la stimulation de la libération des médiateurs solubles à partir des ostéoblastes, capables d'induire un phénotype catabolique chondrocytaire.

En outre, ce modèle ainsi que la co-culture indirecte des ostéoblastes/chondrocytes humains ont permis de reproduire les résultats obtenus à partir de modèle de co-culture directe des ostéoblastes scléreux ou stressés avec des chondrocytes.

Ainsi, l'identification des médiateurs impliqués dans cette communication biochimique ainsi que leurs modes d'action pourrait aider à développer un diagnostic précoce et un traitement plus efficace pour l'arthrose.

6.5. Structures impliquées dans la communication biochimique entre os et cartilage

La diffusion moléculaire entre os et cartilage à travers les tissus calcifiés est assurée par deux structures différentes présentes au niveau de la jonction ostéochondrale : les micro-fissures et les canaux vasculaires (Sellam 2016, Lories et Luyten 2010). Ces deux types de connexion entre l'os et le cartilage ont été identifiés dans les articulations arthrosiques (Henrotin et al. 2012). Ils pourraient favoriser ainsi les interactions biochimiques entre les deux tissus (Sellam 2016, Sharma et al. 2013) en fournissant une voie de passage pour les signaux biologiques (Lajeunesse et Rebol 2003).

En effet, la surcharge excessive produite au cours du processus dégénératif de l'arthrose conduit à l'apparition des lésions dans la région sous-chondrale y compris les micro-fissures et les canaux vasculaires qui favorisent l'apparition d'une communication anormale entre l'os et le cartilage (Imhof et al. 2000) (**Figure 22**).

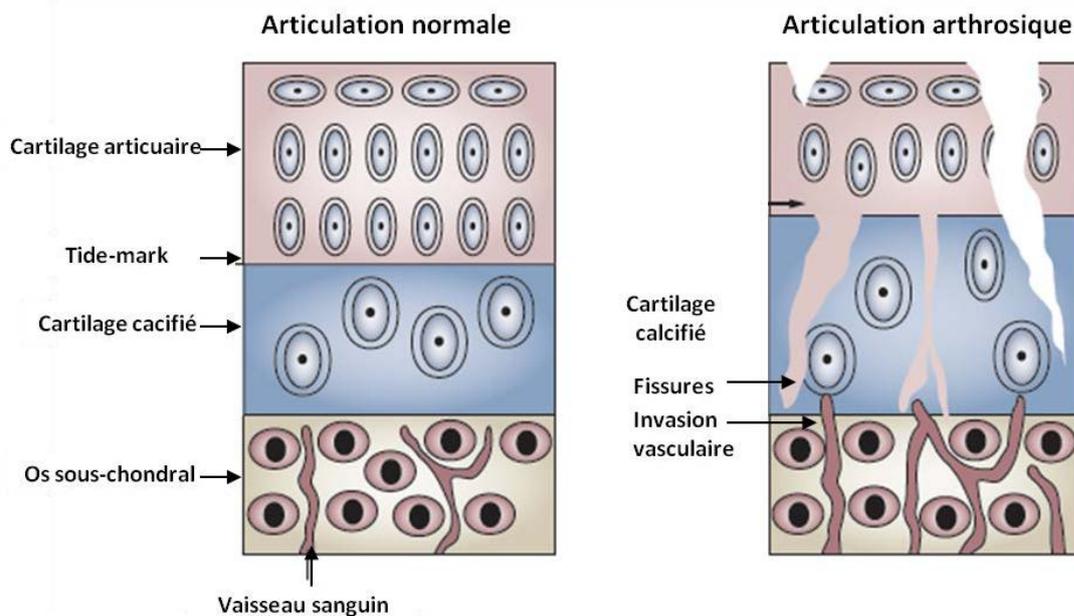


Figure 22: Modifications structurales de l'unité os/cartilage au cours de l'arthrose.

Ces modifications altèrent la communication biochimique entre les deux tissus. Adapté de (Lories et Luyten 2010).

❖ Les micro-fissures :

Ces structures mesurent 2 à 7 μ m de large et se situent entre la tide mark et la plaque osseuse sous-chondrale (**Figure 23**). Elles sont présentes dans le cartilage articulaire calcifié des personnes âgées et des patients arthrosiques et quasi absentes chez des sujets jeunes et sains, suggérant ainsi leur développement avec l'âge et au cours des pathologies articulaires dégénératives (Sokoloff 1993).

Leur développement est lié aux contraintes mécaniques appliquées sur l'articulation (Burr et Radin 2003) et leur présence pourrait faciliter le transfert des médiateurs solubles vers les couches profondes du cartilage (Lajeunesse et Reboul 2003). Ceci potentialise la progression des lésions du cartilage au cours de l'arthrose.

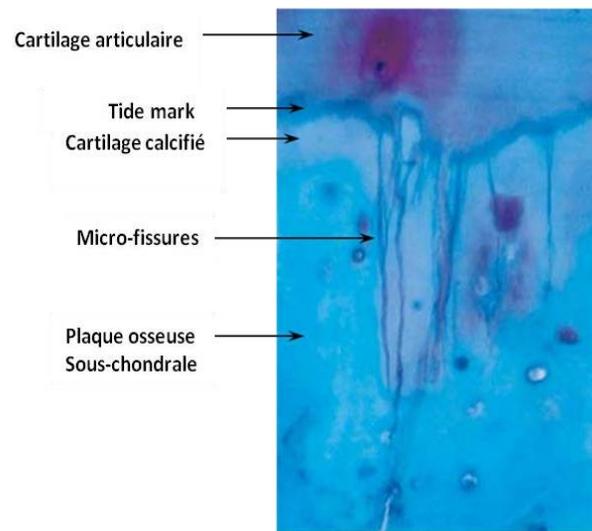


Figure 23 : Les micro-fissures ostéochondrales

Une coupe histologique du cartilage articulaire mettant en évidence la présence des micro-fissures traversant le cartilage calcifié. Adapté de (Sokoloff 1993).

❖ Les canaux vasculaires :

L'os sous-chondral et les couches profondes du cartilage sont connectés par des canaux vasculaires assurant les apports nutritifs de l'os vers le cartilage. En effet, il a été affirmé que plus de 50% du glucose, oxygène et besoins en eau du cartilage sont fournis par l'intermédiaire des vaisseaux de l'os sous-chondral (Imhof et al. 2000).

Le fait que ces canaux vasculaires franchissent la tide mark et envahissent le cartilage articulaire (**Figure 24**) est un signe pathologique (Walsh et Pearson 2001). Il a été montré qu'ils deviennent plus abondants dans le cartilage des patients arthrosiques, comparé à celui des sujets sains suggérant l'activation du processus angiogénique au cours de l'arthrose (Walsh et al. 2010). Cette angiogenèse ostéochondrale a été trouvée associée à un remplacement de la moelle osseuse par un tissu fibrovasculaire exprimant fortement VEGF (Walsh et al. 2010). Ce dernier pourrait fournir ainsi les signaux nécessaires pour le recrutement des éléments vasculaires, ce qui contribue probablement à un déséquilibre entre les facteurs angiogéniques et angiostatiques au niveau de la jonction ostéochondrale.

Le nombre des canaux vasculaires a été trouvé augmenté aussi dans les articulations des modèles animaux d'arthrose, où ils franchissent l'interface ostéochondrale et progressent vers la tide mark. Une fraction de ces vaisseaux dépasse la tide mark tous 160 ou 236 μm dans les deux modèles d'arthrose (Pan et al. 2012).

Durant l'arthrose, la progression des canaux vasculaires vers le cartilage est due à une activité augmentée des ostéoclastes (Mapp et Walsh 2012). En outre, ces structures semblent se concentrer dans les zones où des fortes contraintes mécaniques sont imposées (Berry et al. 1986, Lories et Luyten 2010) suggérant ainsi le rôle joué par le stress mécanique dans la stimulation du développement de ces structures qui altèrent la communication biochimique entre os et cartilage.



Figure 24 : Coupe histologique montrant un canal vasculaire franchissant la jonction ostéochondrale dans le cas d'une arthrose humaine.

Le canal vasculaire est indiqué par la flèche noire et la direction de sa formation est indiquée par la pointe de flèche rouge. Adapté de (Mapp et Walsh 2012).

Les vaisseaux sanguins, qui se développent à partir de l'os sous-chondral pour occuper les canaux vasculaires, sont accompagnés par des prolongements des nerfs sympathiques et sensoriels (Suri et al. 2007). Il a été observé que des fibres nerveuses sensorielles exprimant le facteur de croissance NGF (Nerve Growth Factor) sont associées à l'angiogenèse ostéochondrale. Ceci suggère un lien entre la néo-vascularisation ostéochondrale et la douleur au cours de l'arthrose (Walsh et al. 2010).

Plus qu'un rôle dans la sensation de douleurs, cette néo-vascularisation et l'invasion des canaux vasculaires dans le cartilage articulaire représentent une voie de communication biologique forte permettant le transport des médiateurs solubles à travers les tissus calcifiés entre l'os et le cartilage qui pourraient initier et ou/ amplifier le processus arthrosique.

6.6. Médiateurs identifiés dans la communication os/cartilage

Différents médiateurs provenant de l'os sous-chondral sont capables de réguler le métabolisme du cartilage (Funck-brentano et Cohen-Solal. 2015). Ces facteurs sont notamment produits suite au remodelage osseux ou à l'activation des ostéoclastes et ostéoblastes (Pan et al. 2012). Les médiateurs sécrétés par les ostéoblastes et potentiellement capables de modifier le phénotype chondrocytaire sont discutés ci-dessous :

- ❖ **HGF** (Hepatocyte growth factor) est un potentiel candidat de cette communication os/cartilage (Lajeunesse et Reboul. 2003). En effet, l'expression de ce facteur en ARNm et protéines est détectée dans les ostéoblastes de l'os sous-chondral, tandis qu'il est détecté uniquement en protéines, dans le cartilage articulaire humain provenant des patients atteints d'arthrose (Sharma et al. 2013). Il est détecté uniquement au niveau des couches profondes du cartilage, ce qui suggère sa sécrétion par l'os sous-chondral et sa diffusion ensuite dans le cartilage (Guévremont et al. 2003, Pfander et al. 1999). Ce médiateur induit l'expression de MMP-13 dans les chondrocytes humains en culture, ce qui suggère son rôle dans la dégradation du cartilage (Reboul et al. 2001).
- ❖ **IGF-1** (Insulin-like growth factor-1) est également un médiateur largement transporté vers le cartilage (Zhang et al. 2010). Il s'agit du premier facteur de croissance identifié avec des effets anaboliques puissants dans les chondrocytes (Tyler 1989, Aigner et Sachse. 2006). Plusieurs données suggèrent son implication dans l'arthrose. En effet, son rôle dans l'amélioration de la prolifération des chondrocytes et de la synthèse des produits matriciels a été montré par des études à la fois *in vivo* et *in vitro* (Claessen et al. 2010). De plus, il est capable d'inhiber l'effet des cytokines sur la dégradation du cartilage (Tyler 1989, Fosang et al. 1991). Ainsi, IGF-1 pourrait être sécrété par l'os vers le cartilage où il jouerait un rôle anabolique et protecteur.
- ❖ **TGF- β** (transforming growth factor- β) est un facteur de croissance fortement exprimé par les ostéoblastes arthrosiques au cours du remodelage osseux (Couchourel et al. 2009). Son rôle dans l'arthrose est actuellement discuté (Fang et al. 2016). Il est connu comme un agent protecteur au cours de l'arthrose (Malemud 2010) dû à son rôle anabolique dans les chondrocytes (Aigner et Sachse. 2006). De nombreux rapports indiquent que le TGF- β 1 stimule la synthèse du collagène et des protéoglycanes par les chondrocytes *in vitro* et *in vivo*. En revanche, d'autres études

montrent qu'il est capable d'induire l'expression des enzymes de dégradation de cartilage par les chondrocytes (Fang et al. 2016).

- ❖ **VEGF** (Vascular endothelial growth factor) est un facteur pro-angiogénique, dont l'expression, d'après une méta-analyse effectuée récemment, est fortement corrélée à l'arthrose (Yuan et al. 2014). Il a été proposé aussi qu'il est responsable de la néo-vascularisation du cartilage hypertrophique (Carlevaro et al. 2000). Dans le cartilage, il joue un rôle anti-catabolique, en diminuant la synthèse de la cathepsine B (Pulsatelli et al. 2005).
- ❖ **FGF-2** (fibroblast growth factor-2) est un médiateur fortement exprimé par les ostéoblastes scléreux ou ayant subi une compression cyclique mimant le stress mécanique observé au cours de l'arthrose (Sanchez et al. 2012). Il est suggéré qu'il est impliqué dans l'hypertrophie chondrocytaire et la minéralisation du cartilage durant l'arthrose (Sanchez et al. 2012). Cependant, les effets de ce médiateur sur les chondrocytes sont controversés. En effet, certaines études montrent son rôle anti-catabolique favorisant la régénération du cartilage et d'autres études suggèrent un rôle plutôt catabolique (Li et al. 2012).
- ❖ **Des interleukines** pourraient également jouer un rôle dans la communication os/cartilage. IL-6 et IL-8 sont deux cytokines dont la production est induite par les ostéoblastes scléreux ou en réponse à un stress mécanique (Sanchez et al. 2009, Sanchez et al. 2012). Au niveau du cartilage, IL-6 est capable d'initier la dégradation de la MEC ou agir en synergie avec d'autres cytokines pro-inflammatoires pour amplifier et accélérer le processus pathologique (Malemud 2010). Quant à l'IL-8, il a été montré qu'elle est impliquée dans la différenciation hypertrophique des chondrocytes et la calcification du cartilage (Merz et al. 2003).
- ❖ **OPG (Ostéoprotégérine)** est un médiateur clé impliqué dans la régulation du remodelage osseux (Lloyd et al. 2008). Il a été suggéré comme un régulateur potentiel de l'homéostasie du cartilage, dans un modèle *ex-vivo* sur des explants d'os et de cartilage arthrosiques (Funck-Brentano et al. 2012). Son taux a été montré diminué dans les ostéoblastes scléreux en faveur de RANKL qui active les ostéoclastes et favorise le remodelage osseux (Sanchez et al. 2012). L'expression de ce dernier dans le cartilage a été montrée élevée et associée au remodelage osseux augmenté au cours des stades précoces de l'arthrose (Upton et al. 2012). Il est suggéré que ces deux facteurs sont impliqués dans la communication os/cartilage en régulant à

la fois la résorption osseuse et le catabolisme du cartilage (Funck-Brentano et al. 2012).

- ❖ **HMGB1** (High mobility group box 1) est une protéine suggérée comme étant une alarmine sécrétée par les cellules osseuses nécrotiques et agissant comme une cytokine (Bidwell et al. 2008). Elle est détectée au niveau de la tide mark et suggérée capable de jouer un rôle dans l'ossification endochondrale au niveau de l'interface os/cartilage (Taniguchi et al. 2007). En outre, elle induit la dégradation du cartilage et la différenciation hypertrophique des chondrocytes (Liu-Bryan et al. 2010).

- ❖ **Médiateurs identifiés par des approches globales : La sécrétomique différentielle**

Il a été mentionné précédemment (dans la partie modèle de co-culture indirecte de la section 6.4.2) que le modèle de communication os/cartilage établi par notre équipe a permis de mettre en évidence un effet catabolique induit par les milieux conditionnés des ostéoblastes/ostéocytes comprimés sur les chondrocytes.

Ainsi, pour identifier les médiateurs sécrétés par ces cellules en réponse à la compression et responsables de la mise en place de ce profil catabolique, notre équipe a eu recours à la technique de sécrétomique différentielle iTRAQ® (isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation).

Cette technique permet de comparer simultanément jusqu'à huit conditions différentes (Ross, et al. 2004). Elle consiste à marquer les peptides, issus de la digestion par la trypsine, par des tags chimiques, dit isobariques. Ces tags se composent : d'un groupement réactif permettant la fixation des tags, un groupement rapporteur dont la masse varie en fonction du tag permettant ainsi la quantification et un groupement balance permettant d'équilibrer les variations de masse du groupement rapporteur. Après le marquage, les peptides ont été séparés par chromatographie et finalement analysés en spectrométrie de masse. Celle-ci génère une coupure de part et d'autre du groupement balance, et permet la libération du groupement rapporteur. La quantité de rapporteurs libérés est proportionnelle à la quantité de peptide initialement présent et la quantité relative de chaque protéine dans l'échantillon est déterminée grâce aux rapports entre les différents tags (**Figure 25**).

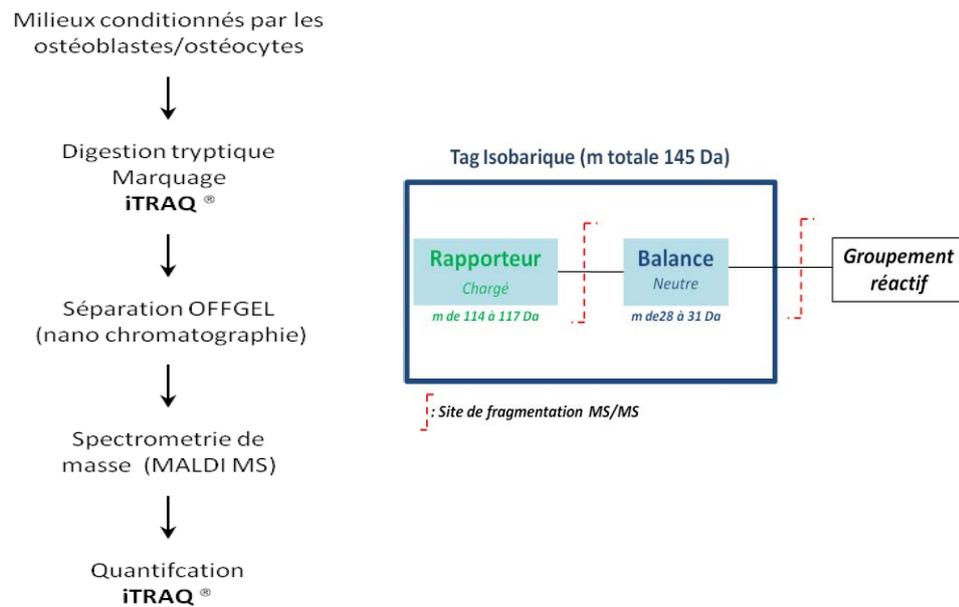


Figure 25 : Analyse iTRAQ des milieux conditionnés d'ostéoblasts/ostéocytes et schéma du tag iTRAQ®.

Grâce à cette technique, l'analyse des milieux conditionnés d'ostéoblastes comprimés et non comprimés a permis d'identifier 104 protéines parmi lesquelles 25 sont sécrétées différemment en réponse à la compression. La sécrétion de 10 protéines seulement a été trouvée augmentée par les ostéoblastes comprimés. Ces médiateurs augmentés incluent des protéines impliquées dans le stockage du calcium et des protéines de la matrice extracellulaire (**Figure 26**).

Ces résultats étaient attendus, étant donné que le stress mécanique est un stimulus ostéoformateur puissant et un régulateur des protéines matricielles qui ont été trouvées induites (Priam et al. 2013).

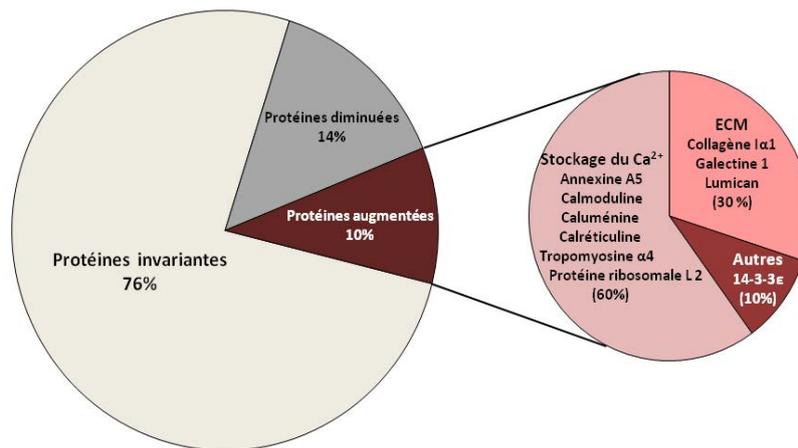


Figure 26 : Résultats obtenus à partir des analyses de sécrétomique différentielle.

Ces résultats mettent en évidence le profil des protéines sécrétées suite à la compression des ostéoblastes/ostéocytes.

L'augmentation de la sécrétion d'une molécule chaperonne dans les milieux conditionnés des ostéoblastes comprimés était inattendue ; il s'agit de la protéine **14-3-3ε**. Les résultats de la quantification montrent que sa sécrétion augmente significativement (4,5 fois en moyenne) en réponse à la compression. Un western blot réalisé sur les milieux conditionnés des ostéoblastes/ostéocytes a confirmé son induction (6.8 fois en moyenne) par la compression cyclique (Priam et al. 2013).

Afin d'évaluer ensuite son effet catabolique, des cultures primaires de chondrocytes articulaires murins ont été stimulés par des doses croissantes de 14-3-3ε recombinante. Les résultats obtenus montrent que cette protéine est capable d'induire l'expression et la sécrétion chondrocytaires de MMP-3 et MMP-13, réguler l'expression des TIMP-1, -2 et -3 et diminuer l'expression d'aggrécane et de collagène de type II (Priam et al. 2013).

L'immuno-déplétion de 14-3-3ε dans les milieux conditionnés a fortement réduit l'expression de MMP-3 et MMP-13 chondrocytaires.

Ces résultats confirment donc le rôle catabolique de 14-3-3ε et l'identifient comme un médiateur responsable de l'acquisition du phénotype catabolique chondrocytaire obtenu dans le modèle communication os/cartilage décrit précédemment (dans la partie modèle de co-culture indirecte de la section 6.4.2).

Cet effet catabolique a été ensuite validé dans des chondrocytes humains, où 14-3-3 ϵ induit l'expression de MMP-3. En outre, la stimulation des chondrocytes humains par les milieux conditionnés d'os sous-chondral arthrosique issus du même patient augmente fortement l'expression chondrocytaire de MMP-3. De manière intéressante, plus ces milieux conditionnés sont riches en 14-3-3 ϵ , plus l'expression de MMP-3 est importante. De plus, 14-3-3 ϵ a été identifiée dans le liquide synovial de patients arthrosiques (Priam et al. 2013).

Ainsi, la protéine **14-3-3 ϵ** représente un nouveau médiateur osseux, induit par le stress mécanique, impliqué dans la communication os/cartilage et responsable de la mise en place d'un phénotype catabolique chondrocytaire, proche de celui observé au cours de l'arthrose. Le rôle de ce médiateur dans le processus catabolique est similaire à celui des cytokines.

C. Les protéines 14-3-3

Les protéines 14-3-3 représentent une famille des protéines acides de 25 à 30kDa, hautement conservées chez les eucaryotes (Mori et al. 2013). Elles ont été identifiées pour la première fois en 1967 au niveau du tissu cérébral de mammifères (Moore et al. 1967). Le nom 14-3-3 a été donné à cette famille de protéines en raison de leur profil d'élution et de migration particulier sur la chromatographie en deux dimensions DEAE cellulose et gel d'électrophorèse (Moore et al. 1967). Quelques années après leur découverte, sept isoformes de protéine 14-3-3 ont été identifiées chez les mammifères. Elles ont été nommées par des lettres grecques en se basant sur leur profil d'élution en HPLC (high performance liquid chromatography) comme β (beta), ϵ (epsilon), η (eta), γ (gamma), τ (teta), ζ (zeta) et σ (sigma) (Aitken 2011, Muslin et al. 1996). Il a été montré ensuite que les isoformes α et δ sont les formes phosphorylées des isoformes β et ζ respectivement (Aitken 2011).

Bien que ces différentes isoformes soient codées par des gènes distincts, il existe une forte homologie de séquences entre elles (Yaffe 2001). En effet, la famille des protéines 14-3-3 est hautement conservée chez de nombreux mammifères, où les isoformes sont identiques en grande partie, mais contiennent quelques régions divergentes (Aitken 2011).

Ces protéines ont été initialement considérées comme des protéines spécifiques du cerveau (Aitken 2006). Cependant, il est aujourd'hui admis que les protéines 14-3-3 sont présentes dans d'autres tissus (Boston et al. 1982). Elles sont ubiquitaires, exprimées non seulement dans les tissus de mammifères mais aussi dans toutes les cellules eucaryotes (cellules

animales et végétales) (Aitken 2002, Fuller et al. 2006), ce qui suggère leur importance biologique.

1. Structure

Les protéines 14-3-3 existent principalement sous forme de dimères avec une masse moléculaire monomérique d'environ 30 kDa (Fu et al. 2000). En effet, leur forme fonctionnelle est représentée par un homo- ou hétérodimère, la tendance à l'agrégation sous forme d'homo- ou hétéro-dimères est différente parmi les isoformes (Han et al. 2010, Mori et al. 2013).

Chaque monomère est constituée de neuf hélices α antiparallèles formant un sillon hautement conservé, compris entre les domaines N-terminal et C-terminal et impliqué dans l'interaction avec les protéines cibles (Mori et al. 2013). Les nombreuses interactions entre les hélices α rendent la structure du dimère de la protéine 14-3-3 très rigide (Obsilova et al. 2014).

La dimérisation des protéines 14-3-3 se fait par l'intermédiaire des extrémités N-terminal. Les dimères de 14-3-3 forment une structure caractéristique en « coupelle » avec un canal central contenant les deux sillons de liaison aux ligands (Obsilova et al. 2014) (**Figure 27-A et B**). Ces sillons de liaison contiennent des chaînes latérales de Lys49, Arg56, Arg127 et Tyr128. Le positionnement des substrats dans ces sillons est accompli par des interactions hydrophobes avec les résidus Leu172, Val176, Leu216, Ile217, Leu220, Leu227 et Trp228 appartenant à la partie C-terminale de 14-3-3 (Sluchanko et Gusev 2012).

Cette structure dimérique des protéines 14-3-3 leur permet de se lier à deux ligands simultanément (Fu et al. 2000) (**Figure 27-C**).

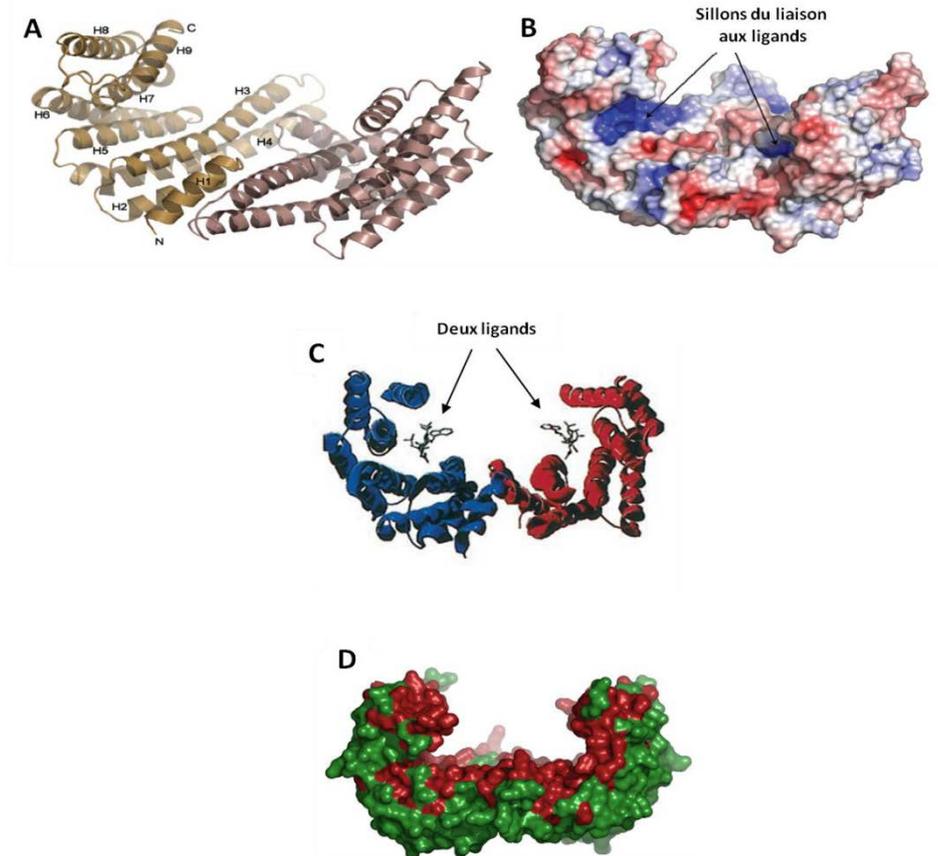


Figure 27 : Structure des protéines 14-3-3.

(A) Représentation en ruban de leur structure cristallographique (exemple de l'isoforme ζ). Chaque monomère est colorée avec une couleur différente. Les hélices α d'un monomère sont marquées de H1 à H9. (B) La forme « en coupelle » du dimère. Les flèches indiquent la position des sillons de liaison aux ligands. (C) Interaction d'un dimère avec deux ligands. (D) Représentation de la surface. Les résidus qui sont totalement conservés parmi les sept isoformes humaines sont colorés en rouge. Adapté de (Obsilova et al. 2014, Obsila et Obsilova 2011 et Fu et al. 2000).

Les résidus invariables des protéines 14-3-3 forment l'interface du dimère et tapissent la paroi interne du canal central, tandis que les résidus les plus variables sont répartis sur la surface convexe extérieure (Figure 27-D). La variabilité maximale des séquences se produit au niveau de la région C-terminale (Obsil et Obsilova 2011). C'est la région la plus variable entre les différentes isoformes. Elle présente également la séquence la plus flexible de la protéine 14-3-3. Il a été montré qu'en raison de sa flexibilité et de la présence des résidus chargés négativement, cette région joue un rôle important dans la régulation des propriétés de

liaison des isoformes des protéines 14-3-3 (Truong et al. 2002, Obsilova et al. 2004). Il a été rapporté qu'un segment C-terminal tronqué possède une affinité de liaison augmentée à plusieurs ligands testés, suggérant ainsi son rôle des interactions non spécifiques entre 14-3-3 et des ligands inappropriés (Truong et al. 2002, Obsil et Obsilova 2011). Par ailleurs, certains fragments C-terminaux des protéines 14-3-3 sont capables de lier des ligands (Fu et al. 2000).

Les extrémités N-terminales sont aussi variables entre les différentes isoformes. Etant donné que ces extrémités sont importantes pour la formation des dimères, leurs variations entre les isoformes limitent les homo- et hétéro-dimérisations. Ceci pourrait conférer quelques spécificités à la fonction des protéines 14-3-3 (Aitken 2011).

Bien que les structures de toutes les isoformes soient très similaires, les analyses comparatives ont révélé plusieurs différences (Gardino et al. 2006, Yang et al. 2006). Les structures individuelles montrent des différences dans la position relative des monomères suite à des variations dans l'angle entre les deux sous-unités. Les autres différences structurelles observées entre les isoformes sont les variations de la longueur et de la conformation des régions de boucle (notamment entre les hélices α H3 et mais aussi entre H8 et H9) ainsi que la longueur des hélices α H3 et H4 (**Figure 28**) (Obsil et Obsilova 2011).

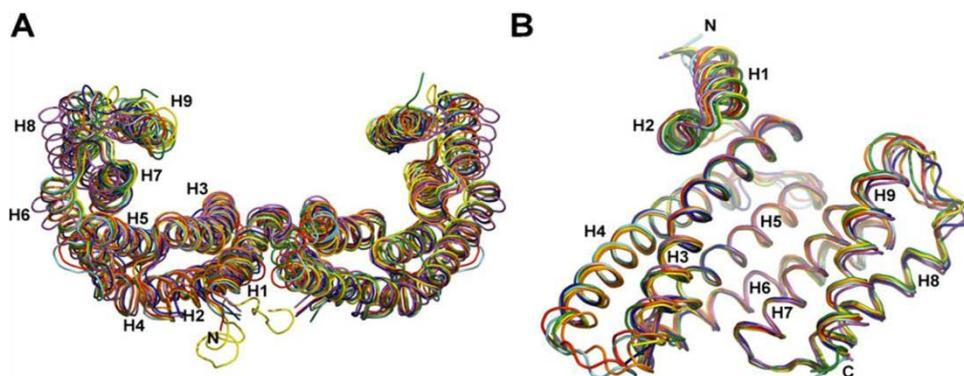


Figure 28 : Comparaison structurelle des sept isoformes humaines de protéines 14-3-3.

(A) Superposition des dimères de 14-3-3. L'isoforme β est représentée en magenta, γ en rouge, ε en orange, ζ en vert, η en cyan, σ en bleu et τ en jaune. (B) Comparaison des monomères. Un seul monomère de chaque structure cristallographique a été utilisé pour cette superposition. Adapté de (Obsil et Obsilova 2011).

Les isoformes individuelles de 14-3-3 diffèrent aussi dans leur tendance à former des homo- ou hétéro-dimères. Ces différences sont dues aux petites variations de séquences qui sont structurellement importantes. On peut citer l'exemple de l'isoforme ϵ qui montre une plus grande affinité pour les autres sous-unités que pour lui-même, et donc s'hétérodimérise préférentiellement (Obsil et Obsilova 2011). Elle a une forte affinité pour l'isoforme γ (Aghazadeh et Papadopoulos 2016).

2. Fonctions intracellulaires

Les protéines 14-3-3 sont des molécules chaperonnes qui modulent les interactions entre les protéines intracellulaires, sans avoir une activité enzymatique propre. Actuellement, plus de 200 partenaires de 14-3-3 ont été identifiés, tels que des kinases (PKC, Raf-1), des phosphatases (cdc25), des facteurs de transcription (FOXO), des régulateurs de la mort cellulaires (Bad) et des produits oncogènes (Bcr-Abl) (Fu et al. 2000).

Les protéines 14-3-3 reconnaissent spécifiquement des motifs contenant des résidus sérine et thréonine phosphorylés (Muslin *et al.* 1996). Elles interagissent avec leurs protéines cibles en reconnaissant deux principaux motifs consensus RSX(pS/T)XP et RXY/FX(pS/T)XP, où F est une tryptophane, P est une proline, R est une arginine, X est un acide aminé indéterminé (pas de cystéine) et pS/T est une sérine ou thréonine phosphorylée (Yaffe et al. 1997). Plus récemment un troisième motif a été identifié, localisé au niveau de C-terminal des protéines cibles dans lequel des résidus Sérine et Thréonine ont été mis en évidence (Coblitz et al. 2006).

Il est clair que les protéines 14-3-3 se lient principalement sur des ligands phosphorylés. Cependant, plusieurs observations ont conduit à l'idée qu'elles sont également capables d'interagir avec des ligands non phosphorylés comme l'exoenzyme S (ExoS) sécrétée par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (Aitken 2002, Jhonson et al. 2010, Henriksson et al. 2000). Lors de l'interaction avec leurs protéines cibles, les protéines 14-3-3 régulent leurs fonctions en modifiant leur conformation qui altère ainsi leurs activités, leurs localisations intracellulaires et leurs affinités pour des protéines cibles (Mori et al. 2013).

Ces régulations se font selon les mécanismes suivants :

❖ **Changement conformationnel de la protéine cible (Figure 29-A) :**

L'interaction des protéines 14-3-3 avec une protéine cible induit un changement structural de cette dernière. Ceci peut moduler l'activité catalytique de cette protéine et empêcher son interaction avec ses partenaires. Comme exemples, on peut citer la protéine kinase C et la phosphatase-5 (Fu et al. 2000).

❖ **Masquage d'un site d'interaction entre la protéine cible et ses partenaires (Figure 29-B) :**

Une fois liées à leurs cibles, les protéines 14-3-3 peuvent masquer les séquences d'interaction protéine-protéine ou protéine-ADN et empêcher ainsi l'interaction des protéines cibles à leurs partenaires (Obsil et Obsilova 2011). Ceci peut inhiber l'activation de certaines voies de signalisation comme la voie de l'insuline, dans laquelle l'interaction entre IRS1 et PI3K est inhibée par 14-3-3 (Kosaki et al. 1998).

Ce masquage peut réguler aussi la localisation subcellulaire (entre le noyau et le cytoplasme) des protéines cibles (Muslin et Xing 2000). En effet, il a été montré que les protéines 14-3-3 modifient dans de nombreux cas, la localisation intracellulaire de leurs ligands. C'est le cas du facteur de transcription FOXO et la phosphatase Cdc25 (Obsil et Obsilova 2011).

Le masquage de la séquence phosphorylée pourrait aussi protéger la protéine cible contre la déphosphorylation et la dégradation protéolytique. C'est le cas de FOXO3 dont l'interaction avec 14-3-3 favorise sa stabilisation (Dobson et al. 2011).

❖ **Echafaudage moléculaire : rapprochement de deux protéines cibles (Figure 29-C):**

Comme il a été indiqué précédemment, le dimère de 14-3-3 peut lier à la fois deux ligands, lui permettant de jouer un rôle d'échafaudage moléculaire pour faciliter l'interaction entre les protéines (Fu et al. 2000). Les protéines 14-3-3 interviennent par exemple dans la formation des complexes protéiques. En effet, il a été montré qu'elles induisent la formation des tétramères à partir des dimères de p53 (un supresseur tumoral), ce qui favorise la liaison de ce dernier sur une séquence spécifique d'ADN (Rajagopalan et al. 2008).

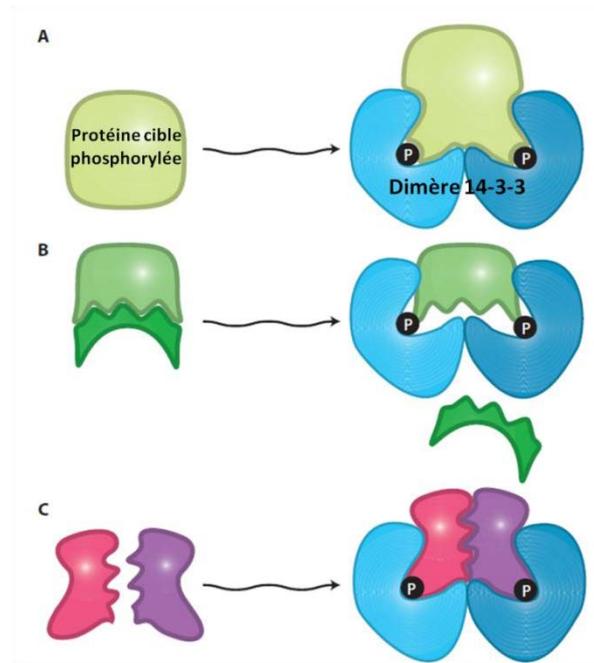


Figure 29: Modes d'action des protéines 14-3-3 sur leurs protéines cibles.

Les protéines 14-3-3 peuvent: **(A)** induire un changement conformationnel. **(B)** masquer d'un site d'interaction. **(C)** jouer un rôle d'échafaudage moléculaire. Adapté de (Bridges et Moorhead 2005).

Grâce à leurs interactions avec des nombreuses protéines effectrices, les protéines 14-3-3 participent à de nombreux processus cellulaires primordiaux y compris le développement neuronal, le contrôle du cycle cellulaire, la régulation des voies de signalisation intracellulaire, l'adhésion cellulaire, les modifications cytosquelettiques, la réplication d'ADN et l'apoptose, (Fu et al. 2000, Aghazadeh et Papadopoulos 2016). Ces fonctions peuvent être classées selon l'isoforme et le tissu où elle se trouve (Aghazadeh et Papadopoulos 2016).

Il est suggéré que les sept isoformes des protéines 14-3-3 possèdent des fonctions distinctes mais qui se chevauchent probablement. En effet, des invalidations géniques (knockouts) de certaines isoformes ont été faites, et dans de nombreux cas, il n'y a pas de phénotype défini (Aitken 2011). Cependant, il a été montré que les souris invalidées pour 14-3-3 ϵ présentent des défauts dans le développement du cerveau et la migration neuronale, suggérant son rôle dans le développement neuronal (Toyo-oka et al. 2003).

3. Régulation

En plus de la phosphorylation des protéines cibles, la fonction de 14-3-3 elle-même est sous contrôle. La phosphorylation des protéines 14-3-3 semble être le moyen le plus important qui régule la fonction des protéines 14-3-3. En effet, des sites de phosphorylation sérine, thréonine et tyrosine ont été identifiés dans les protéines 14-3-3 (Aitken et al. 1995, Megidish et al. 1995, Dubois et al. 1997). Cette phosphorylation peut affecter leur interaction directe avec leurs cibles ou induire la dissociation des dimères (Sluchanko et Gusev 2012, Aitken 2011). Certaines kinases comme la PKC, PKA, JNK et AKT sont connues pour phosphoryler les protéines 14-3-3 (Aitken 2011). L'une des kinases impliquées également dans ce processus de phosphorylation est la SDK1 (sphingosine dependent protein kinase 1) qui catalyse certaines isoformes de 14-3-3 au niveau du résidu Ser58 (Sluchanko et Gusev 2012). D'autres modifications post-traductionnelles des protéines 14-3-3 peuvent réguler leurs fonctions. En effet, l'acétylation des résidus lysine de 14-3-3 mais aussi de leurs ligands peut affecter leur interaction. En outre, la polyglycylation qui consiste à l'addition d'un ou plusieurs glycine aux groupements carboxyl des résidus d'acide glutamique, pourrait affecter la localisation intracellulaire des protéines 14-3-3. Enfin, elles peuvent subir un processus protéolytique suite à leur clivage par des enzymes telle la caspase-3 (Aitken 2011).

L'interaction des protéines 14-3-3 avec leurs ligands peut également être influencée par la variation du taux d'expression de 14-3-3 dans les cellules (Fu et al. 2000). Un défaut de régulation de cette expression pourrait aboutir au développement de certaines pathologies.

4. Implications pathologiques

Des niveaux aberrants de l'expression des protéines 14-3-3 ont été liés au développement de certains cancers et à leur progression. (Mori et al. 2013). L'expression élevée des plusieurs isoformes des protéines 14-3-3 est associée et utilisée parfois comme marqueur du cancer du poumon, du sein, de la prostate, du pancréas, de la peau, etc (Aghazadeh et Papadopoulos 2016). Les isoformes γ et ϵ sont des nouveaux marqueurs des carcinomes hépatocellulaires (Tzivion et al. 2006). Les faibles niveaux de 14-3-3 γ et τ sont des marqueurs de cancer du sein et les niveaux élevés de 14-3-3 β peuvent servir de marqueurs pour le cancer gastrique. D'autres isoformes jouent plutôt un rôle de suppresseur tumoral comme l'isoforme σ dont le niveau diminue au cours des tumeurs (Aghazadeh et Papadopoulos 2016).

De plus, l'abondance des protéines 14-3-3 dans le tissu cérébral indique leur rôle critique dans la fonction neuronale. Plusieurs études montrent leur implication dans les maladies

neurodégénératives. Des isoformes spécifiques apparaissent dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients atteints de la pathologie Creutzfeldt Jakob. Les protéines 14-3-3 participent également au développement de l'Alzheimer et de la maladie de Parkinson (Foote et Zhou 2012). De plus, des souris invalidées pour 14-3-3 ϵ sont considérées comme un modèle de schizophrénie (Iritani et al. 2010).

Actuellement, de nombreuses études considèrent les protéines 14-3-3 comme des cibles thérapeutiques potentielles. Certaines équipes développent des stratégies et des produits permettant d'inhiber leurs interactions et fonctions (Bustos 2012, Russo et al. 2012). Cependant, la majorité de ces études se focalisent sur leur rôle intracellulaire alors qu'elles peuvent jouer aussi un rôle extracellulaire important suite à leur sécrétion.

5. Les protéines 14-3-3 extracellulaires

Les protéines 14-3-3, connues pour être des protéines intracellulaires avec plusieurs activités biologiques critiques, ont été également trouvées libérées dans le milieu extracellulaire. Elles ont été détectées au niveau de certains liquides biologiques comme les milieux conditionnés des cellules, le LCR et le liquide synovial.

Les premières formes sécrétées des protéines 14-3-3 ont été détectées dans le LCR des patients atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Boston et al. 1982). Leur détection par western blot a permis ensuite le diagnostic de cette maladie (Hsich et al. 1996). Leur présence dans le LCR a été mise en évidence également au cours d'autres pathologies telles que la sclérose multiple et les méningo-encéphalites (Golucci et al. 2004, Satoh et al. 1999, Jayaratnam et al. 2008).

Ce sont les isoformes β , γ , ϵ , et η qui sont présentes dans le LCR des patients atteints de la maladie Creutzfeldt-Jakob. D'autres isoformes ont été détectées dans le LCR des patients atteints d'autres pathologies neurodégénératives. C'est le cas de l'isoforme η dans la maladie d'Alzheimer (Aitken 2002).

Des protéines 14-3-3, plus particulièrement σ et ϵ , ont été incluses dans le catalogue des protéines sécrétées par les kératinocytes de l'épiderme (Katz et Taichman 1999). En effet, l'isoforme σ a été trouvée abondamment sécrétée dans les milieux conditionnés des kératinocytes différenciés (Ghahary et al. 2004).

Les isoformes η et γ des protéines 14-3-3 ont été détectées dans le liquide synovial et le sérum des patients atteints de la polyarthrite rhumatoïde (Kilani et al. 2007). La présence de

ces deux isoformes a été révélée également dans le liquide synovial d'un modèle expérimental d'arthrose réalisé chez le chien (Sardari et al. 2011).

14-3-3 α/β est également une isoforme sécrétée par les cellules épithéliales pulmonaires (Asdaghi et al. 2012).

Plus récemment, des protéines 14-3-3 ont été détectées dans le milieu conditionné des lignées myoblastiques C2C12 et des cellules de carcinome de poumon (McLean et al. 2015).

Enfin, 14-3-3 ϵ a été identifiée par notre équipe, grâce à la technique de sécrétomique différentielle iTRAQ, dans les milieux conditionnés des ostéoblastes comprimés. Sa présence a également été mise en évidence dans le liquide synovial des patients arthrosiques (Priam et al. 2013).

La détection de ces isoformes au niveau extracellulaire pose la question de la voie de sécrétion empreintée par 14-3-3 ϵ .

5.1. Mécanisme de sécrétion des protéines 14-3-3

Etant donné que les protéines 14-3-3 sont dépourvues de peptide signal au niveau de leur extrémité N-terminal, leur libération ne peut pas être médiée par la voie de sécrétion classique (via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi) (Ghahary et al. 2004).

Plusieurs études ont montré que la lyse cellulaire ne présente pas leur voie de sécrétion (Chavez-Munoz et al. 2008). En effet, dans le cas de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, les isoformes de 14-3-3 exprimées dans les neurones en cours de dégénération ne correspondent pas à celles détectées dans le LCR des patients, ce qui suggère donc que leur présence dans le LCR n'est pas due à une lyse neuronale (Wilker et Yaffe, 2004).

En outre, la lactate déshydrogénase (LDH), une enzyme strictement cytosolique dont la présence extracellulaire est caractéristique d'une lyse cellulaire, n'a pas été détectée dans les milieux conditionnés des kératinocytes contenant 14-3-3 σ (Ghahary et al. 2004) ou ceux des ostéoblastes comprimés contenant 14-3-3 ϵ (Priam et al. 2013).

Ces données confirment donc que la libération des protéines 14-3-3 n'est pas due à la mort cellulaire mais à un processus de sécrétion non classique.

Plusieurs autres protéines telles que, Hsp70 (Lancaster et Febbraio 2005), IL-1 β , FGF-2 et galectines (Nickel 2003), sont également libérées par des voies non-classiques (indépendamment du réticulum endoplasmique / appareil de Golgi).

On peut distinguer au moins quatre types de mécanisme de sécrétions non classiques ; les transporteurs membranaires (ex : FGF), le mécanisme flip-flop (ex : HASPB), le recyclage des endosomes (ex : IL-1b et HMGB1) et les exosomes (ex: galectines). Ce dernier est le mécanisme de sécrétion le plus courant (Nickel 2003).

Les exosomes sont des vésicules membranaires formées durant la maturation des endosomes (initialement des lysosomes). De nombreuses protéines intracellulaires sont piégées dans ces vésicules (Caby et al. 2005) (**Figure 30**). Leur libération peut être spontanée ou induite en fonction du type cellulaire. Elle est induite par divers facteurs environnementaux, comme la liaison d'un ligand ou certaines conditions de stress. Il est ainsi suggéré être un des moyens utilisés par les cellules pour s'adapter à ces changements de leur environnement (Théry et al. 2009).

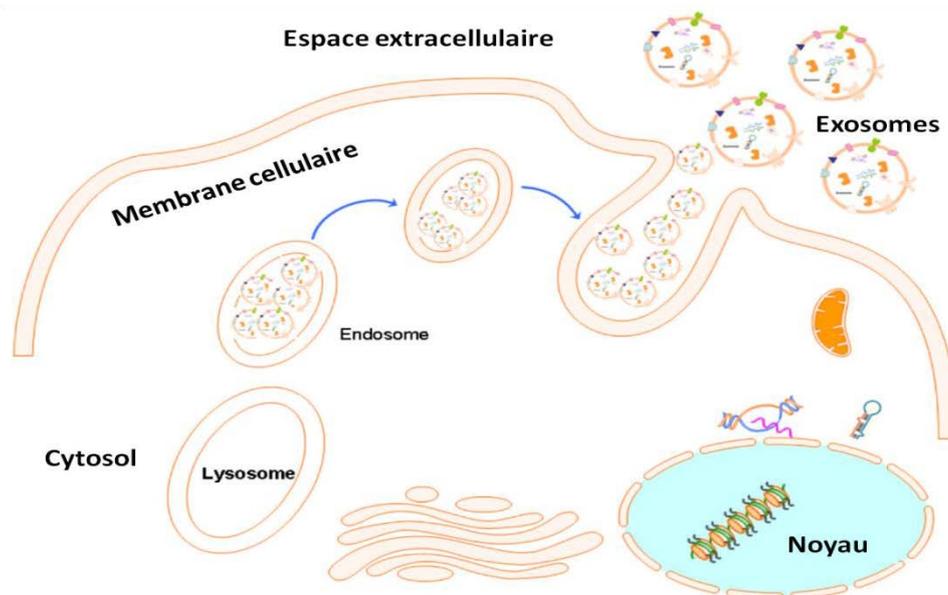


Figure 30: Schéma de la biogenèse et de la libération des exosomes.

Les exosomes dérivent des corps multi-vésiculaires, connus comme des endosomes tardifs (initialement dérivées de lysosomes). Ils sont libérés au milieu extracellulaire par fusion du corps multi-vésiculaires à la surface de la cellule. Cette fusion est prise en charge par un nombre de protéines spécialisées appelées SNAREs. Adapté de (Azmi et al. 2013).

La libération des différentes isoformes de 14-3-3 trouvées dans le milieu extracellulaire, est probablement médiée par ce processus exosomal (Maksymowych et Marotta 2014). En effet, les protéines 14-3-3 ont été décrites comme une composante clé des exosomes libérés par les cellules immunitaires activées y compris les cellules dendritiques, les lymphocytes T, les lymphocytes B, les macrophages ainsi que des cellules épithéliales (Théry et al. 2009).

En outre, il a été montré que 14-3-3 σ est libéré par les kératinocytes dans le milieu conditionné par voie exosomale. En effet la présence des exosomes dans ces milieux conditionnés a été mise en évidence (Chavez-Munoz et al. 2008). Plus récemment, 14-3-3 ζ a été détectée dans des exosomes jouant un rôle important dans la motilité des cellules cancéreuses (Dovrat et al. 2014).

L'ensemble de ces données suggèrent donc que la protéine 14-3-3 ϵ identifiée grâce à notre modèle de communication os/cartilage pourrait aussi être libérée par cette même voie exosomale.

5.2. Les fonctions des protéines 14-3-3 sécrétées

En plus de leurs rôles intracellulaires critiques, les protéines 14-3-3 jouent le rôle de messenger extracellulaire, récemment décrit. Ce rôle a été mis en évidence pour la première fois par les travaux de Ghahary (Ghahary et al. 2004) sur l'implication de 14-3-3 σ dans la communication entre kératinocytes et fibroblastes au cours du remodelage cicatriciel. En effet, cette isoforme dérivant des kératinocytes différenciés induit l'expression de MMP-1, MMP-3 dans les fibroblastes, suggérant ainsi son rôle dans la dégradation de la MEC par les fibroblastes dermiques (Ghahary et al. 2004, Ghaffari et al. 2006). L'induction des MMP par 14-3-3 σ se produit via l'activation de p38 MAPK et c-fos (Lam et al. 2005). Différents modèles de cicatrisation ont montré que la protéine 14-3-3 σ sécrétée par les kératinocytes pourrait contrôler la production fibroblastique des composants matriciels au cours du processus cicatriciel via l'induction des MMP. Ceci pourrait limiter ainsi la fibrose cicatricielle (Rahmani-Neishaboor et al. 2009, Rahmani-Neishaboor et al. 2012).

14-3-3 α/β , sécrétée par les cellules épithéliales, présente des effets similaires. En effet, elle est capable de stimuler fortement l'expression de la collagénase MMP-1 dans les fibroblastes pulmonaires. Il a été suggéré ainsi que cette isoforme pourrait jouer un rôle puissant dans la

communication épithéliale-mésenchymateuse contribuant à un remodelage tissulaire altéré, observé au cours des maladies pulmonaires obstructives (ex : l'asthme) (Asdaghi et al. 2012).

Le niveau de sécrétion augmenté de 14-3-3 η , mis en évidence dans le sérum et le liquide synovial des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, a été trouvé fortement corrélé avec le niveau de l'expression de MMP-1 et MMP-3, mettant en évidence un lien possible entre 14-3-3 η et les dommages articulaires (Kilani et al. 2007). Plus récemment, il a été montré que la stimulation des monocytes avec 14-3-3 η (avec des concentrations reflétant leur niveau dans le sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde) active les voies de signalisation MAPK/ ERK, SAPK/JNK et JAK-STAT favorisant ainsi l'expression des médiateurs pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α ainsi que les facteurs cataboliques MMP-9 et RANKL. En outre, le taux sérique de 14-3-3 η a été trouvé corrélé avec le facteur rhumatoïde ACPA (anti-citrullinated protein antibodies). Il est plus élevé chez les patients souffrant des lésions articulaires évaluées par radiologie ou ceux montrant une progression radiographique. Ainsi, 14-3-3 η pourrait informer sur l'état et la progression radiographique de la polyarthrite rhumatoïde (Maksymowych et al. 2014).

Plus récemment, il a été suggéré que des protéines 14-3-3 extracellulaires sont nécessaires pour le maintien du taux de myosine dans le muscle squelettique et la protection contre la cachexie. En effet, leur déplétion dans les milieux de culture de myotubes induit une diminution du taux de myosine (McClean et al. 2015).

Enfin, 14-3-3 ϵ , identifiée récemment comme un médiateur de communication entre ostéoblastes et chondrocytes, joue un rôle chondrocytaire catabolique puissant. Elle est capable de diminuer l'expression des composants matriciels et de stimuler l'expression de chondrocytaire de MMP-3 et MMP-13, deux métalloprotéases majeures impliquées au cours du processus arthrosique (Priam et al. 2013). Ainsi, l'identification du récepteur permettant la réception et la transmission du signal de 14-3-3 ϵ dans les chondrocytes permettrait de mieux comprendre la communication entre os et cartilage.

Isoforme	Cellule d'origine	Niveau extracellulaire	Fonction	Références
α/β	-Neurones dégénératives	-LCR	-Inconnue	Aitken 2002
	-Cellules épithéliales pulmonaires	-Milieux conditionnés des cellules épithéliales pulmonaires	-Stimule l'expression de MMP-1 dans les fibroblastes pulmonaires	Asdaghi et al. 2012
γ	-Neurones dégénératives	-LCR	-Inconnue	Aitken 2002
	-Cellules synoviales	-Liquide synovial et sérum	- Stimule l'expression de MMP-1 et MMP-3	Kilani et al. 2007, Sardari et al. 2011
ϵ	-Neurones dégénératives	-LCR	-Inconnue	Aitken 2002
	-Kératinocytes de l'épiderme	-Milieux conditionnés des kératinocytes de l'épiderme	-Inconnue	Katz et Taichman 1999
	-Ostéoblastes	-Liquide synovial et milieux conditionnés des ostéoblastes d'os sous-chondral arthrosique	-Stimule l'expression de MMP-3 et MMP-13 et inhibe l'expression de collagène de type II et d'aggrécane dans les chondrocytes	Priam et al. 2013
η	-Neurones dégénératives	-LCR	-Inconnue	Aitken 2002
	-Cellules synoviales	-Liquide synovial et sérum	-Stimule l'expression de MMP-1 et MMP-3 -Active les voies MAPK/ ERK, SAPK/JNK et JAK-STAT et stimule la production de IL-1 β , IL-6, TNF- α , MMP-9 et RANKL	Kilani et al. 2007, Sardari et al. 2011 Maksymowych et al. 2014
σ	-Kératinocytes de l'épiderme	-Milieux conditionnés des kératinocytes différenciés	-Induit l'expression de MMP-1 et MMP-3 dans les fibroblastes dermiques	Ghahary et al. 2004, Ghaffari et al. 2006
			-Active c-fos et p38 MAPK	Lam et al. 2005
			-Joue un rôle anti-fibrogénique	Rahmani-Neishaboor et al. 2009, Rahmani-Neishaboor et al. 2012

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des isoformes des protéines 14-3-3 détectées dans les milieux extracellulaires.

Dans leurs travaux, Ghaffari et ses collègues suggèrent que CD13/APN pourrait être le récepteur de 14-3-3 σ à la surface des fibroblastes médiant ainsi ses effets cellulaires (Ghaffari et al. 2010). Notre hypothèse était donc que CD13/APN pourrait être le récepteur de 14-3-3 ϵ à la surface des chondrocytes.

D. CD13/APN

CD13, aussi connu comme Aminopeptidase N (APN) est une glycoprotéine membranaire de 150 kDa. Elle est codée en 15q25-26 par le gène ANPEP contenant 20 exons (Watt et Willard 1990). Elle est multifonctionnelle et présente dans de nombreux tissus humains. Elle est exprimée dans l'épithélium rénal et intestinal, dans le système nerveux (membranes synaptiques et péricytes), les cellules myéloïdes (monocytes, macrophages et les cellules dendritiques), les cellules de type fibroblaste comme les synoviocytes, les cellules endothéliales, les ostéoclastes, les kératinocytes et les lymphocytes (Mina-Osorio 2008).

1. Structure et mécanismes d'action

1.1. Structure :

CD13/APN est une ectoenzyme (EC3.4.11.2), appartenant à la famille M1 des métallopeptidases dépendantes du zinc dites « Gluzincins ». Cette famille se compose d'un grand nombre d' aminopeptidases caractérisées par la présence d'une courte séquence consensus HEXXH contenant les deux premiers sites de liaison au zinc et un acide glutamique (GXMEN motif) constituant un troisième domaine de liaison au zinc (Hooper 1994). APN est l'enzyme la plus étudiée de cette famille (Chen et al. 2012, Mina-Osorio 2008)

Chez les mammifères, CD13/APN est exprimée sous forme d'un homodimère de hauts poids moléculaire (environ 280kDa) ; les deux sous-unités sont associées de manière non covalentes du côté C-terminal. Sa dimérisation se produit entre les domaines VII (au niveau du domaine extracellulaire) de chaque monomère (Mina-Osorio 2008) (**Figure 28**). APN est la seule enzyme de la famille M1 des métalloenzymes qui forme un dimère. Toutes les autres enzymes de cette même famille sont exprimées en monomères (Kochan et al.2011, Thunnissen et al. 2001). Cette différence de structure entre l'APN et les autres métalloenzymes de la famille M1 est cohérente avec leurs rôles physiologiques différents. En effet, APN est une ectoenzyme exprimée à la surface cellulaire et lie une large gamme de peptides requis pour des rôles multifonctionnels (Mina-Osorio 2008) alors que les autres

métalloenzymes de la famille M1 sont intracellulaires et lient une gamme étroite de peptides requis pour des fonctions physiologiques spécifiques (Kochan et al. 2011, Thunnissen et al. 2001).

Ainsi, cette dimérisation possède des implications fonctionnelles. En effet, elle permet d'augmenter la stabilité de la protéine, en tant qu'une ectoenzyme exprimée à la surface de la cellule, face à un environnement exceptionnel comparé à celui des enzymes intracellulaires (Chen et al. 2012).

CD13/APN est hautement glycosylé et possède 10 sites potentiels de glycosylation constituant environ 20% de son poids total. Les chaînes polypeptidiques de cette ectoenzyme sont organisées en différents domaines ; un petit domaine N-terminal cytoplasmique de type I composé de 7 acides aminés, un domaine transmembranaire du type II composé de 30 acides aminés et un grand domaine extracellulaire C-terminal de type III à VII, de 926 acides aminés et contenant le site actif (Mina-Osorio 2008, Luan et Xu 2007) (**Figure 31**).

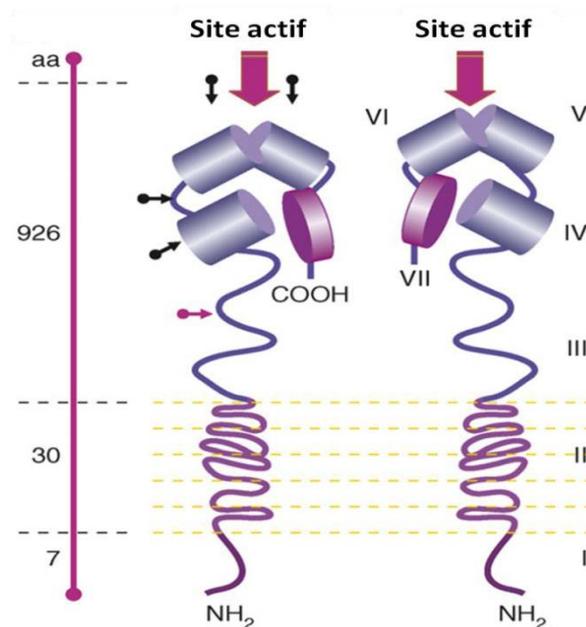


Figure 31: Modèle schématique de la structure tridimensionnelle de CD13/APN humain, montrant les trois domaines et le site actif situé au niveau du domaine extracellulaire. Les sites de N-glycosylation sont indiqués par des flèches noires et des sites de O-glycosylation avec des flèches roses. Le nombre d'acides aminés formant chaque domaine est indiqué sur la gauche. Proposé par (Mina-Osorio 2008).

La structure de CD13/APN est unique. En effet, le site actif et le canal de liaison des substrats résident dans une cavité spacieuse avec des larges ouvertures sur les côtés, permettant un accès facile aux peptides. Le site actif fixe les résidus neutres du segment N-terminale des peptides et le canal de liaison aux peptides se lie à la partie restante du substrat indépendamment de la séquence. En comparaison, les sites actifs des autres métalloenzymes de la famille M1 sont situés dans un petit compartiment fermé (Kochan et al. 2011, Addlagatta et al. 2006).

CD13 est nommée aussi aminopeptidase N en raison de sa préférence pour les acides aminés neutres. En effet, elle clive préférentiellement les acides aminés neutres, et plus particulièrement des résidus d'alanine, de l'extrémité N-terminale de peptides (Chen et al.2012). L'ordre des résidus favorisés est le suivant : Ala>Phe>Tyr>Leu>Arg> Thr>Trp> Lys>Ser>Asp>His>Val (Mina-Osorio 2008).

La liaison d'un peptide sur le site actif de CD13/APN peut induire des changements structuraux. Ces changements se produisent au niveau de l'espace entre les monomères plutôt que dans la conformation intramoléculaire de chaque monomère (Mina-Osorio 2008) (**Figure 32**). De plus, APN est capable de prendre deux conformations distinctes: une conformation fermée et catalytiquement active et une conformation ouverte et inactive (Chen et al. 2012, Wong et al. 2012).

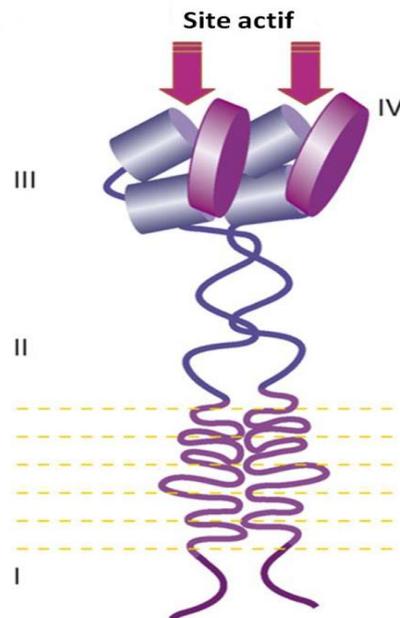


Figure 32 : Les changements conformationnels possibles de CD13/APN associés à la liaison du substrat.

Le site actif est couvert par le domaine C terminal, et un changement conformationnel expose le site catalytique pour permettre l'entrée des substrats. Les monomères sont étroitement accolés pour permettre la fermeture du site actif. Proposé par (Mina-Osorio 2008).

1.2. Mode d'action

APN clive préférentiellement les acides aminés neutres au niveau du segment N-terminal des peptides. Le mécanisme catalytique général de la famille M1 des métalloenzymes est similaire à celui des thermolysines, qui sont aussi des peptidases dépendantes du zinc. Dans le site actif de l'enzyme native, une molécule d'eau nécessaire à l'hydrolyse est liée à l'atome de zinc ainsi qu'à un acide glutamique (Schmit 2012). Cette molécule d'eau, une fois activée par le zinc, attaque les liaisons peptidiques du substrat. Ce mécanisme catalytique a été étudié en se basant sur l'analyse de la structure de l'APN porcine et celle de la thermolysine. Cette analyse a permis de montrer aussi que l'APN fonctionne mieux à pH neutre ou légèrement basique. Un pH extrêmement faible ou élevé peut également avoir un impact sur la structure globale et la conformation de l'enzyme (Chen et al. 2012).

En dehors du clivage peptidique, CD13/APN assure un rôle de transduction du signal. Cette transduction semble être médiée via des partenaires intracellulaires. Cependant le domaine intracellulaire de CD13/APN est très court et ne possède aucun motif de signalisation. Ainsi,

il est suggéré que les changements conformationnels de CD13/APN, suite à la fixation d'un ligand, pourraient jouer un rôle dans cette transduction du signal. En effet, les modèles de changements conformationnels établis pour le dimère de CD13/APN montre qu'il est capable de changer sa conformation (fermée ou ouverte). Durant ce changement, la distance entre les têtes des domaines extracellulaires des monomères ne varie pas mais la distance entre les domaines N-terminal varie (d'environ 50 Å), ce qui change ainsi la structure globale de CD13/APN. Ces changements structuraux pourraient réguler la structure et la fonction des partenaires et assurer la transduction du signal (Chen et al. 2012, Wong et al. 2012) (**Figure 33**).

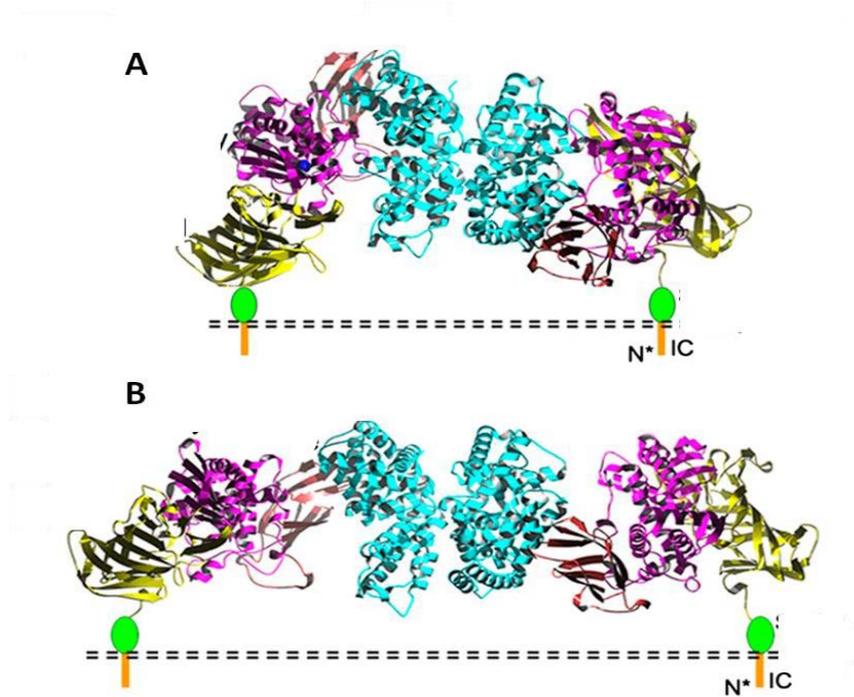


Figure 33 : Les changements conformationnels de CD13/APN, suggérés être impliqués dans la transduction du signal. **(A)** Conformation fermée. **(B)** Conformation ouverte. Les couleurs différentes indiquent les différents sites des domaines extracellulaires de deux monomères. Adapté de (Chen et al.2012).

1.3. Fonctions biologiques

On connaît aujourd'hui une multitude de fonctions assurées par CD13/APN au sein de l'organisme: régulation enzymatique de peptides, invasion des cellules tumorales, différenciation, prolifération, apoptose, motilité, chimiotactisme, présentation d'antigènes,

entrée des virus, cristallisation de cholestérol, angiogénèse, adhérence cellulaire, phagocytose, et sensation des douleur . CD13/APN assure ces fonctions grâce à son rôle de récepteur impliqué dans la transduction du signal cellulaire et/ou à son rôle de clivage peptidique via son activité enzymatique d'aminopeptidase (APN) (Mina-Osorio 2008, Gabrilovac et al. 2005).

Il est à noter que CD13 existe aussi sous forme soluble (Favaloro, et al. 1993). Cette forme soluble a été détectée à une concentration de 4.6 nM dans le sérum humain. Elle est libérée suite à un clivage de la forme membranaire par une enzyme inconnue (Watanabe et al. 1998). Il a été montré que CD13 soluble inhibe l'activité des anticorps-bloquants anti-CD13 membranaire, suggérant son rôle régulateur des fonctions de la forme membranaire de CD13 (Mina-Osorio et Winnicka 2008). En outre, cette forme soluble semble être active par voie enzymatique (van Hensbergen et al. 2002)

1.3.1. Fonction enzymatique

L'activité APN assure une multitude de fonctions au sein de l'organisme (APN est nommée moonlighting enzyme ») qui dépendent généralement du type cellulaire dans lequel elle est exprimée (Mina-Osorio et al. 2008).

Grâce à son activité enzymatique, CD13/APN est capable de moduler l'activité de nombreux peptides qui participent à des processus biologiques primordiaux dans l'organisme tels que les composants de la matrice extracellulaire (Menrad et al. 1993, Saiki et al. 1993), les neuropeptides (Matsas et al. 1985, Jia et al. 2010), des peptides vasoactifs et des peptides inflammatoires (Shipp et Look 1993, Gabrilovac et al.2008). Ainsi, l'activité APN est évidemment impliquée dans la régulation des réponses cellulaires médiées par ces peptides. En activant ou désactivant ces peptides extracellulaire dotés des fonctions du signal, APN change leurs concentrations locales et modifient ainsi la transduction de leurs signaux. Ces fonctions d'APN varient en fonction de la spécificité du substrat et son niveau d'expression (Gabrilovac et al. 2008).

Tout d'abord, APN joue un rôle important dans la sensation des douleurs et la régulation de l'humeur en catalysant le métabolisme des neuropeptides qui traitent l'information sensorielle. Un de ces neuropeptides est l'enképhaline qui joue un rôle dans le soulagement de la douleur et la régulation de l'humeur. Il a été montré *in vivo* que l'APN est capable de dégrader l'enképhaline et ainsi de favoriser la sensation de la douleur (König et al. 1996).

Elle est impliquée également dans la régulation de la pression artérielle. En effet, APN dégrade le peptide vasoconstricteur angiotensine-III ce qui provoque une vasodilatation et une réduction de la pression artérielle (Dazinger 2008).

Le rôle de l'activité APN dans la présentation antigénique a été aussi bien établi. En effet, elle est exprimée sur les cellules présentatrices d'antigène et participe à la présentation antigénique en coupant les peptides qui dépassent le domaine de liaison de CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) (Larsen et al. 1996).

L'activité APN est impliquée dans beaucoup d'autres voies de métabolisme de peptides et processus physiologiques. Ses substrats connus et leurs fonctions physiologiques sont résumés dans le **Tableau 5**.

Substrats	Fonctions et remarques générales	Références
Enképhalines	Des peptides opioïdes endogènes impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques, y compris la perception de la douleur et l'analgésie et les réponses au stress. APN est considérée comme l'une des enzymes majeures impliquée dans leur hydrolyse aux membranes synaptiques. APN pourrait ainsi participer à l'inactivation des enképhalines dans le système nerveux central.	Xu et al. 1995 König et al. 1996
Angiotensines	Des peptides impliqués dans la régulation de la tension artérielle. CD13 hydrolyse angiotensine III (vasconstricteur) pour produire l'angiotensine IV (vasodilatateur).	Dazinger 2008
Tuftsine	Un térapeptide stimulateur de la phagocytose et ayant des effets analgésiques. Entre en compétition avec les enképhalines pour CD13/APN favorisant ainsi les effets analgésiques des enképhalines.	Xu et al. 1995
Kinines	Regroupe plusieurs polypeptides du plasma dont la kallidine et son dérivé la bradykinine sont des substrats de CD13/APN. Ce dernier génère la bradykinine après hydrolyse qui agit par la suite comme un inhibiteur naturel de CD13/APN.	Xu et al. 1995
Hémorphines	Une classe de peptides bioactifs issus de la protéolyse de la chaîne β de l'hémoglobine. Ils partagent leur séquence N-terminale avec l'angiotensine IV. Ainsi, ils rentrent en compétition pour le site catalytique du CD13, ce qui entraîne l'inhibition de l'effet de CD13 sur l'angiotensine IV.	Garreau et al. 1998
Cytokines et chémokines	CD13 hydrolyse in vitro des oligopeptides synthétiques correspondant au N-terminal des IL-1 α , IL-1 β et IL-2. Cependant aucune hydrolyse a été observée en utilisant des protéines recombinantes entières de IL-1 α , IL-1 β et IL-2 et avec IL-2 naturel. Il est suggéré que CD13/APN fait appel à d'autres enzymes pour dégrader les cytokine. C'est le cas de CXXL11 dont l'hydrolyse nécessite l'action de CD26 et CD13/APN.	Hoffmann et al. 1998 Mina-Osorio 2008 Proost et al. 2007
Protéines de la MEC	Le collagène de type IV est un exemple des protéines de la MEC clivées par CD13/APN au cours de l'invasion cellulaire (dans le cas des tumeurs).	Saiki et al. 1993
Autres substrats	CD13/APN participe au métabolisme de beaucoup d'autres substrats tels que le glutathion (anti-oxydant), la somatostatine (une hormone), des immunomodulateurs (la thymopentine et la splenopentine), autres neuropeptides (comme la neurokinine A et la nociceptine) et les peptides dérivés du récepteur de la thrombine.	Mina-Osorio 2008

Tableau 5 : Liste des substrats clivés par l'activité Aminopeptidase N.
Adapté de (Mina-Osorio 2008).

1.3.2. Fonction de récepteur et de transduction du signal

Plusieurs études suggèrent que CD13/APN pourrait avoir de nombreuses fonctions qui sont indépendantes de son activité enzymatique d'APN, y compris son rôle de récepteur aux virus, à la protéine 14-3-3 σ , aux galectines et à d'autres ligands impliqués dans le développement tumoral. De même, la transduction du signal a été proposée comme étant une des fonctions de CD13 qui sont indépendantes de son activité enzymatique APN (Mina-Osorio, 2008).

❖ Récepteur aux virus :

Chez les mammifères, CD13/APN sert de récepteur pour les coronavirus tels que le coronavirus 229E respiratoire humain (HCoV-229E), le virus de la gastro-entérite transmissible porcine (TGEV), le coronavirus entérique félin (FCoV) et le coronavirus entérique canin (CCoV) (Yeager et al. 1992, Delmas et al. 1992, Tresnan et al. 1996).

Trois motifs de liaison localisés dans trois régions différentes de CD13/APN ont été identifiés comme sites de liaison des coronavirus. Ils sont situés sur la surface extérieure de l'APN et facilement accessibles aux virus. Ces sites de liaison ne bloquent pas l'accès des peptides et ne se chevauchent pas avec l'interface du dimère du récepteur. Ainsi, les coronavirus utilisent CD13/APN comme récepteur d'entrée à la cellule sans altérer la fonction physiologique de son activité enzymatique (Chen et al. 2012).

Il a été montré que la liaison de coronavirus à CD13/APN entraîne l'internalisation de ce dernier. Ce mécanisme d'endocytose utilise les cavéoles qui sont des invaginations membranaires riches en cholestérol, en sphingolipides et en cavéoline (Nomura et al. 2004).

Il a été rapporté que CD13 pourrait médier également l'entrée des cytomégalovirus (CMV) dans ses cellules cibles. La transfection de ces cellules avec CD13 dépourvu d'une partie du site actif n'affecte pas la sensibilité des cellules au CMV. Ainsi, CD13 semble être impliqué dans l'infection par le CMV via un processus indépendant de son activité enzymatique et de son site actif (Söderberg et al. 1993). En outre, il a été montré que la fixation de CMV humain sur CD13/APN, exprimé à la surface des monocytes, induit une augmentation de niveau intracellulaire de Ca²⁺ (Gredmark et al. 2004).

❖ **Absorption du cholestérol :**

CD13/APN participe à l'absorption du cholestérol par les entérocytes, au niveau de la bordure en brosse intestinale en utilisant le même mécanisme d'endocytose utilisé pour l'entrée des virus. En effet, il a été montré que CD13/APN est une cible de l'Ezetimibe, un inhibiteur de l'absorption du cholestérol par endocytose, indépendamment de la fonction enzymatique (Kramer et al. 2005).

❖ **Récepteur à la galectine-3 et -4:**

Une liaison de la galectine-4 sur CD13/APN a été également révélée niveau de la bordure en brosse intestinale. Il est suggéré que l'association de la galectine-4 sur des récepteurs exprimés à la surface la bordure en brosse pourrait empêcher sa libération de l'entérocyte vers la lumière intestinale (Danielsen et van Deurs 1997).

Plus récemment, une interaction physique et fonctionnelle est suggérée entre une autre protéine de la famille des galectines ; la galectine-3 et CD13/APN lors de l'agrégation homotypique des monocytes (Mina-Osorio et al. 2007). En effet, il a été montré que CD13/APN exprimé à la surface des monocytes humains induit une forte agrégation homotypique qui est indépendante de son activité Aminopeptidase N. Ce rôle est assuré probablement via la liaison de la galectine-3, exprimée à la surface membranaire en association avec des glycoprotéines. En effet, un anticorps bloquant anti-galectine-3 est capable d'abolir l'agrégation homotypique dont CD13 est le responsable. En outre, un complexe formé par ces deux protéines a été mis en évidence par co-immunoprécipitation (Mina-Osorio et al. 2006).

Il a été rapporté que l'activation de la signalisation de CD13/APN dans les monocytes, en utilisant des anticorps monoclonaux active la voie MAPK, déclenche la mobilisation de Ca⁺⁺ et induit la sécrétion de cytokines (Santos et Langner. 2000, Mina-Osorio et al. 2006). Ceci suggère que CD13/APN joue son rôle récepteur dans les cellules monocytaires. En outre, la localisation du CD13/APN dans des micro-domaines membranaires riches en lipides et caractérisés par la présence des molécules de signalisation (Santos et Roentsch 2000), renforce davantage le rôle de récepteur joué par CD13/APN dans la transduction du signal au cours de l'adhésion monocyttaire.

❖ Récepteur à la protéine 14-3-3 σ :

Il a été montré que CD13/APN, exprimé à la surface des fibroblastes, est le récepteur potentiel de 14-3-3 σ sécrétée par les kératinocytes au cours du processus cicatriciel. CD13 transmet le signal de 14-3-3 σ via l'activation de la voie p38 MAPK qui induit l'expression de MMP-1. L'invalidation de CD13/APN par des siRNA supprime cette induction. Cependant, l'inhibition de son activité enzymatique en utilisant la bestatine ne supprime pas l'expression de MMP-1 dans les fibroblastes stimulés par 14-3-3 σ . Ceci suggère que l'activité APN ne joue pas un rôle dans la régulation de l'expression de MMP-1 et que le site actif de l'enzyme est très probablement indépendant du site de liaison de 14-3-3 σ à CD13/APN. (Ghaffari et al. 2010). Hormis la régulation de l'expression de MMP-1, CD13 semble jouer un rôle dans la modulation de l'expression de la fibronectine, de la tenascine-C et d'autres MMP tels que MMP-1, MMP-3 et MMP-12 au cours du remodelage cicatriciel en réponse aux facteurs dérivés des kératinocytes dont 14-3-3 σ (Lai et al. 2012).

Ces résultats suggèrent le rôle important joué par CD13/APN via son interaction avec 14-3-3 σ dans la régulation des protéines de la MEC au cours de la cicatrisation.

❖ Récepteur aux peptides NGR (asparagine-glycine-arginine) et au TAL6 (tumor-associated antigen L6):

CD13/APN lie également certains ligands impliqués dans le développement des tumeurs tels que les peptides contenant le motif NGR, présents au niveau de cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Des expériences réalisées *in vivo* montrent que des anticorps dirigés contre CD13/APN inhibent l'effet tumoral de NGR (Pasqualini et al. 2000).

TAL6 (tumor-associated antigen L6) est aussi un ligand de CD13/APN au niveau des cellules cancéreuses du poumon. Ceci implique des mécanismes à la fois dépendants et indépendants de l'activité aminopeptidase N (Chang et al. 2005).

L'ensemble de ces données indiquent que les fonctions de CD13 peuvent être divisées en deux groupes ; fonctions dépendantes de son enzyme APN par clivage peptidique ou indépendantes de son activité enzymatique par endocytose ou transduction du signal. Cependant, plus d'un mécanisme est probablement requis pour la plupart des fonctions (Mina-Osorio 2008). En effet ces différents mécanismes d'action de CD13/APN semblent être interconnectés et impliqués dans différentes pathologies humaines.

2. Implications pathologiques :

L'expression de CD13/APN dans les différents types cellulaires peut être liée au développement de nombreuses pathologies telles que les tumeurs, les infections virales et les maladies inflammatoires :

❖ Infections virales :

Etant le récepteur des coronavirus (HCoV-229E) et cytomégalovirus (HCMV) humains, CD13/APN est fortement impliquée dans les infections virales humaines. En effet, toutes les cellules mononuclées qui sont sensibles à l'infection par le HCMV expriment à leur surface CD13. En outre, la transfection des fibroblastes résistants aux CMV avec un ADNc codant pour CD13 humain les rend sensibles à l'infection par le virus (Söderberg et al.1993). La détection des autoanticorps anti-CD13 dans le sérum des patients ayant une infection active à HCMV confirme son implication dans les infections virales (Rahbar et al. 2006).

❖ Tumeurs :

CD13/APN est impliqué dans nombreux types de cancers tels que le cancer du côlon, du sein, du poumon, de la thyroïde, de la peau, des ovaires, du rein et de la prostate (Mina-Osorio 2008). A ce jour, le test de l'activité enzymatique de CD13/APN est suggéré être un bon marqueur sérique pour le diagnostic de certains cancers (Wickström et al. 2011). En outre, son expression est liée à l'agressivité des tumeurs et représente un indicateur d'un mauvais pronostic pour les patients (Hashida et al. 2002). L'élévation de l'expression et de l'activité enzymatique de CD13/APN est fortement associée au pouvoir invasif des nombreuses cellules tumorales (Dixon et al. 1994, Fuji et al. 1995, Bauvois 2004, Carl-McGrath et al. 2006). De plus, son expression a été trouvée associée à la prolifération des cellules tumorales, à la dégradation de la matrice extracellulaire (par clivage de collagène de type IV) et à un comportement métastatique (Carl-McGrath et al. 2006).

L'implication de CD13/APN dans l'invasion tumorale pourrait être expliquée également par son rôle stimulateur de l'angiogenèse et de la migration des cellules (Hashida et al.2002).

En effet, en cas de tumeur, APN est surexprimé dans l'endothélium et favorise l'angiogenèse (Rangel et al. 2007) via le clivage des peptides angiogéniques (Bauvois 2004). De plus, CD13 lie les peptides contenant le motif NGR au niveau de cellules endothéliales des vaisseaux sanguins dans le cas des tumeurs ou au cours de l'angiogenèse (Pasqualini et al. 2000). Les peptides contenant le motif NGR sont développés aujourd'hui comme des moyens

thérapeutiques permettant de cibler un site tumoral (Arap et al.1998) et d'administrer des cytokines anti-tumorales (TNF) (Curnis et al. 2016). A ce jour, plusieurs de ces associations font l'objet d'essais cliniques (Wickström et al. 2011).

CD13/APN régule également la motilité des cellules tumorales (Hashida et al. 2002). Elle est capable de lier TAL6, connu par son rôle dans la migration et l'invasion des cellules tumorales (Chang et al. 2005). Des anticorps bloquants CD13 sont capables d'inhiber significativement la migration des cellules cancéreuses (Chang et al. 2005), suggérant son rôle de récepteur et de signalisation dans ce processus.

Dans ce même contexte, il a été rapporté que des niveaux élevés de CD13 sont corrélés avec la résistance des cellules leucémiques en apoptose. Cette résistance ainsi que la croissance des lignées cellulaires leucémiques est supprimée suite à l'inhibition de CD13/APN (Sekine et al. 1999, Inoi et al 1995).

❖ **Maladies inflammatoires:**

Un rôle joué par CD13/APN dans les maladies inflammatoires a été également montré. En effet, une corrélation entre le nombre de lymphocytes T (LT) et l'activité aminopeptidase N dans le liquide bronchoalvéolaire des patients atteints de **sarcoïdose pulmonaire**, maladie inflammatoire caractérisée par la formation d'amas de cellules inflammatoires appelés « granulomes », a été signalée. Le niveau de l'expression de CD13 est plus élevé dans les macrophages alvéolaires prélevés à partir de ces patients comparés à ceux obtenus chez les sujets témoins. Un rôle chimiotactique joué par CD13/APN sur les LT a été également mis en évidence *in vitro* et supprimé suite à l'inhibition de l'activité APN. Il a été suggéré ainsi que c'est son activité enzymatique qui est nécessaire pour cette activité chimiotactique (Tani et al. 2000). Cependant, l'activation de sa signalisation par un anticorps monoclonal induit la sécrétion de la chémokine IL-8, ce qui suggère que l'activité enzymatique n'est pas le seul mécanisme impliqué dans le chimiotactisme (Santos et Langner 2000).

Le rôle de CD13/APN a été bien établi dans la pathologie articulaire inflammatoire ; la **polyarthrite rhumatoïde (PR)**. En effet, la valeur de l'activité enzymatique de CD13/APN dans le liquide synovial et à la surface des fibroblastes synoviaux provenant des patients atteints de PR a été trouvée significativement élevée. Une corrélation entre cette activité enzymatique et le taux des lymphocytes T présents dans liquide synovial a été également établie, suggérant sa participation dans l'inflammation articulaire en tant que chimioattractant des lymphocytes T (Shimizu et al. 2002).

L'expression synoviale de CD13/APN est nettement augmentée en cas d'inflammation observée chez les patients ayant une PR ou une arthrose, accompagnée d'un épaissement de la couche intima de la membrane synoviale et d'un infiltrat des macrophages positifs pour CD13/APN. Son niveau d'expression vasculaire a été trouvée également augmenté et associé à l'inflammation de la membrane synoviale des patients, suggérant ainsi son rôle dans l'activation endothéliale (Walsh et al. 1993).

Plus récemment, Morgan et ses collègues ont montré qu'une forme soluble de CD13 est libérée dans le liquide synovial et exerce des effets chimiotactiques sur une population des cellules T, similaire à celle des LT détectée dans la membrane synoviale en cas d'une PR. Il est suggéré CD13 soluble pourrait jouer ce rôle chimiotactique indépendamment de son activité enzymatique en se fixant sur un récepteur exprimé à la surface des LT (Morgan et al. 2015).

L'augmentation de l'activité enzymatique de CD13/APN a été mise en évidence également dans le sérum, le liquide synovial et le tissu synovial d'un modèle animal d'arthrite comparé aux animaux contrôles. Cependant, il a été suggéré que la forme membranaire de CD13/APN pourrait jouer un rôle plutôt protecteur contre la PR, car elle a été trouvée associée à une résistance au développement de la maladie (Yamasaki et al. 2012).

De plus, des études antérieures ont montré que l'expression monocyttaire de CD13/APN est induite en réponse à l'IL-4 et pourrait dégrader et inactiver les peptides pro-inflammatoires et mettre fin ainsi aux réponses inflammatoires (van Hal et al. 1994). Il a été montré également qu'il réduit les réponses chimiotactiques des neutrophiles humains en réponse à l'IL-8 (Kanayama et al. 1995).

Ces effets controversés de CD13 dans l'inflammation pourraient être expliqués par la différence du type cellulaire ainsi que le contexte pathologique dans lequel il est impliqué.

D'ailleurs, il est suggéré que l'implication de CD13 dans l'inflammation pourrait être liée non seulement à son effet chimiotactique mais aussi à son rôle puissant dans l'angiogenèse, l'adhésion, la migration cellulaire et l'activation des monocytes (Riemann et al. 1999, Morgan et al. 2015).

L'ensemble de ces données montrent que CD13/APN joue un rôle primordial dans la mise en place et la régulation de nombreux processus pathologiques. Son expression et son activité pourraient être également influencées par certaines conditions pathologiques.

2.1. Régulation

Comme il n'existe pas de forme zymogène pour CD13/APN, son activité est régulée soit au niveau de sa synthèse et de sa dégradation soit par des inhibiteurs endogènes. Son expression est régulée par différents mécanismes. Son niveau d'expression protéique et d'activité enzymatique a été trouvé corrélé à son niveau d'expression génique dans de nombreux types cellulaires (Riemann et al. 1999).

Il a été montré que la maturation et la différenciation des monocytes est accompagnée par une augmentation de l'expression de CD13 (Laouar et al. 1993). En outre, certaines cytokines comme l'IL-4, IFN- γ dérivés des LT sont capables d'augmenter son expression en ARNm et en protéines ainsi que son activité enzymatique dans plusieurs types cellulaires (van Hal et al. 1994, Riemann et al. 1995, Gabrilovac et al. 2005). Son expression à la surface des monocytes est induite également par le facteur de croissance TGF- β (Gabrilovac et al. 2008) et diminuée par la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Kehlen et al. 2004). Ceci suggère un rôle joué par les cytokines dans la régulation de rôle du CD13/APN au cours de l'inflammation.

De plus, l'hypoxie et certains facteurs de croissance angiogéniques (notamment bFGF et VEGF) induisent fortement l'expression de CD13/APN en ARNm dans les cellules endothéliales et dans des xénogreffes de tumeurs. Cette induction d'expression a été trouvée médiée par la voie Ras/MAPK (Bhagwat et al. 2001).

Plus récemment, une régulation paracrine de l'expression de CD13/APN par son ligand 14-3-3 σ a été révélée. En effet, 14-3-3 σ augmente l'expression de CD13/APN à la surface des fibroblastes de façon dose-dépendante, ce qui permet de promouvoir la migration des fibroblastes et d'améliorer ainsi la qualité de la cicatrisation. Ceci suggère que l'expression de CD13/APN pourrait être régulée par ses ligands (Lai et al. 2011).

En plus de sa régulation par les facteurs de croissance et les cytokines, l'expression de CD13/APN peut être influencée par les cellules voisines. En effet, il a été montré que son expression dans les lymphocytes T et B est induite lors de leur adhésion aux synoviocytes (Riemann et al. 1997). Ceci pourrait expliquer davantage l'implication de CD13/APN dans la PR.

Parmi les inhibiteurs endogènes de l'activité de CD13/APN on peut citer la bradykinine et la substance P. Il a été suggéré que l'inhibition de l'activité enzymatique de CD13/APN, par ces peptides naturels, pourrait empêcher l'hydrolyse des neuropeptides tels que les enképhalines et augmenter ainsi les effets analgésiques (Xu et al. 1995).

Par ailleurs, l'activité enzymatique de CD13/APN peut être inhibée par RECK (Reversion-inducing Cysteine-rich protein with kazal motifs). Cette protéine est capable de moduler également la voie de l'endocytose de CD13/APN (Miki et al. 2007). Cette protéine pourrait être impliquée dans la régulation de l'entrée des virus dans les cellules et l'absorption du cholestérol via CD13/APN.

2.2. CD13/APN : une cible thérapeutique

La diversité de ses fonctions et son implication dans différents processus pathologiques font de CD13/APN une importante cible thérapeutique. Ainsi, différentes stratégies ont été développées afin d'inhiber ses implications pathologiques mais également pour mieux comprendre et caractériser ses rôles physiologiques. A ce jour, plusieurs inhibiteurs de CD13/APN ont été développés, que ce soit des inhibiteurs ciblant son activité enzymatique ou des anticorps bloquants ciblant son rôle récepteur et sa transduction du signal. Des modèles animaux *in vivo* invalidés pour CD13/APN ont été également développés.

2.2.1. Anticorps bloquants et inhibiteurs pharmacologiques:

De nombreux ligands ciblant CD13/APN ont été découverts ou développés, dont certains sont actuellement utilisés cliniquement ou en cours d'essais cliniques (Bauvois et Dauzonne 2006, Wickström et al. 2011). La capacité des inhibiteurs et des anticorps bloquants pour empêcher CD13 de jouer ses rôles biologiques et pathologiques a été décrite dans de nombreux types cellulaires (Mina-Osorio 2008).

En effet, les anticorps qui ciblent les sites de liaison des coronavirus sur CD13/APN sont capables de bloquer potentiellement les infections virales, sans interférer avec les fonctions physiologiques de CD13/APN et notamment son activité enzymatique (Chen et al. 2012). D'autres anticorps monoclonaux anti-CD13 (comme MH8-11) sont efficaces pour inhiber par exemples l'invasion et l'angiogenèse tumorale (Hashida et al. 2002). Certains anticorps sont capables également de reconnaître l'isoforme de CD13 exprimée dans les tumeurs (Curnis et al. 2002) et d'agir en compétition avec les auto-anticorps produits naturellement contre CD13/APN (Rahbar et al. 2006).

De plus, des anticorps monoclonaux dirigés contre CD13/APN sont capables de déclencher une signalisation (Santos et Langner 2000, Mina-Osorio et al. 2006) permettant ainsi de comprendre son mécanisme d'action et les voies intracellulaires impliquées dans la transduction du signal. Il a été rapporté, par exemple, que les deux anticorps (My7 et SJ1D1) sont capables de cibler CD13 sans faire intervenir le site catalytique. C'est le cas pour inhiber la croissance cellulaire en cas d'une leucémie myéloïde et d'activer l'apoptose des cellules via l'activation des voies PI3K et AKT impliquées dans la transduction du signal et des caspases impliquées dans les voies de l'apoptose (Piedfer et al. 2011).

En outre, l'implication de CD13 en tant que récepteur dans certains processus tel que son rôle dans la migration des fibroblastes au cours de remodelage cicatriciel a été surtout confirmé en utilisant des anticorps bloquants (3D8 et H300) (Lai et al. 2010).

Plusieurs inhibiteurs naturels et synthétiques de l'activité enzymatique de CD13/APN ont été également caractérisés et utilisés pour révéler son implication dans des processus biologiques et pathologiques primordiaux (Bauvois et Dauzonne 2006). Parmi les inhibiteurs naturels, on peut citer la bestatine, la probestine, l'amastatine, la phebestine, la leuhistin, l'actinonine, le curcumin, la puromycine, et l'acide bétulinique (Mina-Osorio 2008).

La bestatine est l'inhibiteur le plus fréquemment utilisé. Il a été rapporté qu'il augmente le taux de survie des patients atteints du cancer (Ichinose et al. 2003) et qu'il inhibe le chimiotactisme joué par CD13/APN sur les lymphocytes T au cours de la sarcoïdose pulmonaire (Tani et al. 2000). Cependant, il est capable d'interagir avec d'autres aminopeptidases, comme la leucyle aminopeptidase (EC 3.4.11.1) et l'aminopeptidase W (EC 3.4.11.16) dans des cellules myéloïdes (Bauvois et Dauzonne 2006), ce qui pourrait avoir des effets secondaires néfastes (Mishima et al. 2007). Il est suggéré que l'effet inhibiteur observé avec des doses élevées de bestatine reflète probablement ses effets intracellulaires (Grujic, et Renko 2002).

Le curcumin, un produit phénolique naturel, a été décrit également comme un inhibiteur irréversible de l'APN. Ses effets sont étudiés actuellement sur des patients atteints de cancer dans plusieurs essais cliniques (Shim et al. 2003, Wickström et al. 2011). Il possède également des effets anti-inflammatoires via l'inhibition de l'activité et de l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) dans des lignées cellulaires et modèles animaux distincts (Perrone et al. 2015).

Cependant l'ensemble de ces inhibiteurs naturels, à doses élevées, peuvent induire une cytotoxicité de manière non spécifique (Bauvois et Dauzonne 2006). En outre, ils manquent

de spécificité tissulaire et leurs effets sur les fonctions indépendantes de l'activité enzymatique de CD13/APN sont mal caractérisés (Mina-Osorio 2008).

D'autres inhibiteurs synthétiques ciblant CD13/APN ont été ainsi développés. Parmi ces inhibiteurs, les dérivés de l'acide flavones-8-acétique (FAA), notamment le 2',3-dinitro flavone-8-acétique, sont caractérisés par une forte efficacité et spécificité ainsi qu'une faible cytotoxicité sur des cellules humaines en culture (Bauvois et al. 2003, Bauvois et Dauzonne 2006).

Cependant, CD13/APN est une enzyme multifonctionnelle et donc son inhibition pourrait entraîner des effets complexes.

2.2.2. Modèles *in vivo* de CD13/APN : Souris invalidées pour CD13/APN

Les souris déficientes en CD13/APN ont été récemment décrites (Rangel et al. 2007). Elles sont fertiles, en bonne santé et ne montrent aucune anomalie macroscopique ou histologique. Les études neurologiques, cardiovasculaires, métaboliques, locomotrices et hématologiques n'ont détecté aucune anomalie chez ces souris (Rangel et al. 2007, Winnicka et al. 2010). Cependant, une étude plus récente réalisée sur ce modèle a mis en évidence un retard dans la morphogenèse canalaire et alvéolaire des glandes mammaires pendant la gestation, indiquant le rôle essentiel joué par CD13/APN dans le remodelage du tissu mammaire au cours de son développement. Aucun effet de ce retard n'a été détecté sur la lactation (Kolb et al. 2013).

Chez les souris invalidées pour CD13/APN, c'est notamment la réponse à certaines conditions pathologiques qui est altérée. C'est le cas de la réponse angiogénique au cours d'une rétinopathie induite chez ces souris qui a été montrée affectée, confirmant ainsi le rôle angiogénique important joué par CD13/APN dans les conditions pathologiques (Rangel et al. 2007).

Le rôle de CD13/APN comme molécule d'adhésion impliquée dans le processus inflammatoire au cours de la régénération tissulaire a été également confirmé dans un modèle d'infarctus du myocarde. En effet, chez ce modèle déficient en CD13/APN, l'infiltration des cellules inflammatoires et immunitaires est significativement réduite, contribuant ainsi à une différenciation fibroblastiques atténuée et donc à un remodelage cicatriciel altéré (Pereira et al. 2013).

Le rôle de CD13/APN dans la régénération tissulaire a été validé récemment dans un modèle de lésion ischémique du muscle squelettique. En effet, l'invalidation de CD13/APN chez ce modèle altère la mise en place des réponses nécessaires pour la réparation du muscle telles que l'angiogenèse (par manque d'invasion endothéliale), la réponse inflammatoire (par défaut de recrutement des cellules inflammatoires et de production des cytokines pro-inflammatoires) et l'adhésion des cellules musculaires (Rahman et al. 2014).

Le rôle de CD13/APN dans l'infiltration des cellules inflammatoires dans le cas d'une péritonite a été également exploré. Ce modèle de péritonite chez les souris déficientes pour CD13/APN confirme l'importance de CD13/APN dans l'adhérence entre monocytes et cellules endothéliales durant le processus de la migration cellulaire (Ghosh et al. 2014).

L'ensemble de ces études *in vivo* montrent que l'invalidation de CD13/APN n'engendre pas d'effets délétères remarquables sur les fonctions physiologiques de l'organisme. Cependant, elles confirment que l'expression de CD13/APN est indispensable pour la mise en place des réponses appropriées (telles que l'angiogenèse, l'inflammation et l'adhésion cellulaire) dans des conditions pathologiques.

L'expression de CD13/APN dans le cartilage articulaire et son implication dans le processus arthrosique n'a jamais été étudié, d'où l'objectif de ce travail de thèse.

Objectifs

L'ensemble des données bibliographiques précédemment citées met en évidence qu'au cours de l'arthrose, les modifications du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral sont liées. L'os sous-chondral pourrait initier les lésions du cartilage articulaire au cours de l'arthrose. En conditions basales, os et cartilage communiquent via un réseau de médiateurs solubles. Au cours de l'arthrose, le remodelage excessif et l'altération phénotypique des cellules du tissu osseux perturberaient cette communication biochimique entre les tissus, permettant la transmission de signaux osseux anormaux favorisant la dégradation du cartilage.

Récemment, notre équipe a établi un modèle murin de communication os/cartilage. Ce modèle est obtenu en utilisant des ostéoblastes murins, qui sont soumis ou non, à une compression cyclique mimant le stress mécanique observé dans l'arthrose et entraînant l'expression de facteurs sécrétés dans le cadre de l'arthrose. Les milieux conditionnés par ces ostéoblastes sont utilisés pour stimuler des chondrocytes articulaires murins en culture primaire. Cette stimulation entraîne l'apparition d'un phénotype catabolique des chondrocytes correspondant au phénotype des chondrocytes articulaires arthrosiques. L'analyse des milieux conditionnés d'ostéoblastes grâce à la technique de sécrétomique différentielle iTRAQ, a permis à notre équipe d'identifier la protéine 14-3-3 ϵ comme médiateur de cette communication.

Pour agir et ainsi aboutir à l'apparition d'un phénotype catabolique chondrocytaire, 14-3-3 ϵ doit se fixer sur un récepteur présent à la surface des chondrocytes articulaires.

CD13/APN, identifié à la surface des fibroblastes comme récepteur potentiel de l'isoforme σ des protéines 14-3-3, pourrait représenter le récepteur de 14-3-3 ϵ , à la surface des chondrocytes et assurer ainsi la réception et la transmission de son signal.

Les travaux réalisés durant cette thèse ont pour objectif de mieux comprendre les interactions biochimiques délétères existant entre os et cartilage au cours de l'arthrose, en étudiant le rôle de CD13/APN, en tant que récepteur de 14-3-3 ϵ .

Pour cela, nos objectifs sont les suivants :

- **Etudier l'implication de CD13/APN en tant que récepteur mais aussi en tant qu'enzyme aminopeptidase N, dans l'effet catabolique chondrocytaire induit par 14-3-3 ϵ dans des cultures primaires de chondrocytes articulaires murins et humains.**

- **Etudier l'interaction directe entre CD13/APN et 14-3-3 ϵ par différentes approches *in vitro* et *in silico***
- **Evaluer le rôle de 14-3-3 ϵ *in vivo* chez la souris et évaluer l'importance de l'interaction entre 14-3-3 ϵ et CD13/APN dans l'établissement des lésions arthrosiques.**

Interaction entre CD13/APN et 14-3-3 ϵ
(Etudes *in vitro*)

Article publié en 2015 dans *Journal of Cell Science* (*J Cell Sci.*128(17):3250-62)

“The pro-inflammatory cytokine 14-3-3 ϵ is a ligand of CD13 in cartilage”

Meriam Nefla, Laure Sudre, Guillaume Denat, Sabrina Priam, Gwena Ile Andre-Leroux, Francis Berenbaum and Claire Jacques.

Les objectifs de la première partie de ce travail de thèse étaient, dans un premier temps, d'étudier l'implication de CD13/APN dans la réponse chondrocytaire à 14-3-3 ϵ , en terme d'expression de MMP-3 et MMP-13, deux métalloprotéases majeures impliquées dans la dégradation du cartilage au cours de l'arthrose. Dans un second temps, l'interaction directe entre CD13/APN et 14-3-3 ϵ a été explorée.

❖ Mise en évidence de l'expression de CD13/APN dans les chondrocytes articulaires :

L'expression de CD13/APN à la surface des chondrocytes articulaires n'a jusqu'à présent jamais été démontrée. Dans un premier temps nous avons donc examiné son expression génique dans les chondrocytes murins par RT-qPCR et protéique par Western blot (Fig. 1A) et immunocytochimie (Fig. 1B). Son expression a été également étudiée par RT-qPCR, western blot (Fig. 1C) et immunocytochimie (Fig. 1D) dans les chondrocytes humains arthrosiques et par immunohistochimie (Fig. 1E) sur des coupes histologiques de cartilage arthrosique. Par ces différentes techniques, nous avons pu montrer que CD13/APN est exprimé dans les chondrocytes articulaires murins et humains.

❖ Effet de l'inactivation de CD13/APN sur la réponse chondrocytaire à 14-3-3 ϵ :

Afin d'étudier l'implication de CD13/APN dans la surexpression chondrocytaire des enzymes matricielles MMP-3 et MMP-13 induite par 14-3-3 ϵ , les chondrocytes articulaires murins ont été transfectés par des siRNA dirigés contre CD13/APN afin d'invalider à la fois son rôle récepteur et son activité enzymatique aminopeptidase N. Ensuite, les chondrocytes ont été stimulés par la protéine recombinante 14-3-3 ϵ . Vingt-quatre heures après la stimulation, l'expression et la sécrétion de MMP-3 et MMP-13 ont été analysées par RT-qPCR et ELISA.

Les résultats obtenus montrent que l'augmentation de l'expression et de la sécrétion de ces deux métalloprotéases en réponse à 14-3-3 ϵ est inhibée en présence de siRNA CD13 (Fig.2).

Ces résultats montrent que l'inactivation de CD13/APN inhibe l'expression de MMP-3 et MMP-13 en réponse à 14-3-3 ϵ dans les chondrocytes articulaires, suggérant ainsi l'implication de CD13/APN dans l'établissement du phénotype catabolique chondrocytaire induit par 14-3-3 ϵ .

❖ **Mise en évidence de l'activité aminopeptidase N dans les chondrocytes 14-3-3 ϵ :**

CD13, aussi connu comme aminopeptidase N, peut agir grâce à son activité enzymatique. Nous avons vérifié, dans un premier temps, la présence d'une activité APN dans les chondrocytes articulaires. Cette activité n'ayant jamais été explorée dans ce type cellulaire, une mise au point a été nécessaire. Nous avons effectué une cinétique en testant différents temps d'incubation des cultures primaires des chondrocytes murins et humains avec le substrat fluorescent (L-alanine β -naphthylamide) en présence ou non d'APNi (inhibiteur spécifique d'APN) (**Figure 34**).

Nous avons pu mettre en évidence une activité APN dans les chondrocytes murins qui atteint son maximum au bout de 60-90 min. Cette activité est fortement inhibée en présence d'APNi (Fig. 3A). Le temps 60 min a été choisi pour la suite des expériences.

Pour tester l'effet de 14-3-3 ϵ sur l'activité APN, les chondrocytes murins ont été stimulés par 14-3-3 ϵ en présence ou non d'APNi. Nos résultats montrent que l'activité enzymatique APN ne varie pas après la stimulation des chondrocytes par la protéine 14-3-3 ϵ (Fig. 3C).

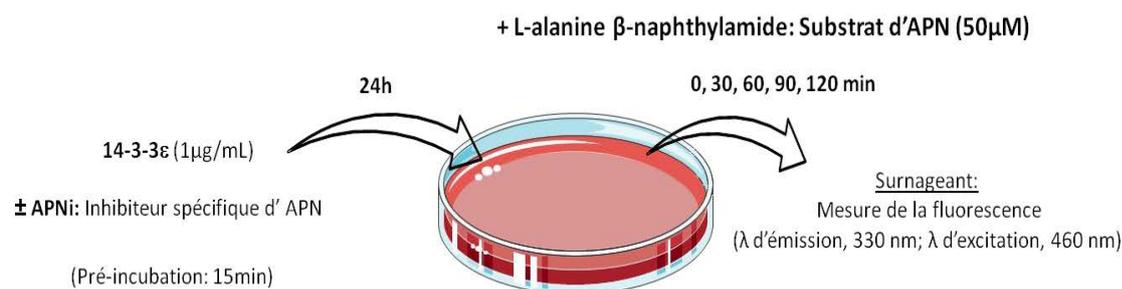


Figure 34 : Schéma du dosage de l'activité enzymatique aminopeptidase N.

Dosage de l'activité enzymatique aminopeptidase N dans les chondrocytes articulaires en absence ou en présence de son inhibiteur (APNi) et de la protéine 14-3-3 ϵ .

Les résultats obtenus dans les chondrocytes murins ont été validés ensuite sur des chondrocytes humains. Ceux-ci possèdent également une activité APN qui augmente au cours du temps et qui est totalement inhibée en présence d'APNi (**Fig.3B**).

Ces résultats montrent donc que les chondrocytes murins et humains possèdent une activité APN mais elle n'est pas modifiée en présence de 14-3-3ε.

❖ **Etude du rôle récepteur de CD13/APN dans la réponse chondrocytaire à 14-3-3ε :**

Afin d'étudier son implication en tant que récepteur dans la réponse chondrocytaire à 14-3-3ε, CD13/APN a été invalidé dans des chondrocytes articulaires murins et humains par des anticorps bloquant n'ayant aucun effet sur son activité enzymatique.

Des cultures primaires de chondrocytes articulaires murins ont été pré-traitées par des doses croissantes d'anticorps bloquant CD13 (AB108310) puis stimulées par la 14-3-3ε recombinante. Vingt-quatre heures après la stimulation, l'expression et la sécrétion de MMP-3 et MMP-13 ont été analysées.

Les résultats montrent que l'expression et la libération de MMP-3 (**Fig. 4A, B**) et de MMP-13 (**Fig. 4C, D**) en réponse à 14-3-3ε sont inhibées de façon dose dépendante par l'anticorps bloquant.

Afin de valider les résultats obtenus dans les chondrocytes murins, nous avons étudié, dans les chondrocytes humains arthrosiques, l'effet d'un anticorps bloquant CD13 humain, SJ1D1, sur l'expression de MMP-3 en réponse à la 14-3-3ε. L'expression et la sécrétion de MMP-3 induite par 14-3-3ε dans les chondrocytes humains sont également inhibées (Fig. S2).

Ainsi, l'invalidation de CD13/APN par des anticorps bloquant uniquement son rôle récepteur inhibe significativement l'expression et la libération de MMP-3 et MMP-13 en réponse à 14-3-3ε. Ceci suggère que CD13/APN joue son rôle récepteur dans la transmission du signal de 14-3-3ε dans les chondrocytes afin d'induire un phénotype catabolique.

❖ Etude de l'interaction directe entre 14-3-3 ϵ et CD13/APN :

Afin de savoir si l'effet catabolique était le résultat d'une interaction directe entre 14-3-3 ϵ et CD13/APN, nous avons choisi d'utiliser la technologie innovante de la résonance plasmonique de surface (SPR) basée sur le système Biacore 3000.

- Principe de la résonance plasmonique de surface (SPR) :

La SPR consiste à déposer sur une interface, entre deux milieux d'indices de réfraction différents, (comme l'air et le liquide) une couche fine d'or riche en électrons libres. Dans ces conditions, lorsqu'une lumière polarisée monochromatique est envoyée sur l'interface, elle peut être réfléchie totalement. Par conséquent, il n'y a pas de réfraction et une des composantes électromagnétiques de la lumière, l'onde évanescente, se propage perpendiculairement à l'interface. Cette onde traverse une zone appelée champ évanescent. Les photons de cette onde évanescente entrent en résonance avec les électrons libres du métal (appelés plasmons). Ce phénomène de résonance se caractérise par une chute de l'intensité de la lumière réfléchie à un certain angle (angle de résonance) (**Figure 35**). Cet angle est étroitement lié à la densité du milieu. En effet, toute interaction moléculaire entre une molécule fixée sur la surface et une autre en solution entraîne un changement de masse qui va modifier l'indice de réfraction du champ évanescent et décaler ainsi la position de l'angle de résonance. La variation de l'angle de résonance est proportionnelle à la quantité de la molécule fixée sur sa partenaire retenue sur la surface. Elle permet ainsi de visualiser l'interaction entre les deux protéines

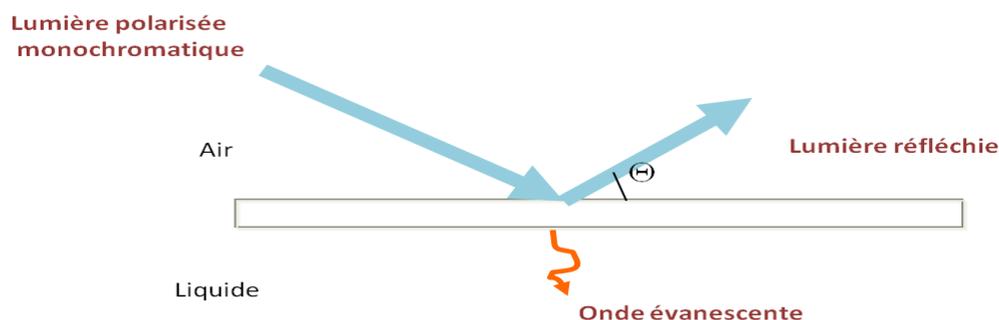


Figure 35 : Schéma d'une réflexion totale d'une lumière polarisée monochromatique engendrant une onde évanescente.

Le système **Biacore** permet de visualiser en temps réel cette interaction dans un débit continu de tampon. Il consiste à immobiliser une des deux molécules, nommée ligand, sur une interface spécifique appelée **Sensor Chip** (biocapteur) et injecter ensuite la molécule partenaire, nommée analyte, à débit constant dans un circuit microfluidique au contact de cette interface.

Le biocapteur du Biacore 3000 comprend une lamelle de verre sur laquelle est déposée une fine couche d'or, recouverte elle-même d'une couche de dextran carboxyméthylé sur lequel on couple de façon covalente le ligand. Il existe différentes surfaces selon le type de ligand à immobiliser (carboxyméthyle CM5, nickel NTA, streptavidine SA).

Dans nos expériences, nous avons utilisé un sensor chip CM5 (**Figure 36**). Le ligand est fixé sur sa surface de manière covalente via des groupes carboxyles. Les groupes fonctionnels dans le ligand qui peuvent être utilisés pour son couplage à la surface de CM5 incluent $-NH_2$, $-SH$, $-CHO$, $-OH$ et $-COOH$.

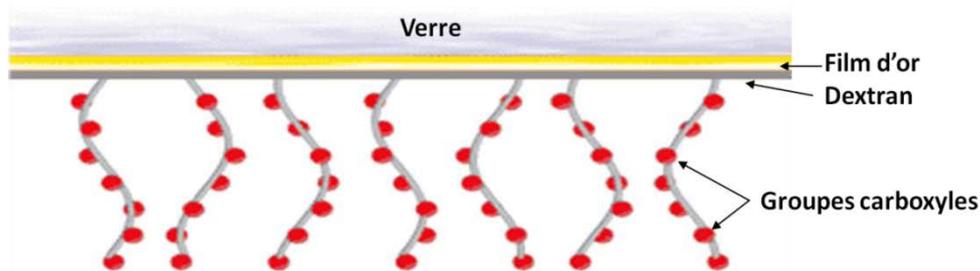


Figure 36 : Sensor Chip CM5.

Le sensor Chip CM5 contient une couche fine d'or recouverte d'une couche de dextran riche en groupes carboxyles permettant l'immobilisation du ligand.

L'analyte dilué dans un tampon est injecté à flux constant à la surface du biocapteur. Les changements de masse induits par l'association ou dissociation des complexes modifient la réfringence du milieu et décalent la position de l'angle de résonance. La variation de l'angle de résonance est enregistrée par le système sous forme d'un **sensorgramme** permettant de suivre en temps réel la fixation de la molécule injectée sur le biocapteur (**Figure 37-B**). Les données sont traitées par le logiciel Biaevaluation de Biacore. Le signal de résonance est exprimé en unités de résonance (RU). Une déviation de l'angle de résonance de 0.1 degré

correspond à une fixation de 1 ng de protéine par mm^2 de surface et induit une variation de 1000 RU.

Le système Biacore permet de déterminer également des paramètres cinétiques (constantes d'équilibre et de cinétique) qui permettent une meilleure compréhension de l'interaction entre le ligand et l'analyte.

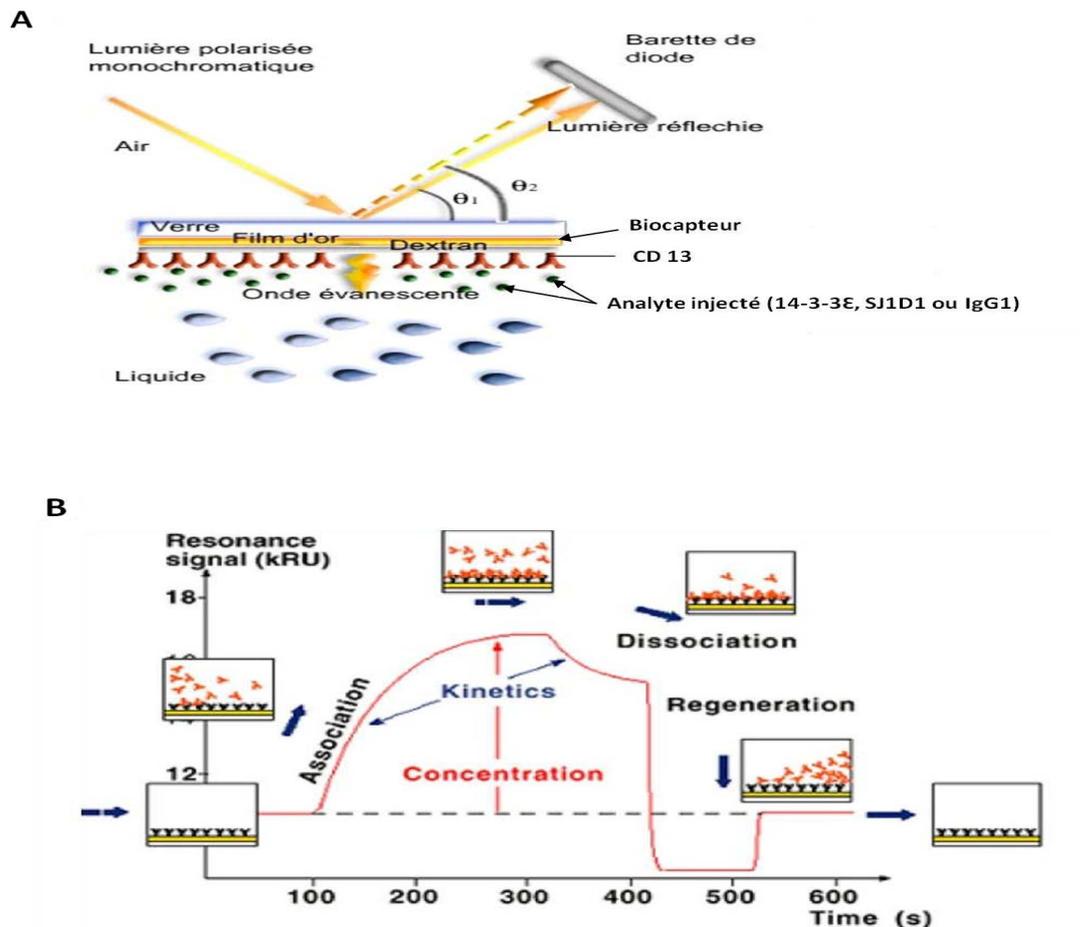


Figure 37 : Principe de la résonance plasmonique de surface (SPR) et le profil du sensorgramme.

La protéine recombinante humaine CD13/APN a été immobilisée sur un sensor chip (biocapteur) de type CM5. Ensuite, la protéine recombinante humaine 14-3-3 ϵ , l'anticorps bloquant spécifique de CD13/APN humain (SJ1D1, contrôle positif) et un isotype IgG1 (contrôle négatif) étaient utilisés en tant qu'analytes injectés par le système afin de circuler à la surface de CM5 contenant CD13/APN (**A**). L'association et la dissociation entre les deux protéines induisent un changement de l'angle de résonance détecté par le système et enregistré sous forme d'un sensorgramme, permettant de suivre en temps réel l'interaction entre les deux molécules (**B**). (Source : site internet de la plateforme des interactions moléculaires (Biacore), IFR83).

Au cours de nos expériences, une mise au point a été nécessaire pour déterminer la concentration de CD13 à immobiliser sur le biocapteur, la dose de 14-3-3ε à injecter et le flux d'injection. Les résultats obtenus suite à ces expériences montrent une interaction directe entre CD13/APN et 14-3-3ε (78 RU), une plus forte liaison avec SJ1D1 (170 RU) et une absence d'interaction avec IgG1 (00 RU) (**Fig.5A**).

Les tests cinétiques effectués en injectant des concentrations croissantes de 14-3-3ε ont montré que l'interaction entre 14-3-3ε et CD13/APN est spécifique mais de faible affinité ($K_d=2.45.10^{-6}$ M) (**Fig.5B**).

❖ **Test de liaison de 14-3-3ε à la surface des chondrocytes:**

Pour tester la capacité de 14-3-3ε à se lier à la surface des chondrocytes, nous avons stimulé les chondrocytes murins avec la protéine recombinante 14-3-3ε marquée à la biotine. L'analyse des cellules par microscopie à fluorescence a montré que 14-3-3ε biotinylée est capable de se fixer sur la surface des chondrocytes. Cette liaison est inhibée en présence de 14-3-3ε non marquée (test de compétition), montrant ainsi la spécificité de la liaison obtenue avec 14-3-3ε marquée. Elle est également inhibée en présence d'anticorps bloquant anti-CD13/APN, suggérant ainsi une possible interaction de CD13/APN et 14-3-3ε à la surface des chondrocytes.

❖ **Modélisation *in silico* de l'interaction entre 14-3-3ε et CD13/APN:**

Afin d'identifier la séquence peptidique de CD13/APN impliquée dans l'interaction avec 14-3-3ε, nous avons effectué des études *in silico*, en collaboration avec G. André-Leroux de l'unité de Microbiologie Structurale de l'Institut Pasteur et de l'unité de « Mathématiques et Informatique Appliquées du Génome à l'Environnement » de l'INRA.

En nous basant sur des études montrant que les protéines 14-3-3 reconnaissent préférentiellement les sites Ser, Thr et Tyr phosphorylés (Uhart et Bustos 2013, 2014), la séquence de CD13/APN a été scannée sur PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org>) afin de repérer les sites de phosphorylation putatifs ou avérés.

- **PhosphoSitePlus** est une ressource en ligne qui fournit des informations et des outils complets pour étudier expérimentalement les modifications post-traductionnelles des protéines, y compris la phosphorylation mais aussi l'ubiquitination, l'acétylation et la méthylation. Cette ressource englobe 129 082

sites de modification (dont 78% sont des phosphorylations) sur 14 256 protéines (Hornbeck et al. 2012).

Les sites de phosphorylation définis sur CD13/APN ont été ensuite cartographiés sur la structure tridimensionnelle de CD13/APN mature, téléchargée à partir de PDB (Protein Data Bank) sous l'identifiant 4FYQ et visualisée avec PyMOL.

- **PDB (Protein Data Bank)** est une banque d'informations sur la structure tridimensionnelle des protéines, des acides nucléiques et des assemblages complexes. Les structures compilées dans la pdb sont résolues expérimentalement par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) ou, plus souvent, par cristallographie de diffraction aux rayons X. La pdb recueille, après validation, les données de chaque structure moléculaire, décrivant la localisation de chaque atome enregistré dans le système de coordonnées cartésiennes ainsi que son mode de liaison covalente. Chaque modèle est référencé dans la banque par un identifiant unique de 4 caractères. Les fichiers décrivant les différents modèles moléculaires peuvent être téléchargés à partir du site de la PDB, visualisés et analysés en 3D grâce à différents logiciels tels que PyMOL (Hornbeck et al. 2011, Pan et Aller 2015).

L'analyse 3D de la structure de CD13/APN nous a permis d'identifier que parmi les 4 résidus susceptibles d'être phosphorylés, seul le résidu Y582 est accessible à la phosphorylation par une Ser/Thr/Tyr kinase, les autres sont enfouis dans la protéine. De plus, Y582 appartient à la séquence E⁵⁷⁹FNYVW⁵⁸⁴, qui est un segment en conformation étendue, c'est à dire qu'il ne participe ni à un brin β ni à une hélice α . Or ce paramètre de "coil" est le critère topologique commun à tous les ligands de 14-3-3 (Yang et al. 2006, Bustos et Iglesias 2006). Nous avons donc décidé de modéliser l'interaction de ce segment ou "hit" identifié chez CD13/APN - dans le site de reconnaissance de la protéine 14-3-3 ϵ .

Pour cela, la stratégie a été la suivante: les coordonnées 3D de l'hexapeptide RQRpSAP en complexe avec 14-3-3 ϵ (ont été mutées afin d'obtenir la séquence EFNYVW en complexe avec 14-3-3 ϵ (l'identifiant PDB est 2BR9, Yang et al. 2006, Yaffe et al. 1997). L'hexapeptide EFNYVW, qui contient le phospho-site Y582, est donc ancrée dans le site de liaison de 14-3-3 ϵ , par analogie avec la position de l'hexapeptide RQRpSAP. Afin d'étudier sa capacité à se lier à un monomère de 14-3-3 ϵ , les deux orientations N ter et C ter ainsi que les deux états de phosphorylation, phosphorylé et non phosphorylé de EFNYVW ont été testés et optimisés par

minimisation de la fonction d'énergie potentielle d'interaction en utilisant le champ de forces CHARMM distribué par Biovia Discovery Studio®. En effet, l'énergie potentielle d'interaction évaluée peut être corrélée à l'affinité, plus l'énergie potentielle d'un système est basse, voire négative en kcal/mol, plus son interaction est forte. Pour avoir une énergie d'interaction de référence en comparaison, nous avons évalué l'énergie d'interaction du complexe RQRpSAP /14-3-3ε.

- La mutation de l'hexapeptide RQRpSAP et l'évaluation des complexes modélisés ont été effectuées grâce aux outils de modélisation moléculaire distribués par Biovia **DiscoveryStudio®**, qui offre un panel d'outils de bioinformatique structurale et un environnement interactif pour la visualisation, l'analyse des interactions ou encore l'évaluation de la dynamique de structures moléculaires complexes. Parmi ces divers modules est implémenté CHARMM (Chemistry at HARvard Molecular Mechanics), un programme de simulation de mécanique et dynamique moléculaires qui calcule et optimise l'énergie potentielle des différentes structures en se basant sur leurs paramètres de champs de forces (Brooks et al. 2009).

De manière intéressante, le meilleur score d'énergie (en comparaison avec la séquence de référence) a été obtenu avec la séquence EFNpYVW contenant le résidu Tyr phosphorylé et orientée de la même façon que le ligand RQRpSAP (N-ter) (Fig 7.C). Notre complexe modélisé montre que le site de liaison de 14-3-3ε est composé des résidus K50, K57, R61, R130 et Y131 qui est donc fortement chargée positivement et qui serait capable d'interagir avec le résidu Y582, chargé négativement via des liaisons électrostatiques (Fig 7.A et B).

❖ **Validation de l'implication de la séquence EFNpYVW dans l'interaction entre 14-3-3ε et CD13/APN :**

Pour étudier l'implication de cette séquence protéique contenant le résidu Y582 phosphorylé dans l'interaction entre 14-3-3ε et CD13, nous avons prétraité des chondrocytes murins avec EFNpYVW, afin d'empêcher 14-3-3ε de se fixer sur CD13 endogène, puis stimulé avec 14-3-3ε. L'expression de MMP-3 et -13 en réponse à 14-3-3ε dans ces cellules a été inhibée en présence de la séquence peptidique, confirmant ainsi que E⁵⁷⁹FNpYVW⁵⁸⁴ est la séquence peptidique de CD13 impliquée dans son interaction avec 14-3-3ε.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que CD13/APN interagit avec 14-3-3ε extracellulaire afin de transmettre son signal dans les chondrocytes articulaires. La

séquence E⁵⁷⁹FNYVW⁵⁸⁴ de CD13/APN, contenant le résidu Y582 phosphorylé, est une séquence indispensable pour cette interaction.

Article :

**“The pro-inflammatory cytokine 14-3-3 ϵ
is a ligand of CD13 in cartilage”**

RESEARCH ARTICLE

The pro-inflammatory cytokine 14-3-3 ϵ is a ligand of CD13 in cartilage

Meriam Nefla^{1,2}, Laure Sudre^{1,2}, Guillaume Denat^{1,2}, Sabrina Priam^{1,2}, Gwenaëlle Andre-Leroux³, Francis Berenbaum^{1,2,4,*} and Claire Jacques^{1,2}

ABSTRACT

Osteoarthritis is a whole-joint disease characterized by the progressive destruction of articular cartilage involving abnormal communication between subchondral bone and cartilage. Our team previously identified 14-3-3 ϵ protein as a subchondral bone soluble mediator altering cartilage homeostasis. The aim of this study was to investigate the involvement of CD13 (also known as aminopeptidase N, APN) in the chondrocyte response to 14-3-3 ϵ . After identifying CD13 in chondrocytes, we knocked down CD13 with small interfering RNA (siRNA) and blocking antibodies in articular chondrocytes. 14-3-3 ϵ -induced MMP-3 and MMP-13 was significantly reduced with CD13 knockdown, which suggests that it has a crucial role in 14-3-3 ϵ signal transduction. Aminopeptidase N activity was identified in chondrocytes, but the activity was unchanged after stimulation with 14-3-3 ϵ . Direct interaction between CD13 and 14-3-3 ϵ was then demonstrated by surface plasmon resonance. Using labeled 14-3-3 ϵ , we also found that 14-3-3 ϵ binds to the surface of chondrocytes in a manner that is dependent on CD13. Taken together, these results suggest that 14-3-3 ϵ might directly bind to CD13, which transmits its signal in chondrocytes to induce a catabolic phenotype similar to that observed in osteoarthritis. The 14-3-3 ϵ –CD13 interaction could be a new therapeutic target in osteoarthritis.

KEY WORDS: 14-3-3 ϵ , CD13, Aminopeptidase N, Chondrocyte, Osteoarthritis

INTRODUCTION

Osteoarthritis is a chronic joint disease characterized by a progressive degradation of articular cartilage, synovial inflammation and remodeling of subchondral bone in response to a variety of stimuli, such as proinflammatory cytokines and mechanical loading (Bijlsma et al., 2011; Martel-Pelletier and Pelletier, 2010). The catabolic phenotype observed in osteoarthritis is caused by an imbalance in synthesis and degradation of matrix components, mainly due to increased production of matrix-degradative enzymes, such as matrix metalloproteinases (MMPs) and aggrecanases (Findlay and Atkin,

2014; Felson and Neogi, 2004). Among the MMPs, MMP-3 and MMP-13 are known to play crucial role in osteoarthritis cartilage destruction (Kim et al., 2014).

There is now general agreement that osteoarthritis involves all structures in the affected joint, which leads to articular cartilage deterioration. Several studies have suggested that subchondral bone and articular cartilage form a functional unit, which might play a role in joint maintenance and degeneration. There is a possibility of direct signaling between the two compartments (Imhof et al., 2000; Pan et al., 2009; Clark and Huber, 1990) and that they interact through increased vascularization and development of micro cracks in the bone matrix (Sharma et al., 2013). With respect to cartilage, the diffusion of mediators has been well demonstrated. For example, insulin-like growth factor is largely transported into cartilage from the circulation (Zhang et al., 2010). Hepatocyte growth factor is found in the deep layers of cartilage; it is produced by osteoarthritis osteoblasts and found in cartilage, even though it is not expressed by chondrocytes. These results suggest the passage of this molecule from bone to cartilage (Guevremont et al., 2003).

Recently, our group identified 14-3-3 ϵ as a new soluble mediator involved in deleterious biochemical interactions between bone and cartilage (Priam et al., 2013). Using iTRAQ analysis of conditioned medium from compressed or uncompressed osteoblasts or osteocytes, we found that 14-3-3 ϵ is upregulated in medium from compressed cells. In addition, 14-3-3 ϵ was released by human osteoarthritis subchondral bone and had a potent effect on the pro-catabolic phenotype of human osteoarthritis chondrocytes by increasing MMP release (Priam et al., 2013).

14-3-3 ϵ belongs to the family of 14-3-3 proteins, acidic proteins of 25 to 33 kDa that are highly conserved in eukaryotes (Aitken, 1995). The proteins were first identified by Moor and Perez in 1968 (Moore et al., 1968) in the brain tissue of mammals. Members of the 14-3-3 family are highly related, and at least seven isoforms have been identified in mammal cells (β , ϵ , η , γ , τ , σ and ζ) (Muslin et al., 1996). 14-3-3 proteins have a large number of partners and thus participate in many intracellular processes including cell cycle control, mitogenesis, cytoskeletal changes and apoptosis (Pallucca et al., 2014; Aitken, 2011). However, they can also be detected in the extracellular environment. The first secreted forms of 14-3-3 were detected in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt–Jacob disease (Boston et al., 1982). 14-3-3 η and 14-3-3 γ proteins were detected in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. The levels of these proteins were strongly correlated with levels of MMP-1 and MMP-3, two biomarkers for rheumatoid arthritis (Kilani et al., 2007). It has been determined that 14-3-3 ϵ is involved in the dialog between keratinocytes and fibroblasts during tissue repair. Indeed, 14-3-3 σ is abundantly secreted by differentiated keratinocytes, and can induce the expression of MMP-1, MMP-3 and MMP-8 in dermal fibroblasts (Ghahary et al., 2004). Lung-epithelial-cell-derived 14-3-3 α and 14-3-3 β also has a

¹UMR_S938, CDR Saint-Antoine - INSERM - University Pierre & Marie Curie Paris VI, Sorbonne Universités, 7 quai St-Bernard, Paris 75252, Cedex 5, France.

²Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (DHU 2B), 1st184 rue du Faubourg Saint-Antoine, Paris 75012, France. ³INRA, Unité MAIAGE, Mathématiques et Informatique Appliquées du Génome à l'Environnement, UR1404, Jouy-en-Josas F78352, France. ⁴Department of Rheumatology, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Saint-Antoine Hospital, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, Paris 75012, France.

*Author for correspondence (francis.berenbaum@sat.ap-hop.fr)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Received 29 January 2015; Accepted 10 July 2015

potent MMP-1-inducing effect on airway fibroblasts (Asdaghi et al., 2012).

No receptor for 14-3-3 ϵ has been identified in articular cartilage. However, CD13 (also known as aminopeptidase N, APN) has recently been identified as a 14-3-3 σ receptor on fibroblasts (Ghaffari et al., 2010). Thus, CD13 could be a potential receptor for 14-3-3 ϵ on the chondrocyte surface. CD13 is a 150-kDa surface glycoprotein, and an ectoenzyme of the superfamily of zinc metalloproteases (EC 3.4.11.2) present in many human tissues. CD13 is widely expressed as a homodimer of high molecular mass (~280 kDa) on the cell surface of tissues such as intestinal epithelia and the nervous system (Zhang et al., 2013). It preferentially cleaves neutral amino acids, most notably alanine residues, from the N-terminus of peptides (Chen et al., 2012). Polypeptide chains of this ectoenzyme are organized in different domains: a small cytoplasmic N-terminal domain, a transmembrane domain and a large extracellular domain containing the active site (Luan and Xu, 2007). CD13 plays pivotal roles in many physiological processes such as antigen-presenting regulation, tumor angiogenesis and metastasis, differentiation, proliferation, apoptosis, chemotaxis, crystallization cholesterol, phagocytosis, pain sensation, cell–cell adhesion and coronavirus entry. CD13 performs these functions through its role as a receptor involved in cellular signal transduction and/or peptide cleavage through its aminopeptidase N enzymatic activity (Mina-Osorio, 2008; Gabrilovac et al., 2005). However, an involvement of CD13 in osteoarthritis has never been shown, although this molecule has been thoroughly investigated in another articular pathology, rheumatoid arthritis (Shimizu et al., 2002). Recently, Morgan and colleagues have suggested that the soluble form of CD13, released into synovial fluid, acts as a T-cell chemoattractant that induces rheumatoid arthritis synovitis (Morgan et al., 2015).

We lack evidence of 14-3-3 ϵ associated with a chondrocyte surface receptor. In the current study, we report the association of 14-3-3 ϵ and CD13, and highlight a transmembrane signaling mechanism for 14-3-3 ϵ -mediated MMP-3 and MMP-13 expression in chondrocytes. This interaction between 14-3-3 ϵ and CD13, leading to a chondrocyte catabolic phenotype similar to that observed in osteoarthritis, could be a new target for treatment of osteoarthritis and could be investigated in preclinical studies.

RESULTS

Expression of CD13 in articular chondrocytes

CD13 expression in articular chondrocytes was first examined in primary cultures of mouse chondrocytes. Using quantitative real-time PCR (qRT-PCR), mRNA expression of CD13 was demonstrated in murine chondrocytes, with the peak of expression at between 24 and 26 cycles (data not shown). CD13 protein expression was found in articular chondrocyte extracts by western blot analysis (Fig. 1A) and immunocytochemistry (Fig. 1B). CD13 mRNA and protein expression was verified in human osteoarthritis articular chondrocytes by qRT-PCR (the peak of expression was at between 24 and 26 cycles; data not shown) and western blot analysis (Fig. 1C), respectively, and by immunocytochemistry (Fig. 1D). Its expression on the surface of human cartilage was found on immunohistochemistry (Fig. 1E). Thus, CD13 is constitutively expressed in articular chondrocytes.

CD13 knockdown inhibits 14-3-3 ϵ -induced MMP-3 and MMP-13 expression in murine chondrocytes

To investigate the role of CD13 in 14-3-3 ϵ -mediated MMP-3 and MMP-13 expression, we used siRNA-mediated knockdown. Mouse chondrocytes transfected with siRNA1 or siRNA2 against CD13

showed significantly decreased expression of CD13 expression at the mRNA level (by 42% and 59%, respectively, as compared with the negative control, $P < 0.05$) and the protein level (by 79% and 88%, respectively, as compared with the negative control, $P < 0.05$) (supplementary material Fig. S1), which demonstrates efficient gene silencing. We selected siRNA2 for the following experiments. Mouse chondrocytes were transfected with the negative control siRNA or CD13 siRNA2, then treated with 14-3-3 ϵ for 24 h to examine MMP-3 and MMP-13 expression. Treatment with 1 μ g/ml 14-3-3 ϵ increased the mRNA and protein levels of MMP-3 by tenfold as compared with the control. The 14-3-3 ϵ -mediated induction of MMP-3 expression and release was significantly inhibited by CD13 siRNA (~66% and ~45%, respectively, relative to stimulated controls) ($P < 0.05$; Fig. 2A,B). Similarly, treatment with 14-3-3 ϵ increased chondrocyte MMP-13 expression and secretion (tenfold and fivefold, respectively, relative to unstimulated controls). The 14-3-3 ϵ -mediated induction of MMP-13 expression and release was significantly decreased by CD13 siRNA (~75% and ~23%, respectively, relative to stimulated controls) ($P < 0.01$; Fig. 2C,D). Thus, CD13 knockdown strongly reduced the 14-3-3 ϵ -induced mRNA and protein expression of both MMP-3 and MMP-13, so CD13 might be involved in establishing a catabolic phenotype in murine articular chondrocytes induced by 14-3-3 ϵ .

Articular chondrocytes exhibit aminopeptidase N activity not modified by 14-3-3 ϵ

CD13 can act through its enzymatic activity. To first determine the presence of this activity in articular chondrocytes, we examined the kinetics of aminopeptidase N activity at different times using a specific substrate (L-alanine β -naphthylamide, 50 μ M) with or without an aminopeptidase N inhibitor (APNi; 1 mM). In mouse chondrocytes, aminopeptidase N activity increased over time, to peak at 60–90 min (~twofold increase versus control); this activity was strongly inhibited by APNi (Fig. 3A). To test the effect of 14-3-3 ϵ aminopeptidase N enzymatic activity, mouse chondrocytes were stimulated with 14-3-3 ϵ with or without APNi (0.1 and 1 mM). 14-3-3 ϵ did not alter aminopeptidase N activity. The dose-dependent inhibitory effect of APNi on enzymatic activity was not modified by 14-3-3 ϵ (Fig. 3C). Similar results were obtained at 60 and 90 min of 14-3-3 ϵ stimulation (only the time 60 min is shown in Fig. 3C). In addition, human osteoarthritis articular chondrocytes showed aminopeptidase N activity, which increased over time (~threefold increase at 90 min) and was strongly inhibited by APNi (Fig. 3B).

14-3-3 ϵ invokes the receptor role of CD13 to induce MMP-3 and MMP-13 expression in chondrocytes

To investigate the involvement of the CD13 receptor in 14-3-3 ϵ -mediated MMP-3 and MMP-13 activity, we used an anti-CD13 blocking antibody to block only the receptor role of this protein. We pretreated primary cultures of murine and human chondrocytes with or without the anti-CD13 blocking antibody, followed by stimulation with 14-3-3 ϵ , and compared the results in untreated and stimulated chondrocytes. In murine chondrocytes, 14-3-3 ϵ -induced MMP-3 mRNA expression was inhibited dose dependently by anti-CD13 blocking antibody (inhibition of 64% at 1 μ g/ml and 90% at 5 μ g/ml), as was MMP-3 protein release (inhibition of 61% at 1 μ g/ml and 87% at 5 μ g/ml) ($P < 0.05$; Fig. 4A,B). Similarly, the blocking antibody dose dependently decreased 14-3-3 ϵ -induced MMP-13 mRNA expression (47% at 1 μ g/ml and 88% at 5 μ g/ml, $P < 0.05$; Fig. 4C) and MMP-13 release (29% at 1 μ g/ml and 32% at 5 μ g/ml, $P > 0.05$; Fig. 4D). The blocking antibody alone has no effect on mouse MMP-3 and MMP-13 gene expression (data not shown).

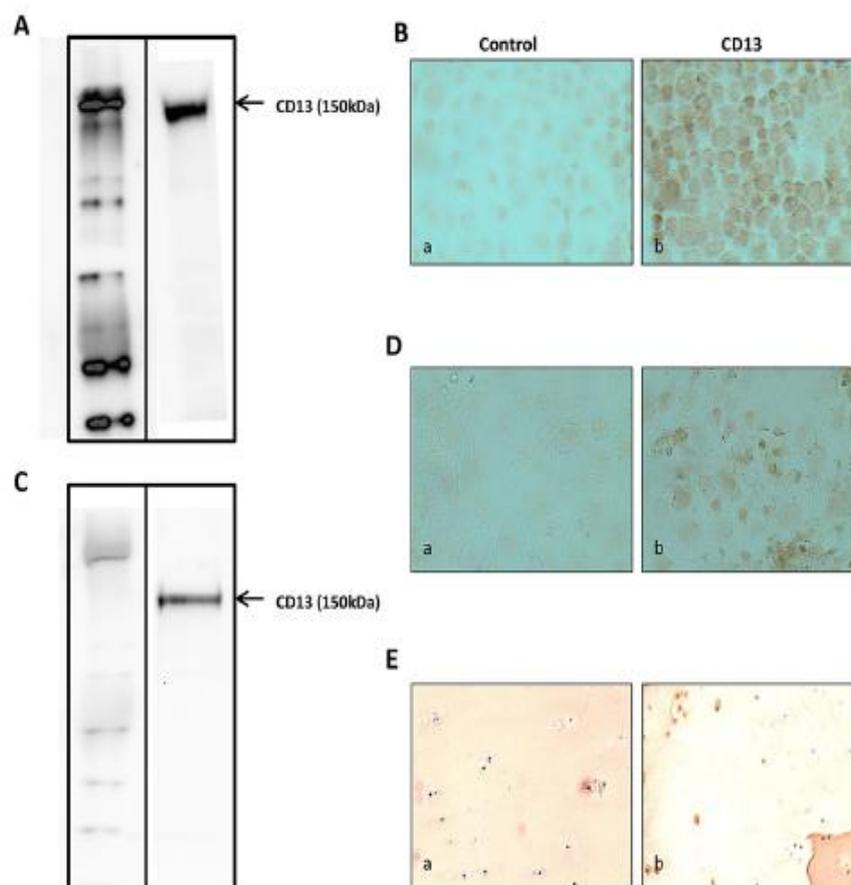


Fig. 1. Expression of CD13 on the surface of murine and human articular chondrocytes. (A,C) Western blot analysis of CD13 protein expression in mouse (A) and human (C) articular chondrocytes. (B,D) Immunocytochemical detection of CD13 expression in mouse (B) and human (D) chondrocytes with anti-CD13 antibody (AB108310) (a) or rabbit IgG (b) (original magnification $\times 60$). Immunohistochemistry analysis of CD13 expression on the surface of human cartilage (E) with anti-CD13 antibody (AB108310) (a) or rabbit IgG (b) (original magnification $\times 20$).

To confirm these results in human chondrocytes, cells were pretreated with a specific human anti-CD13 blocking antibody (SJ1D1, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), which is widely used to block only the receptor role of human CD13 and has no effect on its enzymatic activity. Cells were then stimulated with 14-3-3 ϵ for 24 h. 14-3-3 ϵ -induced MMP-3 mRNA expression and protein release were significantly decreased by 43% and 59%, respectively ($P < 0.05$; supplementary material Fig. S2). As observed in previous publications, MMP-13 expression in human chondrocytes was very low. Thus, the results obtained by qRT-PCR were not interpretable. Taken together, these results show that treatment with an antibody that blocks only the receptor role of CD13 greatly inhibits the 14-3-3 ϵ -mediated mRNA and protein expression of both MMP-3 and MMP-13 in murine and human chondrocytes, which suggests that CD13 has a receptor role in transmitting the 14-3-3 ϵ signal in chondrocytes and inducing a pro-catabolic phenotype.

14-3-3 ϵ interacts with CD13

To test whether 14-3-3 ϵ interacts directly with CD13, we performed surface plasmon resonance (SPR) experiments. Human recombinant CD13 was covalently immobilized on a CM5 chip. Human recombinant 14-3-3 ϵ , a specific blocking antibody against

human CD13 and an IgG1 isotype control were used as analytes. Results showed a direct interaction between recombinant CD13 and 14-3-3 ϵ [78 resonance units (RU)], with higher binding with blocking antibody (170 RU) and no binding with IgG1 isotype control (00 RU) (Fig. 5A). Kinetic tests with increasing concentrations of recombinant 14-3-3 ϵ showed that 14-3-3 ϵ bound with low affinity to CD13, with a dissociation constant (K_D) of 2.45×10^{-6} M (χ -square value 2.09, showing good fit) (Fig. 5B). These results suggest that CD13 interacts directly with extracellular 14-3-3 ϵ to transmit its signal in chondrocytes.

14-3-3 ϵ binds to the cell surface

We assessed the ability of 14-3-3 ϵ to bind to the surface of mouse chondrocytes by incubating these cells with biotin-labeled recombinant 14-3-3 ϵ . The cells were then incubated with fluorescently labeled streptavidin and analyzed by fluorescence microscopy. Biotin-14-3-3 ϵ bound to the chondrocyte surface (Fig. 6A). We performed a competition assay, in which cells were incubated with excess unlabeled 14-3-3 ϵ before the addition of biotin-14-3-3 ϵ . The unlabeled competitor strongly decreased biotin-14-3-3 ϵ binding to the chondrocyte surface (Fig. 6B), thereby demonstrating the specificity of binding. We investigated

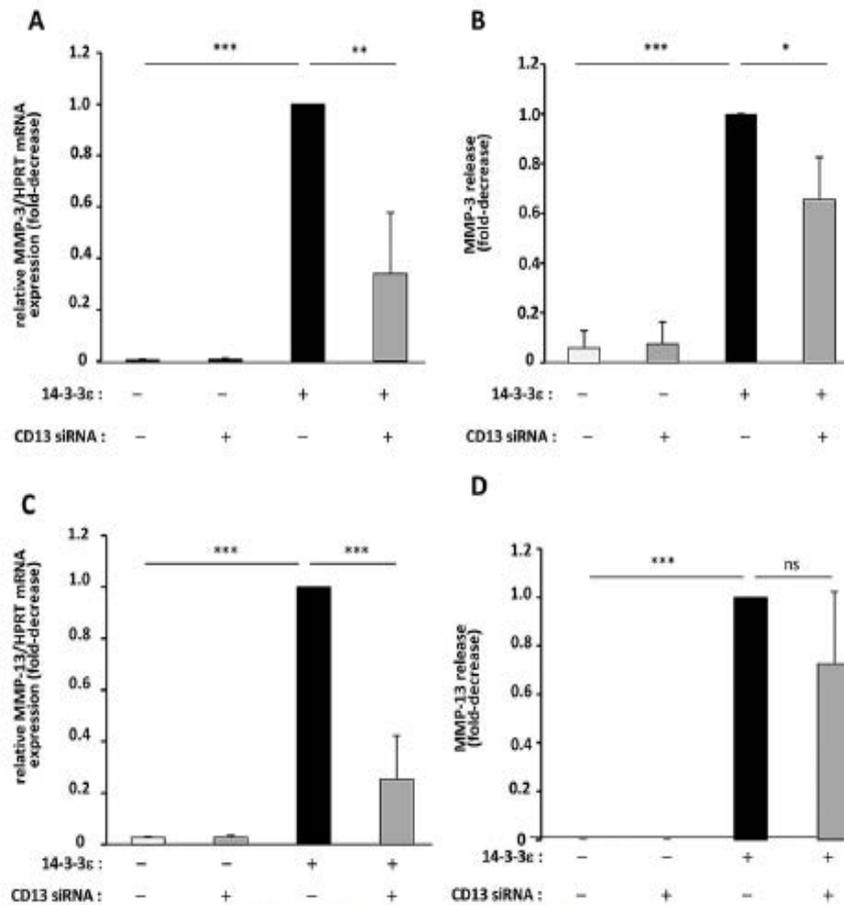


Fig. 2. Involvement of CD13 in 14-3-3 ϵ -induced MMP-3 and MMP-13 release by murine articular chondrocytes. Mouse articular chondrocytes were transfected for 48 h with small interfering (siRNA) targeting the CD13 gene or with negative control AllStars. The cells were then starved and stimulated with recombinant 14-3-3 ϵ (1 μ g/ml) for 24 h. (A,C) Total RNA was extracted and mRNA levels of MMP-3 (A) and MMP-13 (C) were determined by qRT-PCR. (B,D) Protein levels of MMP-3 (B) and MMP-13 (D) in cell supernatants were measured by ELISA. 14-3-3 ϵ -stimulated cells released 756.68 \pm 69 ng/ml and 347.3 \pm 48 pg/ml of MMP-3 and MMP-13, respectively. Bars show the means \pm s.d. fold decrease in expression compared to the negative control-transfected chondrocytes stimulated with 14-3-3 ϵ (set at 1) from three independent experiments. Blots in D are representative of three independent experiments. * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001; ns, not significant.

the involvement of CD13 in biotin-14-3-3 ϵ binding to cells, by subjecting the cells to prior treatment with anti-CD13 blocking antibody (AB108310, 5 μ g/ml). Biotin-14-3-3 ϵ binding was decreased by CD13 blocking (Fig. 6C). No cell binding signal was detected in control cells (Fig. 6D). These results therefore confirm that 14-3-3 ϵ -CD13 interactions probably occur on the surface of chondrocytes.

E⁵⁷⁹FNYVW⁵⁸⁴ is the potential CD13-binding site in 14-3-3 ϵ

To identify the putative motif(s) on CD13 that could bind to 14-3-3 ϵ , we examined the sequence and structure of CD13 (PDB ID 4FYQ) (Wong et al., 2012). We defined three criteria to identify potential binding site(s). First, we looked for phosphorylated residues, with a preference for a phosphorylated Tyr because previous work has shown that 14-3-3 ϵ recognizes phosphorylated Ser, Thr or Tyr residues with a marked preference for Tyr (Uhart and Bustos, 2013, 2014). Second, the phosphorylated motif(s) had to be located at a position on the structure of the CD13 protein where they would be accessible to phosphorylation by a Ser, Thr or Tyr

kinase, and third, they should belong to a segment able to adopt an extended conformation, because all ligands bound to 14-3-3 ϵ display an elongated binding mode (Yang et al., 2006; Bustos and Iglesias, 2006). Tyr582 was identified to have these criteria among several other Ser and Thr residues. This unique Tyr residue of the mature protein has been shown to be phosphorylated *in vivo* (Hombeck et al., 2012) and it is the only accessible phosphorylatable residue, as evidenced by the structure of CD13. Tyr582 is part of a long, accessible and elongated loop. In agreement, Y582 inserted in the sequence E₅₇₉FNYVW₅₈₄ is flanked by charged or polarized residues that are compatible with the preferred recognition sequence of 14-3-3 ϵ , RSXpSXP (mode 1), where pS is a phosphorylated Ser residue (Obenauer et al., 2003; Yaffe et al., 1997). Y582 was selected for further docking calculations. The EFNYVW was docked in the binding groove of 14-3-3 ϵ and positioned by analogy with the hexapeptide RQRpSAP complexed to 14-3-3 ϵ . Two orientations (denoted N-ter and C-ter) and two phosphorylation states (phosphorylated and non-phosphorylated) were tested and compared to the crystal complex.

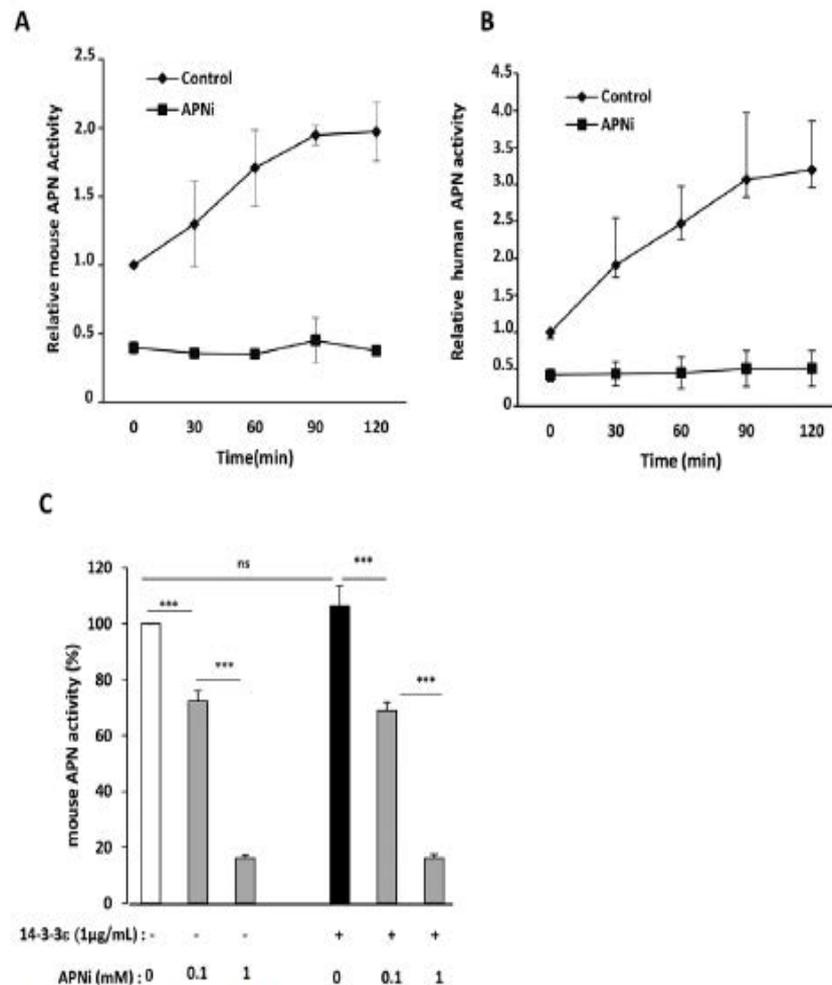


Fig. 3. Kinetics of enzymatic activity of APN and 14-3-3 ϵ effect in murine and human articular chondrocytes. Kinetics of enzymatic activity of APN in mouse (A) and human (B) articular chondrocytes. Primary cultures of articular chondrocytes were starved, then incubated with fluorescent substrate, L-alanine β -naphthylamide (50 μ M), for the indicated times (0 to 120 min) in the absence (control) or in the presence of a specific aminopeptidase inhibitor (APNi) (1 mM). Data are means \pm s.d. relative increase and decrease in fluorescence compared to control aminopeptidase N activity set to 1 (before adding the substrate and without APNi treatment) from three independent experiments. (C) 14-3-3 ϵ effect on aminopeptidase N activity. Primary cultures of mouse articular chondrocytes were starved, pretreated with APNi (0.1 and 1 mM), then stimulated with 14-3-3 ϵ (1 μ g/ml). After 24 h, cells were incubated with L-alanine β -naphthylamide (50 μ M) for 60 min and fluorescence was measured. Data are means \pm s.d. relative decrease in fluorescence versus control aminopeptidase N activity set to 100 (without stimulation with 14-3-3 ϵ and without APNi) from three independent experiments * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001; ns, not significant.

The docking of EFNpYVW with the best scoring energies was found to be oriented in a similar position to that of the solved RQRpSAP ligand, which served as a reference. This complex showed both the lowest total potential energy and the best interaction energy with the protein 14-3-3 ϵ (–897 and –6180 kcal/mol, respectively) (Fig. 7C). In addition, residues of 14-3-3 ϵ , involved in the binding of the crystal peptide, were identified to be involved in the binding of the CD13 hexapeptide fragment. Of note, the groove shows a hydrophobic patch whereby L219, L223 and L230 interact with the hydrophobic facet of the ligand peptide. On the other side of its groove, 14-3-3 ϵ shows a heavily charged region, composed of K50, K57, R61, R130 and Y131, that is particularly able to accommodate the negatively charged phosphorylated Tyr (Fig. 7A,B). Taken together, these results suggest that the 14-3-3 ϵ can accommodate the segment E⁵⁷⁹FNYVW⁵⁸⁴ of CD13. Nonetheless, larger conformational

changes for CD13 and probably for 14-3-3 ϵ should be investigated to reveal better recognition between the two proteins. Such molecular deciphering at this stage is too unreliable to be computed *in silico*. Nevertheless, Y582 inserted in the segment, E⁵⁷⁹FNYVW⁵⁸⁴, is a good phosphorylation candidate for 14-3-3 ϵ recognition and binding.

To confirm our *in silico* analysis and assess the involvement of E⁵⁷⁹FNYVW⁵⁸⁴ as the binding motif between CD13 and 14-3-3 ϵ , mouse chondrocytes were subjected to preincubation with EFNpYVW and were then stimulated with 14-3-3 ϵ in the presence or absence of EFNpYVW, to prevent binding to endogenous CD13. 14-3-3 ϵ -induced MMP-3 mRNA production was dose dependently inhibited by the peptide (48% inhibition at 0.5 μ g/ml and 62% at 5 μ g/ml P <0.05; Fig. 7D). Similarly, EFNpYVW dose dependently decreased 14-3-3 ϵ -induced MMP-13 mRNA synthesis (by 30% at 0.5 μ g/ml and 56% at 5 μ g/ml,

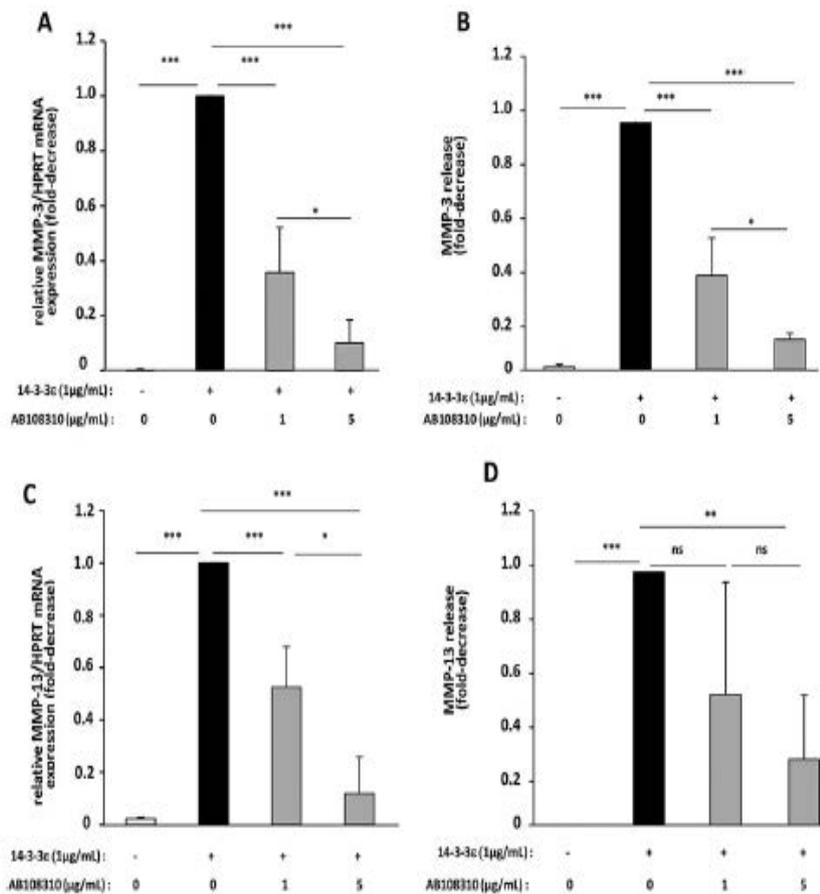


Fig. 4. Inhibition of the expression and release of MMP-3 and MMP-13 in murine chondrocytes by anti-CD13 blocking antibody. Primary cultures of articular chondrocytes from newborn mice were starved, then stimulated with 1 μg/ml recombinant 14-3-3ε in the presence of an anti-CD13 blocking antibody (AB108310) at 1 or 5 μg/ml for 24 h. (A,C) Total RNA was extracted and the mRNA levels of MMP-3 (A) and MMP-13 (C) were determined by qRT-PCR. (B,D) Protein levels of MMP-3 (B) and MMP-13 (D) in cell supernatants were measured by ELISA. 14-3-3ε-stimulated cells released 621.4±50 ng/ml and 286.7±17.1 pg/ml of MMP-3 and MMP-13, respectively. Bars show the means ± s.d. fold decrease in expression compared to control cells stimulated with 14-3-3ε (set at 1) from three independent experiments. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001; ns, not significant.

P<0.05; Fig. 7E). This suggests that EFNpYVW is the peptide sequence within CD13 required for the recognition of 14-3-3ε.

DISCUSSION

To induce the chondrocyte pro-catabolic phenotype, extracellular 14-3-3ε must bind to a receptor expressed on the surface of articular chondrocytes. The aim of this study was to investigate the involvement of CD13, the supposed receptor for 14-3-3ε, in bone-cartilage communication. Through its enzymatic activity, CD13 is able to modulate the activity of numerous peptides that participate in important biological processes such as components of extracellular matrix (Menrad et al., 1993; Saiki et al., 1993) and neuropeptides (Matsas et al., 1985; Jia et al., 2010). CD13 is also a receptor for human coronavirus (Kolb et al., 1998) and cytomegalovirus (Söderberg et al., 1993). Signal transduction has recently been proposed as also being one of the CD13 functions that are independent of its enzymatic activity (Mina-Osorio, 2008).

We found that 14-3-3ε-mediated MMP-3 and MMP-13 expression was suppressed in murine chondrocytes transfected with CD13 siRNA, which suggests the involvement of CD13 in the cellular effects of 14-3-3ε.

As we mentioned previously, CD13 performs its functions through its receptor role and/or its aminopeptidase N enzymatic activity. Several inhibitors of the aminopeptidase N activity were synthesized (Piedfer et al., 2011). We chose an APNi, 2'-3-dinitroflavone-8-acetic acid, to verify the specificity of this activity in articular chondrocytes. In our experiments, the doses of APNi were adjusted according to the literature and cytotoxicity values obtained after lactate dehydrogenase assay in supernatants of treated chondrocytes. First, we demonstrated the presence of aminopeptidase N activity in articular chondrocytes by using the fluorescent substrate L-alanine β-naphthylamide. This aminopeptidase N activity was strongly inhibited in chondrocytes in the presence of APNi but not altered after stimulation with 14-3-3ε. These results suggest that the active site of the enzyme might be distinct from the binding site of 14-3-3ε on CD13. To confirm that, we tested the effect of APNi on 14-3-3ε-mediated MMP-3 and MMP-13 expression. A previous study (Ghaffari et al., 2010) has shown that bestatin (a potent inhibitor of the aminopeptidase N activity) had no effect on the 14-3-3ε-mediated MMP-1 expression. However, our results showed that APNi, used to inhibit the enzyme activity, inhibited also MMP-3 and MMP-13 expression induced by 14-3-3ε (data not shown). This effect could result from a change in CD13

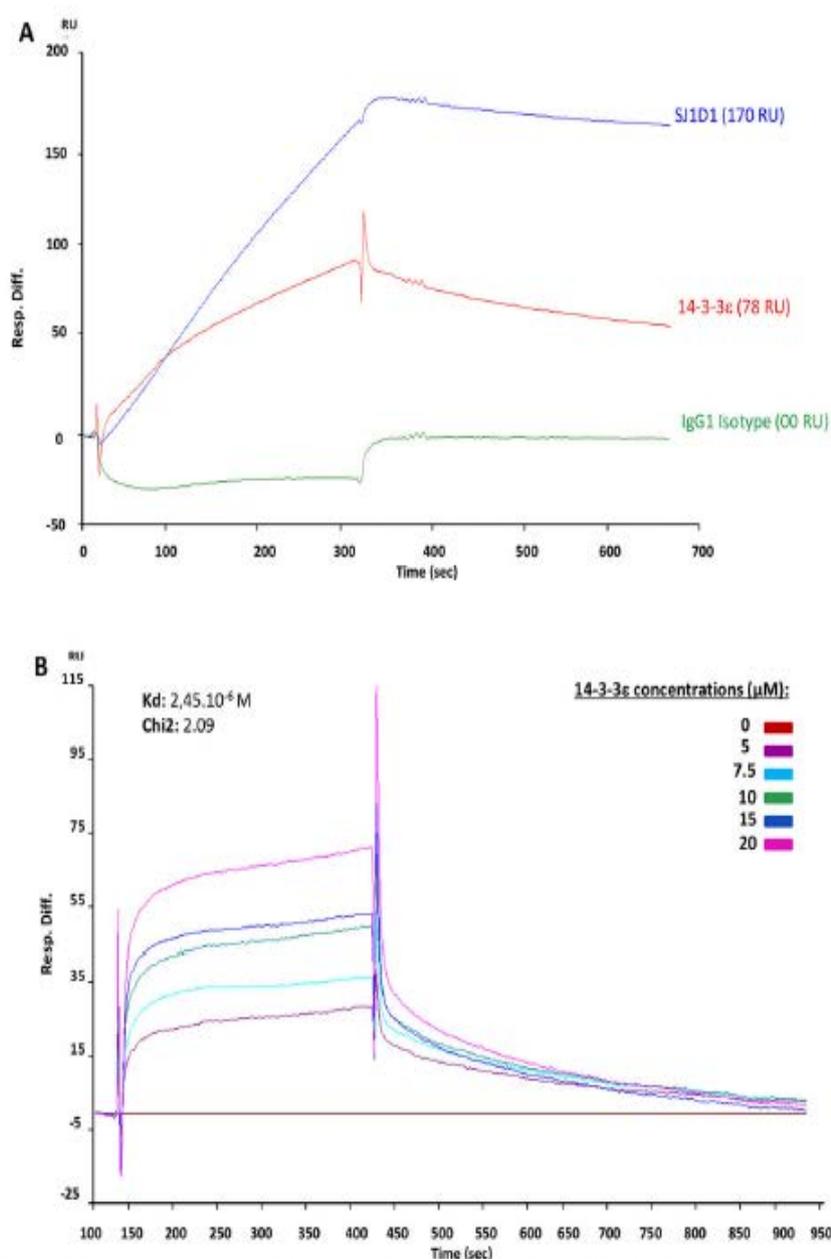


Fig. 5. Interaction between 14-3-3ε and CD13. (A) Representative SPR sensorgrams showing the binding of recombinant human 14-3-3ε (red, 10 μM), human anti-CD13 antibody SJ1D1 (blue, 1 μg/ml), and isotype IgG1 control (green, 1 μg/ml) on recombinant human CD13 immobilized on the sensor chip. The differential response was obtained by subtracting the signal in the blank channel from that in the experimental channel. Response is expressed in resonance units (RU) relative to time in seconds. (B) Kinetics of 14-3-3ε binding to CD13. Six concentrations of 14-3-3ε (5, 7.5, 10, 15 and 20 μM) were tested. The base line (in red) corresponds to HBS-EP alone. Software analysis gave a K_D value of $2.45 \cdot 10^{-6}$ M with χ -squared value 2.09.

conformation induced by the binding of the inhibitor to the active site. As a result, 14-3-3ε could be unable to bind to its binding domain (which would become concealed) to induce the expression of MMP-3 and MMP-13. This hypothesis is based on a study (Chen et al., 2012) showing that the binding of a peptide to the active site leads CD13 to convert from an open inactive state to a closed active state.

We found that the anti-CD13 blocking antibody AB108310 for murine chondrocytes and SJ1D1 for osteoarthritis human chondrocytes, inhibited the chondrocyte response to recombinant

14-3-3ε by decreasing the expression and release of MMP-3 and MMP-13. These antibodies were tested for specifically recognizing CD13 by western blot analysis. Preliminary experiments showed that AB108310 did not alter the aminopeptidase N enzymatic activity. Similarly, SJ1D1 was shown to be specific to human CD13 without affecting the aminopeptidase enzymatic activity (Piedfer et al., 2011). Thus, the catalytic site is not involved in the inhibitory effect of the anti-CD13 blocking antibody. The decrease in expression and release of MMP-3 and MMP-13, despite

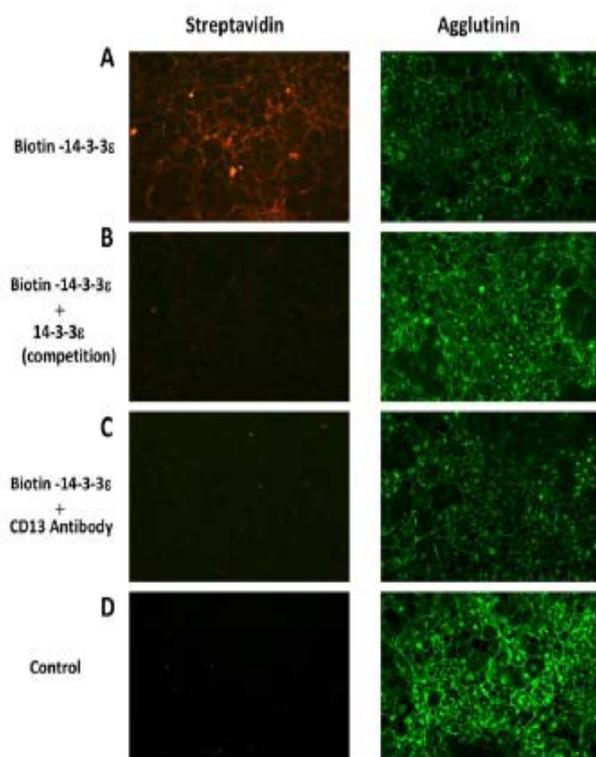


Fig. 6. 14-3-3 ϵ binding to the chondrocyte surface. Mouse chondrocytes were treated with biotin-14-3-3 ϵ for 15 min in the absence (A) or in presence of excess 14-3-3 ϵ (B) or anti-CD13 blocking antibody (AB108310; Abcam) (C). Cells not treated with biotin-14-3-3 ϵ were used as a negative control (D). Cells were analyzed by immunofluorescence microscopy, with Alexa-Fluor-568-conjugated streptavidin or Alexa-Fluor-488-conjugated agglutinin as the plasma membrane marker.

stimulation with 14-3-3 ϵ , was indeed due to deletion of the receptor role of CD13 but not its enzymatic activity. Growing evidence suggests that CD13 might have an array of functions that are independent of its enzymatic activity, including its role as a viral receptor (Wong et al., 2012). Similarly, human monocytic aggregation depends on CD13 signal transduction but is independent of its enzymatic activity (Delmas et al., 1994).

By SPR analysis, we found that 14-3-3 ϵ binds directly to CD13. This technique has been found to be effective in the analysis of direct interaction between proteins. The specific interaction between 14-3-3 ϵ and CD13 was evidenced by SPR with human recombinant CD13 covalently bound on a chip and injected human recombinant 14-3-3 ϵ . Injection of specific blocking antibody against CD13, and IgG isotype negative and positive controls, demonstrated that the interaction between 14-3-3 ϵ and CD13 was specific. This direct interaction was confirmed by kinetic tests, although with weaker binding affinity ($K_D=2.45 \times 10^{-6}$ M), which might be explained by the absence of some amino acid sequences from recombinant 14-3-3 ϵ and CD13 used in SPR analysis. Using labeled biotin-14-3-3 ϵ , we showed that 14-3-3 ϵ binds to the surface of chondrocytes in a manner that is dependent on CD13. Taken together, these results confirm the potential involvement of CD13 in 14-3-3 ϵ signal transmission in chondrocytes and strongly suggest that direct interaction between 14-3-3 ϵ and CD13 could occur in bone-cartilage communication.

However, the mode of binding of 14-3-3 ϵ to CD13 has not been determined. Therefore, we investigated the potential 14-3-3 ϵ -binding site in CD13. The hexapeptide E⁵⁷⁹FNpYVW⁵⁸⁴ shows an energy of interaction with 14-3-3 ϵ in the same range as that displayed by RQRpSAP ligand to 14-3-3 ϵ in the crystal complex. Indeed, among the variants tested, this ligand shows the highest affinity to 14-3-3 ϵ in terms of interaction energy computed, that is, when the Tyr582 was phosphorylated. In addition, this segment

belongs to an unfolded and accessible loop in CD13. Of note, this region of CD13 is likely more accessible in its open state, as described previously (Mina-Osorio et al., 2006) and modeled by us (data not shown). 14-3-3 proteins can distinguish between phosphorylated and non-phosphorylated partners (Bustos, 2012), and many cellular processes are regulated by the binding of 14-3-3 to phosphorylated sites in target proteins (Yasmin et al., 2010). Accordingly, our experimental data reveal an interaction between CD13 and 14-3-3 ϵ domains, previously predicted by our *in silico* studies that identify Y582 as a good candidate for phospho-modification. Such binding of 14-3-3 ϵ to phosphorylated CD13 strongly supports the idea that phosphorylation might regulate CD13 signaling. Moreover, pre-incubation of cells with the mimic peptide EFNpYVW, identified in CD13, which contains a phosphorylation site at Y582, prevents 14-3-3 ϵ binding to CD13 to induce its catabolic effect. This experiment validates candidate EFNpYVW as the CD13 peptide motif involved in 14-3-3 ϵ recognition and binding.

Concerning cell signaling pathways involved in 14-3-3 signal transmission, our results show that specific inhibitors of p38 MAPKs and JNK inhibit MMP-3 and MMP-13 expression in response to 14-3-3 ϵ in articular chondrocytes (supplementary material Fig. S3). However, no effect of ERK inhibitor on chondrocyte response to 14-3-3 ϵ was found (supplementary material Fig. S3). Some published reports have demonstrated a link between 14-3-3 proteins and MAPK signaling cascades. It has recently been suggested that the stimulation of cells with 14-3-3 η leads to the phosphorylation of ERK and JNK, but not p38 MAPKs, inducing mediators of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (Maksymowych et al., 2014). Lam and colleagues have also reported that 14-3-3 σ -induced fibroblast MMP-1 expression was mediated through p38 MAPKs and upregulated c-Jun and c-Fos expression (Lam et al., 2005). In

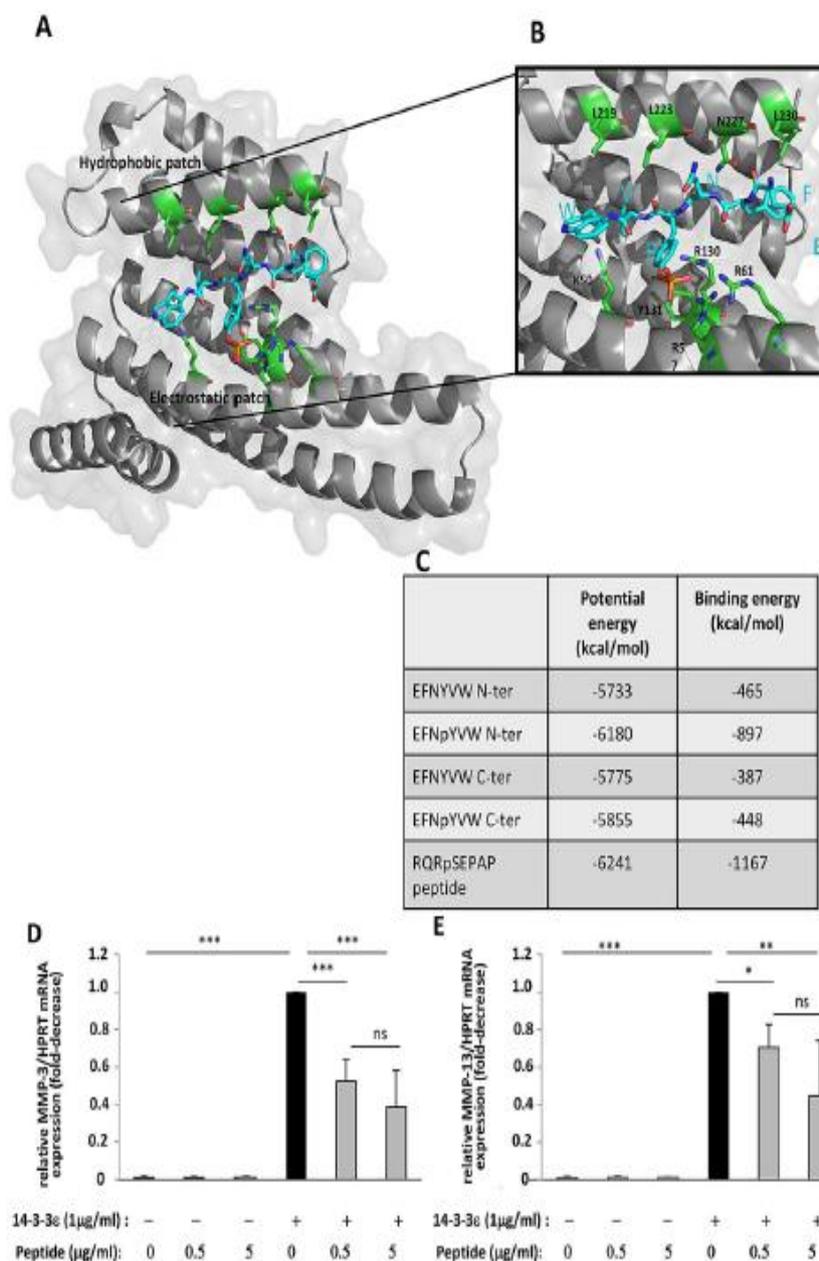


Fig. 7. EFNPYW is probably the amino acid sequence of CD13 recognized by 14-3-3 σ . (A) 14-3-3 σ is shown as a gray ribbon and EFNPYW as blue sticks with the phosphorylated Tyr 582 highlighted (in orange sticks). The residues of 14-3-3 σ involved in the binding are shown as green sticks. (B) Higher magnification of the ligand-binding channel with the amino acid residues involved in the binding of EFNPYW. Structural images were generated by use of PyMOL (www.pymol.org). (C) Data table of energy binding parameters for the reference RQRpSEPAP, EFNPYW and EFNPYW peptides, positioned as the reference (N-ter) or in the reverse orientation (C-ter). (D,E) Primary cultures of mouse articular chondrocytes were serum starved, and incubated with various concentrations (0, 0.5 and 5 μ g/ml) of EFNPYW peptide. They were then unstimulated or were stimulated with 1 μ g/ml recombinant 14-3-3 σ for 24 h. Total RNA was extracted and the levels of mRNA for MMP-3 (D) and MMP-13 (E) were determined by qRT-PCR. Bars show the mean \pm s.d. fold decrease in expression with respect to control cells stimulated with 14-3-3 σ (set to 1), for three independent experiments. * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001; ns, not significant.

addition, CD13 knockdown could block activation of p38 MAPKs in response to 14-3-3 σ stimulation in fibroblasts (Ghaffari et al., 2010). However, anti-CD13 blocking antibodies can inhibit ERK1/2, JNK and p38 phosphorylation (Santos et al., 2000), which suggests a link between CD13 and MAPK pathways. A role for CD13 in signal transduction, independent of its enzymatic activity, has been reported in monocytic cell adhesion (Delmas et al., 1994).

However, CD13 possesses a short intracellular domain (seven amino acids) without a signaling motif. Thus, CD13 needs to associate with other proteins to initiate a signaling cascade. Many proteins are found in complex with CD13 including galectin-3, Grb2, Sos, galectin-4 and reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (Luan and Xu, 2007). Moreover, Mina-Osorio and colleagues have shown that CD13 interacts with IgG receptors

(FcγRs) on the surface of monocytic cells (Mina-Osorio and Ortega, 2005), so CD13 transduction might be activated by other receptors.

We used human osteoarthritis joint samples to strengthen the concept that CD13 is involved in establishing the pro-catabolic phenotype induced by 14-3-3ε in chondrocytes. The results validated our findings in murine chondrocytes and confirmed that CD13 might play a role in osteoarthritis bone–cartilage communication by transmitting the 14-3-3ε signal in chondrocytes. We identify a direct interaction between CD13 and 14-3-3ε, which suggests that CD13 might be a cell surface receptor or co-receptor for 14-3-3ε. The 14-3-3ε and CD13 interaction could represent a new therapeutic target in osteoarthritis.

MATERIALS AND METHODS

Materials

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France), unless stated otherwise. Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Liberase and complete protease inhibitor mixture were from Roche Diagnostics (Meylan, France). The enhanced chemiluminescence western blot analysis kit was from Amersham Pharmacia Biotech (Orsay, France). The immunoblot polyvinylidene difluoride membranes for western blot analysis and kaleidoscope prestained standards were from Bio-Rad (Marnes-la-coquette, France). Recombinant human 14-3-3ε was from Enzo Life Sciences.

Primary culture and stimulation of human articular chondrocytes

Human cartilage samples were obtained from osteoarthritis patients undergoing total joint replacement surgery for osteoarthritis at Saint-Antoine Hospital (Paris, France). These materials are considered surgical waste and are used with informed consent and in accordance with French ethics laws (L.1211-2 to 1211-7, L.1235.2, and L.1245.2). Investigations conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. The osteoarthritis diagnosis was based on clinical and radiographic evaluations according to the American College of Rheumatology criteria (American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines, 2000).

Cartilage samples were obtained from the tibial plateau and femoral condyle of osteoarthritis patients, cut into small pieces (~1 mm³), and washed several times with phosphate-buffered saline (PBS). All enzymatic digestions were performed at 37°C, under agitation, in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 4.5 g/l glucose, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 4 mM glutamine (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Samples were incubated twice for 45 min each, in 25 ml Liberase (Roche Diagnostics) at 0.52 Wunsch units (UW)/ml to eliminate surrounding extracellular matrix, then incubated overnight with 25 ml Liberase at 0.13 UW/ml. The cell suspension was filtered through a 100-µm cell strainer and centrifuged for 6 min at 400 g. Chondrocytes were cultured for 8 to 10 days in 12-well plates (250,000 cells/well) in DMEM containing 4.5 mg/l glucose, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 4 mM glutamine, supplemented with 15% FBS and allowed to grow to confluence. Cells were then starved in serum-free medium containing 0.1% bovine serum albumin (BSA) for 24 h. For blocking antibody experiments, chondrocytes were treated for 15 min with SJ1D1 (1 µg/ml), a human anti-CD13 antibody (Santa Cruz Biotechnology), before stimulation with recombinant 14-3-3ε (1 µg/ml).

Primary culture and stimulation of murine articular chondrocytes

All experiments followed protocols approved by the French or European ethics committee. Mouse articular chondrocytes were isolated by enzymatic digestion of articular cartilage from C57BL/6J mice (5–6 days old), as described previously (Salvat et al., 2005). After 6 to 7 days of culture, chondrocytes were placed in DMEM (1 g/l glucose) containing 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 4 mM glutamine and supplemented with 0.1% BSA for 24 h. For blocking antibody experiments, chondrocytes were treated for 15 min with increasing concentrations (1 and 5 µg/ml) of a

mouse anti-CD13 antibody (AB108310; Abcam), then stimulated with recombinant 14-3-3ε (1 µg/ml) for 24 h. For peptide experiments, murine chondrocytes were treated for 15 min with two concentrations (0.5 and 5 µg/ml) of peptide solution (EFNpYVW, 96.04% pure, Proteogenix), then stimulated with recombinant 14-3-3ε (1 µg/ml) for 24 h. For the inhibition of MAPK pathways, cells were incubated for 15 min with two concentrations (5 and 25 µM) of MAPK-specific inhibitors (SB203580 for p38 MAPKs, PD98059 for ERK1/2 and JNK inhibitor II for JNK; Merck Millipore) and then stimulated with recombinant 14-3-3ε (1 µg/ml) for 24 h.

Immunohistochemical analysis

Human cartilage samples were fixed in 4% paraformaldehyde for 72 h before paraffin embedding. Transverse sections (4 µm thick) were cut parallel to the rib axis by use of a Polycut E microtome (Leica, Wetzlar, Germany), then mounted on slides. For labeling, slides were deparaffinized and unmasked by use of citrate buffer (pH 6) at 95°C, then blocked in a solution of TBS-TC [0.745 g/l Tris-HCl, 9 g/l NaCl, 0.02% Tween 20, 0.6 g/l casein (Sigma), pH 7.4]. Human CD13 was detected with monoclonal rabbit antibody (AB108310; Abcam). Rabbit IgG (DAKO) was a negative control. Secondary antibody and peroxidase were added by use of the horseradish-peroxidase-conjugated LSAB+ system (DAKO). Visualization involved the DAB kit (VECTOR). Image-Pro express was used for image capture.

Immunocytochemical analysis

Mouse and human chondrocytes were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized (0.1% Triton X-100), then blocked in a solution of TBS-TC. Cells were exposed to anti-CD13 antibody (AB108310; Abcam) or an isotype control antibody (rabbit IgG; DAKO). Secondary antibody and peroxidase were added by use of the horseradish peroxidase-conjugated LSAB+ system (DAKO). Visualization involved the DAB kit (VECTOR). Image-Pro express was used for image capture.

siRNA knockdown of CD13

Mouse CD13 knockdown was tested with two different siRNA oligonucleotide sequences: si-CD13-1, 5'-ATGGATCTTACTGAACATTAA-3', and si-CD13-2, 5'-CCGGGTGATCCTGAGACCCTA-3' (Qiagen). AllStars was a negative control. Mouse chondrocytes were cultured as described above. Confluent cells were removed with a mixture of collagenase P and pronase. Cells were centrifuged (1600 rpm for 6 min) and the pellet was resuspended in PBS (Sigma-Aldrich).

Murine articular chondrocytes were transfected by use of an electroporation device (Amaxa) according to the manufacturer's instructions (Qiagen). Briefly, cells (4 × 10⁶) were resuspended in Amaxa electroporation transfection solution with siRNA (1 µM), then placed in cell culture medium DMEM (1 g/l glucose) supplemented with penicillin, streptomycin and L-glutamine containing 10% FBS. At 48 h post-transfection, cells were starved in serum-free medium containing 0.1% BSA overnight, then stimulated with recombinant 14-3-3ε (1 µg/ml) for 24 h.

RNA extraction and qRT-PCR

Total RNA was extracted from chondrocytes by use of the RNeasy Mini kit (Qiagen). Total RNA (0.5 µg) was reverse transcribed with use of the Omniscript RT kit (Qiagen). Relative quantification of genes involved the Light Cycler 480 Real-Time PCR Detection System (Roche Diagnostics) and GoTaq qPCR Master Mix (Promega) as described previously (Blaise et al., 2009).

For amplification of mouse cDNA, oligonucleotide primer sequences were for MMP-3, sense 5'-TGAAAATGAAGGGTCTCCGG-3' and anti-sense 5'-GCAGAAGCTCCATACCAGCA-3'; MMP-13, sense 5'-GATG-GACTGCTGACATCAT-3' and anti-sense 5'-TGTAGCCTTTGGAAC-TGCTT-3'; CD13, sense 5'-AATCTCATCCAGGGAGTGACC-3' and anti-sense 5'-GTGGCTGAGTTATCCGCTTT-5'; and hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), sense 5'-AGGACCTCTCGAA-GTGT-3' and anti-sense 5'-ATTCAAATCCCTGAAGTACTCAT-3'. The relative mRNA expression of MMP-3, MMP-13 and CD13 were normalized to that of HPRT, as an internal gene reference.

For amplification of human cDNA, oligonucleotide primer sequences were for MMP-3, sense 5'-ATGAAAATGAAGGCTCTCCG-3' and anti-sense 5'-GCAGAAGTCCATACCAGCA-3', and human 18S, sense 5'-GCAATTATCCCATGAACG-3' and anti-sense 5'-GGGACTTAA-TCAACGCAAGC-3'. The relative mRNA expression of MMP-3 was normalized to that of 18S, as an internal gene reference.

Protein extraction and western blotting

Chondrocytes were lysed in RIPA buffer [50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and 1× protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics)]. Proteins were separated on Criterion XT 4–12% Bis-Tris gels (Bio-Rad, Munich, Germany) and transferred onto nitrocellulose membranes, which were incubated with antibodies for human or mouse CD13 (Abcam) and β -actin (Sigma Aldrich) by use of the Immun-Star Western C chemiluminescence kit (Bio-Rad). For densitometry, we used Image Gauge software version 3.0 (Fujifilm).

ELISA

Total mouse and human MMP-3 secretion was assayed in cell-free supernatants using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems) according to manufacturer's instructions. MMP-13 was also quantified in culture supernatants from murine chondrocytes using an ELISA kit as recommended by the manufacturer (Usen Life Science Inc.). MMP-3 and MMP-13 concentrations were analyzed in duplicate at serial dilutions and were read against a standard curve.

Assay of aminopeptidase N activity

The activity of aminopeptidase N on cultured human and mouse chondrocytes was determined according to previously published methods (Sihn et al., 2006). Briefly, cells were pretreated or not with a specific aminopeptidase inhibitor (APNi; 2'-3-dinitroflavone-8-acetic-acid, 1 mM) for 15 min, then incubated for various times (15, 30, 60, 90 and 120 min, 37°C) with 50 μ M APN substrate: L-alanine β -naphthylamide (Sigma-Aldrich) in dimethyl sulfoxide (DMSO). The reaction was stopped at different times and fluorescence (emission wavelength, 330 nm; excitation wavelength, 460 nm) was measured in the supernatant by spectrofluorescence (Fluostar Galaxy). All assays were performed in duplicate.

To test the effect of 14-3-3e on aminopeptidase N activity, cells were incubated or not with APNi for 15 min, then stimulated with recombinant 14-3-3e (1 μ g/ml). At 24 h, cells were incubated with the substrate at 37°C for 1 h. The supernatant from each well was collected and enzyme activity was determined as described above.

SPR analysis

The interaction of 14-3-3e and CD13 was measured using SPR on a Biacore 3000 instrument (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) in the molecular interactions facility (IBPS, UPMC, Paris 6). Human recombinant CD13 (Sino Biological) was immobilized to a CM5 sensor chip (GE Healthcare) at 11,949 resonance units (RU) by amine coupling in 10 mM sodium acetate (pH 5.0) according to the manufacturer's instructions. 14-3-3e (10 μ M), a human CD13 antibody (SJ1D1, 1 μ g/ml) and an isotype antibody (IgG1, 1 μ g/ml) were diluted in HBS-EP running buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% P20 surfactant) (GE Healthcare), then injected over the chip at a flow rate of 5 μ l/min for 5 min and dissociated for 8 min. The surface of the sensor chip was regenerated by injecting 10 mM glycine-HCl, 10 mM, pH 2.0 at a flow rate of 30 μ l/min for 30 s. For kinetic study, concentrations (0, 5, 7.5, 10, 15, 20 μ M) of 14-3-3e were injected. Identical injections were performed in parallel over a blank surface, at 0 RU. Data were analyzed and dissociation rate constant (K_D) was determined by use of BIAevaluation software version 4.1. Binding and kinetics tests were first performed on empty surfaces. Data resulted from subtraction of empty-surface RU from active-surface RU.

14-3-3e cell-binding analysis

Recombinant 14-3-3e (200 μ g) in PBS was labeled with a 50-fold molar excess of Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific) reagent, as recommended by the manufacturer. Primary murine chondrocytes

(35×10^3) were cultured on coverslips in a 24-well plate. After six to seven days of culture, cells were placed in culture medium supplemented with 0.1% BSA for 3 h, treated with biotin-14-3-3e for 15 min at 4°C and washed extensively with PBS, as previously described (Ghaffari, et al., 2010). For the competition assay and CD13 blocking, cells were subjected to preincubation with 200 μ g/ml of 14-3-3e for 30 min or with anti-CD13 rabbit antibody (AB108310; Abcam) for 15 min at 4°C before the addition of biotin-14-3-3e. Finally, cells were incubated with streptavidin-Alexa-Fluor-568 (Invitrogen) and then analyzed by immunofluorescence microscopy.

Docking of the EFNpYVW sequence of CD13 in the ligand-binding channel of 14-3-3e

To obtain the phospho-modified sites of the human CD13, its fasta sequence P15144 was browsed in PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org>) (Hornbeck et al., 2012). The residues defined as phospho-modified were all mapped on the mature protein (to discard Y6 from the signal peptide), downloaded from the RCSB database (<http://www.rcsb.org>) under the PDB ID code 4FYQ and visualized with PyMOL Molecular Graphics System v1.5 (Schrödinger). Y582 was the unique residue inserted into an accessible and extended 20-residue-long loop. Y582 belongs to the hexamer sequence E⁵⁷⁹FNYVW⁵⁸⁴ selected for docking, to assess its capacity to accommodate into the groove of one monomer of 14-3-3e. Chain A of the solved structure of 14-3-3e in complex with the phosphorylated RQRpSAP ligand (PDB ID 2BR9) served as the starting coordinate. The missing atoms of K50 side-chain (lacking electronic density) were completed and the ligand was mutated into EFNpYVW by use of the Build module in DiscoveryStudio, Accelrys. Two orientation modes were tested: the N-ter similar to the crystallized ligand N-ter, and the reverse C-ter. In addition, the ligands phosphorylated and not phosphorylated at Y582 were built. All these variants plus the crystal structure of chain A with RQRpSAP, as a reference, were minimized for 5000 iterations by use of the CHARMM force field (Brooks et al., 2009) and the 'smart algorithm' of the energy minimization module in DiscoveryStudio, Accelrys. Then, the energy interaction between the ligand and protein were evaluated in the optimized complexes by use of the interaction energy module in DiscoveryStudio. The analysis of the complexes and images involved use of PyMOL Molecular Graphics System v1.5.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm s.d. relative induction compared with the control (set to 1). Data are reported as mean \pm s.d. unless stated otherwise. Statistical analysis was performed with the paired Student's *t*-test to compare mean values between two groups. One-way analysis of variance (ANOVA) with Turkey Kramer multiple comparisons test was used to compare mean values using GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Acknowledgements

We would like to thank Tahar Boucoba (UPMC, Plateforme d'Interactions Moléculaires, Institut de Biologie Paris-Seine, IBPS, 7 Quai Saint-Bernard, 75252 Paris cedex 05, France) for the Biacore experiments.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

F.B. had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Conception and study design were undertaken by F.B. and C.J. Acquisition of data were undertaken by M.N., G.D., S.P., L.S. and G.A.-L. Analysis and interpretation of data were performed by C.J., F.B., M.N., L.S. and G.A.-L. Manuscript preparation was performed by F.B., C.J., M.N., L.S. and G.A.-L. Statistical analysis was performed by C.J. and M.N.

Funding

This work was supported by the Société Française de Rhumatologie and by Arthritis Fondation Courlin. Deposited in PMC for immediate release.

Supplementary material

Supplementary material available online at
<http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.169573/-DC1>

References

- Aitken, A. (1995). 14-3-3 proteins on the MAP. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 95–97.
- Aitken, A. (2011). Post-translational modification of 14-3-3 isoforms and regulation of cellular function. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 673–680.
- American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines (2000). Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update. *Arthritis Rheum.* **43**, 1905–1915.
- Ardaghi, N., Kilani, R. T., Hosseini-Tabatabaei, A., Odemuyiwa, S. O., Hackett, T.-L., Knight, D. A., Ghahary, A. and Moqbel, R. (2012). Extracellular 14-3-3 from human lung epithelial cells enhances MMP-1 expression. *Mol. Cell Biochem.* **360**, 261–270.
- Bijlsma, J. W. J., Berenbaum, F. and Lafebvre, F. P. J. G. (2011). Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet* **377**, 2115–2126.
- Blaise, R., Mahjoub, M., Salvat, C., Barbe, U., Brou, C., Corvol, M.-T., Savouret, J.-F., Ramnou, F., Berenbaum, F. and Bausero, P. (2009). Involvement of the Notch pathway in the regulation of matrix metalloproteinase 13 and the dedifferentiation of articular chondrocytes in murine cartilage. *Arthritis Rheum.* **60**, 428–439.
- Boston, P. F., Jackson, P. and Thompson, R. J. (1982). Human 14-3-3 protein: radioimmunoassay, tissue distribution, and cerebrospinal fluid levels in patients with neurological disorders. *J. Neurochem.* **38**, 1475–1482.
- Brooks, B. R., Brooks, C. L., III, Mackerell, A. D., Jr, Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S. et al. (2009). CHARMM: the biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.* **30**, 1545–1614.
- Bustos, D. M. (2012). The role of protein disorder in the 14-3-3 interaction network. *Mol. Biosyst.* **8**, 178–184.
- Bustos, D. M. and Iglesias, A. A. (2006). Intrinsic disorder is a key characteristic in partners that bind 14-3-3 proteins. *Proteins* **63**, 35–42.
- Chen, L., Lin, Y.-L., Peng, G. and Li, F. (2012). Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 17966–17971.
- Clark, J. M. and Huber, J. D. (1990). The structure of the human subchondral plate. *J. Bone Joint Surg. Br.* **72**, 866–873.
- Delmas, B., Gelfi, J., Kut, E., Sjöström, H., Noren, O. and Laude, H. (1994). Determinants essential for the transmissible gastroenteritis virus-receptor interaction reside within a domain of aminopeptidase-N that is distinct from the enzymatic site. *J. Virol.* **68**, 5216–5224.
- Felson, D. T. and Neogi, T. (2004). Osteoarthritis: is it a disease of cartilage or of bone? *Arthritis Rheum.* **50**, 341–344.
- Findlay, D. M. and Aitkin, G. J. (2014). Osteoblast-chondrocyte interactions in osteoarthritis. *Curr. Osteoporos. Rep.* **12**, 127–134.
- Gabrilovac, J., Breljak, D., Čupić, B. and Ambrović-Ristov, A. (2005). Regulation of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; APN; CD13) by interferon-gamma on the HL-60 cell line. *Life Sci.* **76**, 2681–2697.
- Ghaffari, A. Li, Y., Kilani, R. T. and Ghahary, A. (2010). 14-3-3 sigma associates with cell surface aminopeptidase N in the regulation of matrix metalloproteinase-1. *J. Cell Sci.* **123**, 2996–3005.
- Ghahary, A., Karimi-Busheri, F., Marcoux, Y., Li, Y., Tredget, E. E., Taghi Kilani, R., Li, U., Zheng, J., Kazami, A., Keller, B. O. et al. (2004). Keratinocyte-releasable stathin functions as a potent collagenase-stimulating factor in fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 1188–1197.
- Guevremont, M., Martel-Pelletier, J., Massicotte, F., Tardif, G., Pelletier, J.-P., Ranger, P., Lajeunesse, D. and Rebol, P. (2003). Human adult chondrocytes express hepatocyte growth factor (HGF) isoforms but not HGF: potential implication of osteoblasts on the presence of HGF in cartilage. *J. Bone Miner. Res.* **18**, 1073–1081.
- Hombeck, P. V., Kornhauser, J. M., Tkachev, S., Zhang, B., Skrzypek, E., Murray, B., Latham, V. and Sullivan, M. (2012). PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic Acids Res.* **40**, D281–D270.
- Imhof, H., Sulzbacher, I., Grampp, S., Czerny, C., Youssefzadeh, S. and Kalnberger, F. (2000). Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Invest. Radiol.* **35**, 581–588.
- Jia, M.-R., Wei, T. and Xu, W.-F. (2010). The analgesic activity of bestatin as a potent APN inhibitor. *Front. Neurosci.* **4**, 50.
- Kilani, R. T., Maksymowych, W. P., Aitken, A., Boire, G., Sy-Pierre, Y., Li, Y. and Ghahary, A. (2007). Detection of high levels of 2 specific isoforms of 14-3-3 proteins in synovial fluid from patients with joint inflammation. *J. Rheumatol.* **34**, 1650–1657.
- Kim, J.-H., Jeon, J., Shin, M., Won, Y., Lee, M., Kwak, J.-S., Lee, G., Rhee, J., Ryu, J.-H., Chun, C.-H. et al. (2014). Regulation of the catabolic cascade in osteoarthritis by the Zinc-ZIP8-MTF1 axis. *Cell* **156**, 730–743.
- Kolb, A. F., Hegyi, A., Maile, J., Heister, A., Hagemann, M. and Siddell, S. G. (1998). Molecular analysis of the coronavirus-receptor function of aminopeptidase N. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**, 61–67.
- Lam, E., Kilani, R. T., Li, Y., Tredget, E. E. and Ghahary, A. (2005). Stathin-induced matrix metalloproteinase-1 in fibroblast is mediated by c-fos and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 230–238.
- Luan, Y. and Xu, W. (2007). The structure and main functions of aminopeptidase N. *Curr. Med. Chem.* **14**, 639–647.
- Maksymowych, W. P., van der Heijde, D., Allaart, C. F., Landowé, R., Boire, G., Tak, P. P., Gui, Y., Ghahary, A., Kilani, R. and Marotta, A. (2014). 14-3-3eta is a novel mediator associated with the pathogenesis of rheumatoid arthritis and joint damage. *Arthritis Res. Ther.* **16**, R99.
- Martel-Pelletier, J. and Pelletier, J. P. (2010). Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? *Eklem Hastalik Cerrahisi* **21**, 2–14.
- Matsas, R., Stephenson, S. L., Hryszko, J., Kenny, A. J. and Turner, A. J. (1985). The metabolism of neuropeptides. Phase separation of synaptic membrane preparations with Triton X-114 reveals the presence of aminopeptidase N. *Biochem. J.* **231**, 445–449.
- Menrad, A., Speicher, D., Wacker, J. and Herlyn, M. (1993). Biochemical and functional characterization of aminopeptidase N expressed by human melanoma cells. *Cancer Res.* **53**, 1450–1455.
- Mina-Osorio, P. (2008). The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends Mol. Med.* **14**, 361–371.
- Mina-Osorio, P. and Ortega, E. (2005). Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγRIIb in human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 1008–1017.
- Mina-Osorio, P., Shapiro, L. H. and Ortega, E. (2006). CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 719–730.
- Moore, B. W., Perez, V. J. and Gehring, M. (1968). Assay and regional distribution of a soluble protein characteristic of the nervous system. *J. Neurochem.* **15**, 265–272.
- Morgan, R., Endres, J., Behbahani-Nejad, N., Phillips, K., Ruth, J. H., Friday, S. C., Edhayan, G., Lanigan, T., Urquhart, A. and Chung, K. C. (2015). Expression and function of Aminopeptidase N/CD13 produced by fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis: role of CD13 in chemotaxis of cytokine-activated T cells independent of enzymatic activity. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 74–85.
- Muslin, A. J., Turner, J. W., Allen, P. M. and Shaw, A. S. (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**, 889–897.
- Obenaus, J. C., Cantley, L. C. and Yaffe, M. B. (2003). ScanSite 2.0: proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3635–3641.
- Pallucca, R., Visconti, S., Camoni, L., Cesareni, G., Melino, S., Panni, S., Torroni, P. and Aducci, P. (2014). Specificity of c and non-c isoforms of amidolysis 14-3-3 proteins towards the H⁺-ATPase and other targets. *PLoS ONE* **9**, e90764.
- Pan, J., Zhou, X., Li, W., Novotny, J. E., Doty, S. B. and Wang, L. (2009). In situ measurement of transport between subchondral bone and articular cartilage. *J. Orthop. Res.* **27**, 1347–1352.
- Piedfer, M., Dauzonne, D., Tang, R., N'Guyen, J., Billard, C. and Bauvois, B. (2011). Aminopeptidase-N/CD13 is a potential proapoptotic target in human myeloid tumor cells. *FASEB J.* **25**, 2831–2842.
- Priam, S., Bougault, C., Houard, X., Gosset, M., Salvat, C., Berenbaum, F. and Jacques, C. (2013). Identification of soluble 14-3-3ε as a novel subchondral bone mediator involved in cartilage degradation in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **65**, 1831–1842.
- Salki, I., Yoneda, J., Azuma, I., Fujii, H., Abe, F., Nakajima, M. and Tsuruo, T. (1993). Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *Int. J. Cancer* **54**, 137–143.
- Salvat, C., Pigenet, A., Humbert, L., Berenbaum, F. and Thirion, S. (2005). Immature murine articular chondrocytes in primary culture: a new tool for investigating cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **13**, 243–249.
- Santos, A. N., Langner, J., Herrmann, M. and Riemann, D. (2000). Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cell. Immunol.* **201**, 22–30.
- Sharma, A. R., Jagga, S., Lee, S.-S. <http://dx.doi.org/10.1006/cimm.2000.>
- Shimizu, T., Tani, K., Hase, K., Ogawa, H., Huang, L., Shinomiya, F. and Sone, S. (2002). CD13/aminopeptidase N-induced lymphocyte involvement in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **46**, 2330–2338.
- Sihn, G., Savary, K., Michaud, A., Fournie-Zalusk, M.-C., Roques, B. P., Corvol, P. and Gasc, J.-M. (2006). Aminopeptidase N during the ontogeny of the chick. *Differentiation* **74**, 119–128.
- Söderberg, C., Glugni, T. D., Zaia, J. A., Larsson, S., Wahlberg, J. M. and Möller, E. (1993). CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* **67**, 6576–6585.

- Uhart, M. and Bustos, D. M. (2013). Human 14-3-3 paralogs differences uncovered by cross-talk of phosphorylation and lysine acetylation. *PLoS ONE* 8, e55703.
- Uhart, M. and Bustos, D. M. (2014). Protein intrinsic disorder and network connectivity. The case of 14-3-3 proteins. *Front. Genet.* 5, 10.
- Wong, A. H. M., Zhou, D. and Rini, J. M. (2012). The X-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing. *J. Biol. Chem.* 287, 36804-36813.
- Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gambill, S. J., Smerdon, S. J. and Cantley, L. C. (1997). The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91, 961-971.
- Yang, X., Lee, W. H., Sobott, F., Papagrigoriou, E., Robinson, C. V., Grossmann, J. G., Sundström, M., Doyle, D. A. and Elkins, J. M. (2006). Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 17237-17242.
- Yasmin, L., Veessenmeyer, J. L., Diaz, M. H., Francis, M. S., Ottmann, C., Palmer, R. H., Hauser, A. R. and Hallberg, B. (2010). Electrostatic interactions play a minor role in the binding of ExoS to 14-3-3 proteins. *Biochem. J.* 427, 217-224.
- Zhang, L., Gardiner, B. S., Smith, D. W., Pivonka, P. and Grodzinsky, A. J. (2010). On the role of diffusible binding partners in modulating the transport and concentration of proteins in tissues. *J. Theor. Biol.* 263, 20-29.
- Zhang, K., Chen, W., Zhang, Y., Ge, Y., Ju, S., Yang, P., Tan, Y., Ge, Z., Cao, Z., Zhao, Y. et al. (2013). An anti-human CD13 monoclonal antibody that suppresses the suppressive function of Treg cells. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* 32, 16-20.



Special Issue on 3D Cell Biology
Call for papers
Submission deadline: January 16th, 2016
Journal of Cell Science

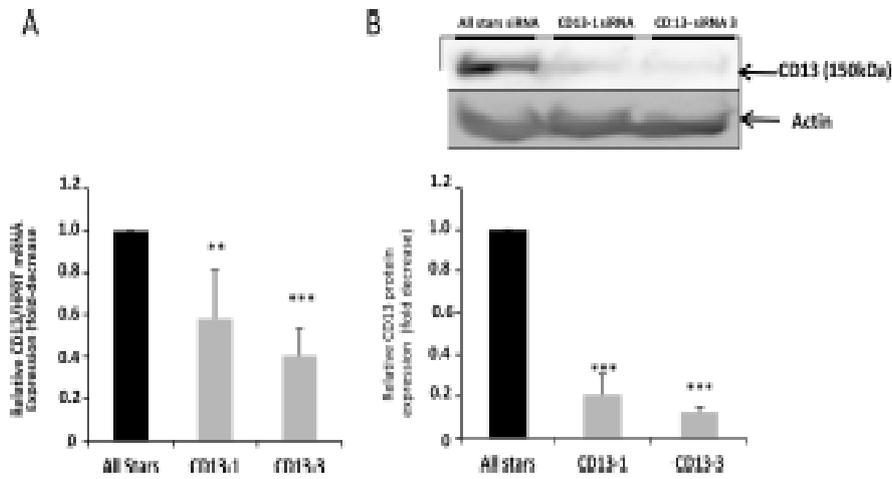


Figure S1 : Efficiency of CD13/APN siRNA. A. mRNA expression of CD13/APN in murine articular chondrocytes transfected with 2 different set of small interfering RNA (siRNA) named CD13-1 and CD13-2, targeting the CD13/APN gene, or with negative control siRNA (All stars). mRNA expression was analyzed using real-time RT-PCR to confirm the knock-down of CD13/APN expression. B. Protein expression of CD13/APN in murine articular chondrocytes transfected with small interfering RNA (siRNA) targeting the CD13 gene, or with negative control siRNA (All stars). Protein expression was analyzed using immunoblot to confirm the knock-down of CD13/APN expression. Blots are representative of three independent experiments. Data are mean \pm SD relative decrease in CD13/APN expression from three independent experiments. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

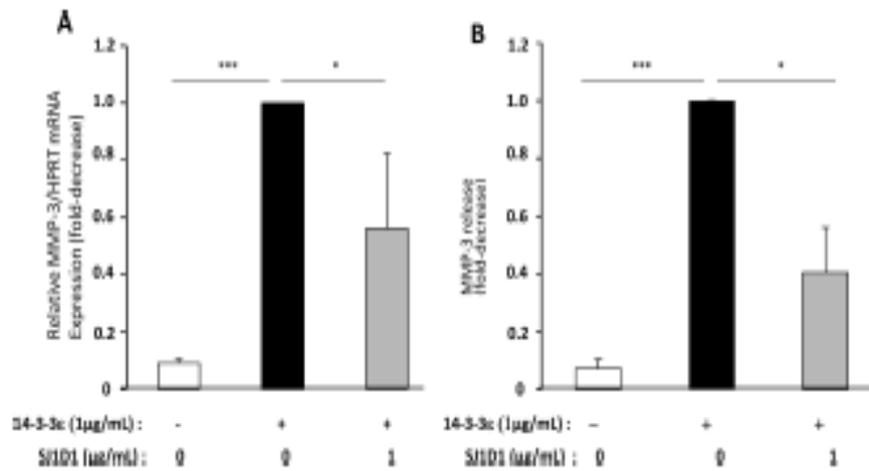


Figure S2: Inhibition of the expression and release of MMP-3 in human chondrocytes by CD13/APN blocking antibody. Primary cultures of human chondrocytes from patients with OA were starved, then stimulated with 1 μg/ml recombinant 14-3-3ε in the presence of a CD13 blocking antibody (SJD1) at 1 μg/ml for 24 h. MMP-3 expression was analyzed by RT-PCR (A) and ELISA (B). 14-3-3ε stimulated cells released 3580.9 ± 1456.2 ng/ml of MMP-3. Data are mean±SD relative decrease in MMP-3 release compared with stimulated cells (set to 1) from three independent experiments. *p<0.05; ***p<0.001.

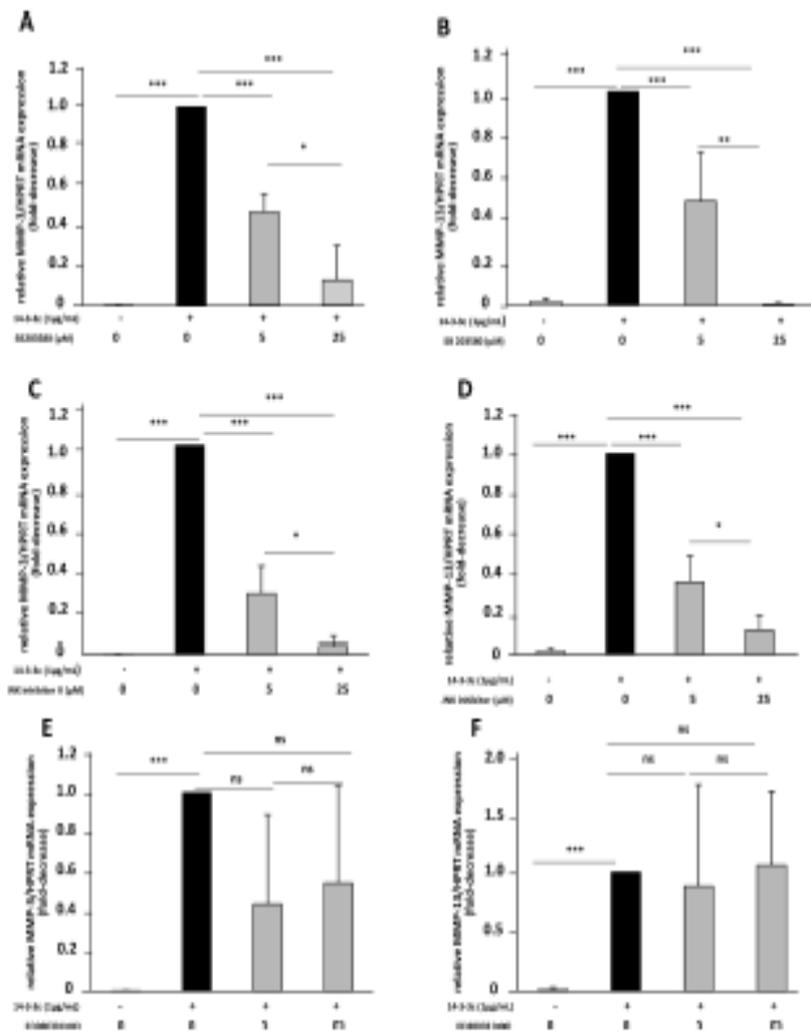


Figure S3: Involvement of MAPK in 14-3-3ε-induced MMP-3 and MMP-13 expression by murine articular chondrocytes. Primary cultures of mouse chondrocytes were starved, then stimulated with 1 μg/mL recombinant 14-3-3ε for 24 h in the presence of specific inhibitors at 5 and 25 μM of MAPK (SB203580 for p38 MAPK, PD98059 for ERK1/2 and JNK inhibitor II for JNK kinase). MMP-3 (A, C and E) and MMP-13 (B, D and F) expression were analyzed by RT-PCR. Data are mean±SD relative decrease in MMP-3 and MMP-13 expression compared with stimulated cells (set to 1) from three independent experiments. ns: not significant; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

**Injection intra-articulaire de
14-3 3ε chez les souris WT et CD13-/-
(Etudes *in vivo*)**

A. Objectifs

Compte tenu de nos résultats obtenus *in vitro* montrant le rôle de l'interaction entre 14-3-3 ϵ et CD13/APN dans la mise en place du phénotype catabolique au niveau des chondrocytes, le but de nos études *in vivo* était de valider l'importance de cette interaction dans l'établissement des lésions arthrosiques dans un modèle murin.

B. Matériels et méthodes

1. Animaux

Les expériences ont été réalisées sur des souriceaux et souris de C57BL/6J Wild-type (WT) ou déficientes en CD13/APN (CD13^{-/-}) fournies par une équipe de l'université d'Aberdeen en Ecosse. Initialement, ces souris ont été établies par cette équipe afin d'étudier l'implication de CD13/APN dans le développement des glandes mammaires (Kolb et al. 2013). Elles sont obtenues par suppression des exons 2 à 9 du gène codant pour CD13/APN comprenant des régions codantes pour le domaine de liaison des coronavirus et pour le domaine catalytique (Kolb et al. 2013) (**Figure 38**).

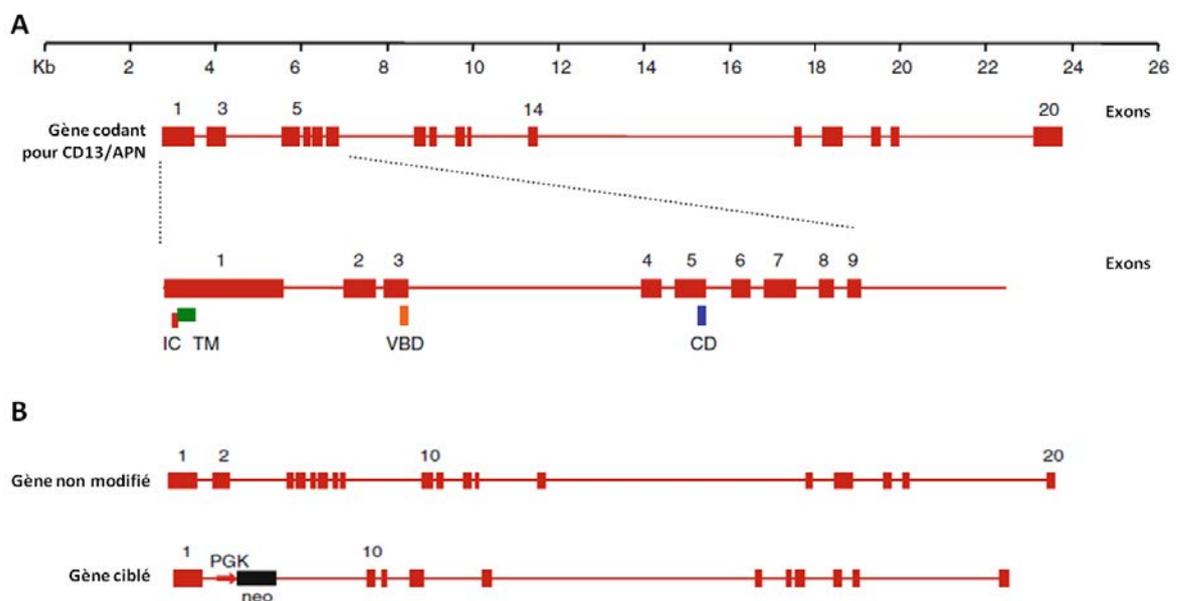


Figure 38 : Création des souris CD13^{-/-}.

(A) La structure génomique du gène codant pour CD13/APN et les exons ciblés pour créer des souris CD13^{-/-}. IC : domaine intracellulaire, TM : domaine transmembranaire, VBD : domaine de liaison des virus et CD : domaine catalytique. (B) La structure génomique du gène codant pour CD13/APN non modifié versus le gène ciblé. Les exons du gène de CD13/APN sont indiqués en carrés rouges.

Après un processus de décontamination (transferts d'embryons réalisés au CDTA d'Orléans), ces souris sont actuellement élevées et stabulées dans des conditions exemptes d'agents pathogènes spécifiques, au sein d'une animalerie de statut EOPS (Exempt d'Organisme Pathogènes Spécifiques) localisée dans le centre de recherche Saint-Antoine.

Le génotypage de ces souris est effectué à partir des ébauches digitales par PCR en utilisant les amorces oligonucléotidiques suivantes :

-muAPN452 : 5'-AGA CCT CAG TAG CTC CAT TGC T-3'

-muAPNrev : 5'-CAG AGC TAT GAG GTT GTT GGG-3'

-muAPN_PGKR : 5'-TCC AGA CTG CCT TGG GGA-3'

Les produits sont visualisés suite à une séparation par électrophorèse sur un gel d'agarose (1.5%) (**Figure 39**).

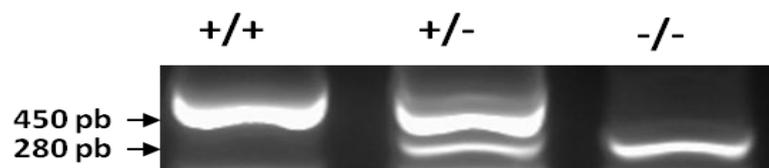


Figure 39 : Analyse des produits de PCR des souris après leur séparation sur un gel d'agarose 1.5%.

+/+ : souris WT, +/- : souris hétérozygotes et -/- : souris homozygotes.

2. Culture primaire et stimulation de chondrocytes articulaires provenant de souriceaux CD13 -/- ou de souriceaux WT

Les cultures primaires de chondrocytes articulaires murin ont été réalisées selon la méthode précédemment décrite par notre équipe (Salvat et al. 2005). Des souriceaux WT ou CD13-/- (n=2), âgés de 5 à 6 jours, sont disséqués afin de prélever le cartilage des genoux et des têtes fémorales. Les prélèvements sont digérés par la libérase à 37°C (deux fois 45 minutes à 0.52 U/ml et une fois sur la nuit à 0.13 U/ml). Le lendemain, le milieu contenant les cellules est complété par un volume de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (1000mg glucose/L) (Sigma) Pénicilline-Streptomycine (5%) et Glutamine (10%) (DMEM PS-Glu) avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) afin d'arrêter l'activité de la libérase. Les cellules sont ensuite filtrées sur tamis cellulaire (100µm), comptées sur cellules de Malassez puis ensemencées

dans du DMEM PS/Glu + 10% (SVF), (40 000 cellules et 2ml de milieu/puits dans les plaques 12 puits).

Les cellules sont cultivées à 37°C dans 5% de CO₂ jusqu'à confluence (environ 1 semaine), le milieu est changé tous les deux jours.

Une semaine après la mise en culture, les chondrocytes articulaires murins sont mis à jeun (DMEM + PS/Glu + Albumine 0.1%) pendant 24 heures puis stimulés par la protéine 14-3-3ε recombinante (1μg/mL) (Enzo life Sciences) pendant 24 heures à 37°C dans 5% de CO₂. Les cellules sont ensuite lysées pour des analyses en q-PCR.

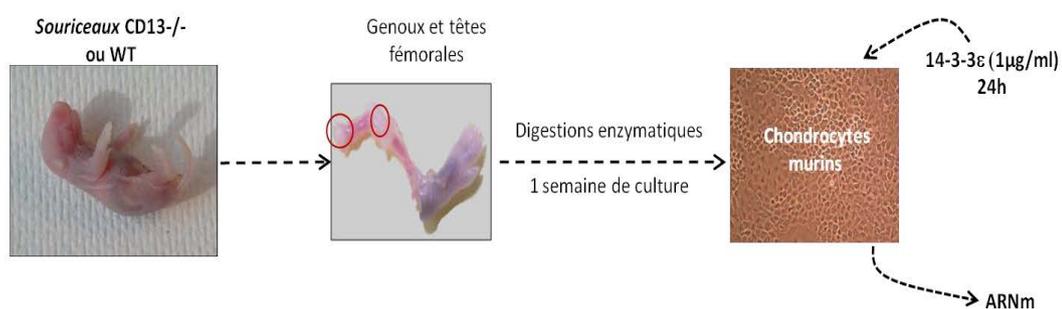


Figure 40 : Isolation, culture et stimulation des chondrocytes murins.

3. Extraction-RT-qPCR

La lyse des cellules et les extractions d'ARN totaux sont effectuées à l'aide d'un kit RlisaPrep (Promega). La concentration et la pureté des ARN sont déterminées par un spectrophotomètre (Eppendorf) après une dilution (1/20) d'échantillon dans l'eau RNase-free.

La reverse transcription s'effectue à l'aide du Kit Omniscript RT (Qiagen). La quantité d'ARN est standardisée (500ng). Le programme utilisé se déroule en deux phases, 50 minutes à 37°C et 15 minutes à 70°C puis l'ADN complémentaire (ADNc) est conservé à -20°C.

Les ADNc sont amplifiés par PCR en temps réel grâce au kit GO Taq qPCR Master Mix (Promega) et au LightCycler Real Time PCR LC480 (ROCHE) selon le protocole présenté dans le **tableau 6**.

95°C pendant 5min	Dénaturation (1cycle)
Dénaturation : 10sec à 95°C	
Hybridation des amorces 15sec à 60°C	Amplification (40 cycles)
Elongation : 10sec à 72°C	
95°C pendant 10sec puis 60°C pendant 30sec	Fusion (1cycle)
40°C pendant 30sec	Refroidissement (1cycle)

Tableau 6 : Protocole d'amplification par qPCR.

La quantité d'ARNm de MMP-13 mesurée est normalisée à celle de l'hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase (HPRT), un gène de ménage murin. Les séquences des amorces utilisées sont dans le **tableau 7**.

Gène	Amorces	
HPRT	S: 5'-TGT AAT GAC CAG TCA ACA GGG-3'	AS: 5'-CCA GTG TCA ATT ATA TCT TCC ACA ATC-3'
MMP-13	S: 5'-GA TGG CAC TGC TGA CAT CAT-3'	AS: 5'-TGT AGC CTT TGG AAC TGC TT-3'

Tableau 7 : Amorces utilisées (S : Sens ; AS: Anti-sens) pour la qPCR.

4. Injection intra-articulaire de 14-3-3ε aux souris

Des souris mâles WT (n=3) et CD13^{-/-} (n=3) âgées de 8 semaines sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane puis injectées au niveau intra-péritonéal par un antalgique (buprénorphine à 0.05mg/kg). Elles sont ensuite injectées, au niveau intra-articulaire (genoux droits), par un volume de 6µl de PBS (phosphate-buffered saline) contenant 5 µg de la protéine recombinante 14-3-3ε (pureté ≥ 90%), à l'aide des seringues Myjector de 0.5mL avec une aiguille montée (29 G x 12 mm, Terumo). Les genoux gauches des souris, non injectés sont utilisés comme contrôle.

La technique d'injection intra-articulaire a été apprise au sein de l'équipe de Pr. Martine Cohen Solal (UMR 1132, Hôpital Lariboisière), sous le tutorat de Cherifi Chahrazad,

étudiante en thèse. Elle consiste à injecter la solution contenant 14-3-3ε sous le tendon rotulien, suite à une incision de la peau.

5. Analyses histologiques

Une semaine ou deux semaines après l'injection intra-articulaire, les souris sont sacrifiées par élongation cervicale. Leurs articulations sont ensuite récupérées pour des analyses histologiques. Ces articulations sont rincées au PBS, fixées pendant 24h dans 4% de paraformaldéhyde (PFA), décalcifiées pendant dix jours par le produit Osteosoft (Merck-Millipore), déshydratées progressivement par l'éthanol puis le xylène et incluses dans la paraffine. Des coupes de 5µm d'épaisseur sont ensuite réalisées à l'aide du microtome à rotation Leica RM2135 (Leica Biosystems). Ces coupes sont ensuite déparaffinées et réhydratées (par le xylène et l'éthanol) puis colorées avec des bains successifs d'hématoxyline (colorant le noyau), du Vert lumière et de Safranine O (colorant les protéoglycanes). Les coupes histologiques colorées sont ensuite analysées par microscopie optique.

6. Tests statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± écart type. Les tests statistiques sont exécutés à l'aide du logiciel GraphPad InStat. On utilise le test de Student (test T) pour comparer les moyennes de deux groupes et le test ANOVA (One-way analysis of variance) suivi d'une comparaison Turkey Kramer pour comparer plusieurs moyennes. Les résultats sont considérés comme statistiquement significatifs pour une valeur de p inférieure à 0,05.

C. Résultats

1. Phénotype des souris CD13^{-/-}

Avant la réalisation de nos expériences, le phénotype des souris déficientes en CD13/APN est analysé et comparé aux souris contrôles. Cette analyse ne montre aucune différence macroscopique entre les souris CD13^{-/-} et les souris WT. Les souris CD13^{-/-} sont viables, fertiles et ne montrent pas d'anomalies physiologiques ou comportementales par rapport aux souris WT.

La comparaison des poids des souris au moment du sacrifice, ne montre également pas de différence significative entre les souris CD13^{-/-} et les souris WT (28,3g \pm 2,3g pour les souris CD13^{-/-} versus 28,1g \pm 1,9g pour les souris WT) (**Figure 41**).

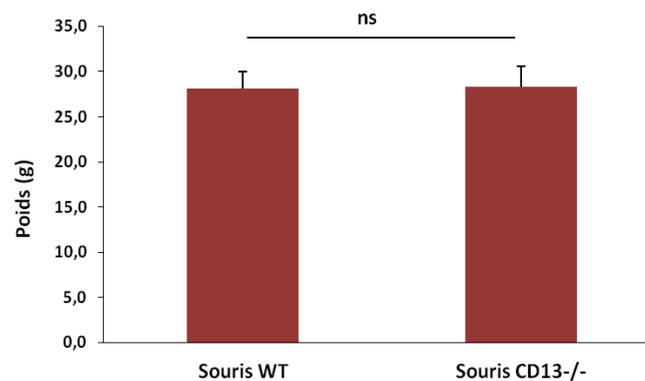


Figure 41 : Comparaison des poids des souris CD13^{-/-} et des souris WT.

Des souris CD13^{-/-} âgées de 8 semaines ont été pesées et comparées aux souris WT de même âge. Les résultats représentent la moyenne des poids \pm écart type (n=9). ns : non significatif.

Pour comparer leur phénotype ostéoarticulaire, les articulations des genoux des souris mâles WT ou CD13^{-/-}, âgées de 8 semaines (n=3), ont été examinées sur des coupes histologiques colorées au Vert lumière-Safranine O permettant de visualiser l'os et le cartilage. Nos résultats préliminaires ne révèlent pas de différence structurelle significative entre les deux types de souris. La surface du cartilage nous semble intacte et quasi-identique entre les souris WT et CD13^{-/-} (**Figure 42**).

Ainsi, la déficience en CD13/APN chez les souris ne semble pas avoir d'effets sur leur physiologie, leur comportement et leur phénotype ostéo-articulaire en comparaison avec les souris WT.

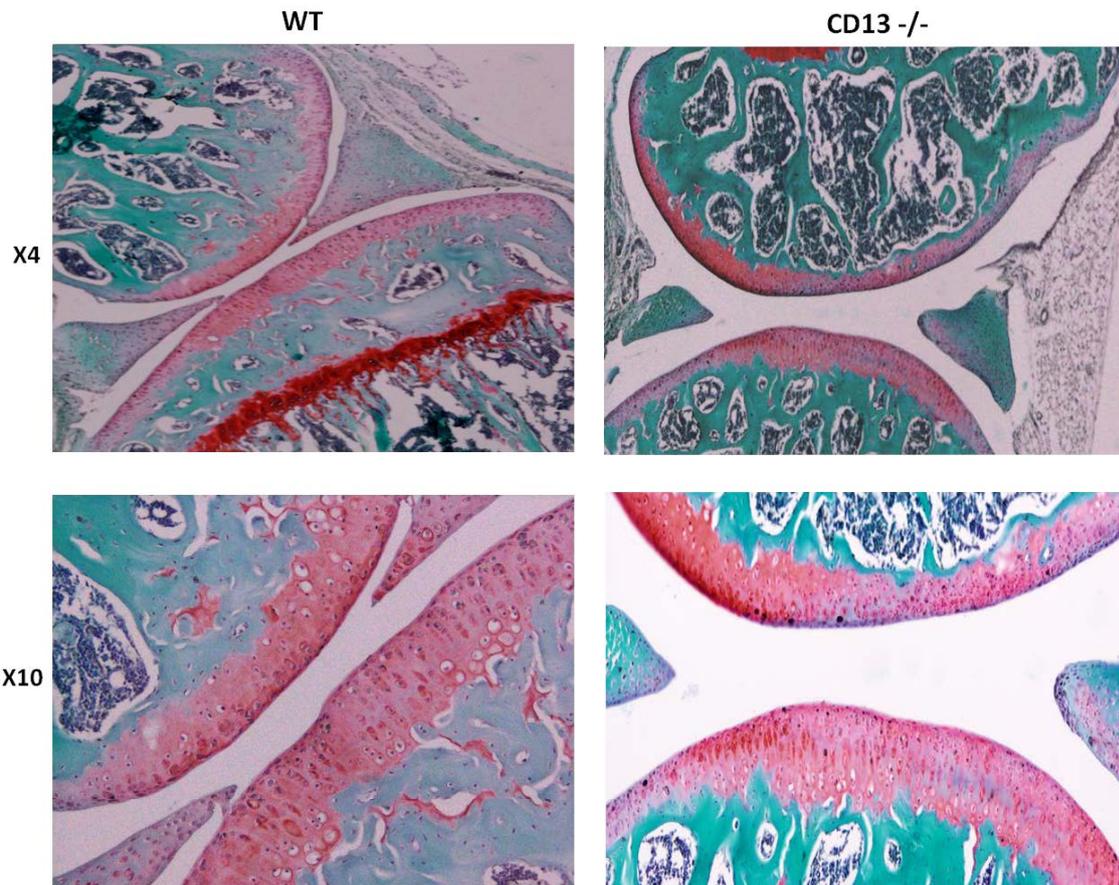


Figure 42 : Phénotype ostéo-articulaire des souris CD13^{-/-} en comparaison avec les souris WT.

Analyse des coupes histologiques des articulations de genoux gauches (contrôle) colorées à l'hématoxyline et au Vert lumière-Safranin O. F : Fémur, T : Tibia. (Grossissement x4 et x10).

2. Etude de l'expression de MMP-13, après stimulation par 14-3-3 ϵ , dans les chondrocytes articulaires provenant des souris CD13^{-/-}

Afin de valider l'implication de CD13/APN dans la mise en place du phénotype catabolique chondrocytaire en réponse à 14-3-3 ϵ , des chondrocytes articulaires en culture primaire provenant des souriceaux CD13^{-/-} ou WT ont été stimulés par 14-3-3 ϵ recombinante (1 μ g/mL). Vingt-quatre heures après la stimulation, l'expression en ARNm de MMP-13 a été analysée par RT—qPCR.

Nos résultats préliminaires (n=2) montrent que la stimulation des chondrocytes murins CD13^{-/-} ou WT par 14-3-3 ϵ augmente significativement l'expression génique de MMP-13 par

rapport aux chondrocytes non stimulés. Cette stimulation semble moins forte dans les chondrocytes CD13^{-/-} par rapport aux chondrocytes WT (**Figure 43**). En moyenne, 14-3-3 ϵ induit 50.1 fois plus l'expression de MMP-13 dans les chondrocytes WT versus 29.5 fois dans les chondrocytes CD13^{-/-}.

Ce résultat préliminaire suggère que la déficience en CD13/APN chez la souris pourrait réduire l'effet de 14-3-3 ϵ sur la surexpression chondrocytaire de MMP-13.

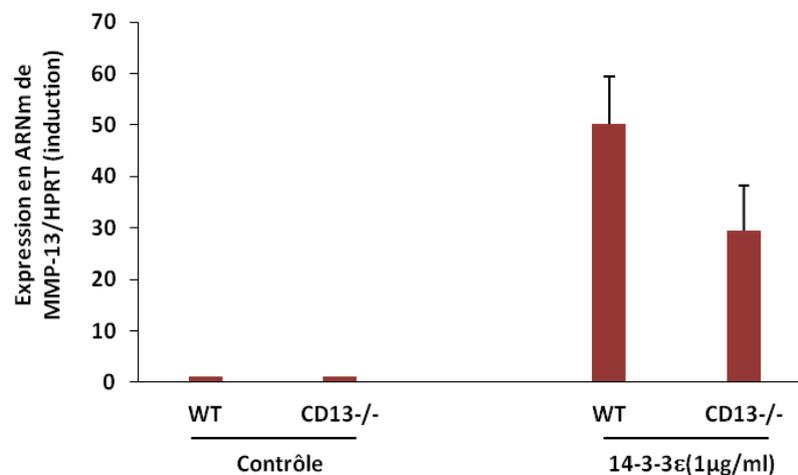


Figure 43 : Effet de la protéine 14-3-3 ϵ sur l'expression de MMP-13 dans les chondrocytes CD13^{-/-}.

Des chondrocytes articulaires des souris WT ou CD13^{-/-} ont été stimulés pendant 24h par la protéine 14-3-3 ϵ recombinante (1 μ g/mL). Les ARNs totaux ont été ensuite extraits et l'expression de MMP-13 en ARNm a été analysée par RT-qPCR (expression rapportée à celle de HPRT). Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart type des inductions rapportées au contrôle (fixé à 1) (n=2).

3. Evaluation de l'effet de l'injection intra-articulaire de 14-3-3 ϵ chez les souris WT

Afin d'étudier l'impact direct de la protéine 14-3-3 ϵ sur le cartilage articulaire, 5 μ g de 14-3-3 ϵ recombinante ont été injectés au niveau intra-articulaire du genou droit des souris C57BL/6 WT (n=3). La période post-injection s'est déroulée sans incident et sans développement d'infections. Les souris ont été observées quotidiennement et aucune modification comportementale n'a été rapportée. Une semaine (n=2) ou deux semaines (n=1) après l'injection intra-articulaire, les articulations ont été isolées pour un examen histologique.

Aucun signe macroscopique (gonflement ou rougeur) n'a été observé dans les articulations de genoux des souris injectées.

Les coupes histologiques des articulations de genoux gauches (contrôles) et droits (injectés) des souris ont été colorées au Vert lumière et Safranine O afin d'évaluer les changements histopathologiques du cartilage et de l'os sous-chondral par microscopie.

Une semaine après l'injection intra-articulaire de 14-3-3ε, le cartilage du plateau tibial et du condyle fémoral des souris injectées (**Figure 44-B**) est normalement coloré par rapport au cartilage des souris contrôles (**Figure 44-A**). Cependant, nous observons des petites fibrillations et irrégularités de la surface du cartilage. Nous observons également une désorganisation cellulaire, caractérisée par la formation de petits amas de chondrocytes. Des changements structuraux sont aussi observés au niveau de l'os caractérisés notamment par la progression de ce dernier vers le cartilage.

Deux semaines après l'injection, l'effet de 14-3-3ε semble être plus marqué chez les souris. Nous détectons la présence des débris dans la cavité articulaire, des petites irrégularités et fibrillations de la surface du cartilage. Nous observons également une atteinte de la surface du ménisque. De plus, les chondrocytes au niveau du cartilage du plateau tibial chez ces souris nous semblent moins nombreux et organisés en petits amas, comparées aux souris contrôles (**Figure 44-C**).

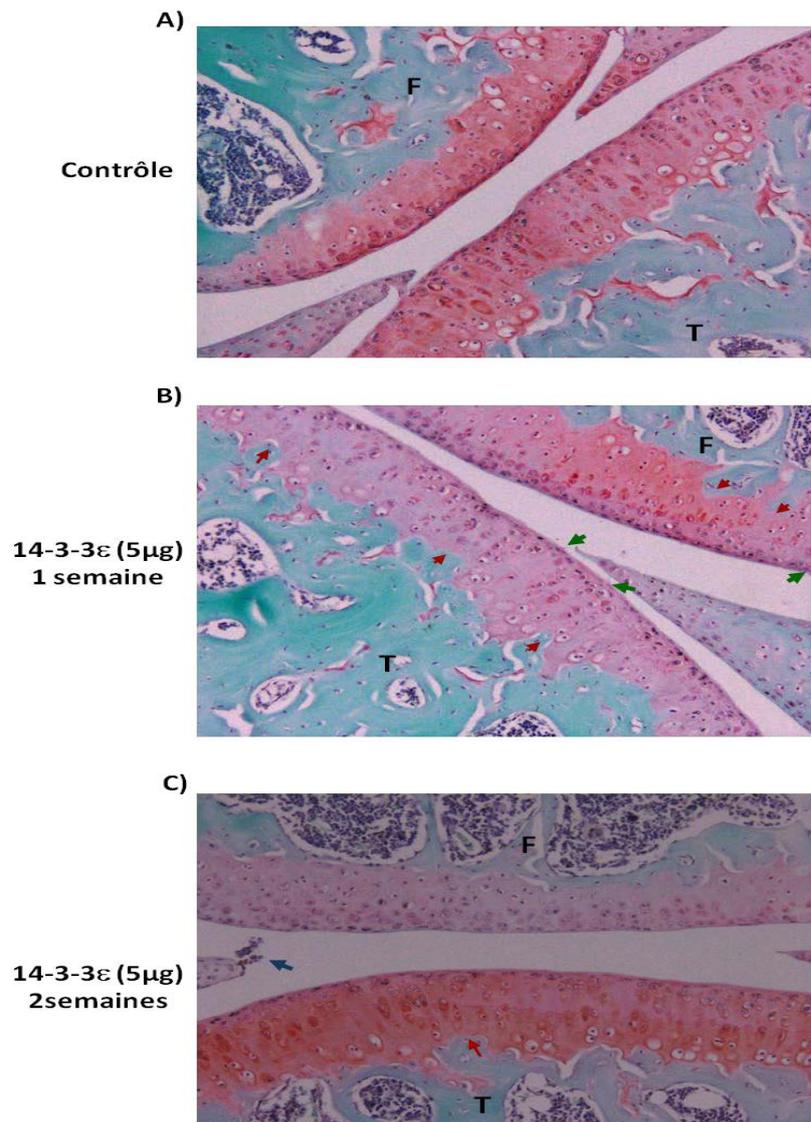


Figure 44 : Modifications histologiques après l'injection intra-articulaire de 14-3-3ε aux souris WT.

Analyse des coupes histologiques des articulations de genoux gauches (contrôle) ou droits (injectés) colorées au Vert lumière-Safranine O, une ou deux semaines après l'injection intra-articulaire de 14-3-3ε (5μg/ml) chez des souris WT. Les flèches bleues indiquent la présence des débris dans la cavité articulaire. Les flèches vertes indiquent les fibrillations du cartilage et les flèches rouges indiquent les changements structuraux de l'os. F: Fémur, T: Tibia. (Grossissement x10).

D'après ces examens histologiques, l'injection intra-articulaire de 14-3-3ε à 5μg/ml semble altérer l'intégrité de la surface du cartilage artériel. Cependant le niveau des lésions induites semble faible et ne varie pas de façon prépondérante entre les différentes conditions.

4. Evaluation de l'effet de l'injection intra-articulaire de 14-3-3 ϵ chez les souris CD13^{-/-}

Pour évaluer l'implication de CD13/APN dans l'effet de 14-3-3 ϵ sur le cartilage, nous avons testé l'effet de son injection chez des souris CD13^{-/-} (n=3). 5 μ g de 14-3-3 ϵ recombinante ont été injectés au niveau intra-articulaire du genou droit des souris C57BL / 6 CD13^{-/-} (n=3). Une semaine (n=2) ou deux semaines (n=1) après l'injection intra-articulaire, les articulations de genoux gauches (contrôles) et droits (injectés) des souris ont été isolées pour des colorations histologiques au Vert lumière et Safranin O. De même que les souris WT, aucun signe macroscopique d'une atteinte articulaire n'a été observé.

Une semaine après l'injection, les examens microscopiques des coupes colorées montrent des irrégularités au niveau de la surface du cartilage des souris CD13^{-/-} injectées (**Figure 45-D**) par rapport à celles non injectées (**Figure 45-B**), mais avec moins de fibrillations par rapport à celles observées chez les souris WT injectées (**Figure 45-C**). Une perte des protéoglycanes (traduite par la perte du safranine-O) est observée au niveau du condyle fémoral des souris CD13^{-/-}, en comparaison avec les souris CD13^{-/-} contrôles. Des changements de structure au niveau de l'os du condyle fémoral sont également observés.

Deux semaines après l'injection, l'effet de 14-3-3 ϵ semble être plus accentué. Nous observons beaucoup de fibrillations du cartilage sont détectées au niveau du condyle fémoral. Ces atteintes semblent être associées à une diminution du nombre des chondrocytes. La désorganisation des chondrocytes et la formation de petits amas sont observées également au niveau du plateau tibial (**Figure 45-F**). Cependant, moins de débris et d'atteintes méniscales sont observés après 2 semaines de l'injection de 14-3-3 ϵ chez les souris CD13^{-/-} par rapport aux souris WT (**Figure 45-E**).

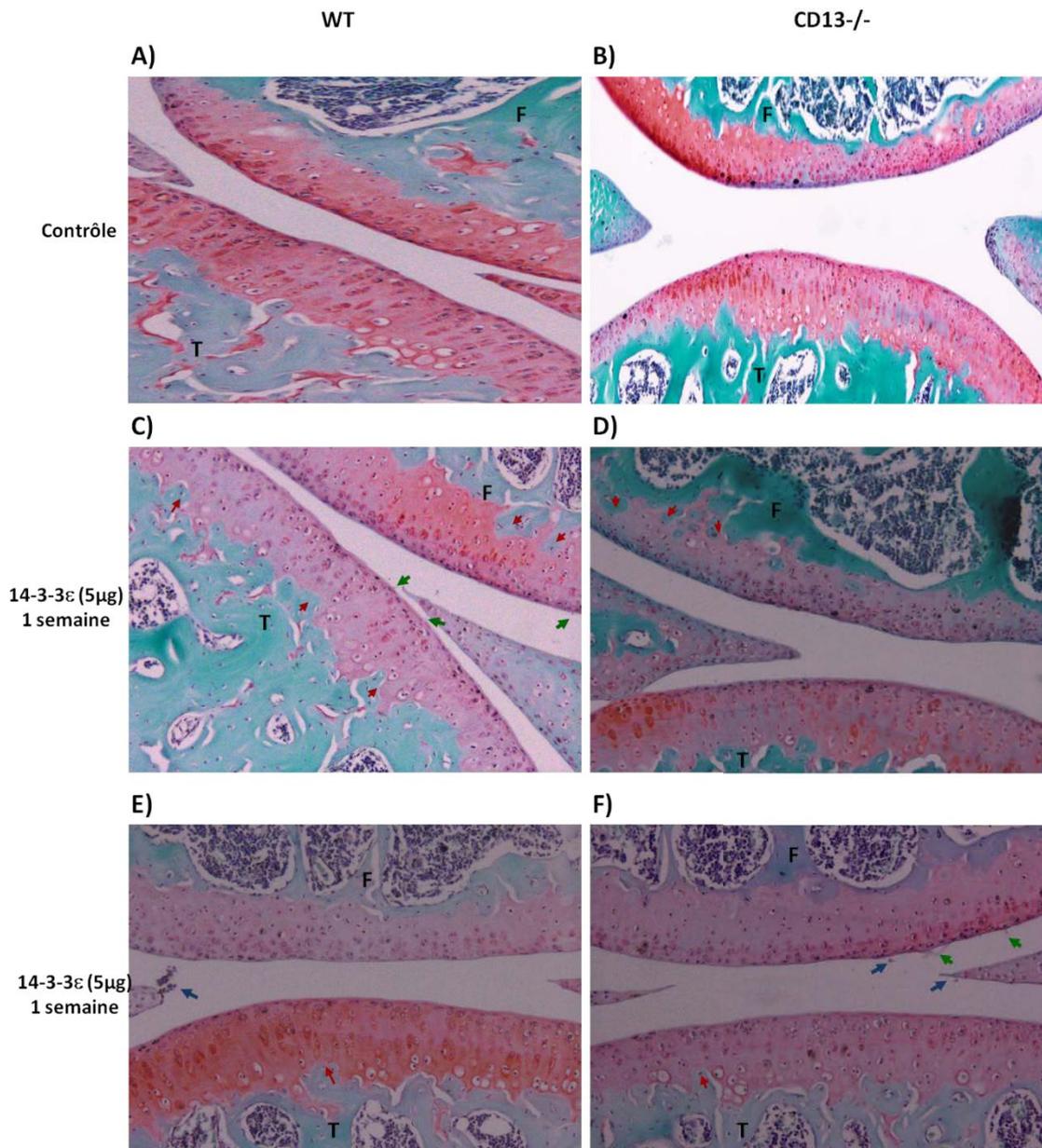


Figure 45 : Modifications histologiques après l'injection intra-articulaire de 14-3-3ε dans les souris CD13^{-/-} par rapport aux souris WT.

Analyse des coupes histologiques des articulations de genoux gauches (contrôle) ou droits (injectés) colorées au Vert lumière-Safranine O, une ou deux semaines après l'injection intra-articulaire de 14-3-3ε (5μg/mL) chez des souris WT ou des souris CD13^{-/-}. Les flèches bleues indiquent la présence des débris dans la cavité articulaire. Les flèches vertes indiquent les fibrillations du cartilage et les flèches rouges indiquent les changements structuraux de l'os. F: Fémur, T: Tibia. (Grossissement x10).

Nos résultats préliminaires ne semblent pas montrer de différence entre les souris WT et les souris CD13^{-/-} suite à l'injection intra-articulaire de 14-3-3 ϵ . Des mises au point du protocole d'injections restent à faire pour évaluer plus précisément le rôle de 14-3-3 ϵ et de son interaction avec CD13.

Afin de déterminer le niveau des lésions générées par 14-3-3 ϵ au niveau du cartilage, les coupes histologiques des articulations des souris WT et CD13^{-/-} devront être évaluées en utilisant le score OARSI dès que nous aurons obtenu un nombre plus conséquent de souris.

Discussion

A. Interaction directe entre 14-3-3 ϵ et CD13/APN *in vitro*

Les protéines 14-3-3 sont des protéines adaptatrices hautement conservées, impliquées dans une large gamme de processus intracellulaires en se liant à plus de 200 partenaires. Dans les conditions normales, ces protéines sont intracellulaires, mais récemment plusieurs études indiquent leur présence au niveau extracellulaire. Certaines isoformes ont été détectées dans le liquide synovial de patients ayant la PR ou dans le LCR de patients atteints de certaines maladies neurodégénératives. D'autres ont été trouvées sécrétées par les kératinocytes de l'épiderme et par les cellules épithéliales pulmonaires.

Notre équipe a identifié récemment la présence de 14-3-3 ϵ dans le milieu conditionné d'ostéoblastes murins comprimés. Cette protéine est impliquée dans la communication entre l'os et le cartilage. En effet, ce médiateur joue un rôle puissant dans l'établissement du phénotype catabolique chondrocytaire en stimulant l'expression de MMP3 et MMP13, les deux métalloprotéases majeures de la dégradation du cartilage dans l'arthrose. Pour induire ce phénotype catabolique chondrocytaire, 14-3-3 ϵ sécrétée par les ostéoblastes, doit se fixer sur un récepteur exprimé à la surface des chondrocytes articulaires.

Le but de ce travail était d'étudier l'implication de CD13/APN, récepteur supposé de 14-3-3 ϵ , à la surface des chondrocytes articulaires dans la communication os/cartilage. CD13/APN est une glycoprotéine de surface exprimée dans plusieurs types cellulaires et impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques grâce à son activité enzymatique aminopeptidase N ou à son rôle de récepteur. Nos résultats montrent que CD13/APN joue son rôle récepteur pour fixer 14-3-3 ϵ et transmettre son signal dans les chondrocytes. En effet, nous avons pu montrer que l'invalidation de ce récepteur dans des chondrocytes murins et humains par des anticorps bloquants, n'ayant aucun effet sur son activité enzymatique APN, inhibe la réponse chondrocytaire à la protéine 14-3-3 ϵ en diminuant l'expression et la libération de MMP-3 et MMP-13. Ceci suggère que la diminution de l'expression et de la libération de deux métalloprotéases malgré la stimulation des chondrocytes par 14-3-3 ϵ est bien due à la suppression de la fonction récepteur de CD13/APN et non à la suppression de son activité enzymatique. Ces résultats nous ont confortés dans l'idée que CD13/APN joue effectivement un rôle dans la réception du message de 14-3-3 ϵ sur les chondrocytes articulaires, comme il le fait sur les fibroblastes pour la 14-3-3 σ (Ghaffari et al. 2010).

Nous avons pu montrer la présence d'une interaction directe entre 14-3-3 ϵ et CD13/APN, en utilisant la technique de SPR basée sur le système Biacore. Ce système a permis de suivre en temps réel l'interaction directe entre les deux protéines. Nous avons montré également la capacité de 14-3-3 ϵ à se lier à la surface des chondrocytes, via sa fixation à CD13/APN. Il était indispensable ensuite d'identifier les motifs impliqués dans cette interaction. Nous avons donc eu recours aux études *in silico* qui ont permis d'identifier le résidu Y582 phosphorylé appartenant à la séquence E⁵⁷⁹FNYVW⁵⁸⁴ de CD13/APN, comme résidu indispensable pour la liaison de 14-3-3 ϵ . Des études antérieures ont déjà montré que les protéines 14-3-3 régulent de nombreux processus cellulaires en se liant sur des sites phosphorylés dans leurs protéines cibles (Pozuelo Rubio et al. 2004). En outre, nos résultats sont en accord avec des études ayant montré que la déphosphorylation des protéines de surface dans les fibroblastes (avec une phosphatase alcaline) réduit considérablement l'affinité de liaison de CD13/APN à la protéine 14-3-3 σ (Ghaffari et al. 2010).

Afin d'identifier ensuite les voies de signalisation activées en aval de CD13/APN suite à la fixation de 14-3-3 ϵ , nous avons ciblé les voies MAPK (mitogen-activated protein kinase), jouant un rôle prépondérant dans l'expression des MMP au cours du processus arthrosique (Berenbaum 2004). En utilisant des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques, nous avons montré que ce sont les voies p38 MAPK et JNK qui sont impliquées dans la transmission du signal de 14-3-3 ϵ et la régulation de l'expression de MMP-3 et -13 (Fig.S3 de l'article). Plusieurs études ont établi le lien entre les protéines 14-3-3 extracellulaires et les voies MAPK (Maksymowych et al. 2014, Lam et al. 2005). L'implication de CD13/APN dans l'activation des voies MAPKs a été également montrée. En effet, il a été rapporté qu'une invalidation de CD13/APN par des siRNA ou des anticorps bloquants est capable d'inhiber l'activation de ERK1/2, JNK et p38 MAPK (Ghaffari et al. 2010, Santos, Langner et al. 2000). Cependant, CD13/APN possède un petit domaine intracellulaire de 7 acides aminés. Ceci a conduit à l'hypothèse selon laquelle la transduction du signal par CD13 nécessite la participation des protéines « auxiliaires » (Mina-Osorio 2008, Chen et al. 2012). En effet, CD13/APN a été trouvé associé aux molécules adaptatrices telles que Grb2 et Sos (Mina-Osorio 2006) ainsi qu'à la protéine RECK (Miki et al. 2007). En outre, une association fonctionnelle entre CD13/APN et les récepteurs aux immunoglobulines (Fc γ R) a été mise en évidence à la surface membranaire des monocytes (Mina-Osorio et Ortega 2005). Il a été montré également que les deux types de récepteurs colocalisent dans les monocytes (Riemann

et al. 2005). Il est ainsi suggéré que CD13/APN pourrait agir en association avec d'autres récepteurs (Mina-Osorio et Ortega 2005).

Son rôle dans la communication entre les cellules a été également décrit antérieurement. En effet, l'identification de CD13/APN comme un récepteur pour 14-3-3 σ implique son importance dans la cicatrisation des plaies, et plus particulièrement sa fonction potentielle dans la communication épithélio-mésenchymateuse (Lai et al. 2011). En outre, CD13 est impliqué dans l'interaction entre monocytes et synoviocytes d'une part (Chomarat et al. 1995) et entre les lymphocytes T et les fibroblastes synoviaux d'autre part (Morgan et al. 2015), contribuant ainsi à l'inflammation synoviale au cours de la PR.

La détection de CD13/APN au niveau articulaire en condition arthrosique a été également rapportée. En effet, il a été montré qu'il est exprimé dans les cellules synoviales arthrosiques (Kurose et al. 2010). De plus, le contenu des cellules synoviales exprimant CD13/APN est fortement augmenté en cas d'une inflammation synoviale observée au cours de l'arthrose. Cette inflammation a été trouvée associée à un infiltrat des macrophages surexprimant également CD13/APN (Walsh et al. 1993). Sa présence sous forme soluble et son activité enzymatique ont également été révélées dans le liquide synovial de patients arthrosiques (Shimizu et al. 2002, Morgan et al. 2015). Cependant, son expression et son rôle dans les chondrocytes articulaires n'ont jamais été étudiés. Nos résultats sont les premiers à montrer son rôle potentiel dans la communication entre os et cartilage au cours de l'arthrose.

B. Rôle de 14-3-3 ϵ dans un modèle murin : Injection intra-articulaire *in vivo*

Afin de valider l'effet catabolique de 14-3-3 ϵ *in vivo*, nous avons choisi d'utiliser le modèle murin pour plusieurs raisons. En effet, plusieurs données indiquent que le modèle murin pourrait présenter un grand nombre de lésions arthrosiques identiques à celles développées chez l'homme y compris, la fibrillation du cartilage et l'érosion de la matrice cartilagineuse visible par la perte de coloration des protéoglycanes à la Safranin O (Glasson et al. 2010). En outre, c'est le modèle idéal permettant d'étudier les lésions arthrosiques sur des coupes du genou entier (du à leur petite taille) à partir d'un nombre d'animaux élevé (grâce à leur taux de reproduction élevé) (Van der Kraan 1990).

Afin d'évaluer le rôle de 14-3-3 ϵ dans un modèle murin, les souris ont été injectées au niveau intra-articulaire avec la protéine 14-3-3 ϵ recombinante. Une mise au point de la dose injectée ainsi que la période post-injection était nécessaire. Le choix de la dose injectée (5 μ g) a été basé sur des études montrant l'effet de l'injection intra-articulaire des protéines S100 et

HMGB1, dont l'effet catabolique semble similaire à celui de 14-3-3 ϵ (Pullerits et al. 2003, Van Lent et al. 2007). Après une semaine d'une injection unique de 14-3-3 ϵ , la coloration à la safranine O, proportionnelle au taux des protéoglycanes du cartilage, n'était pas significativement altérée chez les souris WT. Il n'y avait pas de différence significative dans l'épaisseur moyenne du cartilage articulaire entre les souris injectées et les souris contrôles. Cependant, nous avons remarqué l'apparition des petites atteintes au niveau du cartilage telles que les fibrillations et les irrégularités de la surface. Ces atteintes nous semblent être plus marquées, deux semaines après l'injection. Nous avons observé également l'apparition de certaines atteintes au niveau du ménisque au cours des stades ultérieures (après 2 semaines). Nous avons détecté également la présence de quelques débris, provenant apparemment des zones érodées, au niveau de la cavité articulaire. Des petits amas de chondrocytes (clusters) étaient également présents, mais en faible nombre. La formation des clusters dans le cartilage est une caractéristique histologique de l'arthrose, indiquant le changement phénotypique des chondrocytes. Les cellules de ces amas expriment généralement une large gamme de marqueurs d'activation et de différenciation anormales tels que les marqueurs de l'hypertrophie (comme le collagène de type X, MMP-13 et Runx2), suggérant leur contribution à la pathogenèse. Leur formation est liée principalement à la prolifération des cellules et leur migration en réponse aux cytokines et aux facteurs de croissance (Lotz et al. 2010).

L'ensemble de ces changements n'a pas été observé chez les souris non injectées, ce qui suggère que l'effet observé pourrait être dû à l'injection de 14-3-3 ϵ . Pour confirmer ces résultats préliminaires encourageant, davantage d'injections et d'analyses histologiques sont nécessaires.

Pour évaluer l'importance de l'interaction entre CD13/APN et 14-3-3 ϵ dans l'établissement des lésions arthrosiques, nous avons injecté la protéine 14-3-3 ϵ au niveau intra-articulaire dans les souris CD13 $^{-/-}$. Ceci a pour objectif de vérifier si les lésions arthrosiques qui pourraient être induites suite à l'injection de 14-3-3 ϵ , seraient moins sévères chez ces souris par rapport à des souris WT injectées également avec la 14-3-3 ϵ . Les souris CD13 $^{-/-}$ utilisées pour l'injection ont été établies récemment dans le but d'étudier le rôle de CD13/APN dans le remodelage protéolytique du tissu mammaire durant le développement mammaire adulte. Chez ces souris, un retard dans la morphogenèse des glandes mammaires a été révélé (Kolb et al. 2013). Nos analyses macroscopiques de phénotype des souris CD13 $^{-/-}$ ne montrent pas de différence par rapport aux souris WT dans leur développement, poids et comportement. Ceci

est en accord avec des études antérieures ayant rapporté que malgré la large gamme des fonctions de CD13/APN, les souris déficientes en CD13/APN se développent et se comportent normalement (Rangel et al. 2007, Winnicka et al. 2010). Nos résultats préliminaires obtenus après l'examen de leur phénotype ostéoarticulaire sur des coupes histologiques des articulations de genoux ne montrent pas de différences.

Afin de valider l'importance de l'interaction entre 14-3-3 et CD13/APN dans l'établissement du phénotype catabolique chondrocytaire via l'augmentation de surexpression des MMP, nous avons stimulé des chondrocytes CD13^{-/-} par 14-3-3ε. Nos résultats préliminaires montrent une réduction de l'expression de MMP-13 en réponse à 14-3-3ε dans les chondrocytes CD13^{-/-}, ce qui valide nos résultats obtenus *in vitro* en utilisant les siRNA et les anticorps bloquants anti-CD13/APN. Cependant ces résultats doivent être confirmés en augmentant le nombre d'expériences permettant d'analyser l'effet de la déficience en CD13/APN sur la réponse chondrocytaire en analysant l'expression mais aussi la libération de MMP-3 et MMP-13.

Par ailleurs, pour établir le lien entre CD13/APN et l'apparition de ces lésions, des comparaisons à différents niveaux de coupes articulaires doivent être effectuées. Une évaluation des différentes coupes histologiques en se basant sur le score OARSI nous permettra de distinguer également les niveaux de lésions chez les deux types de souris. Nos résultats préliminaires, ne nous permettent pas de distinguer clairement de différence entre les lésions induites par 14-3-3ε chez les souris CD13^{-/-} et celles induites chez les WT. Les modifications induites par l'injection de 14-3-3ε chez les souris CD13^{-/-} nous semblent quasi identiques à celles observées chez les souris WT.

C. Les protéines 14-3-3 sécrétées dans les pathologies articulaires humaines : nouveaux biomarqueurs ?

Le rôle des protéines 14-3-3 sécrétées a été également établi dans d'autres pathologies articulaires humaines que l'arthrose. En effet, la protéine 14-3-3η est définie aujourd'hui comme un nouveau biomarqueur de la PR (Maksymowych et Marotta 2014, Carrier et al. 2016). Un ELISA pour 14-3-3η a été développée et validée par OMERACT (Outcome Measures in Rheumatology). 14-3-3η extracellulaire provoque la production d'auto-anticorps contre la protéine native, ce qui révèle également une utilité diagnostique. La présence de la protéine 14-3-3η ou de ses auto-anticorps est observée chez 90% des patients atteints de la PR précoce. Sa détection est significativement associée à la progression radiographique au début de la PR, au cours des 1^{ère}, 3^{ème} et 5^{ème} années, indiquant ainsi son utilité pronostique

(Maksymowych et Marotta 2014). Son association avec d'autres marqueurs de la PR, comme la protéine C réactive (CRP) a été montrée capable de prédire plus efficacement les résultats cliniques et radiographiques dans une cohorte de patients ayant une polyarthrite inflammatoire débutante. Ceci permettra une intervention pharmacologique ciblée plus précoce (Carrier et al. 2016). Une étude récente réalisée sur une cohorte des patients souffrant de la PR a également montré que 14-3-3 η est un marqueur utile pour informer sur la réponse aux traitements (Hirata et al. 2015).

Ceci pourrait être aussi le cas de l'isoforme 14-3-3 ϵ , dont la présence dans le liquide synovial et les milieux conditionnés des patients arthrosiques a été mise en évidence (**Figure 46**) et suggérée être associée à l'acquisition du phénotype catabolique chondrocytaire (Priam et al. 2013).

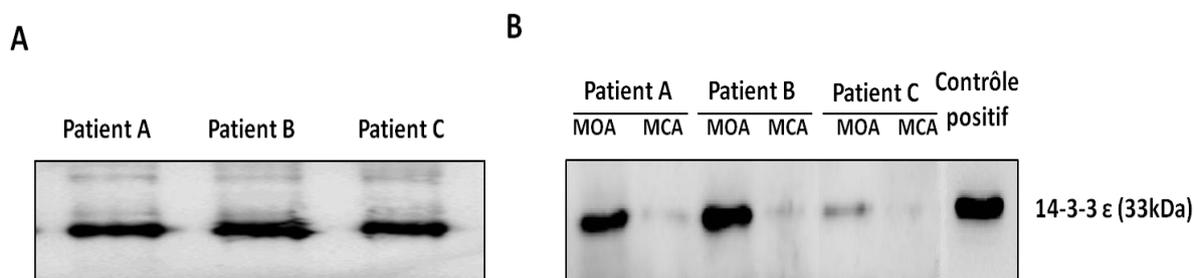


Figure 46 : Détection de la protéine 14-3-3 ϵ dans le liquide synovial (A) et le milieu conditionné d'os arthrosique humain (B).

MOA : milieu conditionné d'os arthrosique, MCA : milieu conditionné du cartilage arthrosique (Priam et al. 2013).

Le rôle de certaines autres isoformes extracellulaires de 14-3-3 ϵ a été également rapporté dans l'arthrose. En effet, chez un modèle d'arthrose réalisé chez le chien, une corrélation a été établie entre la présence de l'isoforme η dans le liquide synovial et la formation des ostéophytes. Il est suggéré chez ce même modèle que les isoformes η et γ pourraient être à l'origine du taux élevé de MMP-1 et MMP-3 (Sardari et al. 2011).

Par ailleurs, il a été montré qu'au niveau intracellulaire, l'isoforme γ forme un hétéro-dimère principalement avec l'isoforme ϵ (Aitken 2002). Ceci pourrait se produire également au niveau extracellulaire au cours du processus arthrosique.

L'ensemble de ces données suggèrent que la protéine 14-3-3 ϵ sécrétées au niveau intra-articulaire pourrait être également un nouveau biomarqueur de l'arthrose, comme c'est le cas pour la PR avec l'isoforme 14-3-3 η .

D. 14-3-3 ϵ serait-elle une nouvelle alarmine sécrétée au cours de l'arthrose?

Les alarmines, appelées aussi « signaux du danger », sont des molécules endogènes sécrétées dans le milieu extracellulaire en réponse à une infection ou une lésion cellulaire afin d'alerter le système immunitaire, de déclencher un processus inflammatoire et/ou initier une réparation tissulaire (Oppenheim et Yang 2005, Harris et Raucci 2006, Bianchi 2007). La sécrétion de ces molécules peut se produire via un mécanisme passif par des cellules subissant une nécrose ou actif par des cellules immunitaires activées (Pugin et al.2008). De nombreuses alarmines telles que les protéines S100 et HMGB1 mais également l'ATP, la thymosine, la galectine et l'annexine jouent un rôle crucial dans la physiopathologie de l'arthrose. Leur expression et sécrétion sont augmentées au cours de l'arthrose et associées aux processus catabolique et/ou inflammatoire.

Il nous semble ainsi que le mode d'action et le profil des protéines 14-3-3 sont similaires à ceux des alarmines. En effet, les protéines 14-3-3, connues pour avoir de nombreuses fonctions intracellulaires sont détectées également au niveau extracellulaire. En outre, les protéines 14-3-3 ont été identifiées dans les exosomes libérés par les cellules immunitaires activées suggérant ainsi que leur libération est due à un mécanisme actif durant l'inflammation (They et al. 2009, Maksymowych et Marotta 2014). Ceci est le cas de plusieurs alarmines. Quand elle est sécrétée, l'isoforme η des protéines 14-3-3 agit en tant qu'un signal de danger. Elle déclenche une réponse immunitaire via l'activation des lymphocytes B et induit la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et enzymes protéolytiques (Maksymowych et Marotta 2014, Carrier et al. 2016).

La protéine 14-3-3 ϵ est sécrétée par les ostéoblastes en réponse au stress mécanique (Priam et al. 2013), de la même manière que certaines autres alarmines (ATP et thymosine), probablement suite à une lésion cellulaire. Par ailleurs, la sécrétion de certaines protéines classées comme alarmines telles que l'annexine et la galectine a été également trouvée augmentée en réponse au stress mécanique par analyse sécrétomique iTRAQ, grâce à notre modèle de communication os/cartilage (Priam et al. 2013).

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que 14-3-3 ϵ pourrait être également classée comme une alarmine, dérivée de l'os endommagé et contribuant à l'arthrose. Cependant, une

étude plus poussée, visant à caractériser cette protéine comme une alarmine nous semble nécessaire.

Le mode d'action et l'implication des alarmines au cours de l'arthrose et des arthrites inflammatoires sont discutées dans la revue :

« The danger from within: alarmins in arthritis »

Nature Reviews Rheumatology. 2016 (sous presse).

Meriam Nefla, Dirk Holzinger, Francis Berenbaum and Claire Jacques.

Revue:

**“The danger from within: alarmins in
arthritis”**

The danger from within: alarmins in arthritis

Meriam Nefla¹, Dirk Holzinger², Francis Berenbaum^{1,3} and Claire Jacques¹

¹Sorbonne University, UPMC University Paris 06, UMR_S 938, F-75005 Paris, France; INSERM UMR_S938, UPMC Univ Paris 06, F-75012 Paris, France; Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (DHU i2B), 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, F-75012 Paris, France.

²Department of Pediatric Rheumatology and Immunology, University Children's Hospital Muenster, Muenster, Germany.

³Sorbonne University, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 938, F-75005 Paris, France; INSERM UMR_S938, UPMC Univ Paris 06, F-75012 Paris, France; Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (DHU i2B) and Department of Rheumatology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Saint-Antoine Hospital, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, F-75012 Paris, France.

Correspondence to: Francis Berenbaum, e-mail: francis.berenbaum@sat.aphp.fr.

Abstract

Alarmins, also called danger signal, are endogenous molecules with intracellular functions that are released to the extracellular milieu after infection or tissue damage. Once released, they interact with specific receptors expressed by cells engaged in host defense and tissue repair to stimulate appropriate signaling pathways. They initiate, thereby, innate and adaptive immune responses, triggering inflammation and/or tissue repair. Today, these molecules are considered markers of destructive processes during degenerative joint disease, primarily osteoarthritis (OA) and chronic inflammatory joint diseases such as rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and spondylarthropathy. In OA, high mobility group box 1 (HMGB1) and S100 proteins but also many other alarmins are abundantly secreted by joint cells to promote cartilage matrix catabolism, osteophyte formation, angiogenesis and hypertrophic differentiation. An involvement of alarmins in chronic inflammatory arthritides was confirmed by their elevated serum levels and their expression within inflamed synovia and/or synovial fluid. S100 proteins, HMGB1, interleukin 33 and other endogenous molecules promote deleterious effects and can recruit immune cells such as dendritic cells to the inflamed synovium to initiate the adaptive immune response and perpetuate disease. Better understanding of the pathological mechanisms of these danger signals is important to target new therapeutic approaches in arthritis.

Introduction

Arthritis is a leading cause of great disability for millions of adults; it includes degenerative joint diseases such as osteoarthritis (OA) and different forms of chronic inflammatory arthritis. OA is the most common joint disease worldwide, with numerous risk factors including aging, joint trauma and obesity (reviewed in 1). OA was previously considered to be driven only by cartilage degradation, but pathological processes in other tissues such as subchondral bone and synovium are now considered strongly implicated in the development of OA (2, 3). Chronic inflammatory arthritides comprise a group of conditions with the primary pathology involving inflammation of the synovium (synovitis). Representatives of these disease groups in adulthood are rheumatoid arthritis (RA), psoriatic arthritis (PsA) and spondylarthropathy (SpA) whereas the umbrella term “juvenile idiopathic arthritis” (JIA) encompasses the different chronic inflammatory arthritides of childhood and adolescence. RA alone affects 1% of the population and is associated with significant morbidity and increased mortality (4). The inflamed synovium mediates progressive damage and erosion to joint tissue such as articular cartilage, muscle tendons, periarticular ligaments and subchondral bone.

In arthritis, inflammatory processes are mediated by numerous factors released from joint tissues to promote joint destruction and pathological progression. Endogenous proteins called “alarmins” are released during inflammation and are involved in joint damage (5). The term “alarmin” was proposed by Oppenheim and co-workers in 2005 to classify proteins that are rapidly released during infection or tissue damage and activate immune cells after interaction with their specific receptors during host defense and tissue repair (6). Today, alarmins are considered markers of destructive processes in joints (7, 8). In this review, we focus on alarmins involved in the pathogenesis of arthritis, with extracellular levels associated with disease activity and joint destruction.

I - Alarmin family

Alarmins, also known as warning signals, belong to damage-associated molecular patterns (DAMPs). They are endogenous molecules rapidly released to the extracellular milieu during infection or tissue damage (6, 9, 10). The release is both passive, by cells undergoing necrosis, and active, by activated cells of the immune system (11). Active release of alarmins is suggested to be mediated by nonconventional secretory pathways independent of endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus (10, 12). Once released, alarmins can

recruit antigen-presenting cells (APCs), including dendritic cells (DCs). These cells initiate innate and adaptive immune responses, triggering inflammation and/or tissue regeneration (6, 9, 10). Alarmins bind to receptors expressed on the surface of cells engaged in host defense and tissue repair. Various receptors including Toll-like receptor 2 (TLR-2), TLR-4 and receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) recognize alarmins and transmit their signal to activate appropriate signaling pathways (6, 7, 10, 13). In the absence of injury or infection, alarmins play important intracellular roles such as regulating DNA transcription, calcium homeostasis, cell proliferation and differentiation. However, their high extracellular levels are involved in a wide range of pathogenic conditions and have been found related to disease severity in a wide range of autoimmune conditions and inflammatory disorders such as sepsis, psoriasis, traumatic brain injury, acute lung injury, inflammatory bowel disease and arthritis (14).

Alarmins not only initiate but also amplify and sustain the inflammatory processes and play a key role in the pathogenesis of inflammatory conditions (15, 16). However, in addition to activating phagocytes and release of pro-inflammatory cytokines, alarmins are an important link between the innate and adaptive immune system. For example, they can activate immature DCs, which process antigens and home to secondary lymphoid organs. In this case, they present antigenic epitopes to naive T cells, thereby inducing the adaptive immune response (17-19). Moreover, alarmins may also be capable of direct commitment towards a T helper 2 cell (Th2), Th17, or regulatory T-cell fate (15). Therefore, alarmins drive a local hyperinflammatory environment but might also prevent hyperactivation of the adaptive immune system, most likely to avoid the tissue damage from an overwhelming immune response (**Figure 1**).

II - Alarmins in OA

Progressive cartilage loss during OA is predominantly due to increased production of proteinases such as matrix metalloproteinases (MMPs) and aggrecanases (20). In addition to extracellular matrix remodeling, OA cartilage is also an active site for chondrocyte hypertrophy as well as proliferation and differentiation that promotes endochondral ossification (2, 20, 21). In vitro experiments showed that chondrocyte damage caused by mechanical cartilage injury stimulated the release of alarmins that activated chondrogenic progenitor cell migration. These cells can produce excessive secretion of chemokines, cytokines and destructive enzymes, for aberrant cartilage breakdown and joint inflammation

(22). Hence, blocking alarmin activity was proposed as a strategy to prevent posttraumatic joint inflammation (23).

During OA, subchondral bone undergoes also several changes, including sclerosis, angiogenesis, microfracture, cysts and osteophyte formation (reviewed in 2; 24). Some of bone changes are suggested to occur in early stages of OA (25). Moreover, osteoblasts respond to mechanical loading by increasing inflammation and the production of catabolic factors, which results in structural changes in subchondral bone and probably cartilage alteration (26). Furthermore, necrotic bone cells can release the alarmin HMGB1 (27). High levels of many alarmins were detected in synovial fluid (SF) of OA patients and were correlated with disease severity (28, 29, 30, 31). Several lines of evidence support synovial inflammation aggravating joint damage during OA. In fact, synovial activation occurs in 50% of human OA knees (32). The OA synovium is composed predominantly of macrophages. However, B- and T-cell infiltration has been described (33, 34), which suggests involvement of the adaptive immune system in OA. Activated synovial cells secrete several degenerative enzymes and inflammatory mediators as well as alarmins (35, 36, 37). These alarmins activate then pattern recognition receptors (PRRs) including TLR and RAGE in OA cartilage and the synovium (13, 38), which in turn amplifies inflammation and cartilage degeneration.

Thus, the following describes alarmins found at high levels extracellularly that enhance catabolic processes and inflammatory responses contributing to OA progression.

II-a) S100 Proteins

S100 proteins are a family of acidic small proteins (10–14 kDa), expressed exclusively in vertebrates and containing two elongation factor (EF)-hand calcium-binding motifs within their structure. Structural features of all S100 proteins are highly conserved, although some variability observed in the C-terminus and the hinge region between the two EF-hand structures contributes to the specificity of biological activity of different members (39, 40). These proteins are found in cells as homo-, heterodimers or multimers. When calcium binds to EF-hand motifs, the protein undergoes a change in its spatial conformation, for interaction with various target proteins (41, 42). Abundant extracellular release of some isoforms of S100 proteins is associated with several inflammatory diseases including OA (43, 44).

S100A4, also known as metastasin and calvasculin, is highly expressed in OA cartilage, binds to RAGE and activates Pyk-2, MAPK and NF- κ B pathways, thereby leading to increased production of MMP-13 and reactive oxygen species (ROS) in chondrocytes. Interleukin 7 (IL-7) can induce S100A4 release from chondrocytes via activation of

JAK/STAT signaling pathway and then S100A4 acts in an autocrine or paracrine manner to stimulate MMP-13 production via RAGE (43).

S100A8 and S100A9 (also known as myeloid-related protein 8 [MRP-8]/MRP-14 or calgranulin A and B) are highly expressed in monocytes, granulocytes and early differentiation stages of macrophages; they can form the heterodimeric complex S100A8/A9 (calprotectin). The proteins have been considered markers of a destructive process in the joint (45) and are found in heterodimers and tetramers abundantly secreted by immune cells during inflammation (46, 47, 48). S100A8 is the active component of this complex, whereas S100A9 exhibits regulatory functions and protects S100A8 against degradation (49, 50). Abundant amounts of S100A8/S100A9 were detected in SF (35) and in serum, the synovium and cartilage of OA patients and may predict joint destruction in OA (37, 51). S100A9 knockout ameliorated the pathologic features of the collagenase-induced OA (CIOA) mouse model in which synovitis is markedly observed. However, in the destabilized medial meniscus model (DMM) in mice, S100A9 knockout did not have any effect. The authors suggested that S100A8/9 is involved only when synovial activation is present (37). S100A8 production by macrophages could be induced by basic calcium phosphate crystals and in an Syk/PI3K-dependent manner. It could form a positive feedback loop in immune cells to induce the production of interleukins contributing to the catabolic chondrocyte phenotype (52). In addition, a role for S100A8/A9 in osteophyte formation was suggested in experimental OA (53), which agrees with a recent report showing S100A8/A9 effects mediated by canonical Wnt signaling, known to promote bone formation (54). S100A8/9 signaling was mediated via TLR-4 in OA chondrocytes (51). This finding was confirmed by a recent study showing that prophylactic treatment with paquinimod, an immunomodulatory compound preventing S100A9 binding to TLR-4, reduced the pathologic effects of S100A9 in CIOA and in the human OA synovium (55). More recently, TLR4 was suggested to mediate dorsal root ganglion neurons excitation by S100A8 contributing to joint nociceptors excitation and pain generation during OA (56).

S100A10, also known as p11, annexin II ligand, calpactin I or light polypeptide, can form a heterotetrameric complex (AIIIt) with its known ligand, annexin II, to serve as an extracellular binding partner for pathogens and host proteins (44). S100A10 could induce the production of tumor necrosis factor α (TNF- α), IL-1 β and IL-10 in human chondrocytes stimulated by lipopolysaccharide (LPS) via mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and NF- κ B signaling pathways (57). On the other hand, one study reported that the production of TNF- α by macrophages in response to exogenous AIIIt required TLR4 (58). Therefore,

S100A10 may involve TLR4 activation to induce inflammatory cytokine production by chondrocytes.

S100A11, also known as S100C and calgizzarin, acts in chondrocytes as a catabolic mediator (59). Its expression was recently found upregulated in human OA knee cartilage, with release by cultured chondrocytes on stimulation with TNF- α , and CXCL8 (21). Moreover, recombinant S100A11 can promote chondrocyte hypertrophic differentiation in a RAGE- and p38 MAPK-dependent manner (21). It can also induce both aggrecanase-generated-neoepitopes NITEGE and glycosaminoglycans release in cartilage explants; posttranslational modification of S100A11 by transglutaminase 2 (homodimerization) is required to acquire the capacity to signal through RAGE and modulate chondrocyte hypertrophy and cartilage matrix catabolism (59).

S100A12 (calgranulin C) is abundantly expressed by human neutrophils, monocytes and macrophages and significantly overexpressed in inflammatory compartments (60). Its expression is markedly increased in human OA cartilage and its addition to cultured human OA chondrocytes upregulated MMP-13 and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and release, thereby leading to cartilage degradation and angiogenesis. These increases were mediated by RAGE and p38 MAPK and NF- κ B pathways (61). Interestingly, proteomic analysis revealed S100A12 at high levels in SF of patients with OA (62). Moreover, S100A12 levels in SF were found correlated with symptomatic and radiographic severity of OA (29).

Finally, S100B was found expressed in chondrocytes (44) and to increase MMP-13 production via ERK and NF- κ B signaling pathways. This signaling was inhibited in cells pretreated with soluble RAGE, and pull-down assay confirmed specific binding of S100B to RAGE in chondrocytes (63) (**Figure 2**).

II-b) HMGB1

High mobility group box 1 (HMGB1), also known as amphoterin, is a 30-kDa non-histone nuclear protein. It contains two DNA binding boxes (A and B) and a C-terminal region (27) and is a highly conserved protein that exerts vital functions inside and outside the cell. When secreted outside the cell, it serves as an alarmin to stimulate the innate immune system and trigger inflammatory responses via its cell-surface receptors, cytokines and chemokines (64). HMGB1 was found overexpressed in synovial membranes of patients with knee OA (28). Its SF level was elevated in patients with knee OA and positively associated with disease severity (65), synovitis and pain (28). HMGB1 expression was also increased in human OA cartilage

and correlated with the OARSI histological score (66, 67). Upregulated HMGB1 was detected in joint tissues of the mouse spontaneous OA model STR/ort (68). OA synoviocytes were shown to release HMGB1 on stimulation with IL-1 β (69). These findings were further confirmed by studies showing that several inflammatory mediators including IL-1 β and TNF- α induced HMGB1 release from chondrocytes (67, 70). Moreover, stimulating chondrocytes with HMGB1 increased the release of chemokines, nitric oxide (66), IL-1 β and TNF- α (67). Articular chondrocytes stimulated with HMGB-1 showed increased MMP-13 production via binding to RAGE, which led to ERK MAPK and NF- κ B activation (63). However, HMGB1-induced MMP-13 expression was only partially inhibited by soluble RAGE, so other receptors are involved in the HMGB1 effects on chondrocytes. In this context, the treatment of murine chondrocytes and cartilage explants with HMGB1 stimulated matrix catabolism and chondrocyte hypertrophic differentiation dependent on TLR-2 and TLR-4 and their cytosolic adaptor molecule myeloid differentiation factor 88 (MyD) (70).

HMGB1 released from hypertrophic human chondrocytes was found to function as a chemoattractant for osteoclasts, osteoblasts and endothelial cells (ECs) and therefore suggested to play a role in endochondral ossification (71). Additionally, increased staining of HMGB1 was detected at the tidemark of cartilaginous and calcified fibrocartilage which suggests its significant role in the mineralization and enchondral bone formation at the cartilage-bone interface area (72). Moreover, HMGB1 is known as a bone active cytokine released from necrotic osteocytes and involved in bone remodeling (27).

In addition to this direct stimulation of cells, HMGB1 can form immunostimulatory complexes with cytokines, endogenous and exogenous factors. It was shown to cooperate with IL-1 β in OA synoviocytes (73) and with IL-1 α , IL-1 β and the microbial mediator LPS in synovial fibroblasts from OA patients (74) to promote inflammation and catabolic effects. These findings suggest that some of the HMGB1 functions in OA joint may be mediated by interaction with other pro-inflammatory mediators (**Figure 2**).

II-c) Heat-shock proteins (HSPs)

HSPs are highly conserved molecules showing strong homology between bacteria and eukaryotes. During infection, microbial HSPs are important antigens, whereas human HSPs act under physiological conditions as intracellular chaperones during synthesis of proteins or

clearance of misfolded proteins. Members of this family, in particular HSP60 and HSP70, have been identified as broad sensors of cellular stress. Under such stress (e.g., increased temperature, nutritional deficiency, exposure to pro-inflammatory mediators or viral infections), HSP60 and HSP70 are highly expressed and secreted into the extracellular space (75).

Hsp70 was found increased in OA chondrocytes (76), and highly detected in cartilage with severe OA (77). This protein is known to protect chondrocytes against NO-induced apoptosis by blocking caspase-3 activity and thereby to reduce OA progression (78). Its expression is known to be counteracted by HSP90.

In fact, *in vivo* Hsp90 inhibition resulted in increased Hsp70 synthesis (79). This study (79) has demonstrated that OA biomechanically-induced in rats results in Hsp90 induction that promotes cartilage degeneration, subchondral bone remodeling and synovial macrophages activation. Its inhibition using a synthetic inhibitor suppressed these deleterious effects and protected cartilage, most likely by subsequent increase of Hsp70. Authors suggest that chondrocytes may up-regulate Hsp70, in response to increased physical activity, in order to protect extracellular matrix against damage. However, persisting physical stress on cartilage could stimulate Hsp90 production, which counteracts Hsp70 protective effects and thus promotes OA development.

A particular class within the HSPs are the small HSPs (sHSPs), a family of proteins with molecular weight <30 kDa characterized structurally by a conserved core domain, called α -crystallin domain (80). Alpha B-crystalline, also known as hspb5, belongs to this family and was found decreased in OA cartilage relative to normal cartilage (81). Its differential expression during OA is suggested to be mainly regulated by inflammatory mediators due to its down-regulation following treatment of chondrocytes with IL-1 β and TNF- α (81). Hsp27 belonging also to sHSPs family showed a decreased expression in OA chondrocytes. Additionally, it has been reported that chondrocytes transfection with siRNA directed against Hsp27 mRNA sequence results in an induction of IL-6 secretion by IL-1 β suggesting that OA chondrocytes response to IL-1 β may be regulated in part by reduced Hsp27 expression (82). All together these results highlight the protective role played by members of sHSPs family during OA by maintaining chondrocyte homeostasis.

To better understand the alarmin activity of HSPs during osteoarthritis, further studies are needed to detect their possible presence in OA joint space and to identify their cell signaling pathways involved in repair and/or damage of tissues.

II-d) Other alarmins

There are many other molecules suggested to have alarmin activities and shown to play a critical role in OA pathogenesis (**summarized in Table 1**). In fact, some members of **annexins** (II, V and VI) have been shown to be overexpressed in OA cartilage and to be major components of matrix vesicles released by hypertrophic chondrocytes into the extracellular matrix to initiate the mineralization process in growth plate cartilage (83, 84). They are also able to induce chondrocytes apoptosis by increasing BCP crystal and TNF- α production (85). To activate macrophages, annexine II in heterotetrameric complex with S100A10 required TLR4 (58). Thereby, the mechanism of action of annexins in chondrocytes may be mediated by TLR4.

ATP is secreted by chondrocytes in response to mechanical compression (86). It was detected in SF of OA patients and found associated with knee pain which may be explained by the capacity of extracellular ATP to act on C fibres in the synovium (87). When released extracellularly, it stimulated PGE2 release from articular chondrocytes by acting on P2Y2-purine receptors and via p38 and ERK1/2 MAPKs activation (88). Moreover, it has reported that high levels of extracellular ATP induce cartilage mineralization by producing calcium crystal (89).

Galectin-3, a soluble protein belonging to galectins family, was found increased in OA human cartilage (90) and in OA synovial tissue during inflammatory phases in which leukocytes and macrophages infiltration occur (91) indicating that it could be released to joint space (92). Intra-articular injection of galectin-3 in mice knees induced joint swelling and generated lesions in both subchondral bone and cartilage tissue. Additionally, treatment with galectin-3 inhibited osteocalcin production by human OA osteoblasts and increased MMP-3 and ADAMTS5 expression by human OA chondrocytes (92).

IL-1 α , is a classical interleukin known as a danger signal (93) and believed to be involved in OA (94). It is secreted mostly by macrophages and with lesser amounts by chondrocytes and synovial fibroblasts (95) to act in autocrine and paracrine manner and promote early degenerative OA changes (96) by binding to its membrane receptor IL-1R (93). IL-1 α synovial fluid concentrations have been reported to be increased in moderate OA compared to mild OA porcine knee joints (97). Additionally, treatment with IL-1 α increased NO and MMP production in cartilage explants (97).

Thymosin β 4, belonging to thymosins family, has been shown to be increased after cartilage mechanical loading and to enhance activation of MMP 2 and 9 in chondrocytes (98). More

recently, high levels of thymosin β 4 in the serum and SF of OA patients were correlated with the radiographic severity of disease (30).

Uric acid level in SF of knee OA patients was found strongly correlated with SF IL-18 and IL-1 β and positively associated with OA severity evaluated by radiography and scintigraphy (31). Because IL-18 and IL-1 β production requires inflammasome activation, authors suggested thus that uric acid stimulate the production of these two cytokines in OA joint, probably from resident macrophages via inflammasome activation and through TLR2 and TLR4, in the same way that in gout (31).

Several extracellular matrix components are also classified as alarmins and play a crucial role in OA pathogenesis. Synovial fluid, as well as the cartilage matrix, of patients with OA contains high levels of **Fibronectin fragments** (99). They were shown to enhance NO (100) and catabolic cytokines production (TNF- α , IL-1 β , IL-1 α and IL-6) (101) by cartilage explants as well as MMP expression via TLR-2, NF- κ B and p38 MAPK activation in chondrocytes (102). However, they can bind also integrins and CD44 (103). **Low molecular hyaluronan**, generated following hyaluronan degradation, induced NO and MMP production in cultured articular chondrocytes by CD44 (104), TLR2 and TLR4/MyD88 (70) -dependent mechanisms. The same data (70) showed that LMW-HA also regulates cartilage hypertrophy by inducing type X collagen and Runx2 in chondrocytes. **Biglycan** is another extracellular matrix molecule found in advanced OA cartilage and SF to trigger catabolic process. It activates chondrocytes mainly through TLR4 and NF- κ B pathway, which results in ADAMTS-4/5, MMP, NO, cathepsin K and interleukins (IL-6 and IL-8) increase and anabolic markers (aggrecan and collagen type II) decrease expression resulting in a net loss of cartilage. In addition, soluble biglycan induced release of proteoglycans, collagen, NO and interleukins (IL-6 and IL-8) from chondrocytes, which may recruit thereafter inflammatory cells and amplify cartilage destruction (105). **Laminins**, trimer consisting of one of five α , one of four β , and one of three γ chains, are also involved in OA pathogenesis. Laminin- α 4 was found overexpressed in human osteoarthritic cartilage with high-grade lesions, and colocalizes with syndecan-4 in hypertrophic areas (106). Additionally, IL-1 effect on MMP3 expression by primary chondrocytes is markedly decreased following laminin- α 4 invalidation by blocking antibody. Thereby, it is suggested that laminins play a regulatory role on MMP expression and promote deleterious effects in OA cartilage (106). Other chains of laminin monomers were also found highly produced in pericellular matrix OA cartilage to promote chondrogenesis. Indeed, laminin- α 1, as well as laminin- α 5 up-regulate collagen type II,

COMP, and aggrecan expression and down-regulate collagen type I expression in chondrocytes (107). Thereby, it is suggested that laminins may be activated to repair damaged tissue but eventually results in cartilage destruction (106). **Tenascin-C** is also an extracellular matrix glycoprotein that has a dual role. Indeed, increased intensity of tenascin C staining has been observed in areas of damaged human OA cartilage relative to normal cartilage (108, 109). Moreover, the correlation between tenascin C levels in synovial fluid with degree of cartilage degradation (110) and radiographic severity of OA (111) has been well established. In one hand, Tenascin-C addition to chondrocytes *in vitro* induced ADAMTS4 expression and IL-6, IL-8, PGE2 and nitrate production through TLR4(109). On the other hand, deficiency of Tenascin-C in KO mice is associated with accelerated development of OA and delayed repair of cartilage damage (112). This was explained by the fact that only Tenascin-C fragments generated by proteases may induce in turn a positive feedback loop cartilage catabolism. However intact Tenascin-C promotes cartilage matrix repair (110). Finally, **aggrecan-derived fragments** were also found in OA SF (113). A recent data has identified aggrecan 32-mer fragment as a novel OA-relevant danger signal that accelerate cartilage destruction by inducing MMP and cytokines production via TLR2 and NF-KB activation in chondrocytes, synovial fibroblasts and macrophages (114).

Several other molecules play a crucial role in arthritis but confusion exists regarding their classification as alarmins. One example is neopterin (115), found at high levels in SF of OA patients (116). In addition, some isoforms of 14-3-3 proteins are released extracellularly in the joint (117, 118) and have been identified in exosomes released by activated immune cells, which suggests their active secretion during inflammation (118, 119). 14-3-3 ϵ isoform, detected in SF of OA patients, is released from osteoblasts in response to mechanical stress and is similar to other alarmins (ATP and thymosins) in inducing cartilage matrix degradation (117). Thus, extracellular isoforms of 14-3-3 proteins may be classified as alarmins derived from activated or damaged joint cells. However, further studies are required to identify their cell receptors and signaling pathways in joints.

III - Alarmins in chronic inflammatory arthritis

During chronic inflammatory arthritis, synovial inflammation and joint tissue damage are the two pathological key processes that lead to the clinical symptoms of pain, swelling, stiffness and loss of function (120, 121). Hallmarks of chronic synovitis are hyperplasia of the synovial lining layer cells, infiltration of leucocytes and angiogenesis. The synovial

membrane becomes hyperplastic, expands and forms villi. Pannus, the osteoclast-rich portion of the synovial membrane, destroys bone, whereas enzymes secreted by neutrophils, synoviocytes and chondrocytes degrade cartilage (122).

Cells of the innate and adaptive immune system that are expanded or recruited to the inflamed synovium include neutrophils, monocytes/macrophages, DCs, T and B cells as well as mast cells and resident fibroblast- and macrophage-like synoviocytes. Antigen-presenting cells present arthritis-associated antigens to T cells. Concurrently, CD4⁺ T cells that secrete IL-2 and interferon- γ infiltrate the synovial membrane. B cells contribute via antigen presentation but also through the production of autoantibodies and cytokines. T- and B-cell activation results in increased production of cytokines and chemokines, for a feedback loop for additional T-cell, macrophage and B-cell interactions (122).

Innate immune cells are responsible for major inflammatory effector mechanisms because they produce activated proteinases such as MMPs, ROS, antimicrobial peptides, complement, and a number of chemokines and cytokines (123). The release of cytokines such as TNF- α , IL-1 and IL-6 has numerous pro-inflammatory effects on recruited leucocytes, ECs and mesenchymal cells including fibroblast-like synoviocytes, chondrocytes and osteoclasts (124). A network of these signaling molecules links effector cells of innate and adaptive immunity as DCs and autoreactive lymphocytes.

III-a) S100 proteins

The significance of S100 proteins in inflammatory arthritis is based on their high extracellular expression in inflamed joints, their role in cellular recruitment and their cytotoxic effects (125, 126). The clinical relevance of the proteins is confirmed by their potential as markers of inflammatory disease activity (127) and radiographic progression (128). Elevated serum levels and expression within the inflamed synovium and/or SF of S100A8, S100A9 and/or the complex S100A8/A9, and S100A12, is reported in several chronic inflammatory arthritides such as RA (129, 130), JIA (131, 132), PsA (129, 133) and SpA (134).

Results from experimental arthritis models indicate a direct role of S100 proteins in synovitis (135). The expression of S100A8 and S100A9 is closely correlated to the intensity of inflammation in both antigen-induced (AIA) and immune complex-induced arthritis (ICA) in mice and their expression reflects the activation of synovial macrophages (136, 137). Their role is reflected in AIA in S100A9^{-/-} mice, which show reduced joint swelling and

proteoglycan depletion and little MMP-mediated cartilage destruction. Accordingly, intra-articular (i.a.) S100A8 injection into wild-type mice induced synovitis, depleted cartilage proteoglycan level and upregulated synovial mRNA levels of S100A8/A9, IL-1 and MMPs (44). Additionally, S100A8 mediates joint inflammation and cartilage destruction in AIA (138, 139). S100A8/A9 complexes can be used as a biomarker for molecular imaging of local inflammatory activity (140). S100A12 can also trigger synovial inflammation in collagen-induced arthritis in mice (141).

In RA, activated phagocytes in the synovium predominantly express S100A8 and S100A9 (142) with strong expression at the cartilage–pannus junction (130). However, in psoriatic arthritis, S100A8, -A9 and -A12 are expressed in a perivascular pattern in the subsynovial layer (129, 133). S100 levels are about 10-fold higher in SF than serum in patients with active inflammatory arthritis (125, 133) and may reflect an intra-articular origin from activated myeloid cells (143).

Because of the excellent correlation of S100 serum concentrations with synovitis activity, these proteins are useful diagnostic markers for monitoring arthritis (144). In JIA, the marker can be used to monitor the response to treatment, detect subclinical inflammation (131, 145, 146) and support diagnosis of systemic JIA in fever of unknown origin (126). S100A8/A9 has been established as a valuable diagnostic and prognostic biomarker in RA (127, 128, 147) (**Figure 3**).

III-b) HMGB1

The role of HMGB1 in chronic inflammatory arthritis has been extensively studied. HMGB1 is released locally at the site of joint inflammation (148-150). Intra-articular HMGB1 injection induces arthritis (151) and therapeutic blockade of HMGB1 prevents the progression of murine arthritis models (148, 152-154). In murine collagen-induced arthritis, HMGB1 induces synovitis, which can be blocked by HMGB-1–specific monoclonal antibodies (152). HMGB1 is significantly increased in the extracellular space and in the cytoplasm of macrophages, synoviocytes, fibroblasts, and ECs. HMGB1, TNF- α , and IL-1 β are particularly abundant in regions with tissue destruction, where proliferating synovial tissue invades cartilage and bone (155). Hypoxia might cause HMGB1 release (143). HMGB1 enhances the activity of tissue plasminogen activator and MMPs and activates osteoclastogenesis, thereby leading to cartilage and bone destruction (156, 157).

In human arthritis, extranuclear expression of HMGB-1 may be detected locally in SF

and serum of patients with RA (148, 149, 158) and JIA, where it is correlated with early-onset disease (159). HMGB1 levels are higher in SF with RA than OA, and its expression is prominent in ECs and macrophages (150). HMGB1 might induce an extension of the inflamed synovium by accelerating angiogenesis in RA via enhancing hypoxia-inducible factor 1 α activation (160). The ability of HMGB-1 to amplify the effect of local cytokines in RA has been suggested by its ability to stimulate SF-derived macrophages to release pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6 (150). IL-1 β , bacterial DNA, viral RNA, endotoxin, and other microbial molecules can form complexes with HMGB1 that synergistically enhance the innate immune response to both factors synergistically (161). HMGB1–LPS complexes might contribute to the development of RA because these complexes promote transformation to an RA synovial fibroblast-like phenotype (162) (**Figure 3**).

III-c) Heat-shock proteins (HSPs)

HSPs have been identified as immune targets in RA and JIA; interestingly, in contrast to other alarmins, HSPs seem to be associated with resolution rather than induction of inflammation. A specific receptor for the non–antigen-specific effects of secreted HSPs, such as cytokine release (e.g., TNF- α , IL-1 and IL-12) or induced maturation of DCs, has not been identified – potential candidates are CD91, TLRs, CD36, CD40 or CD14 (163).

The first indication that immune responses to HSPs have a regulatory role in inflammatory diseases was shown for mycobacteria-induced adjuvant arthritis (164). Thereafter, the protective effects of microbial HSPs were seen in many other experimental disease models (75).

In humans, HSP60 induces a subtype of CD4⁺/CD25⁺/FOXP3⁺ regulatory T cells, which is relevant for the resolution of inflammation. In JIA, the presence of these regulatory T cells has been identified as a prognostically favorable outcome factor (165, 166). In RA, HSP60-reactive T cells suppress TNF- α production of autologous peripheral blood mononuclear cells (167), and disease severity of RA might depend in part on the ability of human HSP60 to induce the production of anti-inflammatory IL-10 by such cells (168). Moreover, HSP-specific regulatory T cells can suppress proinflammatory effector T cells by secreting IL-4, IL-10 and transforming growth factor β (165, 169). Finally, transfer of these HSP-specific regulatory T cells could inhibit inflammation in animal models of arthritis (75, 169) (**Figure 3**).

III-d) IL-33

IL-33 is a member of the IL-1 family and primarily expressed as a nuclear protein, which is released upon cell damage or stress to act as an alarmin. It promotes pro-inflammatory effects by binding to an IL-1 receptor family member called ST2, which is expressed in cells of the innate and adaptive immune system. IL-33 signaling is involved in the pathogenesis of several experimental models of arthritis, contributes to increased erosion of bone and cartilage, and induces neutrophil migration (170). However, AIA or ICA is not impaired in IL-33-deficient mice, and IL-33 may play a modifying rather than a pivotal role in disease development of immune-mediated arthritis (171). IL-33 level is increased both in serum and SF of RA patients as compared to healthy donors or OA patients and decreases with successful treatment, although correlation with disease activity was not observed in all studies (171)

III-e) Mitochondrial DAMPs (mtDAMPs)

mtDAMPs such as oxidized mitochondrial DNA (mtDNA) and *N*-formyl peptides can be released by damaged mitochondria and trigger inflammation. In mice human and murine mtDNAs induce a monocyte/macrophage mediated arthritis and release of TNF α from murine splenocytes (172). Additionally, extracellular mtDNA was detected in SF of patients with RA, but not in control subjects (172, 173). Moreover, an increased mtDNA mutation frequency was observed in synovial tissue from patients with RA/PsA compared to controls. mtDNA mutations correlated positively with synovial inflammation and the frequency of mtDNA mutations was reduced after anti-TNF α therapy in line with disease activity. *In vitro* TNF α significantly induces mtDNA mutations suggesting that mtDNA mutation and oxidative damage driven by TNF α are implicated in the pathogenesis of inflammatory arthritis (174).

In the last years the role of mtDAMPs especially in the pathogenesis of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) has been further investigated. Extracellular mitochondrial formyl peptides and mtDNA activate human PMNs through formyl peptide receptor-1 (FPR-1) and TLR 9, respectively, thus leading to PMN migration and degranulation *in vitro* and *in vivo* (175). Furthermore, mtDAMPs are potent activators of human PMNs leading to L-selectin shedding, ROS production, degranulation and IL-8 release (176). Recently a new role for mtDNA in a murine model of lupus-like disease has been described. Neutrophil extracellular traps (NET) bound mtDNA is proinflammatory by inducing *IFNBI* and other pro-inflammatory cytokines in a stimulator of interferon genes

(STING) and TLR dependent manner (177).

III-f) Other alarmins

There is a growing list of DAMPS that are released by activated or necrotic cells and extracellular matrix (ECM) molecules that are upregulated on injury or degraded after tissue damage. Among them are molecules that induce inflammatory arthritis *in vivo* in mice such as fibronectin extradomain A (FN-EDA), which induces TLR-4–dependent activation of mast cells (158), and tenascin C, an extracellular matrix glycoprotein, which induces TLR-4–dependent cytokine release (178). Tenascin C–deficient mice were also protected against joint erosion and tissue destruction in an antigen-induced arthritis model (178). Blocking neutrophil elastase by ONO-5046 reduced the incidence and the severity of collagen-induced arthritis in both rats and mice (179). Antibody studies of SF or cartilage extracts of patients with chronic inflammatory arthritis suggest a role for molecules such as low-molecular-weight hyaluronic acid (180), which plays a critical role in activating APCs and promoting T-cell activation (181) or biglycans (182). Finally, ATP induces chemotaxis, cytokine release and ROS generation via P2X and P2Y receptors (183).

V - Conclusions

Alarmins play a key role in the pathological process during arthritis. Their excessive and chronic release result in aberrant joint inflammation and cartilage destruction. However, some of these molecules can engage tissue repair and resolve inflammation after joint damage. A wide variety of alarmins originating from distinct joint cells are released extracellularly to create networks able to form feedback loops and amplify joint damage and inflammation. Among the different forms of arthritis, common alarmins include but are not limited to HMGB1, HSPs and S100 proteins, with similar and different effects (**Table 2**). When released to the extracellular milieu, these mediators can crosslink different receptors on the same cell and simultaneously activate many signal transduction pathways within joint cells, thereby leading to destructive inflammation. Thus, the development of preventive and therapeutic strategies for arthritis seems to strongly depend on the early detection and inhibition of these danger signals. Undoubtedly, the level of alarmins in serum and SF may be a useful diagnostic and prognostic biomarker of arthritis. Similar to inflammatory biomarkers such as CRP, erythrocyte sedimentation rate (ESR), serum levels of S100 proteins correlate with several inflammatory disease activity such as in sepsis, Kawasaki disease, psoriasis and

cystic fibrosis (14). Their concentrations correlate also with synovitis activity and are useful diagnostic markers for monitoring arthritis (144). In various inflammatory arthritides, serum levels of S100A8/S100A9 were found to correlate better with disease activity and joint destruction than classical markers of inflammation (133,184). Additionally, serum S100A12 concentrations in the children with systemic onset (So) JIA were able to differentiate SoJIA from infections with high sensitivity and specificity, contrary to CRP or ESR (185). Apart that, alarmins provide more specific indications compared to traditional markers, due to their local expression and direct release in response to tissue injuries (14). Accordingly, it could be more beneficial to measure alarmins than general markers in arthritis. Alarmins could also be a promising biomarker to predict response to biological therapy in arthritis. In fact, S100A8/S100A9 examination could be an additional value in the assessment of RA patients under biologic treatment (127,147). Decreasing serum level of S100A12 could reflect attenuated synovial neutrophil activation during successful anti-inflammatory therapy (intra-articular corticosteroid) in RA (143). It is the case of serum and SF IL-33 levels which are found increased in RA patients but decreased with treatment (171). Because of its association with disease severity, HMGB-1 is also suggested be a biomarker in arthritis that may predict response to treatment (186). Thus, alarmins could serve as a novel target for future therapeutic interventions in arthritis. Inhibiting their pathways could be a therapeutically beneficial approach to patients. Indeed, blocking the actions of alarmins in injured joints may prevent joint destruction. Indeed, blockade of the proinflammatory effects of S100A8 and S100A9 was effective in murine models (187) and there is evidence that S100A12-dependent cell activation and recruitment can be inhibited by either anti-S100A12 antibodies or soluble RAGE constructs (188). Besides agents blocking alarmins, immune intervention by epitope-specific therapy might be a promising approach leading to an immune tolerance to alarmins. In fact, preliminary clinical trials with epitope-specific immunotherapy have shown promising results (189, 190). However, further confirmation of this beneficial effect needs to be demonstrated in larger cohorts with long-term follow-up.

Acknowledgements

The research was supported by INSERM, the University of Paris 6 (Pierre and Marie Curie). Arthritis R&D (ROAD: Research on Osteoarthritic Diseases) and the ANR (French National Research Agency). D.H. acknowledges support from the Interdisciplinary Centre of Clinical Research (IZKF), Münster, Germany (Clinical Research Award CRA0) and the German Ministry for Education and Science (BMBF 01GM08100, AID-Net).

Author contributions

All authors contributed equally to all aspects of the manuscript (researching data for the article, discussions of its content, writing, review and editing of the manuscript before submission).

Competing interests

D.H. declares that he has received speaker's fees from Novartis. The other authors declare no competing interests.

Key Points

- Alarmins are endogenous molecules rapidly released to the extracellular milieu during infection and tissue damage and activate pattern recognition receptors (PRRs), including TLR and RAGE.
- In arthritis, including degenerative joint disease (osteoarthritis) and chronic inflammatory arthritis (rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, spondylarthropathy), extracellular levels of alarmins are related to disease activity and joint destruction.
- In osteoarthritis, S100 proteins and HMGB1 are the two major alarmins leading to a positive feedback loop of synovial cell reactivation, inflammation and cartilage degradation.
- S100 proteins, HMGB1, HSP and IL-33 are major alarmins involved in chronic inflammatory arthritis, where they are an important link between the innate and adaptative immune system.
- The level of alarmins in serum and SF may be a useful diagnostic and prognostic biomarker of arthritis, and inhibiting their pathways could be a therapeutically beneficial approach to patients.

Review Criteria

We searched MEDLINE via PubMed with the following MeSH terms “alarmin”, “DAMP”, osteoarthritis”, “rheumatoid arthritis”, “psoriatic arthritis”, “spondylarthropathy”, “inflammation”, “HMGB1”, “S100”, “HSP”, “IL-33”, “annexins”, “ATP”, “galectins”, “IL-1 α ”, “tenascin-c”, “thymosins”, “uric acid”, fibronectin”, “laminin”, “biglycan”, “Low

molecular hyaluronan” with no restriction on year of publication (published up to February 2016)

References

1. Palazzo, C. et al. Risk factors and burden of osteoarthritis. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* **59**, 134-138 (2016).
2. Abramson, S. B. & Attur, M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. *Arthritis. Res. Ther.* **11**, 227 (2009).
3. Bijlsma, J. W. et al. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet.* **377**, 2115-2126 (2011).
4. Firestein, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* **423**, 356-361 (2003).
5. Foell, D. Wittkowski, H. & Roth, J. Mechanisms of disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **7**, 382-390 (2007).
6. Oppenheim, J. J. & Yang, D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 359-365 (2005).
7. Liu-Bryan, R. & Terkeltaub, R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **11**, 35–44 (2015).
8. Houard, X. , Goldring, M. B. & Berenbaum, F. Homeostatic Mechanisms in Articular Cartilage and Role of Inflammation in Osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* **15**, 375(2013).
9. Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology* **81**, 1-5 (2007).
10. Harris, H. E. & Rautava A. Alarmin(g) news about danger: workshop on innate danger signals and HMGB1. *EMBO Rep.* **7**, 774-778 (2006).
11. Pugin. J. Dear SIRS, the concept of “alarmins” makes a lot of sense! *Intensive Care Med.* **34**, 218–221(2008).
12. Pisetsky, D. S. et al. HMGB1 and Microparticles as Mediators of the Immune Response to Cell Death. *Antioxid. Redox. Signal.* **15**, 2209-2219 (2011).
13. Loeser, R. F. et al. Osteoarthritis A Disease of the Joint as an Organ. *Arthritis Rheum.* **64**, 1697–1707 (2012).
14. Chan, J. K. et al. Alarmins: awaiting a clinical response. *J.Clin. Invest.* **122**, 2711–2719 (2012).

15. Manfredi, A. A. et al. Regulation of dendritic- and T-cell fate by injury-associated endogenous signals. *Crit. Rev. Immunol.* **29**, 69-86 (2009).
16. Tamaki, Y. et al. Expression of Toll-like receptors and their signaling pathways in rheumatoid synovitis. *J. Rheumatol.* **38**, 810-820 (2011).
17. Dumitriu, I. E. et al. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J. Immunol.* **174**, 7506-7515 (2005).
18. Yang, D. et al. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 59-66 (2007).
19. Yang, D. et al. The alarmin functions of high-mobility group proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1799**, 157-163 (2010).
20. Goldring, M. B. & Goldring, S. R. Osteoarthritis. *J. Cell. Physiol.* **213**, 626–634 (2007).
21. Denise, L. C. et al. Inflammation-Induced Chondrocyte Hypertrophy Is Driven by Receptor for Advanced Glycation End Products. *J. Immunol.* **175**, 8296-8302 (2005).
22. Seol, D. et al. Chondrogenic Progenitor Cells Respond to Cartilage Injury. *Arthritis Rheum.* **64**, 3626–3637 (2012).
23. Buckwalter, J. A. et al. The Roles of Mechanical Stresses in the Pathogenesis of Osteoarthritis: Implications for Treatment of Joint Injuries. *Cartilage* **4**, 286–294 (2013).
24. Glyn-Jones, S. et al. Osteoarthritis. *Lancet* **386**, 376–387 (2015).
25. Weinans, H. et al. Pathophysiology of peri-articular bone changes in osteoarthritis. *Bone.* **51**, 190–196 (2012).
26. Sanchez, C. et al. Regulation of Subchondral Bone Osteoblast Metabolism by Cyclic Compression. *Arthritis Rheum.* **64**, 1193–1203 (2012).
27. Bidwell, J. P. et al. Is HMGB1 an Osteocyte Alarmin? *J. Cell. Biochem.* **103**, 1671–1680 (2008).
28. Ke, X. et al. Synovial Fluid HMGB-1 Levels are Associated with Osteoarthritis Severity. *Clin. Lab.* **61**, 809-818 (2015).
29. Wang, L. C. et al. S100A12 levels in synovial fluid may reflect clinical severity in patients with primary knee osteoarthritis. *Biomarkers* **18**, 216-220 (2013).
30. Wei, M. et al. Increased thymosin β 4 levels in the serum and SF of knee osteoarthritis patients correlate with disease severity. *Regul. Pept.* **185**, 34-36 (2013).
31. Denoble, A. E. et al. Uric acid is a danger signal of increasing risk for osteoarthritis through inflammasome activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **108**, 2088-2093 (2011).

32. Ayral, X. et al. Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis: results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. *Osteoarthritis Cartilage* **13**, 361-367 (2005).
33. Benito, M. J. et al. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **64**, 1263–1267 (2005).
34. Da, R. R. et al. B Cell Clonal Expansion and Somatic with Osteoarthritis Genes in the Synovial Membrane of Patients Hypermutation of Ig Variable Heavy Chain. *J. Immunol.* **178**, 557-565 (2007).
35. Sunahori, K. et al. The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **8**, 69 (2006).
36. Daghestani, H. N. et al. Inflammatory biomarkers in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **23**, 1890-1896 (2015).
37. Van Lent, P. L. et al. Active Involvement of Alarmins S100A8 and S100A9 in the Regulation of Synovial Activation and Joint Destruction During Mouse and Human Osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **64**, 1466–1476 (2012).
38. Liu-Bryan, R. & Terkeltaub, R. The Growing Array of Innate Inflammatory Ignition Switches in Osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **64**, 2055–2058 (2012).
39. Marenholz, I. et al. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 1111–1122 (2004).
40. Donato, R. Intracellular and Extracellular Roles of S100 Proteins. *Microsc. Res. Tech.* **60**, 540–551 (2003).
41. Ruse, M. et al. S100A7, S100A10, and S100A11 Are Transglutaminase Substrates. *Biochemistry* **40**, 3167-3173 (2001).
42. Meijer, B. et al. The Role of S100A12 as a Systemic Marker of Inflammation. *Int. J. Inflam.* **2012**, 907078-907084 (2012).
43. Yammani, R.R. Interleukin-7 Stimulates Secretion of S100A4 by Activating the JAK-STAT Signaling Pathway in Human Articular Chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **60**, 792–800 (2009).
44. Donato, R. et al. Functions of S100 Proteins. *Curr. Mol. Med.* **13**, 24–57 (2013).
45. Van den Berg, W. B. Osteoarthritis year 2010 in review: pathomechanisms. *Osteoarthritis Cartilage* **19**, 338-341(2011).

46. Van Lent, P. L. Stimulation of Chondrocyte-Mediated Cartilage Destruction by S100A8 in Experimental Murine Arthritis. *Arthritis Rheum.* **58**, 3776–3787 (2008).
47. Nacken, W. et al. S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. *Microsc. Res. Tech.* **60**, 569-580 (2003).
48. Vogl, T. et al. Pro-Inflammatory S100A8 and S100A9 Proteins: Self-Assembly into Multifunctional Native and Amyloid Complexes. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 2893-2917 (2012).
49. Van Lent, P. L. et al. Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 1750–1758 (2008).
50. Vogl, T. et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat. Med.* **13**, 1042-1049 (2008).
51. Schelbergen, R.F.P. et al. Alarmins S100A8 and S100A9 Elicit a Catabolic Effect in Human Osteoarthritic Chondrocytes That Is Dependent on Toll-like Receptor 4. *Arthritis Rheum.* **64**, 1477–1487 (2012).
52. Cunningham, C. C. et al. Osteoarthritis-associated basic calcium phosphate crystals induce pro-inflammatory cytokines and damage-associated molecules via activation of Syk and PI3 kinase. *Clin.Immunol.* **144**, 228–236 (2012).
53. Schelbergen, R. F. P. et al. Alarmins S100A8/S100A9 aggravate osteophyte formation in experimental osteoarthritis and predict osteophyte progression in early human symptomatic osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 218-225 (2014).
54. Van Den Bosch, M. H. et al. The alarmins S100A8/A9 induce canonical Wnt signaling in murine knee joints; implications for osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* **68**,152-163 (2016).
55. Schelbergen, R. F. P. et al. Prophylactic treatment with S100A9 inhibitor paquinimod reduces pathology in experimental collagenase-induced osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 2254–2258 (2015).
56. Miller, R. et al. Damage-Associated Molecular Patterns Generated in Osteoarthritis Directly Excite Murine Nociceptive Neurons Through Toll-like Receptor 4. *Arthritis Rheum.* **67**, 2933–2943 (2015).
57. Song, C. et al. Regulation of inflammatory response in human chondrocytes by lentiviral mediated RNA interference against S100A10. *Inflamm. Res.* **61**, 1219–1227(2012).

58. Swisher J. F. et al. AnnexinA2 tetramer activates human and murine macrophages through TLR4. *Blood* **115**, 549-558 (2010).
59. Cecil, D. L. & Terkeltaub, R. Transamidation by Transglutaminase 2 Transforms S100A11 Calgranulin into a Pro-catabolic Cytokine for Chondrocytes. *J Immunol.* **180**, 8378–8385 (2008).
60. Kosaki, A. et al. Increased Plasma S100A12 (EN-RAGE) Levels in Patients with Type 2 Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 5423-5428 (2004).
61. Nakashima, M. et al. Role of S100A12 in the pathogenesis of osteoarthritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **422**, 508-514 (2012)
62. Han, M. et al. Identification of Osteoarthritis Biomarkers by Proteomic Analysis of Synovial Fluid. *J. Int. Med. Res.* **40**, 2243 – 2250 (2012).
63. Loeser, R. F. et al. Articular Chondrocytes Express the Receptor for Advanced Glycation End Products. Potential Role in Osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **52**, 2376–2385 (2005).
64. Magna, M. & Pisetsky, DS. The Role of HMGB1 in the Pathogenesis of Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Mol. Med.* **20**, 138-146 (2014).
65. Li, Z. C. et al. Correlation of synovial fluid HMGB-1 levels with radiographic severity of knee osteoarthritis. *Clin. Invest. Med.* **34**, 298-303 (2011).
66. Amin, A. R. & Islam, A. B. Genomic Analysis and Differential Expression of HMG and S100A Family in Human Arthritis: Upregulated Expression of Chemokines, IL-8 and Nitric Oxide by HMGB1. *DNA Cell Biol.* **33**, 550-565 (2014).
67. Terada, C. et al. Gene Expression and Localization of High-mobility Group Box Chromosomal Protein-1 (HMGB-1) in Human Osteoarthritic Cartilage. *Acta Med. Okayama* **65**, 369-377 (2011).
68. Kyostio-Moore, S. et al. STR/ort Mice, a Model for Spontaneous Osteoarthritis, Exhibit Elevated Levels of Both Local and Systemic Inflammatory Markers. *Comp. Med.* **61**, 346-355 (2011).
69. Garcia-Arnanidis, I et al. Haem oxygenase-1 down-regulates high mobility group box 1 and matrix metalloproteinases in osteoarthritic synoviocytes. *Rheumatology.* **49**, 854–861 (2010).
70. Liu-Bryan, R. & Terkeltaub, R. Chondrocyte Innate Immune MyD88-dependent Signaling Drives Pro-Catabolic Effects of the Endogenous TLR2/TLR4 Ligands LMW-HA and HMGB1. *Arthritis Rheum.* **62**, 2004–2012 (2010).

71. Taniguchi N. et al. Stage-Specific Secretion of HMGB1 in Cartilage Regulates Endochondral Ossification. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 5650-5663 (2007).
72. Heinola, T. et al. High mobility group box-1 (HMGB-1) in osteoarthritic cartilage. *Clin. Exp. Rheumatol.* **28**, 511-518 (2010).
73. García-Arnandis, I. et al. High mobility group box 1 potentiates the pro-inflammatory effects of interleukin-1b in osteoarthritic synoviocytes. *Arthritis Res. Ther.* **12**, 165 (2010).
74. Wähämaa, H. et al. High mobility group box protein 1 in complex with lipopolysaccharide or IL-1 promotes an increased inflammatory phenotype in synovial fibroblasts. *Arthritis Res. Ther.* **13**, 136 (2011).
75. Van Eden, W. , van der Zee, R. & Prakken, B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat. Rev.Immunol.* **5**, 318-330 (2005).
76. Kubo, T. et al. Stress-induced proteins in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **28**, 1140-1145 (1985).
77. Takahashi, K. et al. Localization of Heat Shock Protein in Osteoarthritic Cartilage. *Rheumatology.* **26**, 368-375 (2009).
78. Terauchi, R. et al. Hsp70 prevents nitric oxide-induced apoptosis in articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **48**, 1562-1568 (2003).
79. Siebelt, M. et al. Hsp90 inhibition protects against biomechanically induced osteoarthritis in rats. *Arthritis Rheum.* **65**, 2102-2112 (2013).
80. Lambrecht, S. Heat-shock proteins in stromal joint tissues: innocent bystanders or disease-initiating proteins? *Rheumatology* **53**, 223-32 (2014).
81. Lambrecht . S et al. Differential Expression of α -B-Crystallin and Evidence of Its Role as a Mediator of Matrix Gene Expression in Osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **60**, 179–188 (2009)
82. Lambrecht, S. et al. Proteome characterization of human articular chondrocytes leads to novel insights in the function of small heat-shock proteins in chondrocyte homeostasis. *Osteoarthritis Cartilage* **18**, 440-446 (2010).
83. Kirsch, T. et al. Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* **8**, 294–302 (2000).
84. Pfander, D. ,Swoboda, B. & Kirsch, T. Expression of early and late differentiation markers (Proliferating Cell Nuclear Antigen, Syndecan-3, Annexin VI, and Alkaline Phosphatase) by human osteoarthritic chondrocytes. *Am. J. Pathol.* **159**, 1777-1783 (2001).

- 85.** Ea, H. K. Et al. Annexin 5 overexpression increased articular chondrocyte apoptosis induced by basic calcium phosphate crystals. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 1617–1625 (2008).
- 86.** Graff, R. D. et al. ATP release by mechanically loaded porcine chondrons in pellet culture. *Arthritis Rheum.* **43**, 1571–1579 (2000).
- 87.** Kumahashi, N. et al. Correlation of changes in pain intensity with synovial fluid adenosine triphosphate levels after treatment of patients with osteoarthritis of the knee with high-molecular-weight hyaluronic acid. *The Knee* **18**, 160–164 (2011).
- 88.** Berenbaum, F. et al. concomitant recruitment of ERK1/2 and p38MAPK signalling pathway is required for activation of cytoplasmic phospholipase A2 via ATP in articular chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **278**, 13680-13687(2003).
- 89.** Ryan, L. M. et al. ATP-induced chondrocalcinosis. *Arthritis Rheum.* **35**, 1520-1525 (1992).
- 90.** Guévremont, M. et al. Galectin-3 surface expression on human adult chondrocytes: a potential substrate for collagenase-3. *Ann. Rheum. Dis.* **63**, 636-643 (2004).
- 91.** Ohshima, S. et al. Galectin 3 and Its Binding Protein in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* **48**, 2788-2795 (2003).
- 92.** Janelle-Montcalm, A. et al. Extracellular localization of galectin-3 has a deleterious role in joint tissues. *Arthritis Res. Ther.* **9**, 20 (2007).
- 93.** Hirsiger, S. et al. Danger Signals Activating the Immune Response after Trauma. *Mediators Inflamm.* **2012**, 315941-315951(2012).
- 94.** Goldring, MB. et al. Osteoarthritis and Cartilage: The Role of Cytokines. *Curr. Rheumatol. Rep.* **2**, 459-465 (2000).
- 95.** Pelletier, J. P. et al. Are Cytokines Involved in Osteoarthritic Pathophysiology? *Semin. Arthritis Rheum.* **20**, 12-25 (1991).
- 96.** Towle, C. A et al. Detection of interleukin-1 in the cartilage of patients with osteoarthritis: a possible autocrine/paracrine role in pathogenesis. *Osteoarthritis Cartilage* **5**, 293-300 (1997).
- 97.** McNulty, A. L. et al. Synovial fluid concentrations and relative potency of interleukin-1 alpha and beta in cartilage and meniscus degradation. *J. Orthop. Res.* **31**, 1039-1045(2013)

98. Blain, E. J. et al. The effect of thymosin beta4 on articular cartilage chondrocyte matrix metalloproteinase expression. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 879-882 (2002).
99. Homandberg, G. A. et al. Cartilage damaging activities of fibronectin fragments derived from cartilage and synovial fluid. *Osteoarthritis Cartilage* **6**, 231-244 (1998).
100. Pichika, R. and Homandberg, G. A. Fibronectin fragments elevate nitric oxide (NO) and inducible NO synthetase (iNOS) levels in bovine cartilage and iNOS inhibitors block fibronectin fragment mediated damage and promote repair. *Inflamm. Res.* **53**, 405-412 (2004).
101. Homandberg, G. A. & Hui, F. Association of proteoglycan degradation with catabolic cytokine and stromelysin release from cartilage cultured with fibronectin fragments. *Arch. Biochem. Biophys.* **334**, 325-331 (1996).
102. Hwang, HS. Et al. Fibronectin fragment induced expression of matrix metalloproteinases is mediated by MyD88-dependent TLR-2 signaling pathway in human chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 320 (2015).
103. Yasuda, T. Cartilage destruction by matrix degradation products. *Mod. Rheumatol.* **16**, 197-205 (2006).
104. Ohno S. et al. Hyaluronan oligosaccharides induce Matrix Metalloproteinase 13 via transcriptional activation of NFκB and p38 MAP Kinase in articular chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **281**, 17952-17960 (2006).
105. Barreto, G. et al. Soluble biglycan: a potential mediator of cartilage degradation in osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 379 (2015).
106. Fuerst, FC. et al. Regulation of MMP3 by laminin alpha 4 in human osteoarthritic cartilage. *Scand. J. Rheumatol.* **40**, 494-496 (2011).
107. Schminke, B. et al. Laminins and Nidogens in the Pericellular Matrix of Chondrocytes: Their Role in Osteoarthritis and Chondrogenic Differentiation. *Am. J. Pathol.* **186**, 410-418 (2015).
108. Nakoshi Y. et al. Regulation of tenascin-C expression by tumor necrosis factor-alpha in cultured human osteoarthritis chondrocytes. *J. Rheumatol.* **35**, 147-152 (2008).
109. Patel, L. et al. Tenascin-C induces inflammatory mediators and matrix degradation in osteoarthritic cartilage. *BMC. Musculoskelet Disord.* **12**, 164 (2011).

- 110.** Chockalingam, P. S. et al. Tenascin-C levels in synovial fluid are elevated after injury to the human and canine joint and correlate with markers of inflammation and matrix degradation. *Osteoarthritis and Cartilage* **21**, 339-45 (2013).
- 111.** Hasegawa, M. et al. Tenascin-C concentration in synovial fluid correlates with radiographic progression of knee osteoarthritis. *J. Rheumatol.* **31**, 2021-2026 (2004).
- 112.** Okamura, N. et al. Deficiency of tenascin-C delays articular cartilage repair in mice. *Osteoarthritis Cartilage* **18**, 839-848 (2010).
- 113.** Lohmander, L. S. et al. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint injury, and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **36**, 1214-1222 (1993).
- 114.** Lees, S. et al. Bioactivity in an aggrecan 32-mer fragment is mediated via Toll-like Receptor 2. *Arthritis Rheum.* **67**, 1240-1249 (2015).
- 115.** Manson, J., Thiemermann, C. & Brohi, K. Trauma alarmins as activators of damage-induced inflammation. *Br. J. Surg.* **99**, 12-20 (2012).
- 116.** Zhou, SJ., Sun, ZX. & Liu, J. Neopterin concentrations in synovial fluid may reflect disease severity in patients with osteoarthritis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **73**, 344-348 (2013).
- 117.** Priam, S. et al. Identification of Soluble 14-3-3 ϵ as a Novel Subchondral Bone Mediator Involved in Cartilage Degradation in Osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **65**, 1831-1842 (2013).
- 118.** Maksymowych, W.P. & Marotta, A. 14-3-3 η : a novel biomarker platform for rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **32**, 35-39 (2014).
- 119.** Théry, C. et al. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 581-593 (2009).
- 120.** Prakken, B., Albani, S. & Martini, A. Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet* **377**, 2138-2149 (2011).
- 121.** Lee, D.M. & Weinblatt, M.E. Rheumatoid arthritis. *Lancet* **358**, 903-911 (2001).
- 122.** Choy, E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **51 Suppl 5**, v3-11 (2012).
- 123.** Muller-Ladner, U., Pap, T., Gay, R.E., Neidhart, M. & Gay, S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **1**, 102-110 (2005).

- 124.** McInnes, I.B. & Schett, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 429-442 (2007).
- 125.** Frosch, M. et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **43**, 628-637 (2000)
- 126.** Kessel, C., Holzinger, D. & Foell, D. Phagocyte-derived S100 proteins in autoinflammation: putative role in pathogenesis and usefulness as biomarkers. *Clin. Immunol.* **147**, 229-241 (2013).
- 127.** Choi, I.Y. et al. MRP8/14 serum levels as a strong predictor of response to biological treatments in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 499-505 (2015).
- 128.** Hammer, H.B. et al. Calprotectin (a major S100 leucocyte protein) predicts 10-year radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 150-154 (2010).
- 129.** Foell, D. et al. Expression of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **42**, 1383-1389 (2003).
- 130.** Youssef, P. et al. Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane. *J. Rheumatol.* **26**, 2523-2528 (1999).
- 131.** Foell, D. et al. Monitoring neutrophil activation in juvenile rheumatoid arthritis by S100A12 serum concentrations. *Arthritis Rheum.* **50**, 1286-1295 (2004).
- 132.** Frosch, M. et al. Expression of myeloid-related proteins 8 and 14 in systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **48**, 2622-2626 (2003).
- 133.** Kane, D. et al. Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum.* **48**, 1676-1685 (2003).
- 134.** Kruithof, E. et al. Synovial histopathology of psoriatic arthritis, both oligo- and polyarticular, resembles spondyloarthropathy more than it does rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **7**, R569-580 (2005).
- 135.** Imamichi, T. et al. Expression and cloning of migration inhibitory factor-related protein (MRP)8 and MRP14 in arthritis-susceptible rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 819-825 (1993).
- 136.** van Lent, P. et al. The inhibitory receptor FcγRII reduces joint inflammation and destruction in experimental immune complex-mediated arthritides not only by inhibition of

FcγRI/III but also by efficient clearance and endocytosis of immune complexes. *Am. J. Pathol.* **163**, 1839-1848 (2003).

137. Nabbe, K.C. et al. Coordinate expression of activating Fc gamma receptors I and III and inhibiting Fc gamma receptor type II in the determination of joint inflammation and cartilage destruction during immune complex-mediated arthritis. *Arthritis Rheum.* **48**, 255-265 (2003).

138. van Lent, P.L. et al. S100A8 causes a shift toward expression of activatory Fcγ receptors on macrophages via toll-like receptor 4 and regulates Fcγ receptor expression in synovium during chronic experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* **62**, 3353-3364 (2010).

139. Grevers, L.C. et al. S100A8 enhances osteoclastic bone resorption in vitro through activation of Toll-like receptor 4: implications for bone destruction in murine antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **63**, 1365-1375 (2011).

140. Vogl, T. et al. Alarmin S100A8/S100A9 as a biomarker for molecular imaging of local inflammatory activity. *Nat. Commun.* **5**, 4593 (2014).

141. Hofmann, M.A. et al. RAGE and arthritis: the G82S polymorphism amplifies the inflammatory response. *Genes Immun.* **3**, 123-135 (2002).

142. Odink, K. et al. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature* **330**, 80-82 (1987).

143. Wittkowski, H. et al. Effects of intra-articular corticosteroids and anti-TNF therapy on neutrophil activation in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **66**, 1020-1025 (2007).

144. Foell, D. & Roth, J. Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. *Arthritis Rheum.* **50**, 3762-3771 (2004).

145. Holzinger, D. et al. The Toll-like receptor 4 agonist MRP8/14 protein complex is a sensitive indicator for disease activity and predicts relapses in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 974-980 (2012).

146. Moncrieffe, H. et al. A subgroup of juvenile idiopathic arthritis patients who respond well to methotrexate are identified by the serum biomarker MRP8/14 protein. *Rheumatology (Oxford)* **52**, 1467-1476 (2013).

147. Hammer, H.B., Fagerhol, M.K., Wien, T.N. & Kvien, T.K. The soluble biomarker calprotectin (an S100 protein) is associated to ultrasonographic synovitis scores and is sensitive to change in patients with rheumatoid arthritis treated with adalimumab. *Arthritis Res. Ther.* **13**, R178 (2011).

- 148.** Hamada, T. et al. Extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 is a coupling factor for hypoxia and inflammation in arthritis. *Arthritis Rheum.* **58**, 2675-2685 (2008).
- 149.** Kokkola, R. et al. High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis. *Arthritis Rheum.* **46**, 2598-2603 (2002).
- 150.** Taniguchi, N. et al. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum.* **48**, 971-981 (2003).
- 151.** Pullerits, R. et al. High mobility group box chromosomal protein 1, a DNA binding cytokine, induces arthritis. *Arthritis Rheum.* **48**, 1693-1700 (2003).
- 152.** Kokkola, R. et al. Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. *Arthritis Rheum.* **48**, 2052-2058 (2003).
- 153.** Ostberg, T. et al. Oxaliplatin retains HMGB1 intranuclearly and ameliorates collagen type II-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **10**, R1 (2008).
- 154.** Tian, J. et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat. Immunol.* **8**, 487-496 (2007).
- 155.** Palmblad, K. et al. Morphological characterization of intra-articular HMGB1 expression during the course of collagen-induced arthritis. *Arthritis. Res. Ther.* **9**, R35 (2007).
- 156.** Parkkinen, J. & Rauvala, H. Interactions of plasminogen and tissue plasminogen activator (t-PA) with amphotericin. Enhancement of t-PA-catalyzed plasminogen activation by amphotericin. *J. Biol. Chem.* **266**, 16730-16735 (1991).
- 157.** Yamoah, K. et al. High-mobility group box proteins modulate tumor necrosis factor- α expression in osteoclastogenesis via a novel deoxyribonucleic acid sequence. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1141-1153 (2008).
- 158.** Gondokaryono, S.P. et al. The extra domain A of fibronectin stimulates murine mast cells via toll-like receptor 4. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 657-665 (2007).
- 159.** Schierbeck, H. et al. HMGB1 levels are increased in patients with juvenile idiopathic arthritis, correlate with early onset of disease, and are independent of disease duration. *J. Rheumatol.* **40**, 1604-1613 (2013).
- 160.** Park, S.Y. et al. HMGB1 induces angiogenesis in rheumatoid arthritis via HIF-1 α activation. *Eur. J. Immunol.* **45**, 1216-1227 (2015).
- 161.** Hreggvidsdottir, H.S. et al. The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signals to promote inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 655-662 (2009).

- 162.** Qin, Y. et al. HMGB1-LPS complex promotes transformation of osteoarthritis synovial fibroblasts to a rheumatoid arthritis synovial fibroblast-like phenotype. *Cell. Death. Dis.* **5**, e1077 (2014).
- 163.** Srivastava, P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat.Rev. Immunol.* **2**, 185-194 (2002).
- 164.** van Eden, W. et al. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* **331**, 171-173 (1988).
- 165.** Kamphuis, S. et al. Tolerogenic immune responses to novel T-cell epitopes from heat-shock protein 60 in juvenile idiopathic arthritis. *Lancet* **366**, 50-56 (2005).
- 166.** de Kleer, I.M. et al. CD4⁺CD25^{bright} regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J. Immunol.* **172**, 6435-6443 (2004).
- 167.** van Roon, J.A. et al. Stimulation of suppressive T cell responses by human but not bacterial 60-kD heat-shock protein in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* **100**, 459-463 (1997).
- 168.** MacHt, L.M. et al. Relationship between disease severity and responses by blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis to human heat-shock protein 60. *Immunology* **99**, 208-214 (2000).
- 169.** Prakken, B.J. et al. Inhibition of adjuvant-induced arthritis by interleukin-10-driven regulatory cells induced via nasal administration of a peptide analog of an arthritis-related heat-shock protein 60 T cell epitope. *Arthritis Rheum.* **46**, 1937-1946 (2002).
- 170.** Palmer, G. & Gabay, C. Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**, 321-329 (2011).
- 171.** Talabot-Ayer, D. et al. Immune-mediated experimental arthritis in IL-33 deficient mice. *Cytokine* **69**, 68-74 (2014).
- 172.** Collins, LV. et al. Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 995-1000 (2004).
- 173.** Hajizadeh, S. et al. Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **5**: 234-240 (2003).
- 174.** Harty, LC. et al. Mitochondrial mutagenesis correlates with the local inflammatory environment in arthritis. *Ann.Rheum. Dis.* **71**:582-588 (2012).

- 175.** Zhang, Q. et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* **464**: 104-107 (2010).
- 176.** Hazeldine, J. et al. N-Formyl peptides drive mitochondrial damage associated molecular pattern induced neutrophil activation through ERK1/2 and P38 MAP kinase signalling pathways. *Injury* **46**: 975-984 (2015).
- 177.** Lood, C. et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat. Med.* **22**: 146-153 (2016).
- 178.** Midwood, K. et al. Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat. Med.* **15**, 774-780 (2009).
- 179.** Kakimoto, K. et al. Suppressive effect of a neutrophil elastase inhibitor on the development of collagen-induced arthritis. *Cell. Immunol.* **165**, 26-32 (1995).
- 180.** Witter, J. et al. The immunologic detection and characterization of cartilage proteoglycan degradation products in synovial fluids of patients with arthritis. *Arthritis Rheum.* **30**, 519-529 (1987).
- 181.** Powell, J.D. & Horton, M.R. Threat matrix: low-molecular-weight hyaluronan (HA) as a danger signal. *Immunol. Res.* **31**, 207-218 (2005).
- 182.** Cs-Szabo, G., Roughley, P.J., Plaas, A.H. & Glant, T.T. Large and small proteoglycans of osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage. *Arthritis Rheum.* **38**, 660-668 (1995).
- 183.** Di Virgilio, F. et al. Leukocyte P2 receptors: a novel target for anti-inflammatory and anti-tumor therapy. *Curr. Drug. Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* **5**, 85-99 (2005).

- 184.** Hammer, HB. et al. Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **66**, 1093-1097 (2007).
- 185.** Wittkowski, H. et al. S100A12 is a novel molecular marker differentiating systemic-onset juvenile idiopathic arthritis from other causes of fever of unknown origin. *Arthritis Rheum.* **58**, 3924-3931 (2008).
- 186.** O'Reilly, S. Pound the alarm: danger signals in rheumatic diseases. *Clin. Sci. (Lond).* **128**, 297-305 (2015).
- 187.** Srikrishna, G. et al. Carboxylated glycans mediate colitis through activation of NF-kappa B. *J. Immunol.* **175**, 5412-5422 (2005).
- 188.** Hofmann, M.A. et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* **97**, 889-901 (1999).
- 189.** Prakken, B.J. et al. Epitope-specific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **101**, 4228-4233 (2004).
- 190.** Koffeman, E.C. et al. Epitope-specific immunotherapy of rheumatoid arthritis: clinical responsiveness occurs with immune deviation and relies on the expression of a cluster of molecules associated with T cell tolerance in a double-blind, placebo-controlled, pilot phase II trial. *Arthritis Rheum.* **60**, 3207-3216 (2009).

Figure legends

Figure 1. A schematic integrative overview of alarmins. Alarmins can be released from activated immune cells during infection or from cells undergoing necrosis in response to stress and injury. Released alarmins recruit antigen-presenting cells such as dendritic cells (DCs) by binding to specific receptors. DCs process alarmins and home to secondary lymphoid organs, where they present antigens to naïve T cells, which leads to their polarization and differentiation to T helper 1 cells (Th1) or Th2 that amplify inflammation and tissue destruction. T cells can also differentiate to regulatory T cells that are capable of inhibiting inflammation and participating in tissue repair. Released alarmins can also bind to specific receptors on the surface of other target cells such as macrophages and endothelial cells to stimulate the production of pro-inflammatory mediators or activate the endothelium, thereby leading to inflammatory process. Abbreviations: Ag, antigen; DC, dendritic cell; MHC, major histocompatibility complex; Th, T helper; Treg cells, regulatory T cells.

Figure 2. Role of S100 proteins and HMGB1 in OA. Cartilage breakdown during OA induces the release of matrix products that stimulate synovial cells and amplify synovitis ^A. Activated cells produce pro-inflammatory and catabolic factors, S100 proteins and HMGB1 ^B leading to a positive feedback loop of synovial cell reactivation, inflammation and cartilage degradation ^C. Secreted S100 proteins by synovial cells and chondrocytes aggravate cartilage breakdown by inducing the production of ADAMTS, MMP, inflammatory mediators, ROS and VEGF that stimulates angiogenesis ^D. It promotes also hypertrophic differentiation of chondrocytes ^E and osteophytes formation ^F. All these effects are mediated by RAGE, TLR4 and MAPK and/or NF-kB pathways activation. When secreted outside the cell, HMGB1 induces the production of MMP, inflammatory mediators, and NO by chondrocytes via interaction with RAGE and activation of MAPK and/or NF-kB pathways ^G. It promotes also hypertrophic differentiation of chondrocytes via TLR2/4 ^H. In turn, hypertrophic chondrocytes release HMGB1 ^I to promote endochondral ossification and osteophytes formation by acting as chemoattractant for bone cells ^J. It can be released also by necrotic or

dying osteocytes **K** to act as chemoattractant for osteoblasts and osteoclasts via RAGE and TLR2/4 **L** and to promote bone remodeling **M**.

Isotypes of S100 proteins which are found released in joint space are: S100A8/A9 and S100A12. Other isotypes are found expressed within tissue. Abbreviations: ADAMTS, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs; HMGB1, High mobility group box 1; MAPK, Mitogen-activated protein kinases ; MMP, matrix metalloproteinase; NF-kB, Nuclear factor-kappa B ; NO, Nitric oxide; OA, Osteoarthritis; TLR, Toll-like receptors; RAGE, Receptor for advanced glycation endproducts ; ROS, Reactive oxygen species ; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Figure 3. Role of S100 proteins, HMGB1 and HSPs in chronic inflammatory arthritis.

Synovial inflammation and joint tissue damage are the two pathological key processes during chronic inflammatory arthritis. Hallmarks of chronic synovitis are hyperplasia of the synovial lining layer cells **A**, infiltration of leucocytes **B** and angiogenesis **C**. Pannus, the osteoclast-rich portion of the synovial membrane, destroys bone, whereas enzymes secreted by neutrophils, synoviocytes and chondrocytes degrade cartilage **D**. S100 proteins and HMGB1 secreted from activated phagocytes and released from necrotic cells **E** activate other phagocytes through TLR and RAGE signalling to produce pro-inflammatory and catabolic factors **F**, enhance osteoclastic activity **G** and lead to accumulation of other phagocytes through chemotaxis **H**. HMGB1 amplifies the effect other cytokines (e.g. HMGB1:IL-1 complexes) **I** and induces DC maturation **J**. S100 proteins activate endothelial cells and induce extravasation of leukocytes by ICAM and VCAM upregulation on endothelial cells and Mac-1 on leukocytes **K**. In contrast self-HSP specific Tregs inhibit effector T cells and dampen phagocyte activation **L**.

Abbreviations: DC, dendritic cell; HMGB1, High mobility group box 1; HSP, heat-shock proteins; ICAM, Intercellular Adhesion Molecule; IL, interleukin; Mac-1, Macrophage-1 antigen; MMP, matrix metalloproteinase; TLR, Toll-like receptors; TNF, tumor necrosis factor; Tregs, regulatory T cells, RAGE, Receptor for advanced glycation endproducts ; ROS, Reactive oxygen species; VCAM, Vascular cell adhesion molecule

Figure 1: A schematic integrative overview of alarmins

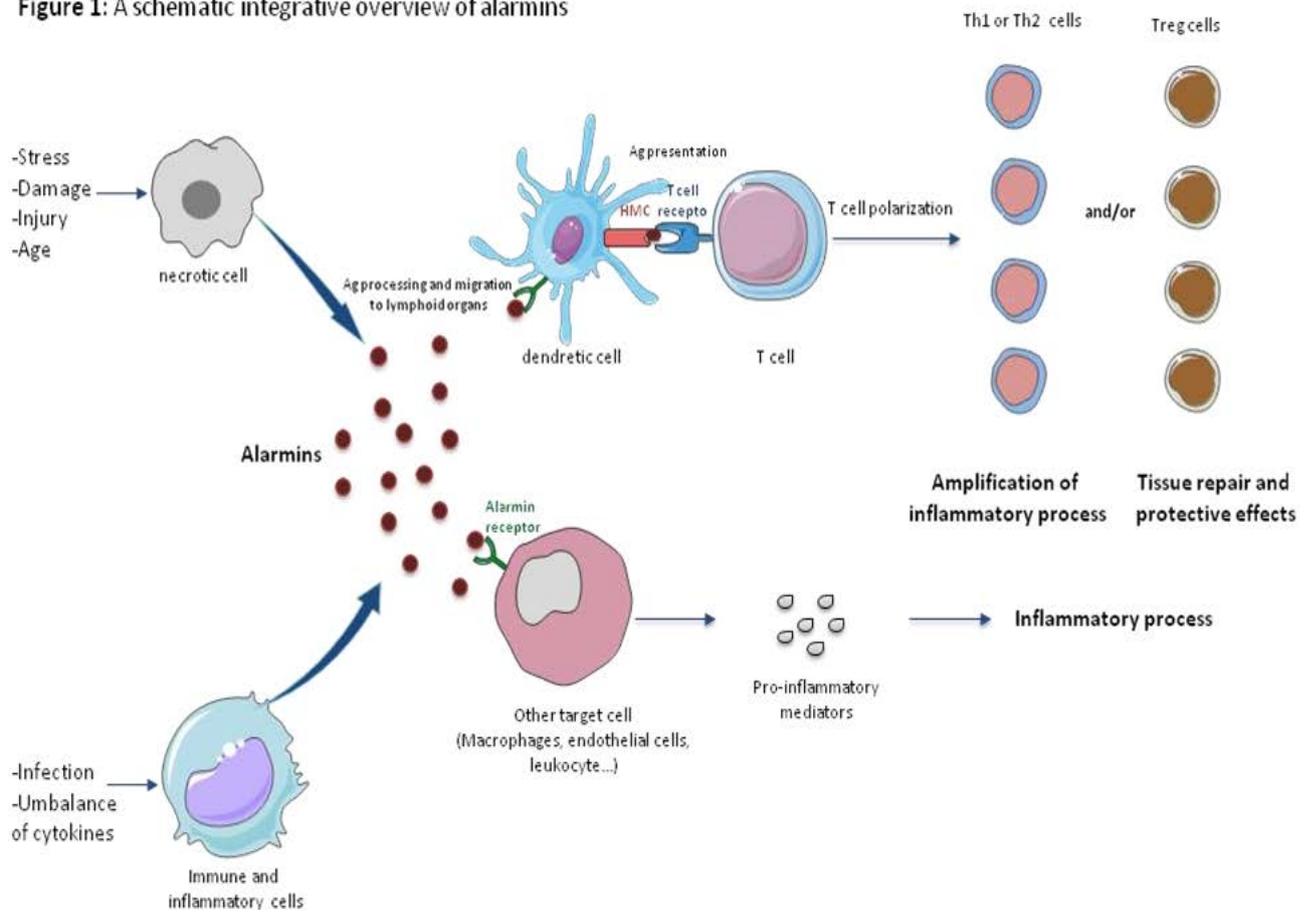


Figure 3: Role of S100 proteins, HMGB1 and HSP in chronic inflammatory arthritis

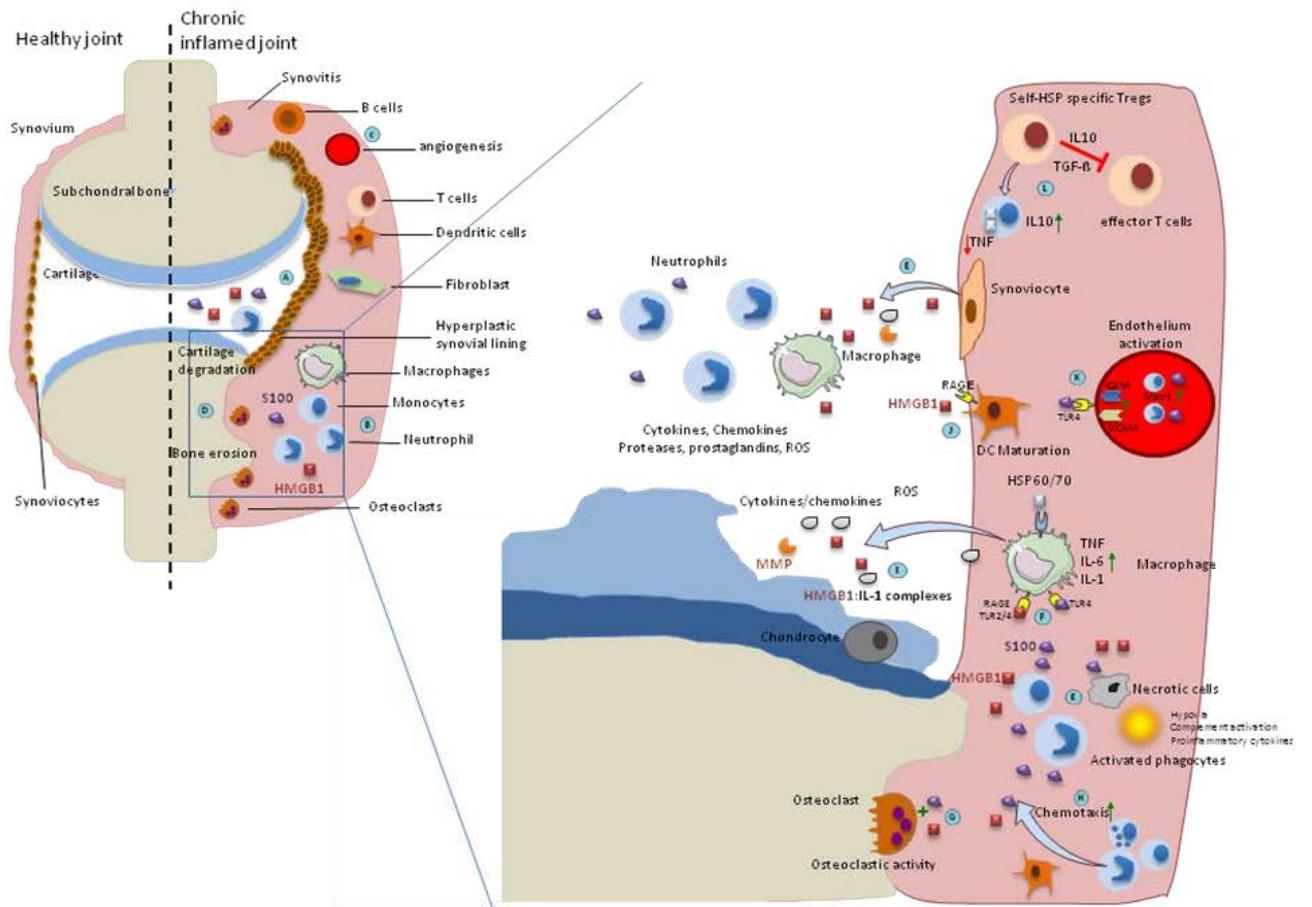


Table 1: list of other alarmins involved in OA

Alarmins	Localization of secreted form	Roles in OA	Receptors in joint cells	References
Annexins (II, V, VI)	Extracellular matrix of cartilage	<ul style="list-style-type: none"> •Overexpressed in OA cartilage •released by hypertrophic chondrocytes •Annexin V induces chondrocytes apoptosis 	TLR4?	58, 83, 84, 85
ATP	Synovial fluid	<ul style="list-style-type: none"> •released by chondrocytes in response to mechanical load •Stimulates PGE2 release from articular chondrocytes via MAPKs activation •Induces, at high levels, cartilage mineralization •SF levels in OA patients is associated with knee pain 	P2X and P2Y2 purino-receptors	86, 87, 88, 89
Galectin 3	Extracellularly in the joint (synovial fluid)?	<ul style="list-style-type: none"> •increased level of expression in human OA articular cartilage compared to normal cartilage •Markedly present in OA synovial tissue during inflammatory phases •Induces joint swelling and OA-like lesions in the knee joints of mice 	Integrin β 1	90, 91, 92
IL-1 α	Synovial fluid	<ul style="list-style-type: none"> •secreted mostly by macrophages and with lesser amounts by chondrocytes and synovial fibroblasts •Produced in early stages of OA and acts in autocrine and paracrine manner •increases cartilage and meniscus catabolism by up-regulation of pro-inflammatory mediators and degradative enzymes 	IL-1R	93, 94, 95, 96, 97
Thymosins (thymosin β 4)	Serum Synovial fluid	<ul style="list-style-type: none"> • Increased expression after cartilage mechanical loading •Enhances MMP expression and activity in chondrocytes •Positive correlation between serum and SF levels and radiographic severity in OA knee patients 	?	30, 98
Uric acid	Serum Synovial fluid	<ul style="list-style-type: none"> •SF level is correlated with IL-18 and IL-1β production and OA severity 	TLR2 ? TLR4?	31
Fibronectin fragments	Synovial fluid	<ul style="list-style-type: none"> •Increased expression in OA cartilage and SF •Activates pro-catabolic responses in chondrocytes 	TLR2 Integrin α 5 β 1 CD44	99, 100, 101, 102, 103
Low molecular hyaluronan	Synovial fluid?	<ul style="list-style-type: none"> •Stimulates cartilage matrix catabolism •Regulates chondrocyte hypertrophic differentiation 	TLR2 TLR4 CD44	70, 104
Biglycan	Synovial fluid	<ul style="list-style-type: none"> •Increases catabolic markers in cartilage •Decreases anabolic markers expression in cartilage •Induces NO, interleukines, GAGs and collagen release by chondrocytes 	TLR4	105
Laminins	Chondrocyte pericellular matrix	<ul style="list-style-type: none"> •increased in OA cartilage matrix •Laminin 4 aggravates cartilage degeneration •Laminin-α1/-α5 play a regenerative activity 	Syndecan-4	106, 107
Tenascin-C	Synovial fluid	<ul style="list-style-type: none"> •Up-regulated expression in OA cartilage •promotes inflammatory mediators release and proteoglycan loss by cartilage •Correlation between SF Tenascin-C levels and cartilage degradation and OA severity •promotes cartilage repair in vivo 	TLR4	108, 109, 110, 111, 112,
Aggrecan-derived fragment	Synovial fluid	<ul style="list-style-type: none"> •Exacerbates inflammation and catabolic activities in joint cells via NF-κB activation 	TLR2	113, 114

Table 2: Major roles of key alarmins in OA versus inflammatory arthritis

Alarmins	Major effects	
	Osteoarthritis	Inflammatory arthritis
HMGB1	<ul style="list-style-type: none"> Synovial inflammation Cartilage degradation Osteophytes formation Endochondral ossification Bone cells recruitment Hypertrophic differentiation Production of cytokines and chemokines 	<ul style="list-style-type: none"> Synovial inflammation Cartilage and bone destruction Angiogenesis Activation of innate immune response Pro-inflammatory cytokines production
HSP	<ul style="list-style-type: none"> Synovial activation Matrix catabolism Bone remodeling Protective effects against chondrocytes apoptosis and cartilage degeneration 	<ul style="list-style-type: none"> Resolution of inflammation
IL-33	-	<ul style="list-style-type: none"> Cartilage and bone erosion Neutrophil migration
S100 proteins	<ul style="list-style-type: none"> Synovial inflammation Cartilage degradation Angiogenesis Osteophytes formation Inflammatory cytokines production Hypertrophic differentiation 	<ul style="list-style-type: none"> Synovial inflammation Cartilage destruction Activation and recruitment of inflammatory cells

Conclusions et perspectives

L'ensemble de ce travail a permis de mettre en évidence l'expression de CD13/APN dans les chondrocytes articulaires et son implication dans la réception et la transmission du signal de 14-3-3 ϵ . Une interaction directe entre les deux protéines a été ensuite mise en évidence par différentes approches. Cette interaction implique un résidu tyrosine phosphorylé Y582 appartenant à la séquence E⁵⁷⁹FNYVW⁵⁸⁴ de CD13/APN.

Ce travail de thèse a permis ainsi d'établir le rôle de 14-3-3 ϵ et de CD13/APN dans la communication os/cartilage, désormais définie comme centrale au cours de l'arthrose (**Figure 47**).

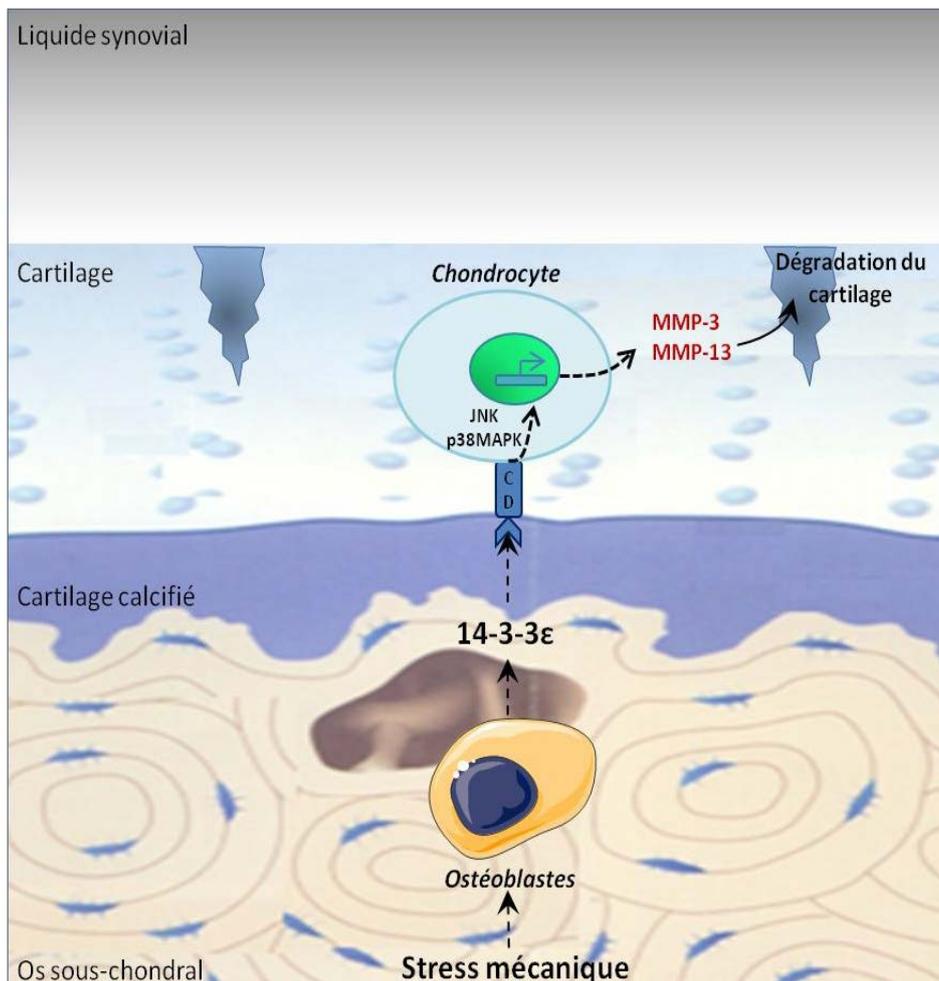


Figure 47 : Rôle de 14-3-3 ϵ et de CD13/APN dans la communication os/cartilage au cours de l'arthrose.

De nombreuses perspectives découlent de ce travail de thèse. Il paraît essentiel de valider dans un premier temps *in vivo* le rôle de 14-3-3 ϵ et de CD13/APN dans l'arthrose.

-Evaluation du rôle de 14-3-3 ϵ dans l'arthrose :

Afin de mieux visualiser les modifications du cartilage induites par l'injection intra-articulaire de 14-3-3, une mise au point sera nécessaire. Il nous semble important dans un premier temps d'analyser des coupes histologiques à différents niveaux de l'articulation de genoux injectés. Il serait indispensable également d'injecter 14-3-3 ϵ à doses croissantes afin d'évaluer son effet dose-dépendant et de préciser la dose capable d'induire des lésions proches de celles observées dans l'arthrose. Des injections répétitives de 14-3-3 ϵ durant une semaine ou 2-3 semaines seront réalisées.

L'effet de l'injection du PBS seul sera également testé en parallèle afin de vérifier que les lésions observées après l'injection de 14-3-3 ϵ ne sont pas dues tout simplement à l'acte de l'injection ou l'administration d'une substance exogène.

Nous avons montré *in vitro* que 14-3-3 ϵ induit son effet catabolique chondrocytaire via les MMP et des ADAMTS. Pour confirmer ceci, les coupes histologiques des articulations injectées seront traitées avec un anticorps anti-VDIPEN ou anti-NITEGE permettant de tester si MMP et ADAMTS seraient responsables des lésions du cartilage induites par 14-3-3 ϵ . En effet, la présence des néo-épitopes VDIPEN et NITEGE dans le cartilage arthrosique a été largement interprétée comme une preuve de l'implication des enzymes MMP et ADAMTS respectivement dans la perte des protéoglycanes (Westling et al. 2002).

Afin de valider ensuite le rôle de 14-3-3 ϵ dans la physiopathologie de l'arthrose, il serait important d'utiliser un modèle expérimental d'arthrose chez la souris obtenu par déstabilisation du ménisque médian (DMM) suivant la méthode décrite par Glasson (Glasson et al. 2007). Dans ce modèle, la sécrétion de 14-3-3 ϵ dans les milieux conditionnés des genoux sera évaluée par ELISA. La corrélation entre le taux de sécrétion de 14-3-3 ϵ et le degré de la dégradation du cartilage en se basant sur le score histologique OARSI sera étudiée ensuite 0,4 et 8 semaines après l'induction de l'arthrose. La recherche de la corrélation entre le taux de la sécrétion de 14-3-3 ϵ et le taux de la libération des marqueurs de la dégradation cartilagineuse (dosage sérique des COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) et fragments de collagène de type II par ELISA) paraît essentielle.

En parallèle, des injections intra-articulaires de 14-3-3 ϵ chez des souris DMM pourront déterminer son éventuel rôle dans l'aggravation de l'arthrose.

- Evaluation du rôle de CD13/APN dans l'arthrose :

En se fondant sur nos résultats, une invalidation de récepteur CD13/APN pourrait diminuer la sévérité de l'arthrose dans le modèle DMM. Afin de tester cette hypothèse *in vivo*, le modèle DMM a été établi chez des souris CD13^{-/-}. L'évaluation de la sévérité de l'arthrose chez ces souris CD13^{-/-} en comparaison aux souris WT est actuellement en cours.

Pour valider son implication dans l'arthrose, l'expression de CD13 dans l'articulation du modèle DMM (contrôle, souris à 4 et 8 semaines) pourra être évaluée par PCR, western blot (sur broyats des pattes) et par immunohistochimie (sur des coupes histologiques). Une éventuelle corrélation pourra être établie ensuite entre son taux d'expression et la sévérité des lésions arthrosiques (dégradation du cartilage).

-Evaluation de l'importance de l'interaction entre 14-3-3 ϵ et CD13/APN dans l'établissement des lésions arthrosiques chez la souris :

Pour valider nos résultats *in vitro* montrant l'importance de l'interaction entre 14-3-3 ϵ et CD13/APN dans l'établissement des lésions arthrosiques, il paraît important de vérifier si l'arthrose serait moins sévère chez les souris CD13^{-/-} après injection intra-articulaire de la protéine 14-3-3 ϵ recombinante par rapport à des souris contrôles injectées aussi par 14-3-3 ϵ .

La comparaison entre les lésions induites chez les deux types de souris (WT et CD13^{-/-}) pourra être réalisée en analysant les modifications structurelles sur des coupes histologiques des articulations de genoux injectés. La différence des niveaux des lésions devrait être confirmée en évaluant les changements histologiques par le score OARSI.

-Caractérisation de 14-3-3 ϵ comme une alarmine :

Une fois secrétées dans le milieu extracellulaire, les alarmines agissent sur leurs cellules cibles en se fixant sur TLR (Toll-like receptors) ou RAGE (Récepteur des produits avancés de glycation) (Oppenheim et Yang 2005, Harris et Raucci 2006). Ainsi pour classer 14-3-3 ϵ comme une alarmine, il serait nécessaire d'étudier l'implication des TLRs et RAGE dans la réception et la transmission de son signal dans les chondrocytes articulaires. Différentes

stratégies comme les anticorps bloquants, les siRNA et les inhibiteurs pharmacologiques seront utilisées.

Nos résultats préliminaires montrent qu'un prétraitement des chondrocytes articulars murins avec des anticorps bloquant anti-TLR2 ou anti-TLR4, semble être capable d'inhiber l'expression de MMP-3 et MMP-13 en ARNm en réponse à 14-3-3ε (**Figure 48**).

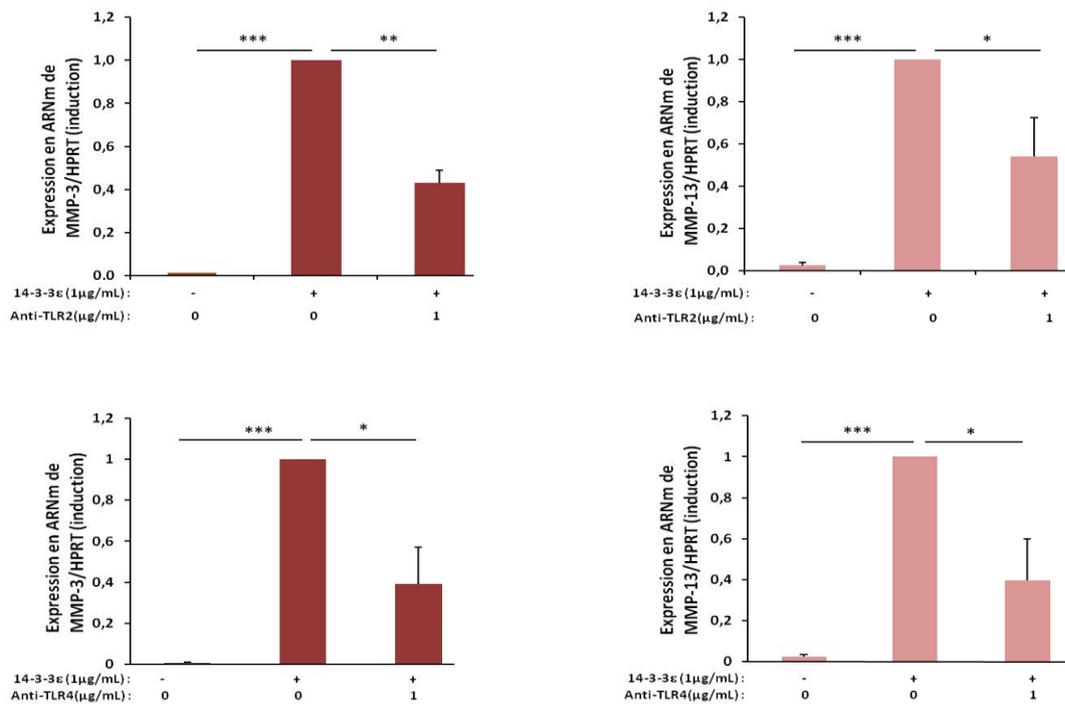


Figure 48 : Effet des anticorps bloquants anti-TLR2 et anti TLR4 sur l'expression de MMP-3 et MMP-13 dans les chondrocytes articulars murins en réponse à la protéine 14-3-3ε.

Expression en ARNm de MMP-3 et MMP-13 dans les chondrocytes articulars murins prétraités 15 min par des anticorps bloquants anti-TLR2 (n=3) ou anti-TLR4 (n=5) à 1µg/ml, puis stimulés 24h par 14-3-3ε recombinante (1µg/ml) et analysés en qPCR. Les résultats représentent la moyenne ± l'écart type des inductions rapportées au contrôle (fixé à 1). *p<0.05, *** p<0.001.

Une inhibition simultanée de TLR2 et TLR4 par un inhibiteur pharmacologique, OxPAPC (1-palmytoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine oxydé) abolit l'expression chondrocytaire de MMP-3 et -13 en réponse à 14-3-3ε (**Figure 49**).

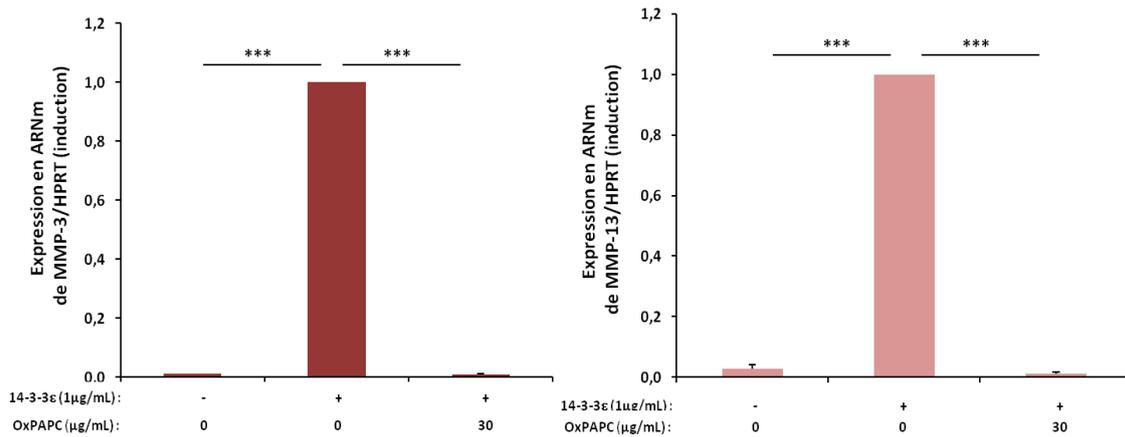


Figure 49 : Effet d'un inhibiteur pharmacologique (OxPAPC) sur l'expression de MMP-3 et MMP-13 dans les chondrocytes articulaires murins en réponse à la protéine 14-3-3ε. Expression en ARNm de MMP-3 et MMP-13 dans les chondrocytes articulaires murins prétraités 15 min par un inhibiteur pharmacologique de TLR2 et de TLR4 (30 μg/ml), puis stimulés 24h par 14-3-3ε recombinante (1μg/ml) et analysés en qPCR. Les résultats représentent la moyenne ± l'écart type des inductions rapportées au contrôle (fixé à 1) (n=3). *** p<0.001.

Ces résultats suggèrent que TLR2 et TLR4 pourraient être impliqués dans la réponse chondrocytaire à 14-3-3ε. Cependant, une confirmation en utilisant d'autres stratégies serait nécessaire.

L'interaction directe entre ces récepteurs avec 14-3-3 pourra être également explorée en utilisant le système Biacore et des études *in silico*.

-Evaluation de la protéine 14-3-3ε en tant que nouveau biomarqueur dans l'arthrose chez l'homme :

Les 14-3-3 extracellulaires sont utilisées aujourd'hui comme des biomarqueurs dans la maladie de Creutzfeld-Jacob (Leitao et al. 2016) et dans la PR (Maksymowych et Marotta 2014, Carrier et al. 2016). Pour définir 14-3-3ε comme un biomarqueur dans l'arthrose, il semble important d'analyser son expression dans les milieux conditionnés des 3 tissus ostéoarticulaires (cartilage, os et membrane synoviale), les liquides synoviaux et les sérums des patients arthrosiques. La recherche ensuite de la corrélation entre son taux de sécrétion et la sévérité de l'arthrose chez les patients (score de la douleur, destructions radiologiques et taux de libération de COMP, MMP-3 et MMP-13) pourrait être réalisée.

Ce travail ainsi que les perspectives envisagées pourraient permettre de définir la protéine 14-3-3 ϵ comme un nouveau biomarqueur et son interaction avec ses récepteurs comme une nouvelle cible thérapeutique dans l'arthrose. Ceci pourrait aider ensuite à développer un diagnostic précoce et un traitement plus efficace pour l'arthrose.

Références

A

- Abramson, S.** et **Attur, M.** (2009). Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. *BioMed Central Ltd.* **11**(3): 227.
- Addlagatta, A.** et al. (2006). Structure of aminopeptidase N from *Escherichia coli* suggests a compartmentalized, gated active site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**(36) : 13339-44.
- Aghazadeh, Y** et **Papadopoulos, V.** (2016). The role of the 14-3-3 protein family in health, disease, and drug development. *Drug Discov Today.***21**(2):278-87
- Aigner, T.** et al. (2007). Osteoarthritis: aging of matrix and cells--going for a remedy. *Curr Drug Targets.* **8**(2):325-31.
- Aigner, T.** et **Dudhia, J.** (1997). Phenotypic modulation of chondrocytes as a potential therapeutic target in osteoarthritis: a hypothesis. *Ann Rheum Dis* **56**(5): 287-91.
- Aigner, T.** et **Zien, A.** (2001). Anabolic and Catabolic Gene Expression Pattern Analysis in Normal Versus Osteoarthritic Cartilage Using Complementary DNA–Array Technology. *Arthritis Rheum.* **44**: 2777-2789.
- Aigner, T., Sachse, A.** et al. (2006). Osteoarthritis: Pathobiology—targets and ways for therapeutic intervention. *Adv Drug Deliv Rev.* **58**: 128– 149.
- Aitken, A.** (2002). Functional specificity in 14-3-3 isoform interactions through dimer formation and phosphorylation. Chromosome location of mammalian isoforms and variants. *Plant Mol Biol.* **50**(6):993-1010.
- Aitken, A.** (1995). 14-3-3 proteins on the MAP. *Trends Biochem Sci* **20**(3): 95-7.
- Aitken, A.** (2006). 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol* **16**(3): 162-72.
- Aitken, A.** (2011). Post-translational modification of 14-3-3 isoforms and regulation of cellular function. *Semin Cell Dev Biol* **22**(7): 673-80.
- Allen, K.** et **Golightly, Y.** (2015). Epidemiology of osteoarthritis: state of the evidence. *Curr Opin Rheumatol.* **27**(3): 276–283.
- Amin, A. K.** et al. (2009). Chondrocyte survival in articular cartilage: the influence of subchondral bone in a bovine model. *J Bone Joint Surg Br.***91**(5):691-9.
- Anderson-MacKenzie, J. M.** et al. (2005). Fundamental subchondral bone changes in spontaneous knee osteoarthritis. *Int J Biochem Cell Biol* **37**(1): 224-36.
- Arap, W.** et al. (1998). Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science.* **279**(5349):377-80.
- Archer, C. W.** et **Francis-West, P.** (2003). The chondrocyte. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* **35**(4):401-4.
- Asdaghi, N.** et al. (2012). Extracellular 14-3-3 from human lung epithelial cells enhances MMP-1 expression. *Mol Cell Biochem* **360**(1-2): 261-70.

Azmi, A. S. et al. (2013). Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev.* **32**(3-4):623-42

B

Bailey, A. J. et al. (2002). Phenotypic expression of osteoblast collagen in osteoarthritic bone: production of type I homotrimer. *Int J Biochem Cell Biol* **34**(2):176-82.

Bakker, A. C. et al. (2001). Overexpression of active TGF-beta-1 in the murine knee joint: evidence for synovial-layer-dependent chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage.* **9** (2):128-36.

Baranayay, F. J. et al. (2007). Association of bone marrow lesions with knee structures and risk factors for bone marrow lesions in the knees of clinically healthy, community-based adults. *Semin Arthritis Rheum.* **37**(2):112-8

Bauvois, B. et al. (2003). Synthesis and biological evaluation of novel flavone-8-acetic acid derivatives as reversible inhibitors of aminopeptidase N/CD13. *J Med Chem.* **46**(18) : 3900-13

Bauvois, B. et Dautonne, D. (2006). Aminopeptidase N/ CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Med Res Rev.* **26**(1):88-130.

Bauvois, B. (2004). Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis? *Oncogene.* **23**(2):317-29.

Bay-Jensen, A. C. et al. (2016). The Need for Predictive, Prognostic, Objective and Complementary Blood-Based Biomarkers in Osteoarthritis (OA). *EBio. Medicine.* **7**:4-6.

Belido, M. et al. (2010). Subchondral bone microstructural damage by increased remodelling aggravates experimental osteoarthritis preceded by osteoporosis. *Arthritis Res Ther.* **12**(4):R152.

Bendall, A. J. et Abate-Shen, C. (2000). Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development. *Gene* **247**(1-2):17-31.

Berenbaum. (2004). Signaling transduction: target in osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology.* **16**(5): 616-22.

Berry, J. L. et al. (1986). Subchondral pathways to the superior surface of the human talus. *Foot Ankle.* **7**(1):2-9.

Bhagwat, S. V. et al. (2001). CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood.* **97**(3):652-9.

Bianchi, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* **81**(1):1-5.

Bidwell, J. P. et al. (2008). Is HMGB1 an osteocyte alarmin? *J Cell Biochem.* **103** (6):1671-80

Bijlsma, J. W. et al. (2011). Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet.* **377**:2115–26.

- Billinghamst**, R. C. et al. (1997). Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *The Journal of Clinical Investigation*. **99**(7):1534-45.
- Blair**, H. C. et al. (2007). Balanced regulation of proliferation, growth, differentiation, and degradation in skeletal cells. *Ann NY Acad Sci* **1116** :165-73.
- Blair-Levy**, J. M. et al. (2008). A type I collagen defect leads to rapidly progressive osteoarthritis in a mouse model. *Arthritis Rheum*. **58**(4): 1096-106
- Blalock**, D. et al. (2015). Joint Instability and Osteoarthritis. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*. **19** (8): 15-23
- Blaney-Davidson**, E. N. et al. (2007) .TGF-beta and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. **15**(6):597-604.
- Blom**, A. B. et al. (2007). Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3. *Arthritis Rheum* . **56**(1):147-57.
- Boegard**, T. et al. (1998). Correlation between radiographically diagnosed osteophytes and magnetic resonance detected cartilage defects in the patellofemoral joint. *Ann Rheum Dis* **57**(7): 395-400
- Bondeson**, J. et al. (2007). The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis: a review. *Clinical and Experimental Rheumatology*. **26**(1):139-45.
- Bonucci**, E. (2012). Bone mineralization. *Front Biosci*. **17** :100-28.
- Bosman**, F. T. et **Stamenkovic**, I. (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* **200**(4):423-8.
- Boston**, P. F. et al. (1982). Human 14-3-3 protein: radioimmunoassay, tissue distribution, and cerebrospinal fluid levels in patients with neurological disorders. *J Neurochem* **38**(5): 1475-82.
- Boyle**, W. J. et al. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**(6937): 337-42.
- Brandt**, K. D. et al. (2006). Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann Rheum Dis* **65**(10):1261-4.
- Bridges**, D. et **Moorhead**, G. B. (2005). 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE* (296), re10.
- Brookss**, B.R. et al. (2009). CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *J Comput Chem*. **30**(10): 1545–1614.
- Buckland-Wright**, J. C. et al. (2000) Early radiographic features in patients with anterior cruciate ligament rupture. *Ann Rheum Dis* **59**(8): 641-6.
- Burr**, B. D. et **Radin**, E.L. (2003). Microfractures and microcracks in subchondral bone: are they relevant to osteoarthrosis? *Rheum Dis Clin North Am*. **29**(4):675-85.
- Bustos**, D. M. et **Iglesias**, A. A. (2006). Intrinsic disorder is a key characteristic in partners that bind 14-3-3 proteins. *Proteins*. **63**(1):35-42.

Bustos, D. M. (2012). The role of protein disorder in the 14-3-3 interaction network. *Mol Biosyst.* **8**(1): 178-84

C

Caby, M. P. et al. (2005). Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol.* **17** (7):879-87.

Caetano-Lopes, J. et al. (2007). Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port* **32**(2): 103-10.

Carlevaro, M. F. et al. (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci* **113** (Pt 1): 59-69.

Carl-McGrath, S. et al. (2006). Ecto-peptidases in tumour biology: a review. *Histol Histopathol.* **21**(12): 1339-53.

Carrier, N. et al. (2016). rheumatoid arthritis-associated antibodies to predict clinical and radiographic outcomes in a prospective cohort of patients with recent-onset inflammatory polyarthritis. *Arthritis Res Ther.* **1**: 18:37.

Carrino, J. A. et al. (2006). MRI of bone marrow edema-like signal in the pathogenesis of subchondral cysts. *Osteoarthritis Cartilage* **14**(10):1081-5.

Chang, Y. W. et al. (2005). CD13 (aminopeptidase N) can associate with tumor-associated antigen L6 and enhance the motility of human lung cancer cells. *Int J Cancer.* **116** (2):243-52.

Chapple, C. M. et al. (2011). Patient characteristics that predict progression of knee osteoarthritis: a systematic review of prognostic studies. *Arthritis Care Res (Hoboken)* **63**(8): 1115-25.

Chavez-Munoz, C. et al. (2008). Primary human keratinocytes externalize stratifin protein via exosomes. *J Cell Biochem* **104**(6): 2165-73.

Chen, L. et al. (2012). Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109** (44): 17966-71.

Chen, Y. et al. (2015). Bone turnover and articular cartilage differences localized to subchondral cysts in knees with advanced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* **23**(12): 2174-83

Choi, K. et al. (1990). The elastic moduli of human subchondral, trabecular, and cortical bone tissue and the size-dependency of cortical bone modulus. *J Biomech.* **23**(11): 1103-13.

Chomarot, P. et al. Contribution of IL-1, CD14, and CD13 in the increased IL-6 production induced by in vitro monocyte-synoviocyte interactions. *J Immunol.* **155**(7):3645-52.

- Christensen, R.** et al. (2007). Effect of weight reduction in obese patients diagnosed with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis.* **66**(4):433-9.
- Chu, X. Q.** et al. (2015). Cartilage oligomeric matrix protein and matrix metalloproteinase-3 expression in the serum and joint fluid of a reversible osteoarthritis rabbit model. *Genetics and Molecular Research.* **14**(4): 14207-15.
- Claessen, K. M.** et al. (2010). Relationship between insulin-like growth factor-1 and radiographic disease in patients with primaryosteoarthritis: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage.* **20**(2)/ 79-86
- Clark, I. M.** et al. (1993). The measurement of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), and collagenase-TIMP complex in synovial fluids from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **36**(3):372-9.
- Clark, J. M.** et Huber, J.D. (1990). The structure of the human subchondral plate. *J Bone Joint Surg Br.* **72**(5):866-73
- Coblitz, B.** et al. (2006). C-terminal binding: An expanded repertoire and function of 14-3-3 proteins. *FEBS Lett.* **580**(6)/1531-5.
- Colucci, M.** et al. (2004). The 14-3-3 protein in multiple sclerosis: a marker of disease severity. *Mult Scler.* **10**(5):477-81.
- Couchourel, D.** et al. (2009). Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is attributable to abnormal type I collagen production. *Arthritis Rheum* **60**(5), 1438-50.
- Curnis, F.** et al. (2002). Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells. *Cancer Res.* **62**(3):867-74.
- Curnis, F.** et al. (2016). NGR-tagged nano-gold: A new CD13-selective carrier for cytokine delivery to tumors. *Nano Res.* **9**(5):1393-1408.

D

- Danielsen, E. M.** et **van Deurs, B.** (1997). Galectin-4 and small intestinal brush border enzymes form clusters. *Mol Biol Cell.* **8**(11): 2241-51.
- Dazinger, R. S.** (2008) . Aminopeptidase N in arterial hypertension. *Heart Fail Rev.* **13**(3): 293-8.
- Delmas, B.** et al. (1992) Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature.* **357**(6377):417-20.
- Demoor, M.** et al. (2012). Deciphering chondrocyte behaviour in matrix-induced autologous chondrocyte implantation to undergo accurate cartilage repair with hyaline matrix. *Pathol Biol (Paris).* **60**(3):199-207.
- Dieppe, P.** et al. (1993). Prediction of the progression of joint space narrowing in osteoarthritis of the knee by bone scintigraphy. *Ann Rheum Dis* **52**(8): 557-63.

- Dixon, J.** et al. (1994). Expression of aminopeptidase-n (CD 13) in normal tissues and malignant neoplasms of epithelial and lymphoid origin. *J Clin Pathol.* **47(1):**43-7.
- Dobnig, H.** et **Turner, R. T.** (1995). Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* **136(8):** 3632-8.
- Dobson, M.** et al. (2011) Bimodal regulation of FoxO3 by AKT and 14-3-3. *Biochim Biophys Acta.* **1813(8):**1453-64
- Dovrat, S.** et al. (2014). 14-3-3 and β -catenin are secreted on extracellular vesicles to activate the oncogenic Wnt pathway. *Mol Oncol.* **8(5):**894-911
- Dreier, R.** et al. (2004). Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade. *Experimental Cell Research.* **297(2):**303-12.
- Dubois, T.** al. (1997). 14-3-3 is phosphorylated by casein kinase I on residue 233. Phosphorylation at this site in vivo regulates Raf/14-3-3 interaction. *J Biol Chem* **272(46):** 28882-8.
- Ducy, P.** et al. (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89(5):** 747-54.
- Dudhia, J.** (2005). Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS.* **62(19-20):** 2241-56.
- Duerr, S.** et al. (2004) .MMP-2/gelatinase A is a gene product of human adult articular chondrocytes and is increased in osteoarthritic cartilage. *Clin Exp Rheumatol.* **22(5):** 603-8.
- Dumas, V.** et al. (2009). The effect of dual frequency cyclic compression on matrix deposition by osteoblast-like cells grown in 3D scaffolds and on modulation of VEGF variant expression. *Biomaterials.* **30(19):** 3279-88.

E

- El Hajjaji, H.** et al. (2004). Treatment with calcitonin prevents the net loss of collagen, hyaluronan and proteoglycan aggregates from cartilage in the early stages of canine experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* **12(11):** 904-11.
- Evangelou, E.** et al. (2009). Large-Scale Analysis of Association Between GDF5 and FRZB Variants and Osteoarthritis of the Hip, Knee, and Hand. *Arthritis Rheum.* **60(6):**1710–1721.
- Eyre, D.** et al. (2006). Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *European Cells & Materials.* **12:**57-63.
- Eyre, D.** et al. (2002). Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* **4(1):** 30-5.

F

- Fang, H.**, et **Beier, F.** (2014). Mouse models of osteoarthritis: modelling risk factors and assessing outcomes. *Nature Reviews Rheumatology*. **10**, 413–421.
- Fang, J.** et al. (2016). Roles of TGF-beta 1 signaling in the development of osteoarthritis. *Histol Histopathol*. **11**:11779.
- Favaloro, E. J.** et al. (1993). NGR-tagged nano-gold: A new CD13-selective carrier for cytokine delivery to tumors. *Exp Hematol*. **21**(13), 1695-701.
- Fazzalari, N. L.** et al. (1998). Three-dimensional confocal images of microdamage in cancellous bone. *Bone*. **23**(4):373-8.
- Felson, D.** et al. (2003). Bone marrow edema and its relation to progression of knee osteoarthritis. *Ann Intern Med* **139**(5 Pt 1): 330-6.
- Feng, J. Q.** et al. (2003) The Dentin matrix protein 1 (Dmp1) is specifically expressed in mineralized, but not soft, tissues during development. *J Dent Res* **82**(10): 776-80.
- Fernandes, J. C.** et al. (1998). Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in normal and early experimental osteoarthritic canine cartilage: an immunohistochemical study. *J Rheumatol* **25**(8): 1585-94.
- Findlay, D. M.** et **Atkins, GJ.** (2014). Osteoblast-Chondrocyte Interactions in Osteoarthritis. *Current Osteoporosis Reports*. **12**(1): 127–134.
- Foote, M.** et **Zhou, Y.** (2002) .14-3-3 proteins in neurological disorders. *Int J Biochem Mol Biol*. **3**(2):152-164
- Fosang, A. J.** et al. (1991). Effect of interleukin-1 and insulin like growth factor-1 on the release of proteoglycan components and hyaluronan from pig articular cartilage in explant culture. *Matrix*. **11**(1): 17-24.
- Franz-Odendaal, T. A.** et al. (2006). Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* **235**(1):176-90.
- Fu, H.** et al. (2000). 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **40**: 617-47.
- Fuji, H.** et al. (1995) .Human melanoma invasion and metastasis enhancement by high expression of aminopeptidase N/CD13. *Clin Exp Metastasis*. **13** (5): 337-44.
- Fuller, B.** et al. (2006). Proteomic analysis of the 14-3-3 family in Arabidopsis. *Proteomics*. **6**(10):3050-9.
- Funck-brentano, T.** et al. (2012). Targeting bone alleviates osteoarthritis in osteopenic mice and modulates cartilage catabolism. *PLoS One*. **7**(3) : e33543
- Funck-brentano, T.** et **Cohen-Solal, M.** (2015) . Subchondral bone and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. **27**(4):420-6

G

- Gabrilovac, J.** et al. (2008). Regulation of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; APN; CD13) on the HL-60 cell line by TGF-beta(1). *Int Immunopharmacol.* **8(5):613-23.**
- Gabrilovac, J.** et al. (2005). Regulation of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; APN; CD13) by interferon-gamma on the HL-60 cell line. *Life Sci.* **76(23):2681-97.**
- Galasso, O.** et al. (2012). Recent findings on the role of gelatinases (matrix metalloproteinase-2 and -9) in osteoarthritis. *Advances in Orthopedics.* **2012:** 834208.
- Gardino, A. K.** et al. (2006). Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms. *Semin Cancer Biol.* **16 (3):173-82**
- Garreau, I.** et al. (1998). Hemorphins inhibit angiotensin IV binding and interact with aminopeptidase N. *Peptides.***19(8):1339-48.**
- Gendron, C.** et al. (2003). TIMP-3 inhibits aggrecanase-mediated glycosaminoglycan release from cartilage explants stimulated by catabolic factors. *FEBS Letters.* **555(3):431-6.**
- Gevers, G.** et J. **Dequeker** (1987). Collagen and non-collagenous protein content (osteocalcin, sialoprotein, proteoglycan) in the iliac crest bone and serum osteocalcin in women with and without hand osteoarthritis. *Coll Relat Res* **7(6): 435-42.**
- Ghaffari, A.** et al. (2006). Fibroblast extracellular matrix gene expression in response to keratinocyte-releasable stratifin. *J Cell Biochem* **98(2): 383-93.**
- Ghaffari, A.** et al. (2010). 14-3-3 sigma associates with cell surface aminopeptidase N in the regulation of matrix metalloproteinase-1. *J Cell Sci* **123(Pt 17): 2996-3005.**
- Ghahary, A.** et al. (2004). Keratinocyte-releasable stratifin functions as a potent collagenase-stimulating factor in fibroblasts. *J Invest Dermatol* **122(5): 1188-97.**
- Ghosh, M.** et al. (2014). Molecular mechanisms regulating CD13-mediated adhesion. *Immunology.* **142(4):636-47.**
- Gilberston, E. M.** (1975). Development of periarticular osteophytes in experimentally induced osteoarthritis in the dog. A study using microradiographic, microangiographic, and fluorescent bone-labelling techniques. *Ann Rheum Dis.* **34(1):12-25**
- Girkontaite, I.** et al. (1996). Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies. *Matrix Biology.* **15(4):231-8.**
- Glasso, O.** et al. (2012). Recent findings on the role of gelatinases (matrix metalloproteinase-2 and -9) in osteoarthritis. *Adv Orthop.* **2012:834208**
- Glasson, S.S.** et al. (2010). The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage.* **18 Suppl 3:S17-23.**
- Glasson, S. S.** et al. (2004). Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis and Rheumatism.***50(8):2547-58.**
- Glasson, S. S.** et al. (2007). The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthritis Cartilage.***15(9):1061-9.**

- Glyn-Jones, S.** et al. (2015). Osteoarthritis. *Lancet*. **386**(9991):376-87.
- Goldring, M. B.** et **Goldring, S. R.** (2010) .Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci*. **1192**, 230-7
- Goldring, M. B.** (2012). Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*. **4**(4):269-85.
- Goldring, M. B.** et **Marcu, K. B.** (2012). Epigenomic and microRNA- mediated regulation in cartilage development,homeostasis, and osteoarthritis. *Trends Mol Med*. **18** (2):109-18.
- Goldring, M. B.** et al. (2006). The control of chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. **97**(1):33-44.
- Goldring, M. B.** et **Goldring, S. R.** (2007). Osteoarthritis. *The Journal of Cell Physiology*. **213**(3):626-34.
- Golucci, M.** et al. (2004). The 14-3-3 protein in multiple sclerosis: a marker of disease severity. *Mult Scler*. **10**(5):477-81.
- Gosset, M.** et al. (2006). Prostaglandin E2 synthesis in cartilage explants under compression: mPGES-1 is a mechanosensitive gene. *Arthritis Research & Therapy*. **8**(4):R135.
- Gredmark, S.** et al. (2004). Human cytomegalovirus induces inhibition of macrophage differentiation by binding to human aminopeptidase N/CD13. *J Immunol*. **173**(8):4897-907.
- Girkontaite, I.** et al. (1996). Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonalantibodies. *Matrix Biol*. **15**(4):231-8.
- Grotle, M.** et al. (2008). Obesity and osteoarthritis in knee, hip and/or hand: an epidemiological study in the general population with 10 years follow-up. *BMC Musculoskeletal Disord*. **9**:132.
- Grujic, M.** et Renko (2002). Aminopeptidase inhibitors bestatin and actinonin inhibit cell proliferation of myeloma cells predominantly by intracellular interactions. *Cancer Lett*. **182**(2):113-9.
- Guevremont, M.** et al. (2003). Human adult chondrocytes express hepatocyte growth factor (HGF) isoforms but not HgF: potential implication of osteoblasts on the presence of HGF in cartilage. *J Bone Miner Res* **18**(6): 1073-81.
- Guymer, E.** et al. (2007). A study of the prevalence and associations of subchondral bone marrow lesions in the knees of healthy, middle-aged women. *Osteoarthritis Cartilage*. **15**(12):1437-42
- Guzman, R. E.** et al. (2003). Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicologic Pathology*. **31**(6):619-24.

H

- Hamann, N.** et al. (2013). Growth-related structural, biochemical, and mechanical properties of the functional bone-cartilage unit. *J Anat.* **222**(2):248-59.
- Han, D.** et al. (2010). Functional identification of a novel 14-3-3 epsilon splicing variant suggests dimerization is not necessary for 14-3-3 epsilon to inhibit UV-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* **396**(2) : 401-6.
- Harris, H. E.** et **Rauci, A.** (2006). Alarmin(g) news about danger: workshop on innate danger signals and HMGB1. *EMBO Rep.* **7**(8):774-8.
- Hashida, H.** et al. (2002). Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology.* **122**(2):376-86.
- Hayami, T.** et al. (2004). The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum* **50**(4): 1193-206.
- Hayashi, D.** et al. (2015). Imaging for osteoarthritis. *Ann Phys Rehabil Med.* **59**(3):161-9
- Hayes, W. C.** et **Bodine, A. J.** (1978). Flow-independent viscoelastic properties of articular cartilage matrix. *Journal of Biomechanics.* **11**(8-9):407-19.
- He, B.** et al. (2014). High-resolution measurements of the multilayer ultra-structure of articular cartilage and their translational potential. *Arthritis Research & Therapy.* **16**(2):205.
- Hedbom, E.** et **Hauselmann, HJ.** (2002). Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS.* **59**(1):45-53.
- Heijink, A.** et al. (2011). Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy : official journal of the ESSKA.* **20**(3):423-35.
- Heino, T. J.** et al. (2009). Evidence for the role of osteocytes in the initiation of targeted remodeling. *Technol Health Care.* **17**(1): 49-56.
- Henriksson, M. L.** et al. (2000). 14-3-3 proteins are required for the inhibition of Ras by exoenzyme. *Biochem J.* **3**: 697-701.
- Henrotin, Y.** et al. (2012). Subchondral bone and osteoarthritis: biological and cellular aspects. *Osteoporos Int.* **23** Suppl 8:S847-51
- Hilal, G.** et al. (1998). Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis Rheum* **41**(5): 891-9.
- Hirata, S.** et al. (2015). Serum 14-3-3 η level is associated with severity and clinical outcomes of rheumatoid arthritis, and its pretreatment level is predictive of DAS28 remission with tocilizumab. *Arthritis Res Ther.* **9**;17:280.

- Hoffmann, T.** et al. (1998). Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) and aminopeptidase N (CD 13) catalyzed hydrolysis of cytokines and peptides with N-terminal cytokine sequences. *FEBS Lett.* **336**(1):61-4.
- Hooper, N. M.** (1994). Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* **354**(1):1-6.
- Hornbeck, P. V.** et al. (2012). PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic Acids Res.* **40**(Database issue):D261-70.
- Houard, X.** et al. (2013). Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. *Current Rheumatology Reports.* **15**(11):375.
- Hsich, G.** et al. (1996). The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* **335**(13): 924-30.
- Hu, K.** et al. (2006). Pathogenesis of osteoarthritis-like changes in the joints of mice deficient in type IX collagen. *Arthritis Rheumatism.* **54**(9):2891-900.
- Hunter, D. J.** et al. (2006). Increase in bone marrow lesions associated with cartilage loss: a longitudinal magnetic resonance imaging study of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **54**(5):1529-35
- Hunter, D. J.** et al. (2007). Cartilage markers and their association with cartilage loss on magnetic resonance imaging in knee osteoarthritis: the Boston Osteoarthritis Knee Study. *Arthritis Research & Therapy.* **9**(5):R108.
- Hwang, J.** et al. (2008). Increased hydraulic conductance of human articular cartilage and subchondral bone plate with progression of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **58**(12): 3831-42.

I

- Ichinose, Y.** et al. (2003). Randomized double-blind placebo-controlled trial of bestatin in patients with resected stage I squamous-cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* **95**(8):605-10.
- Imai, K.** et al. (1997). Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and activation of progelatinase A in human osteoarthritic cartilage. *The American Journal of Pathology.* **151**(1):245-56.
- Imhof, H.** et al. (2000). Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Invest Radiol* **35**(10): 581-8.
- Imhof, H.** et al. (1999). Importance of subchondral bone to articular cartilage in health and disease. *Top Magn Reson Imaging.* **10**(3):180-92.
- Inoi, K.** et al. (1995). Aminopeptidase inhibitor ubenimex (bestatin) inhibits the growth of human choriocarcinoma in nude mice through its direct cytostatic activity. *Anticancer Res.* (5B):2081-7.
- Iritani, S.** et al. (2010). Immunohistochemical study of vesicle monoamine transporter 2 in the hippocampal region of genetic animal model of schizophrenia. *Synapse.* **64**(12):948-53.

Ishiguro, N. et al. (1999). Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover: analyses of synovial fluid from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **42**(1):129-36.

J

Javaid, M. K. et al. (2010). Pre-radiographic MRI findings are associated with onset of knee symptoms: the most study. *Osteoarthritis Cartilage.* **18**(3): 323–328

Jayaratnam, S. et al. Rapidly progressive Alzheimer's disease and elevated 14-3-3 proteins in cerebrospinal fluid. *Age Ageing.* **37**(4):467-9.

Jhonson, C. et al. (2010). Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites. *Biochem J.* **427**(1):69-78

Jia, M. R. et al. (2010). The Analgesic Activity of Bestatin as a Potent APN Inhibitor. *Front Neurosci.* **28**, 4:50

Johson, V. L. et al. (2014). The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* **28**(1):5-15.

K

Kadri, A. et al. (2008). Osteoprotegerin inhibits cartilage degradation through an effect on trabecular bone in murine experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **58**(8): 2379-86.

Kadri, A. et al. (2010). Inhibition of bone resorption blunts osteoarthritis in mice with high bone remodelling. *Ann Rheum Dis.* **69**(8):1533-8.

Kanayama, N. et al. (1995). Inactivation of interleukin-8 by aminopeptidase N (CD13). *J Leukoc Biol.* **57**(1):129-34

Katz, A. B. et **Taichman, L. B.** (1999). A partial catalog of proteins secreted by epidermal keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol.* **112**(5):818-21.

Kehlen, A. et al. (2004). IL-10 and TGF-beta differ in their regulation of aminopeptidase N/CD13 expression in monocytes. *Int J Mol Med.* **13**(6):877-82.

Kevorkian, L. et al. (2004). Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis and Rheumatism.* **50**(1):131-41.

Kijowski, R. et al. (2006). Subchondral bone marrow edema in patients with degeneration of the articular cartilage of the knee joint. *Radiology.* **238**(3):943-9.

Kilani, R. T. et al. (2007). Detection of high levels of 2 specific isoforms of 14-3-3 proteins in synovial fluid from patients with joint inflammation. *J Rheumatol* **34**(8): 1650-7.

- Ko, F. C. et al.** (2013). In vivo cyclic compression causes cartilage degeneration and subchondral bone changes in mouse tibiae. *Arthritis Rheum.* **65**(6):1569-78.
- Kochan, G. et al.** (2011). Crystal structures of the endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 (ERAP1) reveal the molecular basis for N-terminal peptide trimming. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**(19):7745-50.
- Kolb, A. F. et al.** (2013) Mammary gland development is delayed in mice deficient for aminopeptidase N. *Transgenic Res.***22**(2):425-34.
- König, M. et al.** (1996). Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin. *Nature.* **383**(6600):535-8.
- Kook, S. H. et al.** (2011). Involvement of JNK-AP-1 and ERK-NF- κ B signaling in tension-stimulated expression of Type I collagen and MMP-1 in human periodontal ligament fibroblasts. *J Appl Physiol* **111**(6):1575-83
- Kosaki, A. et al.** (1998). 14-3-3beta protein associates with insulin receptor substrate 1 and decreases insulin-stimulated phosphatidylinositol 3'-kinase activity in 3T3L1 adipocytes. *J Biol Chem* **273**(2): 940-4.
- Kramer, W. et al.** (2005). Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane. *J Biol Chem.* **280**(2):1306-20.
- Kumar, D. et al.** (2009). Transcriptional synergy mediated by SAF-1 and AP-1: critical role of N-terminal polyalanine and two zinc finger domains of SAF-1. *J Biol Chem.* **284**(3):1853-62.
- Kurose, R. et al.** (2010). Characterization of human synovial fluid cells of 26 patients with osteoarthritis knee for cartilage repair therapy. *Int J Rheum Dis.* **13**(1):68-74
- Kwan Tat, S. et al.** (2010). Targeting subchondral bone for treating osteoarthritis: what is the evidence? *Best Pract Res Clin Rheumatol* **24**(1): 51-70.
- Kyostio-Moore, S. et al.** (2011). STR/ort mice, a model for spontaneous osteoarthritis, exhibit elevated levels of both local and systemic inflammatory markers. *Comparative Medicine.* **61**(4):346-55.

L

- Lai, A. et al.** (2012). Microarray-based identification of aminopeptidase N target genes in keratinocyte conditioned medium-stimulated dermal fibroblasts. *J Cell Biochem.* **113**(3):1061-8
- Lai, A. et al.** (2010). Inhibitory effect of anti-aminopeptidase N/CD13 antibodies on fibroblast migration. *Mol Cell Biochem.* **343**(1-2):191-9.

- Lai, A.** et al. (2011). Paracrine regulation of fibroblast aminopeptidase N/CD13 expression by keratinocyte-releasable stratifin. *J Cell Physiol.* **226**(12):3114-20.
- Lajeunesse, D.** et **Reboul, P.** (2003). Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. *Curr Opin Rheumatol.* **15**(5):628-33.
- Lam, E.** et al. (2005). Stratifin-induced matrix metalloproteinase 1 in fibroblast is mediated by c-fos and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Invest Dermatol.* **125**(2):230-8.
- Lancaster, G. I.** et **Febbraio, M. A.** (2005). Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J Biol Chem.* **280**(24):23349-55.
- Laouar, A.** et al. (1993). Divergent regulation of cell surface protease expression in HL-60 cells differentiated into macrophages with granulocyte macrophage colony stimulating factor or neutrophils with retinoic acid. *Int Immunol.* **5**(8):965-73.
- Larsen, S. L.** et al. (1996). T cell responses affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming of major histocompatibility complex class II-bound peptides. *J Exp Med.* **184**(1):183-9
- Li, B.** et **Aspden, R. M.** (1997). Composition and mechanical properties of cancellous bone from the femoral head of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *J Bone Miner Res.* **12**(4):641-51.
- Li, C. F.** et **Hughes-Fulford, M.** (2006). Fibroblast growth factor-2 is an immediate-early gene induced by mechanical stress in osteogenic cells. *J Bone Miner Res.* **21**(6):946-55.
- Li, G.** et al. (2013). Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis Res Ther.* **15**(6):223.
- Li, X.** et al. (2012). Species-specific biological effects of FGF-2 in articular cartilage: implication for distinct roles within the FGF receptor family. *J Cell Biochem* **113**(7): 2532-42.
- Lin, Y. Y.** et al. (2010). Applying an excessive mechanical stress alters the effect of subchondral osteoblasts on chondrocytes in a co-culture system. *Eur J Oral Sci.* **118**(2):151-8.
- Little, C. B.** et al. (2009). Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis and Rheumatism.* **60**(12):3723-33.
- Liu-Bryan, R.** et al. (2010). Chondrocyte Innate Immune MyD88-dependent Signaling Drives Pro-Catabolic Effects of the Endogenous TLR2/TLR4 Ligands LMW-HA and HMGB1. *Arthritis Rheum.* **62**(7): 2004–2012
- Lloyd, S. A.** et al. (2008). Soluble RANKL induces high bone turnover and decreases bone volume, density, and strength in mice. *Calcif Tissue Int* **82**(5): 361-72.
- Lo, G. H.** et al. (2005). Bone marrow lesions in the knee are associated with increased local bone density. *Arthritis Rheum* **52**(9): 2814-21.
- Loeser, R. F.** et al. (2012). Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* **64**(6):1697-707.
- Lories, R. J.** et **Luyten, F. P.** (2010). The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **7**(1): 43-9.

Lories, R. J. et Luyten, F.P. (2012). Osteoarthritis, a disease bridging development and regeneration. *Bonekey Rep.* **1**, 1-136.

Lotz, M. K. et al. (2010). Cartilage cell clusters. *Arthritis Rheum.* **62(8)**: 2206–2218

Luan, Y. et Xu, W. (2007). The structure and main functions of aminopeptidase N. *Curr Med Chem.* **14(6)**:639-47. 1008-1017.

M

Madry, H. et al. (2010). The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **18(4)**: 419-33.

Maetzel, A. et al. (1997). Osteoarthritis of the hip and knee and mechanical occupational exposure--a systematic overview of the evidence. *J Rheumatol* **24(8)**: 1599-607.

Maksymowych, W. P. et al.2014. 14-3-3 η is a novel mediator associated with the pathogenesis of rheumatoid arthritis and joint damage. *Arthritis Res Ther.* **16(2)**:R99

Maksymowych, W. P. et Marotta, A. (2014). 14-3-3 η : a novel biomarker platform for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* **32(5 Suppl 85)**:S-35-9.

Malemud, C. J. (2010). Anticytokine therapy for osteoarthritis: evidence to date. *Drugs Aging.* **27(2)**:95-115.

Malinin, T. et Ouellette, E. A. (2000). Articular cartilage nutrition is mediated by subchondral bone: a long-term autograft study in baboons. *Osteoarthritis Cartilage.* **8(6)**:483-91.

Mapp, P. I. et Walsh, D.A. (2012). Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* **8(7)**:390-8.

Martel-Pelletier, J. et Pelletier, J. P. (2010). Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? *Eklem Hastalıkları ve Cerrahisi.* **21(1)**:2-14.

Martig, S. et al. (2007). MRI characteristics and histology of bone marrow lesions in dogs with experimentally induced osteoarthritis. *Vet Radiol Ultrasound* **48(2)**: 105-12.

Massicotte, F. et al. (2006). Modulation of insulin-like growth factor 1 levels in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Bone.* **38(3)**:333-41.

Matsas, R. et al. (1985). The metabolism of neuropeptides. Phase separation of synaptic membrane preparations with Triton X-114 reveals the presence of aminopeptidase N. *Biochem J.* **231(2)**:445-9.

McAlindon, T. E. (2015). Toward a New Paradigm of Knee Osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **67**: 81987–1989

McLean, J. B. et al. (2015). Proteomic analysis of media from lung cancer cells reveals role of 14-3-3 proteins in cachexia. *Front Physiol.* **28**; 6:136.

Megidish, T. et al. (1998) A Novel Sphingosine-dependent Protein Kinase (SDK1) Specifically Phosphorylates Certain Isoforms of 14-3-3 Protein. *J Biol Chem.* **273(34)**:21834-45.

- Menkes, C. J. et Lane, N. E.** (2004). Are osteophytes good or bad? *OsteoArthritis and Cartilage* **12**, S53–S54
- Menrad, A. et al.** (1993). Biochemical and functional characterization of aminopeptidase N expressed by human melanoma cells. *Cancer Res* **53**(6):1450-5.
- Merz, D. et al.** (2003). IL-8/CXCL8 and growth-related oncogene alpha/CXCL1 induce chondrocyte hypertrophic differentiation. *J Immunol* **171**(8): 4406-15.
- Miki, T. et al.** (2007) The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. *J Biol Chem.* **282**(16):12341-5.
- Miller, R. E. et al.** (2012). CCR2 chemokine receptor signaling mediates pain in experimental osteoarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**(50):20602-7.
- Mina-Osorio, P. et al.** (2007). A role for galectin-3 in CD13-mediated homotypic aggregation of monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **353**(3):605-10
- Mina-Osorio, P.** (2006). CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells. *J Leukoc Biol.* **79**(4):719-30.
- Mina-Osorio, P.** (2008). The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends Mol Med.***14**(8):361-71
- Mina-Osorio, P. et Ortega, E.** (2005). Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγR3 in human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* **77** (6) :1008-17
- Mina-Osorio, P. et Winnicka, B.** (2008). CD13 is a novel mediator of monocytic/endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol.* **84**(2):448-59.
- Mishima, Y. et al.** (2007). Continuous treatment of bestatin induces anti-angiogenic property in endothelial cells. *Cancer Sci.***98**(3):364-72.
- Mobasher, A. et Henrotin, Y. et al.** (2016). Biomarkers of (osteo)arthritis. *Biomarkers*, **20** (8), 513-518
- Moore, B. E.** (1967). Physiological and biochemical aspects of nervous integration. *Carlson FD:* 343-59.
- Morgan, R. et al.** (2015). Expression and Function of Aminopeptidase N/CD13 Produced by Fibroblast Like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis: Role of CD13 in Chemotaxis of Cytokine Activated T cells Independent of Enzymatic Activity. *Arthritis Rheumatol.* **67**(1): 74–85.
- Mori, M. et al.** (2013). Small molecules modulation of 14-3-3 protein-protein interactions. *Drug Discov Today Technol.* **10**(4):e541-7.
- Morris, K. J. et al.** (2010). Characterization of TIMP-3 in human articular talar cartilage. *Connective Tissue Research.* **51**(6):478-90.
- Motokawa, M. et al.** (2005). Effects of cyclic tensile forces on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and macrophage-colony-stimulating factor (M-CSF) in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Dent Res.* **84**(5):422-7.
- Mow, V. C. et al.** (1984). Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. *Journal of Biomechanics.* **17**(5):377-94.
- Murphy, C. L. et al.** (2009). Hypoxia. HIF-mediated articular chondrocyte function: prospects for cartilage repair. *Arthritis Research & Therapy.* **11**(1):213.

- Muslin, A. J, Xing, H.** (2000). 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal*. **12**(11-12):703-9.
- Muslin, A. J. et al.** (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*. **84**(6):889-97.
- Musumeci, G. et al.** (2011). Characterization of apoptosis in articular cartilage derived from the knee joints of patients with osteoarthritis. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. **19**(2):307-13.
- Musumeci, G. et al.** (2013). Post-traumatic caspase-3 expression in the adjacent areas of growth plate injury site: a morphological study. *International Journal of Molecular Sciences*. **14**(8):15767-84.
- Musumeci, G. et al.** (2015). Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *International Journal of Molecular Sciences*. **16**(3):6093-112.
- Musumeci, G. et al.** (2001). OA cartilage derived chondrocytes encapsulated in poly (ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) for the evaluation of cartilage restoration and apoptosis in an in vitro model. *Histol Histopathol*. **26**(10):1265-78.

N

- Nakki, A. et al.** (2015). Association study of MMP8 gene in osteoarthritis. *Connective Tissue Research*. **57**(1):44-52.
- Nampe, A. J. et al.** (2004). Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is highly expressed in osteocytes in human bone. *J Bone Miner Metab* **22**(3): 176-84.
- Neogi, T. et al.** (2009). Cartilage Loss Occurs in the Same Subregions as Subchondral Bone Attrition: A Within-Knee Subregion-Matched Approach From the Multicenter Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum*. **61**(11): 1539–1544.
- Neogi, T. et Zhang, Y.** (2013). Epidemiology of OA. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*. **39**(1): 1–19.
- Neuhold, L. A. et al.** (2001). Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. **107**(1):35-44.
- Nickel, W.** (2003). The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem* **270**(10): 2109-19.
- Nomura, R. et al.** (2004). Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. *J Virol*. **78**(16):8701-8.

O

- Obsil, T. et Obsilova, V.** (2011). Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin Cell Dev Biol.* **22**(7):663-72.
- Obsilova, V. et al.** (2014). Mechanisms of the 14-3-3 Protein Function: Regulation of Protein Function Through Conformational Modulation. *Physiol. Res.* **63** (Suppl. 1): S155-S164, 2014
- Oppenheim, J. J. et Yang, D.** (2005). Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol.* **17**(4):359-65.
- Osterberg, A. et al.** (2016). Subchondral bone sclerosis and cancellous bone loss following OA induction depend on the underlying bone phenotype. *Joint Bone Spine. pii: S1297-319X*(16).
- Ozler, K. et al.** (2015). Serum and knee synovial fluid matrix metalloproteinase-13 and tumor necrosis factor-alpha levels in patients with late-stage osteoarthritis. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica.* **50**(3):356-61.

P

- Page-McCaw, A. et al.** (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology.* **8**(3):221-33.
- Palazzo, C. et al.** (2016). Risk factors and burden of osteoarthritis. *Annals of Physical Rehabilitation Medicine.* **59**(3):134-8.
- Palotie, A. et al.** (1989). Predisposition to familial osteoarthritis linked to type II collagen gene. *Lancet.* **1** (8644):924-7.
- Pan, J. et al.** (2012). Elevated cross-talk between subchondral bone and cartilage in osteoarthritic joints. *Bone.* **51**(2):212-7.
- Pan, J. et al.** (2009). In situ measurement of transport between subchondral bone and articular cartilage. *J Orthop Res* **27**(10): 1347-52.
- Pan, L. et Aller, S. G.** (2015). Tools and procedures for visualization of proteins and other biomolecules. *Curr Protoc Mol Biol.* **110**:19.12
- Papaoannou, N. A. et al.** (2007). Effect of calcitonin in early and late stages of experimentally induced osteoarthritis. A histomorphometric study. *Osteoarthritis Cartilage* **15**(4): 386-95.

- Pasqualini, R.** et al. (2000). Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* **60**(3):722-7.
- Pastoureau, P.** et al. (2003). Quantitative assessment of articular cartilage and subchondral bone histology in the meniscectomized guineapig model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* **11**(6):412-23.
- Pereira, F. E.** et al. (2013). CD13 is essential for inflammatory trafficking and infarct healing following permanent coronary artery occlusion in mice. *Cardiovasc Res.* **100**(1):74-83.
- Perrier, A.** (2010). Ostéoblastes et environnement physico-chimique : Effets du degré de minéralisation et des micro-vibrations. Biologie moléculaire et cellulaire. Saint-Etienne, Université Jean Monnet. **PhD.**
- Perrone, D.** et al. 2015. Biological and therapeutic activities, and anticancer properties of curcumin. *Exp Ther Med.* **10**(5):1615-1623.
- Perry, G. H.** et al. (1972). Spontaneous recovery of the joint space in degenerative hip disease. *Ann Rheum Dis* **31**(6): 440-8.
- Pfander, D.** et al. (1999). Hepatocyte growth factor in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* **7**(6):548-59.
- Piedfer, M.** et al. (2011). Aminopeptidase-N/CD13 is a potential proapoptotic target in human myeloid tumor cells. *FASEB J.* **25**(8):2831-42
- Pottenger, L. A.** et al. (1990). The effect of marginal osteophytes on reduction of varus-valgus instability in osteoarthritic knees. *Arthritis Rheum* **33**(6): 853-8.
- Pouders, C.** et al. (2008). Prevalence and MRI-anatomic correlation of bone cysts in osteoarthritic knees. *AJR Am J Roentgenol* **190**(1): 17-21.
- Poulet, B.** et al. (2015). Intermittent applied mechanical loading induces subchondral bone thickening that may be intensified locally by contiguous articular cartilage lesions. *Osteoarthritis Cartilage.* **23**(6):940-8.
- Pozuelo Rubio, M.** et al. (2004). 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem J.* **379**(Pt 2):395-408.
- Prasadam, I.** et al. (2012). Aggravation of ADAMTS and Matrix Metalloproteinase Production and Role of ERK1/2 Pathway in the Interaction of Osteoarthritic Subchondral Bone Osteoblasts and Articular Cartilage Chondrocytes - Possible Pathogenic Role in Osteoarthritis. *J Rheumatol.* **39**(3):621-34.
- Priam, S.** et al. (2013). Identification of soluble 14-3-3 \square as a novel subchondral bone mediator involved in cartilage degradation in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **65**(7):1831-42.
- Proost, P.** et al. (2007). Proteolytic processing of CXCL11 by CD13/aminopeptidase N impairs CXCR3 and CXCR7 binding and signaling and reduces lymphocyte and endothelial cell migration. *Blood.* **110**(1):37-44
- Pugin, J.** (2008). Dear SIRS, the concept of “alarmins” makes a lot of sense! *Intensive Care Med.* **34**(2):218-21
- Fullerits, R.** et al. (2003). High mobility group box chromosomal protein 1, a DNA binding cytokine, induces arthritis. *Arthritis Rheum.* **48**(6):1693-700.
- Pulsatelli, L.** et al. (2005). Vascular endothelial growth factor activities on osteoarthritic chondrocytes. *Clin Exp Rheumatol* **23**(4): 487-93.

R

- Ra, H. J. et Parks, W. C.** (2007). Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biology*. **26**(8):587-96.
- Radin, E. L., et al.** (1970). A comparison of the dynamic force transmitting properties of subchondral bone and articular cartilage." *J Bone Joint Surg Am* **52**(3): 444-56.
- Radin, E. L. et Rose, R. M.** (1986). Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop Relat Res* **213**: 34-40.
- Rahbar, A. et al.** (2006). Detection of cytotoxic CD13-specific autoantibodies in sera from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Autoimmun.* **26**(3):155-64
- Rahman, M. M. et al.** (2014). CD13 regulates anchorage and differentiation of the skeletal muscle satellite stem cell population in ischemic injury. *Stem Cells*. **32**(6):1564-77
- Rahmani-Neishaboor, E. et al.** (2009). Composite hydrogel formulations of stratifin to control MMP-1 expression in dermal fibroblasts. *Pharm Res* **26**(8): 2002-14.
- Rahmani-Neishaboor, E. et al.** (2012). Localized controlled release of stratifin reduces implantation-induced dermal fibrosis. *Acta Biomater. Acta Biomater.* **8**(10):3660-8.
- Rajagopalan, S. et al.** (2008). 14-3-3 activation of DNA binding of p53 by enhancing its association into tetramers. *Nucleic Acids Res.* **36**(18):5983-91.
- Rangel, R. et al.** (2007). Impaired angiogenesis in aminopeptidase N-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**(11):4588-93
- Rannou, F. et al.** (2010). Physiopathologie de l'arthrose : conceptions actuelles. *Presse Médicale.* **39**(11):1159-63.
- Raynauld, J. P. et al.** (2008). Correlation between bone lesion changes and cartilage volume loss in patients with osteoarthritis of the knee as assessed by quantitative magnetic resonance imaging over a 24-month period. *Ann Rheum Dis* **67**(5): 683-8.
- Reboul, P. et al.** (1996). The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *The journal of Clinical Investigation.* **97**(9):2011-9.
- Reboul, P. et al.** (2001). Hepatocyte growth factor induction of collagenase 3 production in human osteoarthritic cartilage: involvement of the stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase pathway and a sensitive p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor cascade. *Arthritis Rheum* **44**(1): 73-84.
- Riemann, D. et al.** (1995). Stimulation of the expression and the enzyme activity of aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 on human renal cell carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by T cell-derived cytokines, such as IL-4 and IL-13. *Clin Exp Immunol.* **100**(2):277-83.

- Riemann, D.** et al. (1997). Induction of aminopeptidase N/CD13 on human lymphocytes after adhesion to fibroblast-like synoviocytes, endothelial cells, epithelial cells, and monocytes/macrophages. *J Immunol.* **158**(7):3425-32.
- Riemann, D.** et al. (1999). CD13 – not just a marker in leukemia typing. *IMMUNOLOGY TODAY* **20** (283):83.
- Riemann, D.** et al. (2005). Functional co-localization of monocytic aminopeptidase N/CD13 with the Fc gamma receptors CD32 and CD64. *Biochem Biophys Res Commun.* **331**(4):1408-12
- Roemer, F. W.** et al. (2010). Subchondral bone marrow lesions are highly associated with, and predict subchondral bone attrition longitudinally: the MOST study. *Osteoarthritis Cartilage* **18**(1): 47-53.
- Roemer, F. W.** et al. (2009). Change in MRI-detected subchondral bone marrow lesions is associated with cartilage loss: the MOST Study. A longitudinal multicentre study of knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* **68**(9):1461-5.
- Rogers, J.** et al. (2004). Is osteoarthritis a systemic disorder of bone? *Arthritis Rheum.* **50**(2):452-7.
- Roman-Blas, J. A.** et al. (2016). An update on the up and coming therapies to treat osteoarthritis, a multifaceted disease. *Expert Opin Pharmacother.* 1-12
- Ross, P. L.** et al. (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* **3**(12): 1154-69.
- Russo, L. C.** et al. (2012). Natural intracellular peptides can modulate the Interactions of mouse brain proteins and thimet oligopeptidase with 14-3-3 and calmodulin. *Proteomics.* **12**(17):2641-55.

S

- Sahebjam, S.** et al. (2007). Increased collagen and aggrecan degradation with age in the joints of Timp3(-/-) mice. *Arthritis Rheum.* **56**(3):905-9.
- Saiki, I.** et al. (1993). Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *Int J Cancer.* **54**(1):137-43.
- Salvat, C.** et al. (2005). Immature murine articular chondrocytes in primary culture: a new tool for investigating cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **13**(3): 243-9.
- Sanchez, C.** et al. (2005). Subchondral bone osteoblasts induce phenotypic changes in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **13**(11): 988-97
- Sanchez, C.** et al. (2005). Osteoblasts from the sclerotic subchondral bone downregulate aggrecan but upregulate metalloproteinases expression by chondrocytes. This effect is mimicked by interleukin-6, -1beta and oncostatin M pre-treated non-sclerotic osteoblasts. *Osteoarthritis Cartilage* **13**(11): 979-87.
- Sanchez, C.** et al. (2008). Phenotypic characterization of osteoblasts from the sclerotic zones of osteoarthritic subchondral bone. *Arthritis Rheum* **58**(2): 442-55.

- Sanchez, C.** et al. (2009). Mechanical loading highly increases IL-6 production and decreases OPG expression by osteoblasts. *Osteoarthritis Cartilage* **17**(4): 473-81.
- Sanchez, C.** et al. (2012). Regulation of subchondral bone osteoblast metabolism by cyclic compression. *Arthritis Rheum.* **64**(4):1193-203.
- Sanchez, K.** et al. (2010). Prises en charge non pharmacologiques et non chirurgicales de l'arthrose : orthèses, exercices. *Presse médicale.* **39**: 1172–1179.
- Sandell, L. J.** et **Aigner, T.** (2001). Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Research.* **3**(2):107-13.
- Santos, A.** et **Roentsch, J.** et al. (2000). Aminopeptidase N/CD13 is associated with raft membrane microdomains in monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **269**(1):143-8.
- Santos, A. N.** et **Langner, J.** et al. (2000). Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cell Immunol.* **201**(1):22-32.
- Sardari, K.** et al. (2011). Increased levels of the 14-3-3 eta and gamma proteins in the synovial fluid of dogs with unilateral cranial cruciate ligament rupture. *Can J Vet Res* **75**(4): 271-7.
- Satoh, J.** et al. (1999). The 14-3-3 protein detectable in the cerebrospinal fluid of patients with prion-unrelated neurological diseases is expressed constitutively in neurons and glial cells in culture. *Eur Neurol* **41**(4): 216-25.
- Scharstuhl, A.** et al. (2002). Inhibition of endogenous TGF-beta during experimental osteoarthritis prevents osteophyte formation and impairs cartilage repair. *J Immunol* **169**(1): 507-14.
- Schmit, C.** (2012). Expression, purification et cristallisation de l'aminopeptidase-N humaine (APN ou CD13) : évaluation in vitro et in vivo d'inhibiteurs sélectifs. Université de Haute-Alsace .**PhD**
- Sekine, K.** et al. (1999). Induction of apoptosis by bestatin (ubenimex) in human leukemic cell lines. *Leukemia.* **13**(5):729-34.
- Sellam, J.** (2016). De l'arthrose aux arthroses : une nouvelle vision physiopathologique . L'arthrose est une vraie maladie métabolique. *Springer Science + Business Media France Sarl.*
- Sellam, J.** et **Berenbaum, F.** (2011). arthrosis. *Rev Prat.* **61**(5):675-85
- Sellam, J.** et **Berenbaum, F.** (2010). The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nature Reviews. Rheumatology.* **6**(11):625-35.
- Sharma, A. R.** et al. (2013). Interplay between Cartilage and Subchondral Bone *Int J Mol Sci.* **14**(10):19805-30

- Sherwood, J. C.** et al. (2014). Cellular and molecular mechanisms of cartilage damage and repair. *Drug Discov Today*. **19**(8):1172-7
- Shim, J. S.** et al. (2003). Irreversible inhibition of CD13/aminopeptidase N by the antiangiogenic agent curcumin. *Chem Biol*. **10**(8):695-704.
- Shimizu, T.** et al. (2002). CD13/aminopeptidase N-induced lymphocyte involvement in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. **46**(9):2330-8.
- Shipp, M. A.** et **Look, A. T.** (1993) Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood*. **82**(4):1052-70.
- Sholpov, B. V.** et al. (1997). Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum* **40**(11):2065-74.
- Sluchanko, N. N.** et **Gusev, N. B.** (2012). Oligomeric structure of 14-3-3 protein: what do we know about monomers? *FEBS Lett*. **586**(24):4249-56.
- Smith, R. L.** (1999). Degradative enzymes in osteoarthritis. *Frontiers in Bioscience : a journal and virtual library*. **4**:D704-12.
- Snoek-van Beurden, P. A.** et **Von den Hoff, J. W.** (2005). Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*. **38**(1):73-83.
- Söderberg, C.** et al. (1993). CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *J Virol*. **67**(11):6576-85.
- Sokoloff, L.** (1993). Microcracks in the calcified layer of articular cartilage. *Arch Pathol Lab Med*. **117**(2):191-5.
- Sophia Fox, A. J.** et al. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*. **1**(6):461-8.
- Srikanth, V. K.** et al. (2005). A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage/OARS*. **13**(9):769-81.
- Stamenkovic, I.** (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *The Journal of Pathology*. **200**(4):448-64.
- Stanton, H.** et al. (2005). ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature*. **434**(7033):648-52.
- Stok, K. S.** et al. (2009). Revealing the interplay of bone and cartilage in osteoarthritis through multimodal imaging of murine joints. *Bone*. **45**(3):414-22.
- Stoop, R.** et al. (1999). Type II collagen degradation in spontaneous osteoarthritis in C57Bl/6 and BALB/c mice. *Arthritis Rheum*. **42**(11):2381-9.
- Stoop, R.** et al. (2000). Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum*. **43**(9):2121-31.
- Suri, S.** et **Walsh, D. A.** (2012). Osteochondral alterations in osteoarthritis. *Bone* **51**(2):204-11.
- Suri, S.** et al. (2007). Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **66**(11): 1423-8.

T

- Tanamas, S. K.** et al. (2010). The associations between indices of patellofemoral geometry and knee pain and patella cartilage volume: a cross-sectional study. *BMC Musculoskeletal Disord* **11**: 87.
- Tani, K.** et al. (2000). CD13/aminopeptidase N, a novel chemoattractant for T lymphocytes in pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* **161**(5):1636-42.
- Taniguchi, N.** et al. (2007). Stage-specific secretion of HMGB1 in cartilage regulates endochondral ossification. *Mol Cell Biol.* **27**(16):5650-63.
- Tao, Y.** et al. (2015). Expression and correlation of matrix metalloproteinase-7 and interleukin-15 in human osteoarthritis. *International Journal of Clinical Experimental Pathology.* **8**(8):9112-8.
- Tetlow, L. C.** et al. (2001). Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis and Rheumatism.* **44**(3):585-94.
- Théry, C.** et al. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* **9**(8):581-93.
- Thomas, E.** et al. (2014). Defining and mapping the person with osteoarthritis for population studies and public health. *Rheumatology* **53**(2):338-45
- Thunnissen, M. M.** et al. (2001). Crystal structure of human leukotriene A (4) hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. *Nat Struct Biol.* **8**(2):131-5.
- Thyssen, S.** et al. (2015). Targets, models and challenges in osteoarthritis research. *Disease Models & Mechanisms.* **8**(1):17-30.
- Toyo-oka, K.** et al. (2003). 14-3 3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nat Genet.* **34**(3):274-85.
- Tresnan, D. B.** et al. (1996). Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. *J Virol.* **70**(12):8669-74.
- Troeberg, L.** et **Nagase, H.** (2012). Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1824**(1):133-45.
- Truong, A. B.** et al. (2002). Role of the 14-3-3 C-terminal loop in ligand interaction. *Proteins.* **49**(3):321-5.
- Tyler, J. A.** (1989). Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *Biochem J.* **260**(2):543-8.
- Tzivion, G.** et al. (2006). 14-3-3 proteins as potential oncogenes. *Semin Cancer Biol.* **16**(3):203-13.

U

- Uhart, M. et Bustos, D. M.** (2013). Human 14-3-3 paralogs differences uncovered by cross-talk of phosphorylation and lysine acetylation. *PLoS One*. **8**(2):e55703.
- Uhart, M. et Bustos, D. M.** (2014). Protein intrinsic disorder and network connectivity. The case of 14-3-3 proteins. *Front Genet.***3**;5:10.
- Upton, A. R. et al.** (2012). The expression of RANKL and OPG in the various grades of osteoarthritic cartilage. *Rheumatol Int.* **32**(2):535-40.

V

- Valdes, A. M. et al.** (2007). Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* **56**(1): 137-46.
- Valdes, A. M. et al.** (2014). Large scale meta-analysis of urinary C-terminal telopeptide, serum cartilage oligomeric protein and matrix metalloprotease degraded type II collagen and their role in prevalence, incidence and progression of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage / OARS.* **22**(5):683-9.
- Van Bezooijen, R. L. et al.** (2004). Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* **199**(6): 805-14.
- Van der Kraan, P. M. et Van den Berg, W. B.** (2007). Osteophytes: relevance and biology. *Osteoarthritis Cartilage* **15**(3): 237-44.
- Van der Kraan, P. M.** (1990). Degenerative knee joint lesions in mice after a single intra-articular collagenase injection. A new model of osteoarthritis. *J Exp Pathol (Oxford).* **71**(1):19-31.
- Van der Kraan, P. M. et al.** (1989). Development of osteoarthritic lesions in mice by "metabolic" and "mechanical" alterations in the knee joints. *The American Journal of Pathology.* **135**(6):1001-14.
- Van Hal, P. T. et al.** (1994). Potential indirect anti-inflammatory effects of IL-4. Stimulation of human monocytes, macrophages, and endothelial cells by IL-4 increases aminopeptidase-N activity (CD13; EC 3.4.11.2). *J Immunol.***153**(6):2718-28.
- Van Hensbergen, Y. et al.** (2002). Soluble aminopeptidase N/CD13 in malignant and nonmalignant effusions and intratumoral fluid. *Clin Cancer Res.* **8**(12):3747-54
- Van Lent, P. L. et al.** (2008). Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis.* **67** (12):1750-8

W

- Walsh, D. A. et Pearson, C. I.** (2001). Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases. *Arthritis Res* **3**(3): 147-53.
- Walsh, D. A. et al.** (1993). Neuropeptide degrading enzymes in normal and inflamed human synovium. *Am J Pathol.* **142**(5):1610-21.
- Walsh, D. A. et al.** (2010). Angiogenesis and nerve growth factor at the osteochondral junction in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* **49**(10): 1852-61.
- Watanabe, Y. et al.** (1998). Aminopeptidase N in sera of healthy subjects is a different N-terminal processed derivative from the one obtained from maternal serum. *Mol Genet Metab.* **63**(4):289-94.
- Watt, V. M. et Willard, H.F.** (1990). The human aminopeptidase N gene: isolation, chromosome localization, and DNA polymorphism analysis. *Hum Genet.* **85**(6):651-4.
- Wei, Y. et Bai, L.** (2016). Recent advances in the understanding of molecular mechanisms of cartilage degeneration, synovitis and subchondral bone changes in osteoarthritis. *Connect Tissue Res.* **57**(4):245-61.
- Westacott, C. I. et al.** (1997). Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone. *Arthritis Rheum* **40**(7): 1282-91.
- Westling, J. et al.** (2002). ADAMTS4 cleaves at the aggrecanase site (Glu373-Ala374) and secondarily at the matrix metalloproteinase site (Asn341-Phe342) in the aggrecan interglobular domain. *J Biol Chem.* **277**(18):16059-66.
- Wickström, M. et al.** (2011). Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Sci.* **102**(3):501-8.
- Wieland, H. A. et al.** Osteoarthritis - an untreatable disease? *Nat Rev Drug Discov.* **4**(4):331-44.
- Wilker, E. et Yaffe, M. B.** (2004). 14-3-3 Proteins--a focus on cancer and human disease. *J Mol Cell Cardiol* **37**(3): 633-42.
- Wilson, A. J. et al.** (1988). Transient osteoporosis: transient bone marrow edema? *Radiology* **167**(3):757-60.
- Wilusz, R.E. et al.** (2014). The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biology.* **39**:25-32.
- Winnicka et al.** (2010). CD13 is dispensable for normal hematopoiesis and myeloid cell functions in the mouse. *J Leukoc Biol.* **88**(2):347-59.
- Wluka, A. E. et al.** (2009). Bone marrow lesions predict increase in knee cartilage defects and loss of cartilage volume in middle-aged women without knee pain over 2 years. *Ann Rheum Dis* **68**(6): 850-5.
- Wong, A. H. et al.** (2012). The X-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptideprocessing. *J Biol Chem.* **287**(44):36804-13.

X

Xia, B. et al. (2014). Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms. *Calcified Tissue International*. **95**(6):495-505.

Xu, Y. et al. (1995). Substance P and bradykinin are natural inhibitors of CD13/ aminopeptidase N. *Biochem Biophys Res Commun*. **208**(2):664-74.

Y

Yaffe, M. B. (2001). How do 14-3-3 proteins work ? Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Letters* **513**: 53-57.

Yaffe, M. B. et al. (1997). The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell*. **91**(7):961-71.

Yamasaki, S. C. et al. (2012). Neutral aminopeptidase and dipeptidyl peptidase IV in the development of collagen II-induced arthritis. *Regul Pept*. **173**(1-3):47-54.

Yang, X. et al. (2006). Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**(46):17237-42.

Yeager, C. L. et al. (1992). Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*. **357**(6377):420-2.

Yuan, Q. et al. (2014). Elevated VEGF levels contribute to the pathogenesis of osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord*. **17**:15:437.

Yusup, A. et al. (2015). Bone marrow lesions, subchondral bone cysts and subchondral bone attrition are associated with histological synovitis in patients with end-stage knee osteoarthritis: a cross-sectional study. *Osteoarthritis Cartilage*. **23**(11):1858-64.

Z

Zamli, Z. et **Sharif, M.** (2011). Chondrocyte apoptosis: a cause or consequence of osteoarthritis? *International Journal of Rheumatic Diseases*. **14**(2):159-66.

Zanetti, M. et al. (2000). Bone marrow edema pattern in osteoarthritic knees: correlation between MR imaging and histologic findings. *Radiology* **215**(3): 835-40.

Zeng, C. Q. et al. (2015). High MMP-1, MMP-2, and MMP-9 protein levels in osteoarthritis. *Genetics and Molecular Research: GMR*. **14**(4):14811-22.

Zhang, L. et al. (2010). On the role of diffusible binding partners in modulating the transport and concentration of proteins in tissues. *J Theor Biol*. **263**(1):20-9

Zhang, L. et al. (2011). Fluctuation of knee pain and changes in bone marrow lesions, effusions, and synovitis on magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum*. **63**(3):691-9

- Zhang, L. Z.** et al. (2012). Mechanical and biologic link between cartilage and subchondral bone in osteoarthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. **64**(7):960-7
- Zhang, X.** et al. (2015). Classifications and Definitions of Normal Joints. <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/48112.pdf>.
- Zhang, Y.** et al. (2011). Fluctuation of knee pain and changes in bone marrow lesions, effusions, and synovitis on magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum*. **63**(3):691-9.
- Zoricic, S.** et al. (2003). Expression of bone morphogenetic proteins and cartilage-derived morphogenetic proteins during osteophyte formation in humans. *J Anat*. **202**(Pt 3):269-77.