



HAL
open science

Implication de la protéine 14-3-3 ϵ , une nouvelle alarmine, dans l'activation de l'immunité innée au cours de l'arthrose

Marion Millerand

► To cite this version:

Marion Millerand. Implication de la protéine 14-3-3 ϵ , une nouvelle alarmine, dans l'activation de l'immunité innée au cours de l'arthrose. Rhumatologie et système ostéo-articulaire. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS225 . tel-03371393

HAL Id: tel-03371393

<https://theses.hal.science/tel-03371393>

Submitted on 8 Oct 2021

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 SORBONNE UNIVERSITÉ**

Spécialité

Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Présentée par

Marion MILLERAND

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE SORBONNE UNIVERSITÉ

**IMPLICATION DE LA PROTEINE 14-3-3 ϵ , UNE NOUVELLE
ALARMINE, DANS L'ACTIVATION DE L'IMMUNITE INNEE
AU COURS DE L'ARTHROSE**

Soutenue le 24 mars 2020

Devant le jury composé de :

Pr. Bruno FEVE
Dr. Danièle NOEL
Dr. Véronique WITKO-SARSAT
Dr. David MOULIN
Dr. Vincent MARECHAL
Dr. Gwenaëlle ANDRE-LEROUX
Pr. Francis BERENBAUM
Dr. Claire ATTALI

Président du jury
Rapporteuse
Rapporteuse
Examineur
Examineur
Invitée
Directeur de thèse
Co-encadrante

Résumé

L'arthrose est la pathologie articulaire la plus fréquente et se caractérise par une dégradation du cartilage, une inflammation de la membrane synoviale et un remodelage de l'os sous-chondral. La dégradation du cartilage provoque l'accumulation de débris dans la capsule articulaire. La présence anormale de ces débris déclenche une inflammation et induit la libération de signaux d'alarmes, les alarmines (*damage associated molecular pattern* : DAMPS). Ces molécules endogènes ont de nombreux rôles physiologiques intracellulaires, cependant en cas de lésions tissulaires ou de stress, elles sont libérées dans le milieu extracellulaire et se lient aux récepteurs exprimés à la surface des cellules engagées dans la défense de l'hôte, notamment les *Toll Like récepteurs* (TLR2, TLR4) impliqués dans l'activation de l'immunité innée.

Le laboratoire a mis en évidence un médiateur soluble, la protéine 14-3-3 ϵ . Cette molécule est libérée par les ostéoblastes en réponse à un stress mécanique excessif et induit des effets cataboliques (production de MMP-3 et MMP-13) sur les chondrocytes articulaires. La protéine 14-3-3 ϵ partage de nombreuses caractéristiques avec les alarmines.

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets de la protéine 14-3-3 ϵ sur les différents types cellulaires de l'articulation ; les chondrocytes, macrophages et synoviocytes fibroblast like (FLS) et déterminer si les récepteurs de l'immunité innée, TLR2 et TLR4 sont impliqués dans ces effets. L'ensemble des résultats a pour but de déterminer si la protéine 14-3-3 ϵ peut être considérée comme une nouvelle alarmine dans l'arthrose.

La protéine 14-3-3 ϵ recombinante induit des effets pro-inflammatoires sur les explants de membranes synoviales humaines ainsi que sur les deux types cellulaires qui la composent, les FLS et les macrophages. De plus, 14-3-3 ϵ induit une polarisation des macrophages humains et murins vers un phénotype pro-inflammatoire M1 en provoquant l'augmentation significative de leurs productions de facteurs inflammatoires. Les récepteurs TLR2 et TLR4 sont impliqués dans les effets de la protéine 14-3-3 ϵ car l'inhibition de ces récepteurs sur des cultures de chondrocytes murins sauvages ou l'absence de ces récepteurs dans des cultures de chondrocytes ou macrophages murins déficients pour TLR2 ou TLR4 provoque une diminution significative des effets de 14-3-3 ϵ . L'étude des interactions entre 14-3-3 ϵ et les récepteurs TLR2 et TLR4 par la technique de résonance plasmonique de surface a mis en évidence une interaction entre les récepteurs TLR2/TLR4 et 14-3-3 ϵ . L'affinité est plus forte entre TLR2 et 14-3-3 ϵ . Les résidus thréonine T142 et sérine S143 phosphorylés, identifiés par modélisation informatique chez TLR2, ne semblent pas responsables de la liaison TLR2 et 14-3-3 ϵ . L'ensemble de ces résultats montrent que la protéine 14-3-3 ϵ possède de nombreux effets inflammatoires et pro-cataboliques impliquant les TLRs et la désigne comme une nouvelle alarmine impliquée dans l'arthrose.

L'identification de nouvelles alarmines dans cette pathologie et la compréhension de leurs mécanismes physiopathologiques sont essentielles afin d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour l'arthrose.

Mots-clés : 14-3-3 ϵ , Alarmine, Immunité innée, TLRs, Arthrose

Abstract

Osteoarthritis is the most common joint disease characterized by cartilage degradation, synovitis and subchondral bone remodeling. Cartilage degradation causes an accumulation of matrix products in the joint. The abnormal presence of these matrix components triggers inflammation and induces the release of alarm signals called damage associated molecular pattern (DAMPs). These endogenous molecules have many intracellular physiological roles, however in the event of tissue damage or stress, they are released into the extracellular environment and bind to receptors expressed on the surface of cells involved in host defense, especially the Toll Like receptors (TLR2, TLR4) involved in the activation of innate immunity.

The laboratory has identified a soluble mediator, the protein 14-3-3 ϵ . This molecule is released by osteoblasts in response to excessive mechanical stress and induces catabolic effects (production of MMP-3 and MMP-13) on articular chondrocytes. Protein 14-3-3 ϵ shares many features with alarmins.

The aim of this work is to study the effects of protein 14-3-3 ϵ on the different cell types of the joint; chondrocytes, macrophages and fibroblast-like synoviocytes (FLS) and determine whether innate immunity receptors, TLR2 and TLR4 are involved in these effects. The overall aim of the results is to determine whether protein 14-3-3 ϵ can be considered as a new alarmin in osteoarthritis.

The recombinant protein 14-3-3 ϵ induces pro-inflammatory effects on human synovial membranes as well as on the two types presents inside the synovium, FLS and macrophages. In addition, 14-3-3 ϵ induces a polarization of human and murine macrophages towards a pro-inflammatory M1 phenotype by causing a significant increase in their inflammatory factor production. TLR2 and TLR4 receptors are implicated in the effects of 14-3-3 ϵ because inhibition of these receptors in wild murine chondrocyte cultures or the absence of these receptors in cultures of murine chondrocytes or macrophages deficient for TLR2 or TLR4 causes a significant decrease in the effects of 14-3-3 ϵ . The study of the interactions between 14-3-3 ϵ and the TLR2 and TLR4 receptors using the surface plasmon resonance technique has shown an interaction between the TLR2/TLR4 and 14-3-3 ϵ receptors. The affinity is stronger between TLR2 and 14-3-3 ϵ . The phosphorylated threonine T142 and serine S143 residues, identified by computer modelling on TLR2, do not appear to be responsible for the binding between TLR2 and 14-3-3 ϵ . All these results show that the 14-3-3 ϵ protein has numerous inflammatory and pro-catabolic effects involving TLRs and designate it as a new alarmin involved in osteoarthritis.

The identification of new alarmins in this pathology and the understanding of their physiopathological mechanisms are essential in order to establish new therapeutic strategies in osteoarthritis.

Keywords: 14-3-3 ϵ , Alarmin, Innate Immunity, TLRs, Osteoarthritis

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie le Pr. Bruno Fève pour m'avoir accueillie au sein du Centre de recherche Saint Antoine et accepté d'être le président de mon jury de thèse. Merci pour vos précieux encouragements qui m'auront aidé à obtenir ma prolongation de thèse.

Je remercie les Dr. Danièle Noël et Véronique Witko d'avoir accepté avec spontanéité la fonction de rapportrice et pour l'intérêt qu'elles portent à mes travaux.

Je remercie les Dr. David Moulin et Vincent Maréchal d'avoir accepté la fonction d'examineur pour ce travail. Leurs expertises me seront précieuses.

Je remercie le Dr. Gwenaëlle André-Leroux pour son aide précieuse dans le travail de modélisation et sa bonne humeur rayonnante. Merci pour toutes ces sessions à l'Inra avec Laure et Anna qui m'auront tant appris.

Je remercie le Pr. Francis Berenbaum qui a eu la gentillesse de m'accueillir au sein de son laboratoire et pour ses précieux conseils prodigués tout au long de la thèse.

Je remercie chaleureusement le Dr. Claire Attali pour m'avoir encadrée durant ces 4 années avec une grande bienveillance. Merci pour sa disponibilité, sa profonde gentillesse et ses conseils qui m'auront permis de me construire petit à petit en tant que chercheuse.

Je remercie la FRM pour le financement de ma prolongation de thèse.

Un grand merci à Laure Sudre pour sa gentillesse et son aide si précieuse dans ce travail et pour son soutien tout au long de la thèse.

Un merci tout particulier à Anna et Arnaud, les deux meilleurs stagiaires du monde ! Merci pour votre participation au projet et votre bonne humeur.

Merci à Natalia, ma super co-bureau pour son aide et tous ses petits mots de soutien qui m'ont accompagné dans les derniers mois de thèse.

Je remercie chaleureusement Alice et Xavier pour leur aide précieuse et leurs conseils avisés, Kristell et Audrey pour leur aide et leur gentillesse ainsi que Jérémie, Adeline, Pauline, Coralie et tous ceux qui sont passés par le laboratoire, Maria-Luisa, Sandy, Sabine, Danièle, et les supers stagiaires, Manon, Sarah, Paul, Julie, Anouchka, Alexis et Simge pour leur soutien.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe d'Yves Lebouc qui m'ont tant apporté au cours de ces années. Merci à Sarah et Lyvianne, Laurent, Maud, Clémence et Yves.

Je remercie également la plateforme d'animalerie et particulièrement Tatiana, Timothé, Laetitia, Alizée et Quentin et tous les autres membres de l'animalerie pour leur gentillesse et leur aide.

Merci à Indira, Ilhem et Charlène qui ont rendu ces années de thèse si joyeuses. Merci pour votre grain de folie et la super ambiance que vous apportez au laboratoire ! Je vous souhaite beaucoup de réussite dans vos projets de thèse.

Je remercie énormément la team Poudlargenne qui a constitué une petite famille au sein du centre et organisé un évènement de folie ! Merci à Pauline, Jennifer, Indira, Emilie, Titou et Camille pour ces supers moments passés ensemble.

Je remercie ma famille qui m'a toujours soutenue tout au long de mes années d'études. Merci à mes parents d'avoir toujours cru en moi, j'en suis là grâce à vous aujourd'hui. Merci à Nicolas et Antoine, les meilleurs petits frères que l'on puisse avoir et qui m'ont toujours encouragée. Je vous aime très fort.

Merci à mes grands-parents, Odette, Alain et Danièle, mes cousins et cousines, Alix, Solène, Alexandre, Diane, Tristan, Baptiste et Léna, mes oncles et tantes, Nicolas et Sophie, Cyrille et Véronique, qui sont toujours aussi présents dans ma vie malgré le temps qui passe. Merci à tous pour votre énorme soutien.

Je remercie mes amis pour leur soutien sans faille, leur humour et les nombreux moments passés ensemble qui m'auront permis d'aller jusqu'au bout de cette aventure ! Merci de m'apporter tant de bonheur au quotidien.

Merci à toi Aude pour ton amitié incroyable et toutes les aventures que nous avons vécues ensemble (et qui ne sont pas prêtes de s'arrêter !). Tu transmets ta joie de vivre à toutes les personnes qui t'entourent et je suis vraiment heureuse de partager tant de voyages et vacances avec toi. Merci à toi Jérôme pour tous les bons moments passés ensemble.

Merci à Pauline et Jennifer pour tous les merveilleux moments passés avec vous. Nous avons tant partagé ces dernières années ! Nos sorties, rendez-vous gym et sushis nous ont permis de traverser cette épreuve digne d'un marathon comme des chefs. Merci à vous pour votre amitié et votre soutien qui ont été si précieux pour moi. Je vous souhaite beaucoup de réussite dans vos projets à toutes les deux.

Merci à Alexandra et Adrian sans oublier Leia pour votre joie de vivre, votre gentillesse et votre énergie incroyable ! Les soirées à Alfortville et vacances avec vous resteront à jamais gravés dans ma mémoire. Continuez à nous faire rêver avec vos aventures à l'autre bout du monde.

Merci à toi Cindy pour tous les beaux moments que nous avons partagés comme les rendez-vous pâtisserie, la gym, les soirées entre amis et les manips en musique au labo. Je te souhaite beaucoup de réussite, tu le mérites.

Merci à toi Marylène pour les nombreux fou-rires et moments mémorables que nous avons eu à Roscoff, Villefranche et Paris. Merci pour ton soutien et ta joie de vivre !

Merci à toi Julia pour ton amitié, ton soutien et tous les supers moments passés ensemble depuis toutes ces années. Je suis fière de ce que nous avons réussi à accomplir chacune et je te souhaite le meilleur avec Julien.

Je remercie Maud, Nawell, Adeline, Julie, Edwige, Alexandre, Magalie, Alix, Domitille, Karol, Pierre et tous les amis rencontrés au cours de mes années d'études pour leur amitié et leur bienveillance. Merci de m'avoir soutenue et encouragée.

Et enfin merci à toi Benjamin, pour tout l'amour que tu m'apportes. Tu es celui qui me fait me sentir heureuse tous les jours et qui me motive à donner le meilleur de moi-même.

Table des matières

Liste des abréviations.....	10
Avant-propos.....	13
Introduction.....	14
1. L'articulation.....	15
1.1 Définition d'une articulation	15
1.2 Structure et fonction de l'articulation synoviale.....	15
1.3 Les différents tissus de l'articulation.....	17
1.3.1 Le cartilage articulaire.....	17
1.3.1.1 Organisation du cartilage articulaire.....	18
1.3.1.2 Les chondrocytes.....	19
1.3.1.3 La matrice extracellulaire du cartilage	20
1.3.1.4 Charge mécanique et homéostasie du cartilage	22
1.3.1.5 Les métalloprotéases matricielles.....	24
1.3.1.6 Régulation des MMPs	26
1.3.1.7 Les ADAMTS	27
1.3.2 La membrane synoviale.....	27
1.3.2.1 Le liquide synovial	29
1.3.2.2 Les synoviocytes fibroblast like	29
1.3.2.3 Les macrophages de la membrane synoviale	30
1.3.2.4 Autres cellules de la membrane synoviale	31
1.3.2.5 Matrice extracellulaire de la membrane synoviale	32
1.3.3 L'os sous-chondral	32
1.3.3.1 Les cellules de l'os	34
1.3.3.2 La matrice osseuse.....	35
1.3.4 Le tissu adipeux de Hoffa.....	36
1.3.5 Autres tissus de l'articulation	36
2. L'arthrose	36
2.1 Epidémiologie, diagnostic et traitements.....	36
2.1.1 Epidémiologie	36
2.1.2 Diagnostic.....	38
2.1.3 Traitements.....	38
2.1.4 Prévention.....	40
2.2 Les phénotypes d'arthrose.....	41
2.2.1 Classification des phénotypes par facteurs de risques.....	42

2.2.1.1	L'âge.....	42
2.2.1.2	L'obésité/ Syndrome métabolique.....	44
2.2.1.3	Le stress mécanique.....	45
2.2.1.4	Le genre	46
2.2.1.5	Facteurs génétiques, épigénétiques et ethniques	46
2.2.2	Classification des phénotypes par symptômes cliniques	47
2.2.2.1	Phénotype de douleur chronique	48
2.2.2.2	Phénotype inflammatoire.....	49
2.2.2.3	Phénotype lié au syndrome métabolique	49
2.2.2.4	Phénotype de stress mécanique	50
2.2.2.5	Phénotype lié au cartilage et à l'os	50
2.2.2.6	Phénotype minimal d'arthrose.....	51
2.2.3	Classification par endotypes :.....	51
2.2.3.1	Endotype lié à l'âge ou la senescence cellulaire.....	51
2.2.3.2	Endotype inflammatoire	51
2.2.3.3	Endotype lié à la douleur	52
2.2.4	Big Data et thérapies ciblées	52
2.3	Altérations tissulaires et cellulaires au cours de l'arthrose.....	54
2.3.1	Cartilage arthrosique	54
2.3.1.1	Changements macroscopiques.....	54
2.3.1.2	Au niveau cellulaire.....	55
2.3.2	Membrane synoviale arthrosique :	57
2.3.3	Os sous-chondral arthrosique :	59
2.4	Communication entre les tissus au cours de l'arthrose.....	60
2.4.1	Communication os/cartilage.....	60
2.4.1.1	Les chenaux vasculaires	61
2.4.1.2	Les microfractures	62
2.4.2	Communication cartilage/os et membrane synoviale	63
3.	Immunité innée et Arthrose	64
3.1	Vue générale du système immunitaire	64
3.1.1	Immunité innée, immunité adaptative et réaction inflammatoire	64
3.1.2	Immunité adaptative et arthrose	66
3.2	Implication de l'immunité innée dans l'arthrose :.....	67
3.2.1	Les alarmines.....	68
3.2.1.1	Définition.....	68
3.2.1.2	Mode de libération active et passive.....	70
3.2.1.3	Libération des alarmines par les différents tissus de l'articulation.....	71

3.2.2	Récepteurs de l'immunité innée : Les <i>Pathogen recognition receptors</i> (PRR)	75
3.2.3	Facteurs pro-inflammatoires (Cytokines, chémokines).....	81
3.2.4	Le système du complément	81
3.2.5	Les macrophages	83
3.2.6	Les neutrophiles.....	86
3.3	Immunité innée et phénotypes d'arthrose.....	87
3.3.1	Dérégulation de l'immunité innée et phénotype lié au vieillissement.....	87
3.3.2	Dérégulation de l'immunité innée en cas d'obésité/syndrome métabolique	89
3.3.3	Immunité innée et stress mécanique.....	90
4.	Les protéines 14-3-3.....	94
4.1	Structure	95
4.2	Fonctions intracellulaires.....	98
4.3	Les protéines 14-3-3 extracellulaires.....	100
4.3.1	Protéines 14-3-3 extracellulaires et implications dans différentes pathologies	100
4.3.2	14-3-3 epsilon et caractéristiques communes avec les alarmines.....	101
	Objectifs.....	101
	Résultats.....	102
1.	Etude des effets de 14-3-3ε sur les différents tissus de l'articulation et de son interaction avec les récepteurs TLR2 et TLR4.....	103
1.1	Principaux résultats soumis	103
1.2	Article soumis à Osteoarthritis and Cartilage (Minor Revision).....	107
2.	Contrôle des endotoxines potentiellement présentes dans la protéine 14-3-3ε recombinante et caractérisation de l'effet propre de la protéine 14-3-3ε recombinante	147
3.	Modélisation des interactions entre 14-3-3 et TLR2 (Résultats non soumis)	150
3.1	Etude des interactions entre 14-3-3ε et les récepteurs TLR2 et TLR4 par Résonance plasmonique de surface	150
3.2	Modélisation informatique des interactions ligand/récepteur par outils numériques (Etude <i>in Silico</i>)	152
4.	Présence de la 14-3-3ε dans le liquide synovial de patients arthrosiques (Résultats non soumis)	158
5.	Etude des effets de 14-3-3ε par injections intra-articulaires chez la souris (Etude <i>in vivo</i>)	
	Résultats non soumis	159
	Discussion.....	162
	Conclusion/Perspectives.....	168
	Bibliographie.....	172
	Annexes.....	209
	Revue.....	210

Table des figures et Tableaux

<i>Figure 1 : Anatomie de l'articulation du genou en vue de face et latérale</i>	15
Figure 2 : Structure de l'articulation synoviale du genou (vue sagittale)	16
Figure 3 : Coupe histologique de cartilage articulaire montrant des chondrocytes entourés de matrice extracellulaire	17
Figure 4 : Schéma de l'organisation et de la composition du cartilage articulaire en couches	19
Figure 5 : Schéma de la composition de la matrice extracellulaire présente dans le cartilage articulaire	22
Figure 6 : Principaux mécanorécepteurs présents chez les chondrocytes	23
Figure 7 : Schéma de l'homéostasie du cartilage	24
Figure 8 : Coupe histologique de membrane synoviale	28
Figure 9 : Mise en évidence de la présence d'une mono-couche de macrophages au niveau de la membrane synoviale de souris par microscopie à nappe de lumière (LSFM) et microscopie confocale à balayage laser (CLSM).....	31
Figure 10 : Schéma de la structure d'un os long Adapté de Medelli.fr, Georges Dolisi.....	32
Figure 11 : Schéma de la jonction ostéocondrale	33
Figure 12 : Schéma des acteurs du remodelage osseux	35
Figure 13 : Changements pathologiques des tissus au cours de l'arthrose	37
Figure 14 : Classification radiologique de la sévérité de l'arthrose (échelle Kellgren-Lawrence).....	38
Figure 15 : Présentation des différents facteurs de susceptibilité et prédisposition de l'arthrose	42
Figure 16 : Les caractéristiques du vieillissement.....	43
Figure 17 : Les différents alignements de l'articulation du genou	45
Figure 18 : Phénotypes cliniques de l'arthrose de genoux selon Dell'Isola et al.....	48
Figure 19 : Coupes histologiques de genou provenant de donneur sain (gauche) ou de patient arthrosique (droite)	55
Figure 20 : Changements histopathologiques de la membrane synoviale au cours de l'arthrose	58
Figure 21 : Communication cellulaire et moléculaire entre l'os et le cartilage dans l'arthrose	61
Figure 22 : Coupes histologiques de la jonction ostéocondrale montrant l'invasion du cartilage par les chenaux vasculaires au cours de l'arthrose	62
Figure 23 : Coupe histologique de la jonction ostéocondrale montrant des microfractures en condition arthrosique	63
Figure 24 : Vue d'ensemble du système immunitaire	65
Figure 25 : Vue d'ensemble de l'inflammation	66
Figure 26 : Implication des alarmines dans l'articulation synoviale.....	69
Figure 27 : Mode de libération et d'action des alarmines	71
Figure 28 : Représentation cristallographique de l'hétérodimère TLR2/TLR1	76
Figure 29 : Schéma de l'activation de la signalisation intracellulaire par les DAMPS via TLR2 et TLR4	77
Figure 30 : Activateurs endogènes (DAMPS) des récepteurs TLRs regroupés en fonction de leur nature biochimique	78
Figure 31 : Exemple de convergence des voies de signalisation entre TLR et RAGE activés par HMGB1	80
Figure 32 : Schéma du système du complément	82
<i>Figure 33 : Schéma du rôle central des macrophages avec les différents tissus de l'articulation au cours de l'arthrose</i>	84
Figure 34 : Instauration d'un cercle vicieux d'inflammation par les alarmines dans l'arthrose.....	87
Figure 35 : Schéma des mécanismes impliqués dans le risque d'arthrose lié à une dysbiose du microbiote notamment chez les personnes obèses	90
Figure 36 : Modèle de de communication os/cartilage mis au point par le laboratoire.....	92

Figure 37 : Analyse de la présence différentielle de protéines présentes dans les milieux conditionnés d'ostéoblastes comprimés et non comprimés (iTRAQ)	94
Figure 38 : Comparaison structurale des différentes isoformes de protéines 14-3-3	95
Figure 39 : Dimère de 14-3-3 et la liaison de 2 ligands représenté en structure cristallographique et focus sur les résidus permettant l'interactions entre un ligand phosphorylé et un monomère de 14-3-3 zeta.	96
Figure 40 : Structure cristallographique de 14-3-3 zeta	97
Figure 41 : Exemples de régulation de protéines cibles par un dimère de 14-3-3.....	99
Figure 42 : Stimulation d'explants de membrane synoviale humaine (biobanque Biojoint).....	104
Figure 43 : Culture primaire de synoviocytes fibroblast like (FLS).....	104
Figure 44 : Culture primaire de macrophages issus de moelle osseuse murine (technique de flush) .	106
Figure 45 : Culture primaire de chondrocytes murins	106
Figure 46 : Dosage des endotoxines dans les différents lots de 14-3-3ε recombinante	147
Figure 47 : Caractérisation de l'effet propre de la protéine 14-3-3ε recombinante par inhibition des endotoxines (par la polymixine B : PMB) dans des chondrocytes murins.....	148
Figure 48 : Caractérisation de l'effet propre de la protéine 14-3-3ε recombinante par inhibition des endotoxines dans des macrophages murins (BMM).....	149
Figure 49 : Caractérisation de l'effet propre de la protéine 14-3-3ε recombinante par inhibition des endotoxines dans des macrophages murins (BMM).....	149
Figure 50 : Principe de la technologie de Résonance Plasmonique de Surface (SPR).....	151
Figure 51 : Interaction entre 14-3-3ε et TLR2, TLR4 analysée par la technique de Résonance Plasmonique de Surface (SPR).....	151
Figure 52 : Sites de phosphorylations présents sur TLR2 et potentiellement reconnus par 14-3-3ε...	153
Figure 53 : Schéma de l'interaction entre 14-3-3ε et TLR2	154
Figure 54 : Modélisation du monomère de 14-3-3 (bleu) et d'une séquence potentielle de liaison sur le récepteur TLR2 (Rose) possédant des résidus phosphorylés (PyMol).....	155
Figure 55 : Test d'inhibition des effets de 14-3-3ε par les peptides mimiques de TLR2 sur des cultures de chondrocytes murins (n=1).....	157
Figure 56 : Etude de la présence de 14-3-3ε dans les liquides synoviaux de 3 patients arthrosiques (western blot).....	158
Figure 57 : Sécrétion de la protéine 14-3-3ε par les synoviocytes fibroblast like après stimulation par des facteurs pro-inflammatoires (TNFα et IL-1β).....	159
Figure 58 : Protocole d'injections intra-articulaires de 14-3-3ε chez des souris WT	160
Figure 59 : Coupes longitudinales de genoux de souris injectées en intra articulaire par la 14-3-3ε..	160
Figure 60 : Résultats du scoring de l'hyperplasie de la membrane synoviale des souris injectées	161
Figure 61 : Résultats du marquage des macrophages présents dans la membrane synoviale par CD68	162
Figure 62 : Nomenclature proposée par Rider et al. pour classifier les cytokines, alarmines et stressorines	164
Figure 63 : Résumé schématique de l'action de 14-3-3ε sur les différents types cellulaires de l'articulation dans un contexte d'arthrose mécanique.	170
Tableau 1 : Présentation des différentes Métalloprotéases Matricielles.....	25
Tableau 2 : Composition du liquide synovial.....	29
Tableau 3 : Les différentes alarmines impliquées dans l'arthrose	73
Tableau 4 : Diversité des phénotypes de macrophages	83
Tableau 5 : Modifications des activités des cellules immunitaires au cours du vieillissement	88
Tableau 6 : Présentation des activités et application thérapeutiques potentielles des protéines 14-3-3 extracellulaires.....	101
Tableau 7 : Energies de liaison des peptides mimant des séquences de TLR2avec le monomère de 14-3-3ε.....	155

Abréviations

ADAMTS : A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATM : Adipose Tissue Macrophage

BMM : Bone marrow derived macrophages

BMP : Bone Morphogenetic protein

BSA : Bovine serum albumin

CD : Cluster of Differentiation

COL : Collagène

COMP : Cartilage oligomeric matrix protein

COX2 : Cyclooxygénase 2

CRP : Protéine C-Réactive

DAMP : Damage-associated molecular pattern

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

DMM : Déstabilisation du Ménisque Médial

DMOADs : Disease-modifying osteoarthritis drugs

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay

ERK : Extracellular signal-regulated kinases

ESR : Erythrocyte sedimentation rate

FAK : Focal Adhesion Kinase

FBS : Fetal bovine serum

FDA : Food and Drug Administration

FFA : Free Fatty Acids

FGF : Fibroblast Growth Factor

FLS : Fibroblast-like synoviocyte

GAG : Glycosaminoglycane

Glu : Glutamine

GPCR : Récepteur couplé aux protéines G

H&E : Hematoxylin and eosin

HDL : High density lipoprotein
HMGB1 : High-mobility group box 1
HPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
HSP : Heat shock protein
IGF1 : Insulin-like growth factor-1
IHH : Indian Hedgehog Homolog
IL : Interleukine
IMC : Indice de masse Corporelle
iTRAQ : Isobaric tags for relative and absolute quantitation
kDA : Kilo Dalton
KO : Knockout
LDL : Low density lipoprotein
LPS : Lipopolysaccharides
mAB : Monoclonal antibody
MAC : Complexe d'attaque membranaire
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MEC : Matrice Extra Cellulaire
Met-S : Metabolic Syndrome
MCP1 : Monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor
MMP : Metalloprotéases Matricielles
MRI : Imagerie par résonance magnétique
NK Cells : Natural Killer Cells
NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NF- κ B : Nuclear factor-kappa B
NLR : NOD-like receptors
NSAIDS : Nonsteroidal anti-inflammatory drug
OA : Osteoarthritis
OxPAPC : Oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
PAMPS : Pathogen-associated molecular pattern
PAR : Proteinase-activated Receptor
PBS : Phosphate buffered saline

PGE2 : Prostaglandine E2
PI3K : Phosphoinositide 3-kinases
PK: Protéine Kinase
PMB : Polymyxine B
PRRs : Pattern-recognition receptors
PS : Penicillin/Streptomycin
PTOA : Post Traumatic Osteoarthritis
RA : Rheumatoid arthritis
RAGE : Receptor for advanced glycation end products
RANKL : Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RT-PCR : real-time polymerase chain reaction
RUNX2 : Runt-related transcription factor 2
SPR : Résonance Plasmonique de Surface
SYSADOAs : Slow acting drugs for Osteoarthritis
TAH : Tissu adipeux de Hoffa
TGF β : Transforming Growth Factor-beta
TIMPS : Tissue inhibitors of metalloproteinases
TLR : Toll like receptor
TNF α : Tumor necrosis factor alpha
tPA: Activateur Tissulaire du plasminogène
uPA : Urokinase
VEGF : Vascular endothelial growth factor
WOMAC : Western Ontario McMaster
WT : Wild-type
YLD : Years lived with disability

Avant-Propos

L'arthrose est la pathologie articulaire dégénérative la plus fréquente. Elle affecte 10 millions de français dont 65% des personnes âgées de plus de 65 ans. L'arthrose provoque des douleurs et des raideurs entraînant un handicap chez les patients. Ses principaux facteurs de risques sont le vieillissement, l'obésité et le stress mécanique. Au vu du vieillissement de la population et de l'épidémie d'obésité qui sévit à l'échelle mondiale, l'arthrose constitue un problème de santé publique majeur. À l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif permettant de stopper la progression de l'arthrose ou de régénérer les tissus articulaires.

Longtemps considérée comme une maladie liée à l'usure du cartilage au cours du vieillissement, elle est à présent étudiée comme une pathologie impliquant l'ensemble des tissus articulaires notamment la dégradation du cartilage articulaire, le remodelage de l'os sous-chondral, l'inflammation de la membrane synoviale et la formation d'ostéophytes. Ses altérations sont principalement liées des facteurs mécaniques liés au stress mécanique excessif et à des facteurs biochimiques inflammatoires.

Au cours de l'arthrose, la dégradation du cartilage provoque l'accumulation de débris dans l'articulation. En conséquence, les alarmines, signaux d'alarme endogènes, sont libérés par les cellules nécrotiques ou immunitaires dans l'articulation et vont activer les récepteurs de l'immunité innée, les *Toll like receptors*, de l'hôte afin d'enclencher un processus d'inflammation. Le développement d'un cercle vicieux et l'échec de la résolution de l'inflammation vont provoquer la mise en place d'une inflammation de bas grade et provoquer la progression de l'arthrose.

Dans ce contexte nous nous intéressons à un nouveau médiateur soluble, la protéine 14-3-3 ϵ . Cette molécule possédant de nombreux rôles intracellulaires est libérée par les ostéoblastes en réponse à un stress mécanique excessif et induit des effets cataboliques sur les chondrocytes articulaires. La protéine 14-3-3 ϵ partage de nombreuses caractéristiques avec les alarmines.

Nous posons donc l'hypothèse que la protéine 14-3-3 ϵ est une nouvelle alarmine dans l'arthrose induisant des effets inflammatoires chez les différents types cellulaires de l'articulation (chondrocytes, macrophages, synoviocytes) et que ses effets sont dépendants des récepteurs de l'immunité TLR2 et TLR4.

L'identification de nouvelles alarmines dans cette pathologie et la compréhension de leurs mécanismes physiopathologiques sont essentielles afin d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Introduction

1. L'articulation

1.1 Définition d'une articulation

Les articulations sont définies comme des zones de jonction entre deux extrémités osseuses. En fonction de leur mobilité ou de leur composition tissulaire, les articulations peuvent être classées en différentes catégories. Les diarthroses, appelées aussi articulations synoviales sont caractérisées par leur grande mobilité. Ce type d'articulation doit remplir deux fonctions : assurer le maintien de la posture et permettre le mouvement.

1.2 Structure et fonction de l'articulation synoviale du genou

Anatomiquement, l'articulation du genou est la plus importante articulation synoviale portante du corps humain (Blalock et al. 2015). Du fait de sa position, elle est cruciale pour le maintien de la posture mais aussi pour les mouvements de marche et de course. Cette articulation permet une flexion et une extension ainsi qu'une légère rotation.

Le genou est subdivisé en deux articulations : une articulation Fémoro-patellaire, entre la zone postérieure de la rotule et la face antérieure du Fémur et Fémoro-tibiale, entre l'épiphyse du fémur et celle du tibia (Flandry 2011; Hirschmann and Müller 2015) (**Figure 1**).

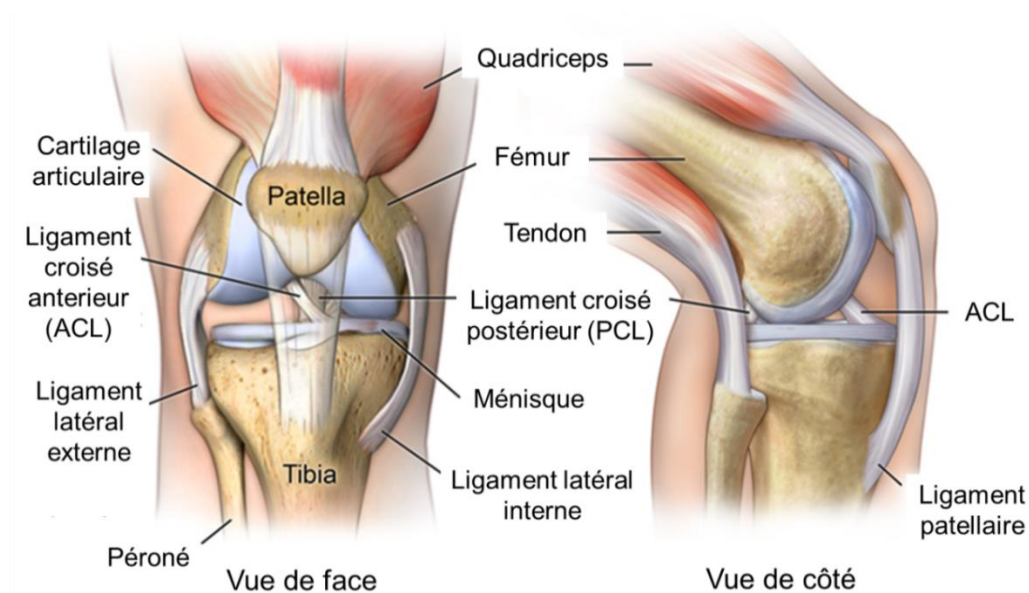


Figure 1 : Anatomie de l'articulation du genou en vue de face et latérale
(Adapté de <https://comportho.com/anatomy/anatomy-of-the-knee>)

Les épiphyses du tibia et du fémur sont enfermées dans une capsule articulaire (Orr et al. 2017). Leurs extrémités sont recouvertes d'un tissu conjonctif élastique, le cartilage articulaire qui réduit les frottements entre les deux extrémités osseuses (Sophia Fox et al. 2009). Les mouvements sont facilités par la présence d'une substance visqueuse et lubrifiante, la synovie ou liquide synovial, produite par la membrane synoviale qui tapisse la face interne de la capsule articulaire (Orr et al. 2017). Cette synovie permet également la nutrition du cartilage. Le maintien de l'ensemble de la structure est assuré par les ligaments et tendons qui entourent l'articulation ainsi que par les ménisques se trouvant entre les épiphyses (Blalock et al. 2015) (**Figure 2**).

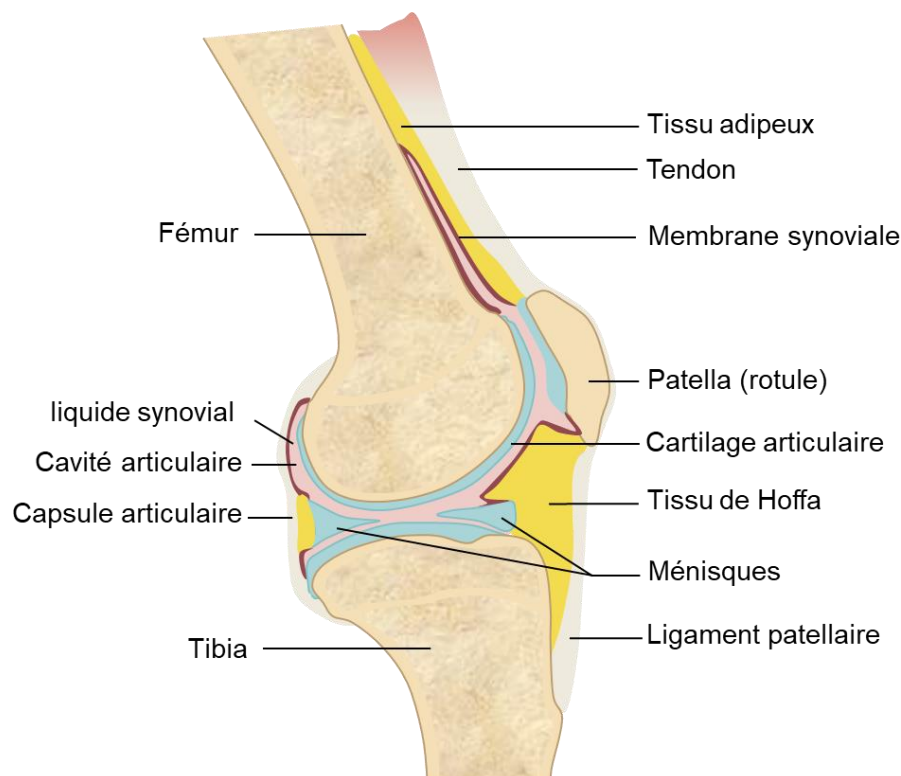


Figure 2 : Structure de l'articulation synoviale du genou (vue sagittale)

Les différents tissus de l'articulation participent chacun au bon fonctionnement de l'articulation. Leur coordination est assurée par une communication grâce à des facteurs biochimiques, leur permettant d'adapter leur homéostasie en fonction des besoins. Les principaux tissus de l'articulation synoviale sont le cartilage articulaire, l'os sous-chondral et la membrane synoviale.

1.3 Les différents tissus de l'articulation

1.3.1 Le cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif, hautement spécialisé (Alford and Cole 2005). Ce tissu visco-élastique de couleur blanc nacré, recouvre les surfaces osseuses de l'articulation et fournit une surface lisse et lubrifiée permettant le glissement des extrémités osseuses l'une par rapport à l'autre en réduisant au maximum les frictions (Sophia Fox et al. 2009). Le cartilage a la particularité d'être non vascularisé et non innervé (Alford and Cole 2005; Sophia Fox et al. 2009). Sa nutrition est assurée par le liquide synovial qui pénètre dans le cartilage comme dans une éponge grâce aux mouvements de compression de l'articulation (Sophia Fox et al. 2009; Blalock et al. 2015).

Il se compose en grande partie d'eau (80% du poids du cartilage) (Blalock et al. 2015), de cellules spécialisées, les chondrocytes enchâssés dans une matrice extracellulaire (MEC) composée de collagènes, protéoglycanes, glycoprotéines et autres protéines non collagéniques (**Figure 3**).

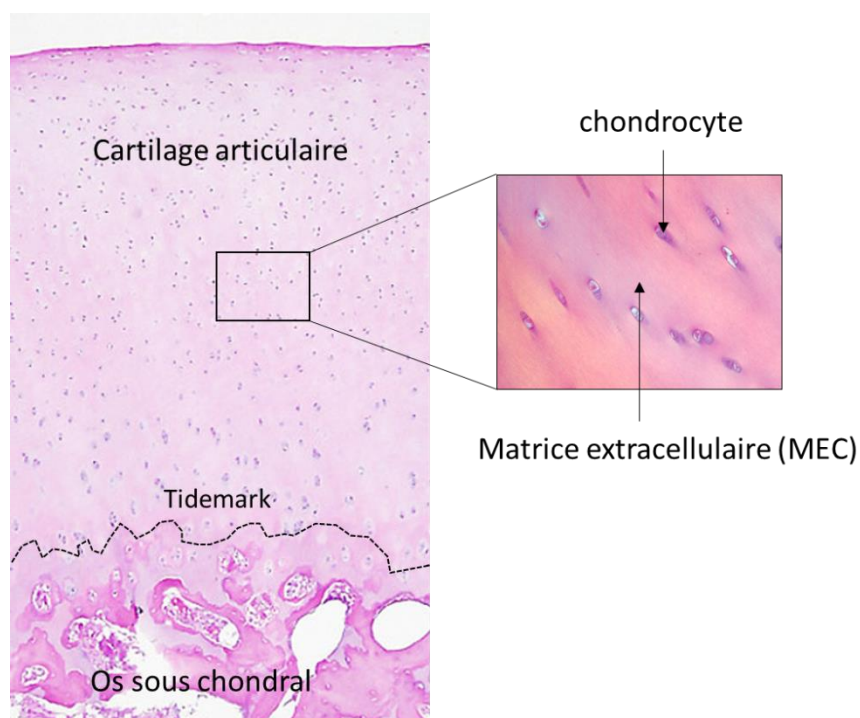


Figure 3 : Coupe histologique de cartilage articulaire montrant des chondrocytes entourés de matrice extracellulaire

Adapté de Getgood et al. 2009. (Getgood et al. 2009)

1.3.1.1 Organisation du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire dont l'épaisseur varie entre 2 et 4 mm, est organisé en 4 couches dont la composition matricielle et chondrocytaire évolue en fonction de la profondeur (Sophia Fox et al. 2009) (**Figure 4**).

Couche superficielle : Cette couche est la plus proche de la cavité articulaire et sert de protection aux couches sous-jacentes. Elle représente 10 à 20% de l'épaisseur du cartilage articulaire et est composée de chondrocytes articulaires en forme de disques enserrés par des fibres de collagène (principalement de type II) orientées parallèlement à la surface (Blalock et al. 2015; Zhang et al. 2015).

Couche moyenne : La couche moyenne représente 40 à 60% du cartilage articulaire. Fonctionnellement, elle constitue la 1^{ère} ligne de résistance aux forces de compression. Les fibres de collagène qui la composent sont orientées de manière oblique. Les chondrocytes sont de formes rondes et répartis aléatoirement et en faible densité (Sophia Fox et al. 2009).

Couche profonde : Dans la couche profonde, constituant 30% de l'épaisseur du cartilage articulaire, les fibres de collagène sont orientées perpendiculairement à la surface articulaire. Les chondrocytes sont organisés en colonnes parallèles aux fibres de collagène. Cette couche possède la plus forte concentration de protéoglycanes et la plus faible concentration d'eau par rapport aux autres. Cette organisation lui confère une plus grande résistance aux forces de compressions (Sophia Fox et al. 2009).

Cartilage calcifié : Le cartilage calcifié est une couche minéralisée qui jouxte l'os sous-chondral (Blalock et al. 2015) et qui est séparé des couches de cartilage articulaire supérieures par la tidemark. La tidemark est une bande de cartilage minéralisé composée de collagènes et d'acide hyaluronique et caractérisée par l'absence de protéoglycanes « classiques » retrouvés dans les autres couches de cartilage (Lyons et al. 2005). Le cartilage calcifié est composé de chondrocytes hypertrophiques radicalement différents de ceux présents dans les couches supérieures. Ces chondrocytes synthétisent une MEC minéralisée et contenant une plus forte proportion de collagène de type X mais une faible proportion de collagène de type II. Cette couche limite le gradient de rigidité et par ce biais, les forces de cisaillements qui s'exercent sur le cartilage (Radin and Rose 1986).

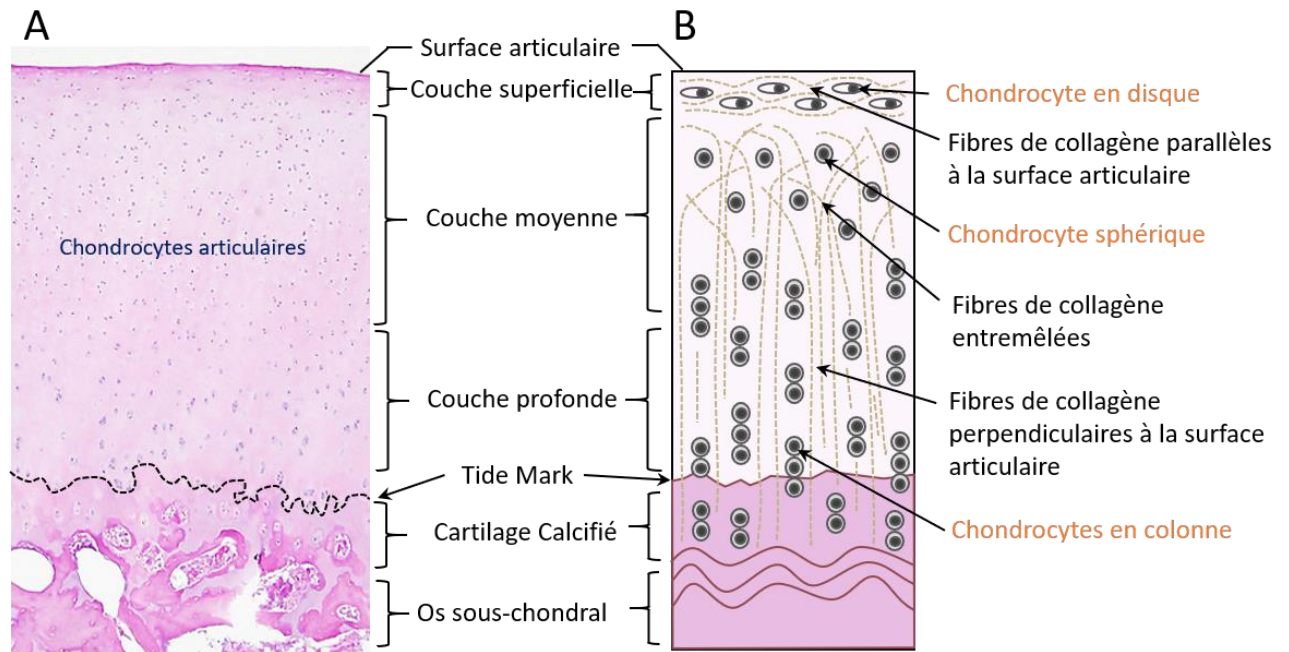


Figure 4 : Schéma de l'organisation et de la composition du cartilage articulaire en couches

A : Coupe histologique d'un cartilage articulaire sain montrant l'organisation des chondrocytes suivant la profondeur des couches (superficielle, moyenne, profonde et calcifiée). La tidemark délimite le cartilage articulaire non calcifié du cartilage calcifié. Adapté de Hill, M.A. 2019 Embryology Articular cartilage B : Schéma représentatif de l'organisation des chondrocytes en fonction des couches du cartilage. Adapté de Mansfield 2019 et Getgood et al. 2009. (Getgood et al. 2009; Mansfield et al. 2019)

1.3.1.2 Les chondrocytes

Les chondrocytes représentent l'unique type cellulaire présent dans le cartilage. Ces cellules d'environ 20 à 40 μm sont enchâssées dans de petites loges appelées chondroplastes et représentent 2% du volume total du cartilage.

Les chondrocytes dérivent des cellules souches mésenchymateuses au cours du développement embryonnaire. Certains facteurs sont indispensables pour la chondrogenèse notamment ceux de la famille de facteurs de transcription Sox et RunX (Bi et al. 1999; Shimizu et al. 2007). D'autres molécules de signalisation comme les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF), la protéine Hedgehog (IHH), la protéine morphogénétique de l'os (BMP) et la voie Wnt régulent finement la chondrogenèse (Shimizu et al. 2007). Les chondrocytes activent ensuite des gènes spécifiques comme Col2A impliqué dans la production du collagène de type II.

Les chondrocytes participent au phénomène d'ossification endochondrale permettant la croissance des os. Durant le reste de la vie, leur rôle est de maintenir la MEC en régulant son homéostasie sous la régulation de facteurs biochimiques, mécaniques et endocriniens (Goldring and Marcu 2009). Cette régulation s'effectue à l'aide d'enzymes spécialisées dans la synthèse ou la destruction de la MEC.

La densité du nombre de chondrocytes, leur forme et leur taille varient en fonction de leur position dans l'épaisseur du cartilage. Les chondrocytes de la couche superficielle sont petits, aplatis et en plus forte densité que dans les couches plus profondes. En descendant dans la profondeur du cartilage, les chondrocytes sont organisés en colonnes perpendiculaires par rapport à la surface et ont une forme plus ronde (Sophia Fox et al. 2009) (**Figure 3 et 4**).

Le cartilage étant non vascularisé, les chondrocytes vivent avec de faibles quantités d'oxygène (5% proche de la surface et 1% dans les zones profondes) (Murphy and Sambanis 2001; Zhou et al. 2004) et utilisent un métabolisme anaérobie (Lane et al. 1977).

Les chondrocytes sont caractérisés par un faible renouvellement cellulaire. Leur nombre de réplifications est limité (environ 30 à 40 divisions).

1.3.1.3 La matrice extracellulaire du cartilage

Le cartilage articulaire est composé d'environ 80% d'eau (80%) dans les couches supérieures du cartilage et 65% dans les couches profondes). C'est le flux d'eau à travers le cartilage qui permet de nourrir le tissu et apporter la lubrification à la surface articulaire (Sophia Fox et al. 2009).

Les 20% de poids sec restants représentent le collagène et les protéoglycanes de la MEC (Blalock et al. 2015). D'autres classes de molécules sont également présentes en petite quantité comme les glycoprotéines, protéines non collagéniques, lipides et phospholipides (Sophia Fox et al. 2009) (**Figure 5**).

Le collagène est la macromolécule la plus présente dans la MEC. Le plus abondant est le collagène de type II (90 à 95%) mais d'autres types comme le I, IV, V, VI, IV et XI sont également présents en petite proportion. Ces derniers ont pour rôle de stabiliser le collagène de type II. Les structures en triple hélice des chaînes polypeptidiques du collagène dotent le cartilage de sa force de résistance aux tensions (Sophia Fox et al. 2009).

Les protéoglycanes sont le 2^{ème} type de molécules les plus abondantes de la MEC (10 à 15%). Ces molécules sont constituées d'un cœur protéique lié de manière covalente à des chaînes linéaires de glycosaminoglycanes (GAG). Différentes variétés de protéoglycanes sont présentes dans le cartilage articulaire : l'aggrécane, le biglycane, la décorine et la fibromoduline. Parmi ces molécules, l'aggrécane est la plus présente et possède le plus haut poids moléculaire. L'aggrécane s'associe à l'acide hyaluronique pour former de grands complexes remplissant l'espace entre les fibrilles de collagène (Hardingham and Muir 1974). Cela apporte la résistance nécessaire au cartilage contre les forces de compression (Sophia Fox et al. 2009).

Les protéines non collagéniques comme COMP (cartilage oligomeric protein ou thrombospondine 5) sont également présentes dans la MEC. Cependant, leurs fonctions restent mal connues. Elles joueraient un rôle structurel dans l'ossification endochondrale et la stabilisation de la MEC grâce à ses interactions avec les fibrilles de collagène et les autres composants matriciels. COMP est utilisé actuellement comme un biomarqueur sanguin, urinaire et synovial reflétant la dégradation du cartilage (Valdes et al. 2014; Fernandez-Puente et al. 2015).

Les interactions entre les protéoglycanes chargés négativement et les fibres de collagène de type II sont la source de la résistance aux forces de compression et de tension du cartilage (Knudson and Knudson 2001; Chen et al. 2006). Par ailleurs, l'ensemble des composants de la MEC participent à la rétention d'eau, indispensable pour maintenir les propriétés mécaniques de la matrice (Sophia Fox et al. 2009).

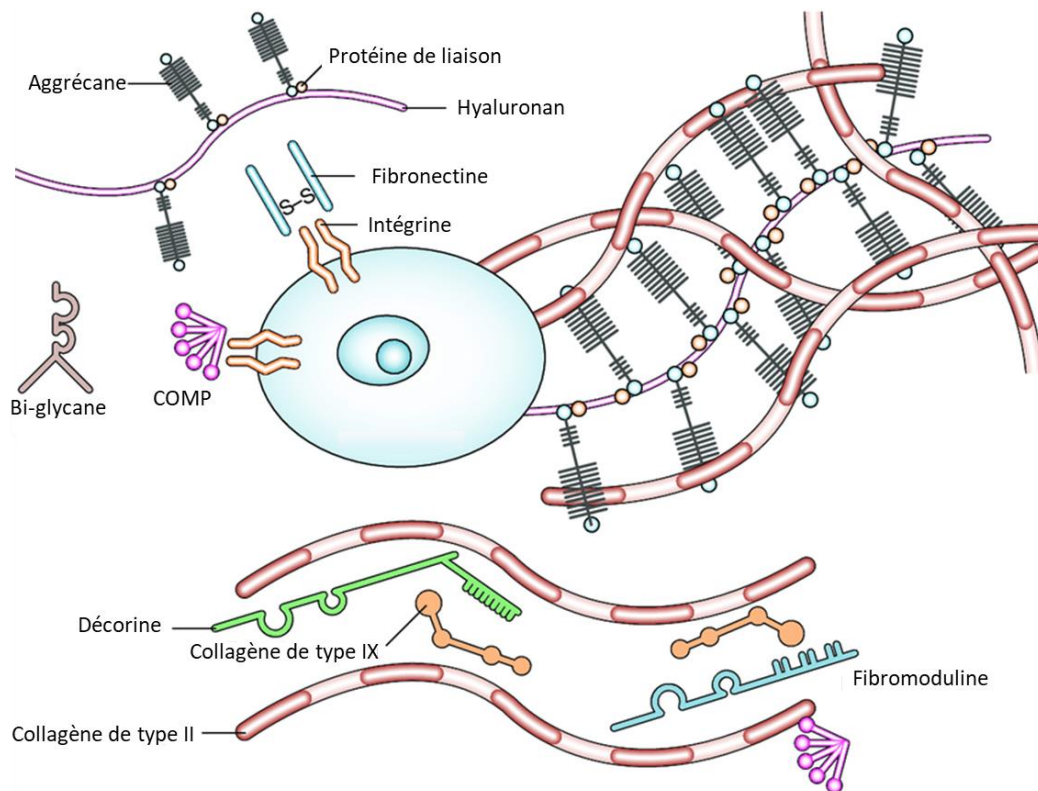


Figure 5 : Schéma de la composition de la matrice extracellulaire présente dans le cartilage articulaire

Adapté de Chen et al. 2006. (Chen et al. 2006)

1.3.1.4 Charge mécanique et homéostasie du cartilage

La charge mécanique, lorsqu'elle reste dans les limites physiologiques, est indispensable pour le bon fonctionnement et le maintien de l'homéostasie de l'articulation. La fourchette de tension subit par le cartilage articulaire d'un humain adulte sain est comprise entre 5 et 25 MPa dépendant du type d'articulations (Kempson et al. 1973; Akizuki et al. 1986). L'absence de stimulation mécanique entraîne une atrophie du cartilage et une réduction de la quantité de protéoglycanes et d'acide hyaluronique (Jurvelin et al. 1985; Helminen et al. 1987). La compréhension des mécanismes de détection de la pression et de réponse des chondrocytes est encore incomplète et continue à progresser. Certains mécanorécepteurs et systèmes senseurs des vibrations, tensions et pressions ont été mis en évidence chez les chondrocytes tels que les intégrines, connexines, canaux ioniques sensibles aux tensions et cils primaires (Salter et al. 1992; Martinac 2004; Ruhlen and Marberry 2014; Zhang et al. 2014). La stimulation de ces mécanorécepteurs active différentes cascades de signalisation modulant l'expression génique, la différenciation et la survie/apoptose des chondrocytes (Anghelina et al. 2008; Fitzgerald et al. 2008). (Figure 6)

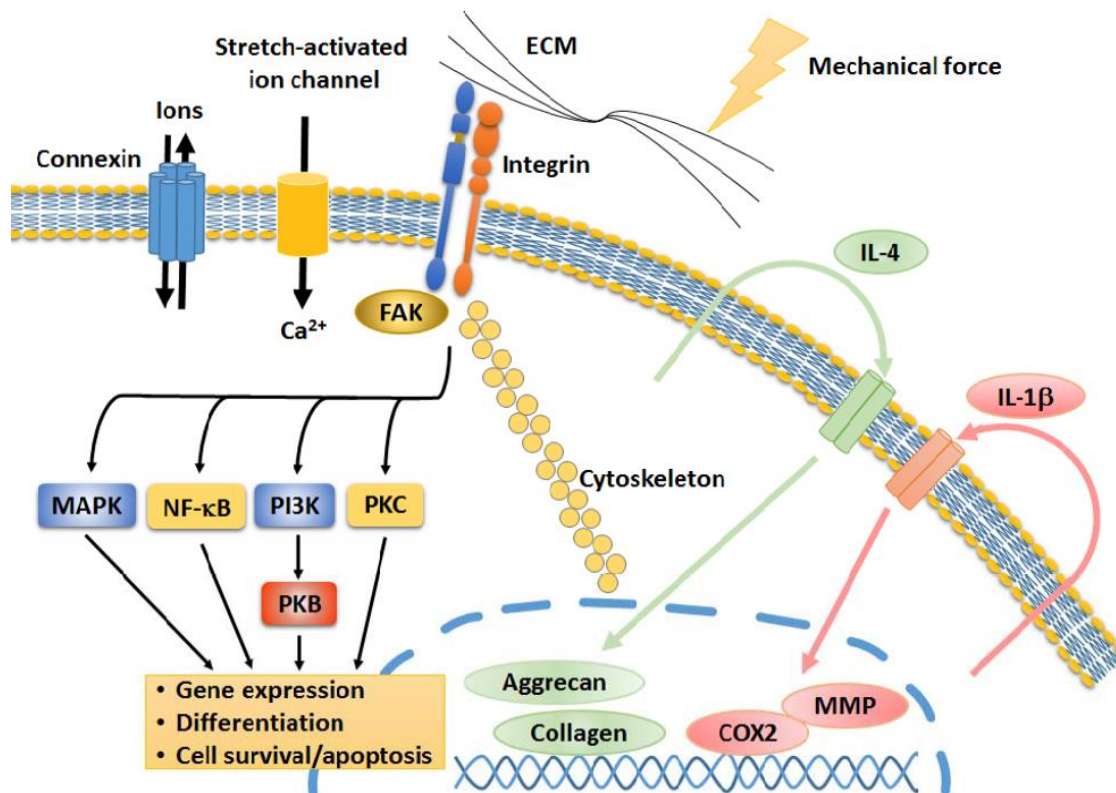


Figure 6 : Principaux mécanorécepteurs présents chez les chondrocytes

Les intégrines, connexines et canaux ioniques *stretch-activated* sont stimulés par des forces mécaniques transmises par la matrice axtracellulaire (ECM). Les voies de signalisation impliquent le cytosquelette et différents intermédiaires comme les molécules FAK, PKC, PI3K, PKB, NF-κB, and MAPK, qui régulent l'expression génique, les fonctions cellulaires et la survie/apoptose. L'effet autocrine de la cytokine anti-inflammatoire IL-4 régule positivement l'anabolisme en induisant l'expression des aggrécanes et en inhibant celle des MMPs. Au contraire la production d'IL-1 β , qui se produit au cours de l'arthrose active le catabolisme provoquant une augmentation de l'expression de COX2 et des MMPs. D'après Lee & Salter, 2015. (Lee and Salter 2015)

En fonction des signaux perçus, les chondrocytes synthétisent les composants de la MEC (Collagènes de type II en majorité et autres types de collagènes, aggrécanes, COMP) ou les dégradent grâce à des enzymes cataboliques. Les protéinases impliquées dans la dégradation de la matrice sont les métalloprotéases matricielles (MMPs : collagénases, gélatinases et stromélysines) ainsi que les cathepsines (B et D) et les ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs). La balance entre anabolisme et catabolisme est finement régulée dans le cartilage sain pour maintenir l'homéostasie du tissu. L'IGF1, les BMPs et le TGF β activent la synthèse des composants de la MEC. Les facteurs pro-

inflammatoires $TNF\alpha$ et $IL-1\beta$ et $IL-6$ stimulent la production des protéases (MMPs, ADAMTS) et inhibent les TIMPs qui régulent négativement les MMPs (**Figure 7**).

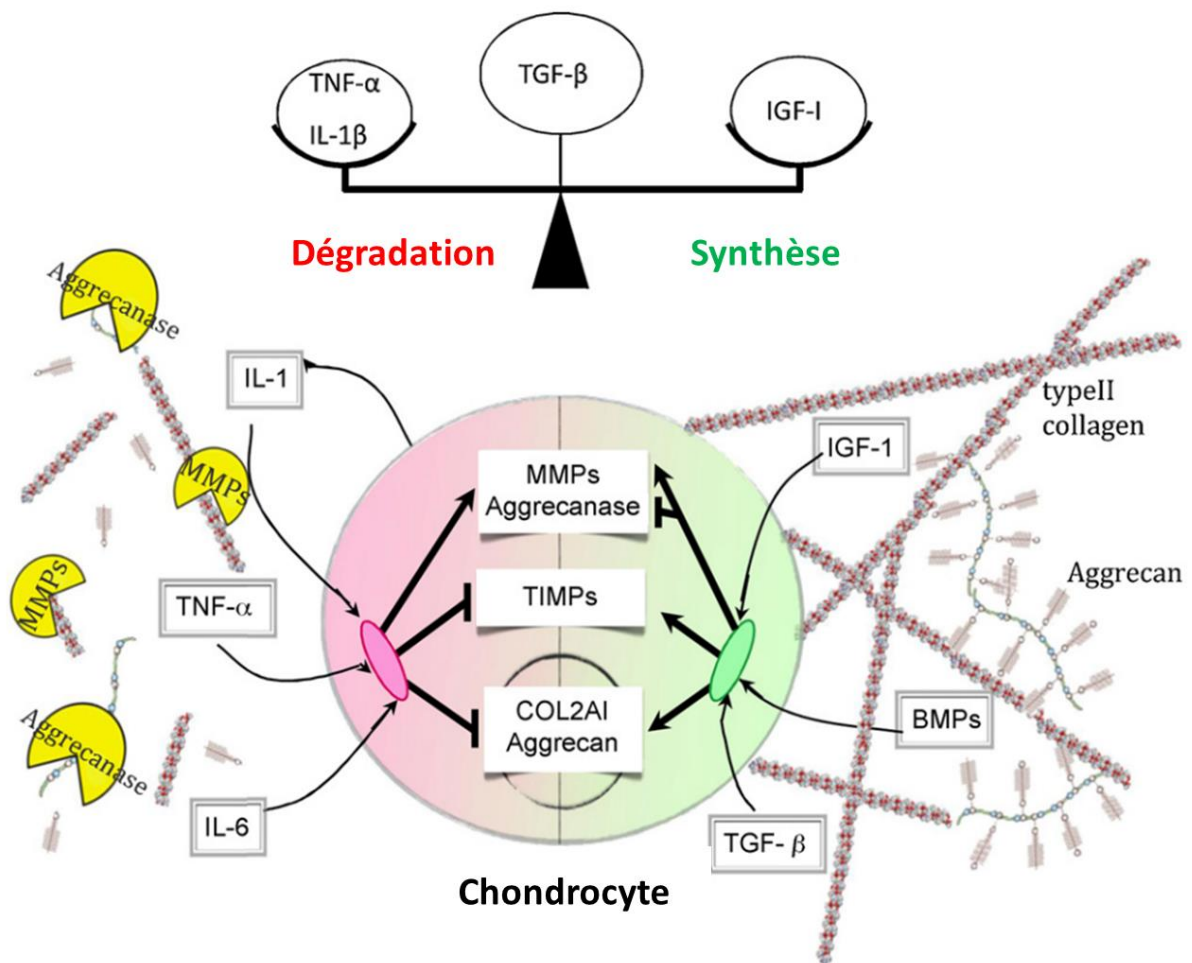


Figure 7 : Schéma de l'homéostasie du cartilage

En condition physiologique la balance est équilibrée entre l'anabolisme et le catabolisme de la matrice extracellulaire. Adapté de Demoor et al. 2014. (Demoor et al. 2014)

1.3.1.5 Les métalloprotéases matricielles

Les MMPs sont une famille d'endopeptidases zinc-dépendantes. 23 formes différentes ont été identifiées et 7 formes sont exprimées par le cartilage articulaire (MMP-1, 2, 3, 8, 9, 13, 14) (**Tableau 1**). Les MMPs sont relativement homogènes mais différent en fonction de la présence de certains domaines dans leur structure. Les MMPs sont composées de 3 domaines, un pré-domaine qui leur permet d'être acheminées jusqu'à la membrane, un pro-domaine et un domaine catalytique. Le pré-domaine est clivé pour que l'enzyme devienne active. Le pro-domaine permet de maintenir l'activité enzymatique sous forme latente et le domaine

catalytique contenant un site de fixation au zinc permet le clivage des composants matriciels (Yang et al. 2017a).

Les métalloprotéases sont impliquées dans le remodelage tissulaire et sont chargées de dégrader les composants de la MEC par clivage des liaisons peptidiques. Chaque type de MMP est spécialisé dans la dégradation d'un ou plusieurs composants (Page-McCaw et al. 2007). Ces groupes de MMPs sont répartis en différents groupes, les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, matrylisines et de type membranaire (MT-MMP).

Métalloprotéases Matricielles (MMPs)	
Collagénases	MMP-1, MMP-8, MMP-13
Gélatinases	MMP-2, MMP-9
Stromélysines	MMP-3, MMP10, MMP-11
matrylisines	MMP-7
Metalloelastase	MMP-12
MMP de type membranaire (MT-MP)	MT-MMP1, 2, 3 et 4

Tableau 1 : Présentation des différentes Métalloprotéases Matricielles

- **MMP-1** (collagénase-1 interstitielle) dégrade les collagènes de type I, II et III. Elle est exprimée durant le développement embryonnaire dans le processus d'ossification endochondrale (Gack et al. 1995).
- **MMP-9** (gélatinase B) est similaire à MMP-1 et est exprimée précocement dans les processus de cicatrisation. Elle joue un rôle important dans l'angiogenèse de la plaque de croissance et l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques (Vu et al. 1998).
- **MMP-2** (gélatinase A) est impliquée dans la dégradation des collagènes de type I, IV, V, VII et X. Son expression est plutôt faible en condition physiologique (Duerr et al. 2004; Wu et al. 2008).
- **MMP-3** (stromelysin-1) est capable de dégrader à la fois différents collagènes (II, III, IV, IX et X) mais aussi des fibronectines, laminines, élastines et quelques protéoglycanes. Cette enzyme impliquée dans les processus de cicatrisation a montré un rôle de facteur de transcription permettant de réguler l'expression d'autres MMPs (Eguchi et al. 2008). Son expression est augmentée en présence de facteurs

inflammatoires. Elle est retrouvée dans les liquides synoviaux et le cartilage des patients arthrosiques (Okada et al. 1992).

- **MMP-8** (neutrophil collagenase) est exprimée par un certain nombre de cellules comme les neutrophiles mais aussi les chondrocytes. Elle dégrade le collagène de type II mais aussi les types I et III ainsi que d'autres composants de la MEC (Näkki et al. 2016).
- **MMP-13** (Collagénase-3) est l'enzyme la plus étudiée pour son rôle dans le turnover du cartilage sain. Elle est considérée comme la protéine majeure de dégradation du collagène de type II et donc fortement impliquée dans l'arthrose (Davidson et al. 2009; Wang et al. 2013b). Elle peut également dégrader les collagènes de type IV et IX et les protéoglycanes.
- **MMP-14** (MT-MMP-1) est impliquée dans la dégradation de l'aggrécane et du clivage des cadhérines (Kevorkian et al. 2004).

1.3.1.6 Régulation des MMPs

L'activité des MMPs est finement régulée. Une partie de leur régulation est faite par leur propre inactivation protéolytique et leur dégradation. Il est montré que des clivages de leur séquence peptidique conduisent à des formes tronquées des enzymes et donc à leur inactivation. En raison de leur sécrétion sous forme inactive, c'est donc l'étape d'activation qui est cruciale pour maintenir une bonne homéostasie. Les activateurs majeurs des MMPs sont l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) et l'urokinase (uPA) (Legrand et al. 2001; Kelly et al. 2006).

La régulation de l'expression des MMPs est également effectuée par des facteurs de transcription comme AP-1 (activator protein-1) activés par les voies MAPK (Chakraborti et al. 2003). L'activation des voies MAPK est régulée par comme les cytokines IL-1 β et TNF α (Tetlow et al. 2001).

Les TIMPS (Tissue inhibitors of metalloproteinases) sont les inhibiteurs spécifiques des MMPs (Cawston et al. 1999). Ils se fixent à la partie catalytique des MMPs et bloquent l'accès à la poche contenant l'atome de zinc (Bode et al. 1999).

1.3.1.7 Les ADAMTS

Les ADAMTS (a disintegrin and a metalloproteinase with a thrombospondin motif) sont des enzymes zinc-dépendantes spécialisées dans la dégradation de l'aggrécane. Ces protéines sont un sous-groupe de la famille des ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase). Ces protéines ont à la fois une activité protéolytique mais aussi une activité dans l'adhérence (Tetsunaga et al. 2011; Yang et al. 2017a).

Deux formes d'ADAMTS (4 et 5), exprimées par les cellules du cartilage, jouent un rôle important dans la dégradation des composants matriciels. Elles clivent l'aggrécane de manière différente des métalloprotéases (Kuno et al. 1997; Hurskainen et al. 1999). Ces deux enzymes sont fortement impliquées dans l'arthrose. Dans deux études impliquant un modèle d'arthrose et d'arthrite (Glasson et al. 2005; Stanton et al. 2005) , il a été montré que des souris invalidées pour le gène *Adamts5* présentaient une arthrose moins sévère que les souris contrôles. Comme les MMPs, l'activité de ces enzymes est régulée par différents facteurs dont les cytokines IL-1 et TNF- α (Bondeson et al.).

➤ Les cathepsines

Les cathepsines sont une famille de protéases à cystéine dont il existe une douzaine de membres (A, B, C, D, F, H, K, L, L2, S et Z). Ces protéases possèdent un résidu cystéine au niveau de leur site catalytique qui hydrolyse certaines liaisons peptidiques. Contrairement aux MMPs et ADAMTs qui sont actives à pH neutre, les cathepsines lysosomales sont actives à pH acide (Caglič et al. 2013). Cependant les cathepsines B et S sont capables de maintenir leur activité enzymatique dans une large gamme de pH (entre 5 et 7.5) (Brömme et al. 1993; Turk et al. 1997). Elles contribuent à la dégradation du cartilage dans l'arthrose (Baici et al. 1995; Pozgan et al. 2010). Les cathepsines dégradent différents composants matriciels. Par exemple la cathepsine K clive les collagènes de type I et II altérant la capacité des fibres à résister aux forces de traction (Panwar et al. 2013) et la cathepsine S clive les aggrécanes (Hou et al. 2003).

1.3.2 La membrane synoviale

L'intérieur de la capsule articulaire est recouverte d'une fine couche de tissu appelée membrane synoviale (Orr et al. 2017). Macroscopiquement, la membrane synoviale s'organise en replis ou franges. Elle sécrète le liquide synovial qui lubrifie et nourrit le cartilage. Elle remplit des fonctions mécaniques mais aussi de défense contre les infections et

l'inflammation. La membrane synoviale s'organise en deux couches distinctes, l'intima, directement en contact avec le liquide synovial et la sous-intima, en contact avec la capsule articulaire (**Figure 8**). L'intima a une épaisseur qui varie entre 20 et 40 μm . Les cellules sont disposées en une à trois couches de cellules. Elles sont endothéliiformes et ont parfois des prolongements cytoplasmiques dirigés vers la lumière articulaire. La substance intercellulaire contient de grandes quantités d'acide hyaluronique (Cantagrel and Constantin 2013). Les 2 principaux types cellulaires de cette couche sont les macrophages qui forment une couche superficielle et les fibroblast like synoviocytes formant une couche juste en dessous (Smith et al. 2003).

La sous-intima contient divers types de cellules mais celles-ci sont dispersées dans son épaisseur. Cette couche est vascularisée et les vaisseaux sanguins sont associés à des fibres nerveuses et des mastocytes. On trouve également des vaisseaux lymphatiques, des adipocytes, des fibroblastes ainsi que des macrophages et lymphocytes (Mapp 1995; Smith et al. 2003; Xu et al. 2003; Cantagrel and Constantin 2013).

L'homéostasie de la membrane synoviale est maintenue grâce à la balance entre production de matrice extracellulaire par les FLS et à la sécrétion de MMPs.

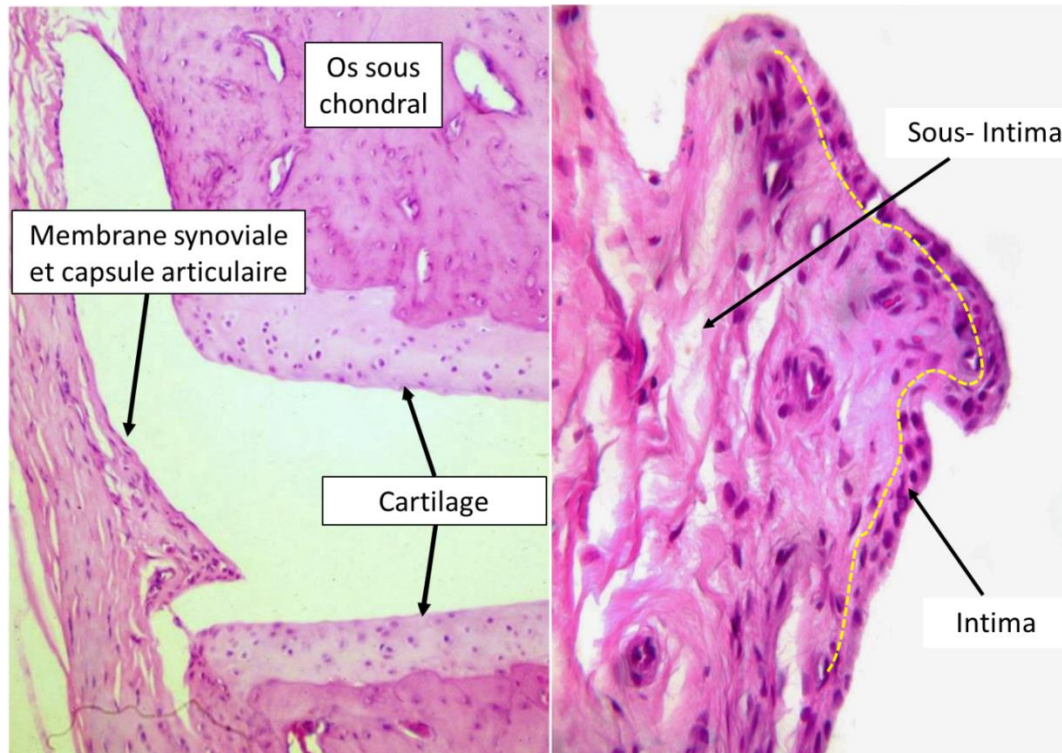


Figure 8 : Coupe histologique de membrane synoviale

Adapté de Jennings et Premanadan. 2017. (Jennings and Premanadan 2017)

1.3.2.1 Le liquide synovial

Le liquide synovial est un fluide clair et visqueux qui remplit la cavité articulaire. Ce liquide sert à nourrir le cartilage et à le lubrifier pour réduire les frottements lors des mouvements. Ses propriétés rhéologiques (étude de la déformation/écoulement sous l'effet d'une contrainte) comme la viscosité, permettent à l'articulation de pouvoir supporter de fortes charges et pressions (Seller et al. 1971). A l'état physiologique, la cavité articulaire contient peu de liquide synovial. Au contraire, dans les maladies articulaires inflammatoires, on observe un épanchement de synovie dans la cavité.

Ce liquide légèrement alcalin (pH 7.3-7.64) est composé principalement de plasma, mélange d'eau et de solutés (minéraux, organiques, gaz respiratoires) ainsi que de nombreuses molécules sécrétées par les FLS comme l'acide hyaluronique et la lubricine (ou Proteoglycan 4) (Martin-Alarcon and Schmidt 2016). Sa viscoélasticité est due principalement à la présence d'acide hyaluronique, molécule de haut poids moléculaire (Fam et al. 2007) (**Tableau 2**).

Constituent type	Constituent	Concentration (mg/ml)	Molecular mass (kDa)
Glycosaminoglycan	HA	2–4	6000–7000
Glycoprotein	PRG4	0.035–0.250	228
Serum protein	Albumin	8–12	66
	γ -Globulin	2–7	155
Ion (electrolyte)	Na ⁺	3.335	
	Cl ⁻	3.94	
Lipid	Phospholipids	0.1–0.2	
	Cholesterol	0.07–0.08	
	Triglycerides	0	
Small molecule	Urea	0.082	
	Urate	0.0155	
	Glucose	0.66	

Tableau 2 : Composition du liquide synovial

D'après Martin-Alarcon and Schmidt, 2016. (Martin-Alarcon and Schmidt 2016)

1.3.2.2 Les synoviocytes fibroblast like

Les fibroblast like synoviocytes (FLS) sont les principales cellules stromales de la membrane synoviale et présentent des caractéristiques fibroblastiques. Comme les fibroblastes classiques, elles expriment différentes sorte de collagène (IV et V) (Schneider et al. 1994; Xue et al. 1997). Elles se trouvent à la fois dans l'intima et la sous-intima. Elles sont chargées de produire les composants du liquide synovial qui permet la nutrition et la lubrification du

cartilage. Les FLS sont essentielles dans la formation de l'intima. Elles sont à l'origine de l'organisation 3D du tissu (Kiener et al. 2010). Ces cellules produisent l'acide hyaluronique (Yielding et al. 1957), la lubricine ((Hui et al. 2012) et sont capables d'exprimer des molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1, intégrines, CD55). (Smith 2011) ainsi que des récepteurs de l'immunité (TLR1-7 et plus faiblement TLR8-10) (Ospelt et al. 2008; Carrión et al. 2011). Par ailleurs les FLS activés en condition inflammatoire expriment également des PRR cytosoliques (RIG-1 et MDA5) qui reconnaissent les ARN double brins (Carrión et al. 2011). Les FLS activés par des stimuli inflammatoires comme TNF α libèrent de nombreuses cytokines dans le liquide synovial (Huang et al. 2019).

La membrane synoviale saine sécrète également des cytokines (IL-1, IL-6, TNF α) mais dans des quantités beaucoup moins importantes qu'en condition pathologique (arthrose et polyarthrite rhumatoïde). De plus, cette sécrétion de facteurs pro-inflammatoires est contre-carrée au moins en partie par celle de l'IL1Ra, un antagoniste naturel de l'IL1 ainsi que par une faible expression de RANKL (Smith et al. 2003). Ces mécanismes semblent mis en place pour supprimer les processus inflammatoires dans la membrane synoviale saine.

1.3.2.3 Les macrophages de la membrane synoviale

Les macrophages sont des cellules effectrices de l'immunité capables de phagocytter leurs cibles dans un but d'homéostasie tissulaire physiologique mais également en cas de reconnaissance de facteurs étrangers et pathogènes pour l'hôte. (Mosser and Edwards 2008)

Les macrophages de la membrane synoviale proviennent en partie de monocytes circulant d'origine hématopoïétique et de populations de macrophages résidents. En effet, de récentes études ont suggéré que certains macrophages colonisaient les tissus durant le développement embryonnaire et entretenaient leur nombre indépendamment des monocytes circulant au cours de la vie.(Yona et al. 2013; Sheng et al. 2015; Honold and Nahrendorf 2018). Ces macrophages résidents auraient donc des spécificités fonctionnelles comparées aux autres du fait de leurs signatures épigénétiques et transcriptionnelles différentes et de leur microenvironnement (Okabe and Medzhitov 2014). Ils sont présents dans toutes les couches de la membrane synoviale cependant, ils n'expriment pas les mêmes marqueurs en fonction de leur présence dans l'intima ou la sous-intima. Une étude récente a mis en évidence pour la 1^{ère} fois la présence d'une ligne/mono-couche de macrophages au niveau de l'intima qui forment une barrière physique entre la sous-intima et le liquide synovial (**Figure 9**). Les

macrophages de l'intima forment une barrière physique et expriment le récepteur de chemokines CXCR1, CD163 et CD68 ainsi que le récepteur à l'immunoglobuline FcγRIIIa. Ce dernier marqueur n'est peu ou pas présent chez les macrophages de la sous-intima (Bhatia et al. 1998). Par ailleurs les macrophages de la sous-intima n'expriment pas CXCR1 (Culemann et al. 2019). Les macrophages de l'intima sont nécessaires au maintien d'une barrière physique et fonctionnelle grâce aux jonctions serrées. Cette barrière isole et protège les structures intra-articulaires et contrôle ainsi l'inflammation (Culemann et al. 2019).

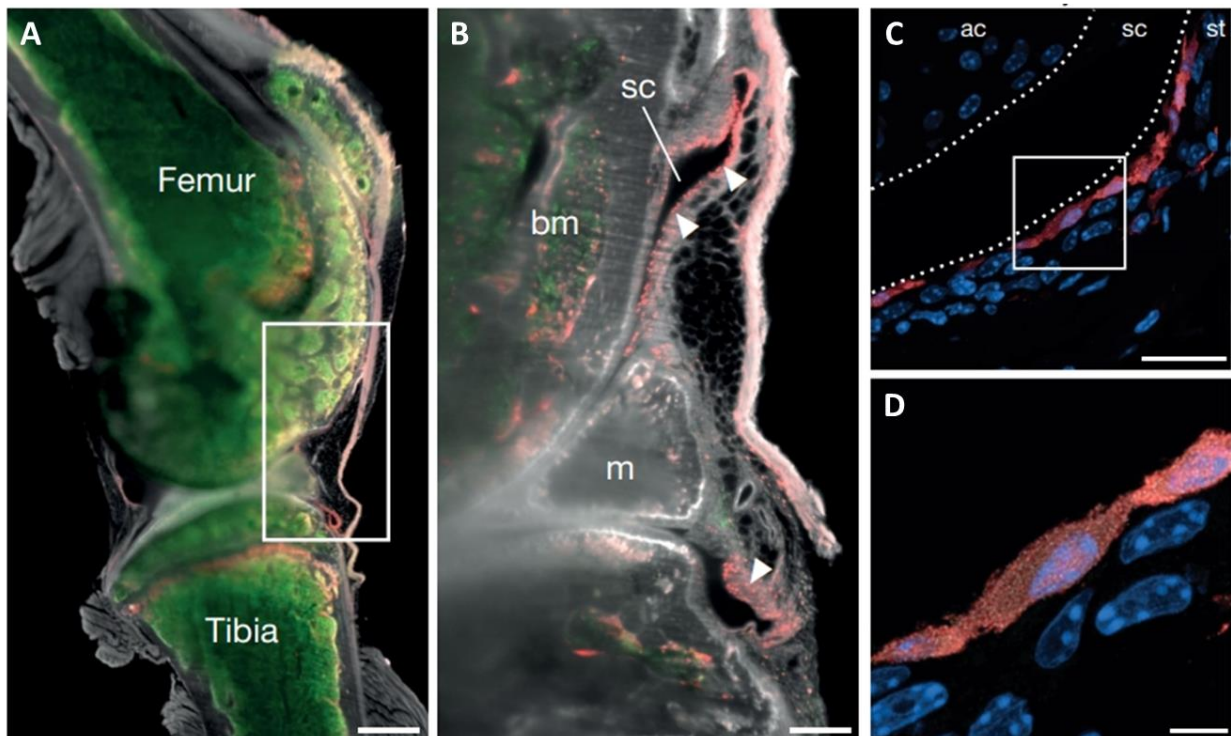


Figure 9 : Mise en évidence de la présence d'une mono-couche de macrophages au niveau de la membrane synoviale de souris par microscopie à nappe de lumière (LFSM) et microscopie confocale à balayage laser (CLSM)

(A, B) Localisation des macrophages (têtes de flèches) de la membrane synoviale (fluorescence rouge, td tomato) et PMNs (polymorphonuclear leukocytes) (fluorescence verts, Ly6G) par LFSM. A, échelle : 500µm ; B, échelle : 100µm. (C,D) Visualisation par CLSM barrière de macrophages (rouge, td tomato) et de cellules endothéliales (bleu, CD31+). C. échelle : 20µm, D, échelle : 5µm (ac : cartilage articulaire, st : tissu synovial). Adapté de Culemann et al. 2019 (Culemann et al. 2019)

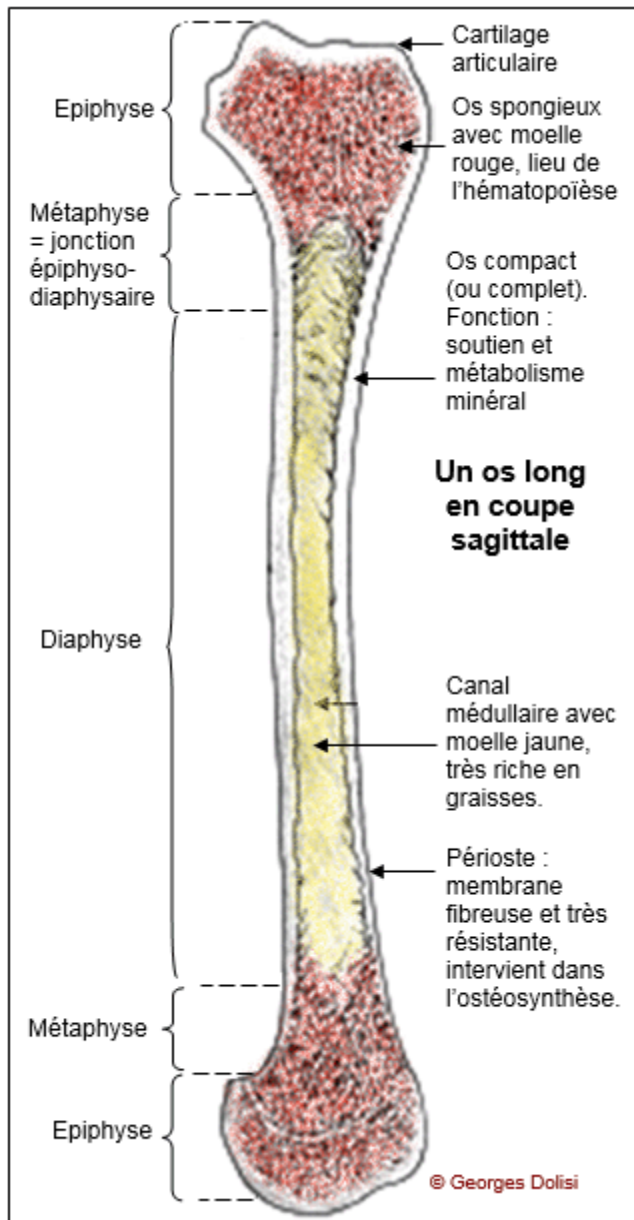
1.3.2.4 Autres cellules de la membrane synoviale

D'autres types cellulaires peuvent être observés dans la sous-intima saine. On trouve notamment des plasmocytes lymphocytes B et T (CD4+, CD8+). Leur possible participation à l'homéostasie tissulaire n'est pas clairement établie (Smith et al. 2003; Singh et al. 2004)

1.3.2.5 Matrice extracellulaire de la membrane synoviale

La matrice de l'intima est composée de différentes molécules des collagènes (III, IV, V et VI avec une petite quantité de coll I), des laminines, fibronectines et proteoglycanes. De grande quantité d'acide hyaluronique sont également retrouvées dans l'intima. Plus on progresse dans la sous-intima et plus sa concentration diminue (Revell et al. 1995).

1.3.3 L'os sous-chondral



L'os est composé de tissu conjonctif minéralisé permettant de remplir deux grandes fonctions vitales : Une fonction mécanique permettant d'assurer le maintien et la protection des organes vitaux et une fonction biologique assurant l'homéostasie du calcium et la production de cellules sanguines grâce à l'hématopoïèse. Le squelette contient 90% du phosphore et 99% du calcium de l'organisme (Constantin 2013).

Les os longs sont divisés en 3 zones : les épiphyses, métaphyses et la diaphyse (**Figure 10**). Les épiphyses se situent aux 2 extrémités de l'os et sont recouvertes de cartilage articulaire. La métaphyse est le siège de la croissance osseuse. La diaphyse est constituée de tissu de soutien appelé cortex. Elle contient la moelle osseuse jaune qui se trouve dans un canal central s'étendant sur toute sa longueur.

Figure 10 : Schéma de la structure d'un os long
Adapté de Medelli.fr, Georges Dolisi

L'os sous-chondral est divisé en deux couches distinctes : la plaque d'os sous-chondral et l'os sous-chondral trabéculaire (**Figure 11**) (Goldring and Goldring 2010).

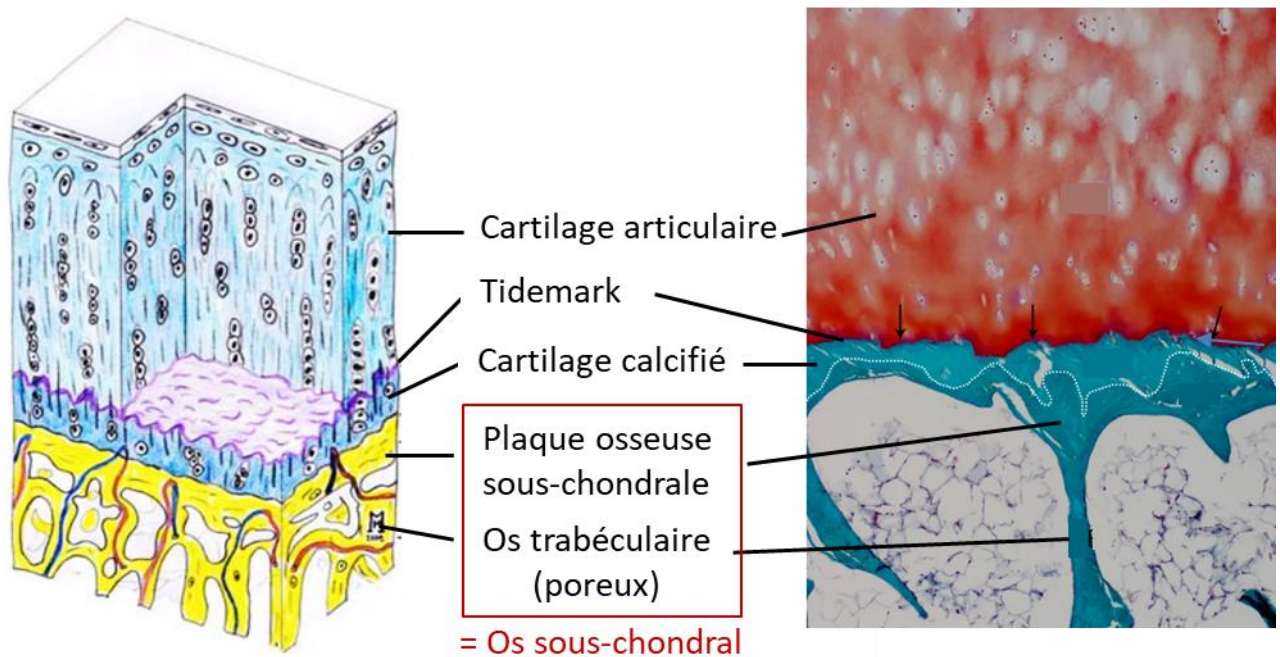


Figure 11 : Schéma de la jonction ostéochondrale

Adapté de Madry et al. 2010 et Li et al. 2013 (Madry et al. 2010; Li et al. 2013)

La plaque osseuse est une couche corticale lamellaire située juste en dessous du cartilage calcifié (Madry et al. 2010). Cette couche est poreuse et présente des vaisseaux et des nerfs qui s'étendent jusque dans la couche de cartilage calcifié (Holmdahl and Ingelmark 1950). Cette couche très dense est constituée de structures cylindriques orientées selon l'axe de l'os qui lui confèrent une résistance contre les contraintes mécaniques (Madry et al. 2010). Juste en dessous de la plaque osseuse se trouve l'os trabéculaire qui est spécialisé dans l'absorption des chocs. Comparé à la plaque osseuse, l'os trabéculaire est plus innervé et vascularisé. Il est constitué de travées entourées de moelle osseuse et de tissu adipeux qui lui confère sa flexibilité (Madry et al. 2010; Suri and Walsh 2012).

L'os sous-chondral est chargé d'amortir les chocs que subit l'articulation. Cette structure est capable de s'adapter aux contraintes mécaniques en modifiant l'orientation des travées de l'os trabéculaire (Walker et al. 2013).

1.3.3.1 Les cellules de l'os

L'environnement osseux sous-chondral est composé d'une grande diversité cellulaire comme les ostéoblastes, ostéoclastes, ostéocytes et des cellules myéloïdes de la moelle osseuse dont les macrophages. Ces cellules coopèrent afin d'entretenir l'os grâce à un processus appelé « remodelage osseux » (**Figure 12**).

➤ Les ostéoblastes

Ces cellules d'origine mésenchymateuses sont spécialisées dans la synthèse de matrice osseuse et dans la minéralisation dans les stades de développement comme dans le remodelage osseux chez l'adulte. Elles se différencient grâce à des facteurs comme RunX2 et Msx2 (Bendall and Abate-Shen 2000; Ducy et al. 2000). Les ostéoblastes sont des cellules de forme cuboïdales mononuclées de 20 µm de diamètre et forment un tapis de cellules jointives. Ces cellules expriment la phosphatase alcaline qui permet la synthèse du collagène de type I et la formation de la matrice osseuse. Ces cellules sont spécialisées dans la synthèse des composants de la matrice (collagènes, protéines matricielles) Les ostéoblastes s'aplatissent au fur et à mesure de la minéralisation de la matrice et deviennent de moins en moins actifs. Ils peuvent alors évoluer vers l'apoptose, la différenciation en ostéocytes ou en cellules bordantes (Constantin 2013).

➤ Les ostéocytes

Les ostéocytes sont des ostéoblastes ayant atteint leur dernier stade de différenciation. Ces cellules agissent comme des cellules endocrines et orchestrent le remodelage osseux en modulant les activités des ostéoblastes et ostéoclastes (Bonewald 2011). Ces cellules ont une forme étoilée comportant des prolongements cytoplasmiques qui permettent de transmettre des informations chimiques (hormones et ions) ainsi que mécaniques (gravité, déformation, mouvement des fluides).

Ces cellules ont une durée de vie longue dans leur environnement minéralisé et représentent 90 à 95% des cellules osseuse chez l'adulte. Ces cellules sont sensibles à la stimulation mécanique et sont considérées comme les cellules osseuses les plus mécanosensibles (Constantin 2013).

➤ Les cellules bordantes

Ces cellules aplaties dorment une couche cellulaire qui recouvre la surface de l'os. Ces cellules constitueraient une source de cellules ostéoblastiques de réserve capables de se

dédiérencier en ostéoblastes actifs sous l'action de différents facteurs (ex : parathormone PTH) (Constantin 2013).

➤ Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont connus pour leur rôle de résorption de l'os permettant ainsi le renouvellement de la matrice osseuse (Teitelbaum 2007). Ces cellules sont membres de la famille des monocytes/macrophages. Ces cellules se différencient en ostéoclastes sous l'action de 2 cytokines, le receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) et le macrophage colony stimulating factor (M-CSF). Le facteur TNF α est également impliqué dans l'ostéoclastogenèse mais plutôt dans des contextes inflammatoires (Kodama et al. 1991; Odgren et al. 2003).

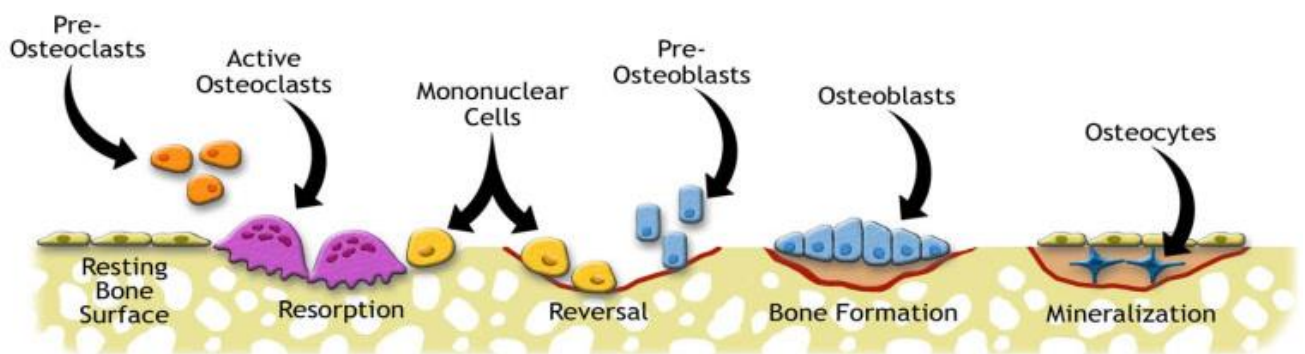


Figure 12 : Schéma des acteurs du remodelage osseux

D'après <https://www.orthopaedicsone.com>

1.3.3.2 La matrice osseuse

La matrice osseuse est composée de 2 phases, une phase organique et une phase minérale. La phase organique contient des fibres de collagène (90% de la phase organique), de nombreux protéoglycanes, des glycoprotéines (ostéonectine, sialoprotéine et ostéopontine) et des lipides (Bonucci 2012; Constantin 2013). La fraction minérale représente 70% de la matrice osseuse. La minéralisation s'effectue grâce aux sites de nucléation se situant dans des régions spécifiques des fibres de collagène de type I. Ces sites permettent la formation de cristaux d'hydroxyapatite.

1.3.4 Le tissu adipeux de Hoffa

L'articulation synoviale contient des zones de tissu adipeux infrapatellaire dont l'une d'elles est appelée tissu adipeux de Hoffa (TAH). Le TAH est situé dans la partie antérieure du genou et situé sous la patella et en avant des condyles fémoraux et plateaux tibiaux. Sa face postérieure est tapissée par la membrane synoviale. Ce tissu vascularisé et innervé est constitué majoritairement d'adipocytes, de fibroblastes mais aussi de macrophages, lymphocytes et mastocytes (Maurel et al. 2010). En remplissant l'espace articulaire antérieur lors de la flexion du genou, le TAH servirait d'amortisseur. Le TAH possède également des propriétés endocrines et sécrètent des molécules notamment des adipokines (leptine, adiponectine, resistine, visfatine, adipsine) (Labusca and Zugun-Eloae 2018).

1.3.5 Autres tissus de l'articulation

Les ménisques sont deux structures en forme de croissant se trouvant à la jonction entre les épiphyses du tibia et du fémur. Leur rôle est de stabiliser l'articulation en formant une cavité où viennent se loger les condyles fémoraux. La répartition des charges est inéquitable puisque le ménisque médial supporte près de 80% du poids comparé au ménisque latéral qui en supporte 20%.

2. L'arthrose

2.1 Epidémiologie, diagnostic et traitements

2.1.1 Epidémiologie

Parmi les nombreuses pathologies touchant les articulations, l'arthrose est la pathologie articulaire la plus fréquente. Des prévisions estiment que l'arthrose sera la quatrième principale cause d'années vécues avec un handicap (« years lived with disability »= YLD) à travers le monde en 2020 (Woolf and Pfleger 2003). Selon l'INSERM, l'arthrose concerne 65 % des personnes de plus de 65 ans et 80 % des plus de 80 ans. Longtemps considérée comme la conséquence d'une usure du cartilage due au vieillissement, elle est maintenant considérée comme une pathologie à part entière affectant l'ensemble des tissus de l'articulation (Loeser et al. 2012a). Elle est caractérisée par une dégradation du cartilage articulaire, une inflammation de la membrane synoviale et un remodelage de l'os sous-chondral (**Figure 13**). Ces altérations se développent sous l'action de facteurs, biochimiques, métaboliques,

mécaniques et d'une inflammation de bas grade qui conduisent à la destruction de l'articulation (Liu-Bryan 2015).

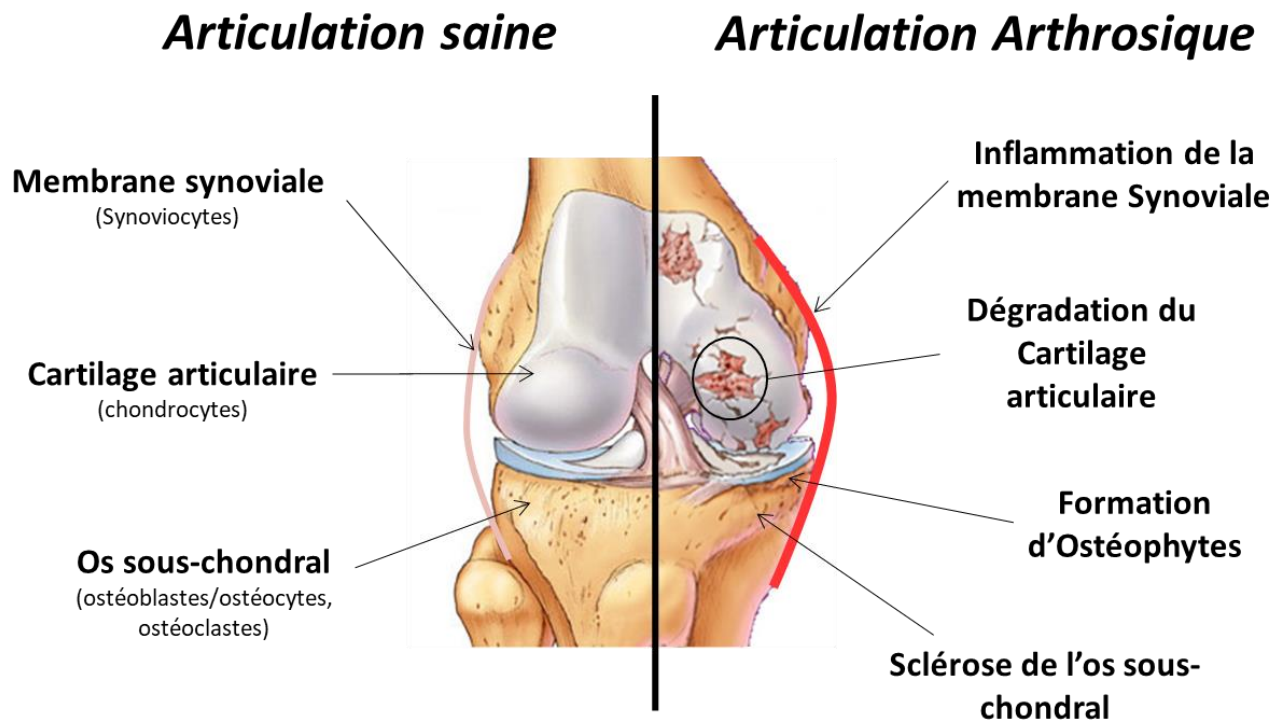


Figure 13 : Changements pathologiques des tissus au cours de l'arthrose

La douleur est l'un des symptômes de la maladie les plus prépondérants chez les patients bien qu'elle ne soit pas liée à la gravité des lésions arthrosiques (Bennell et al. 2012). Le handicap moteur, les raideurs et douleurs, entraînent une baisse de la qualité de vie des patients. Le coût économique, social et psychologique de l'arthrose est conséquent et ne fait qu'augmenter. Dans les années 2000, le coût de la maladie représentait déjà 1 à 2,5% du produit national brut des pays comme Les Etats-Unis, le Canada, la Grande-Bretagne, la France et l'Australie (March and Bachmeier 1997).

Très récemment, l'arthrose a été reconnue comme maladie grave et handicapante par la FDA (Food and Drug Administration, 2018). Cette reconnaissance de la gravité de la maladie aux Etats-Unis est la preuve que l'arthrose est un problème de santé publique mondial extrêmement préoccupant compte tenu de l'épidémie d'obésité et du vieillissement de la population à travers le monde (Frasca et al. 2017).

2.1.2 Diagnostic

Le diagnostic de l'arthrose se fait grâce à un examen clinique et majoritairement par investigation radiologique. La classification de Kellgren-Lawrence permet de classer les stades d'arthrose en 4 grades en fonction de leur degré de sévérité. Cette classification prend en compte des paramètres radiographiques tels que la présence d'ostéophytes et le pincement de l'interligne articulaire (**Figure 14**).

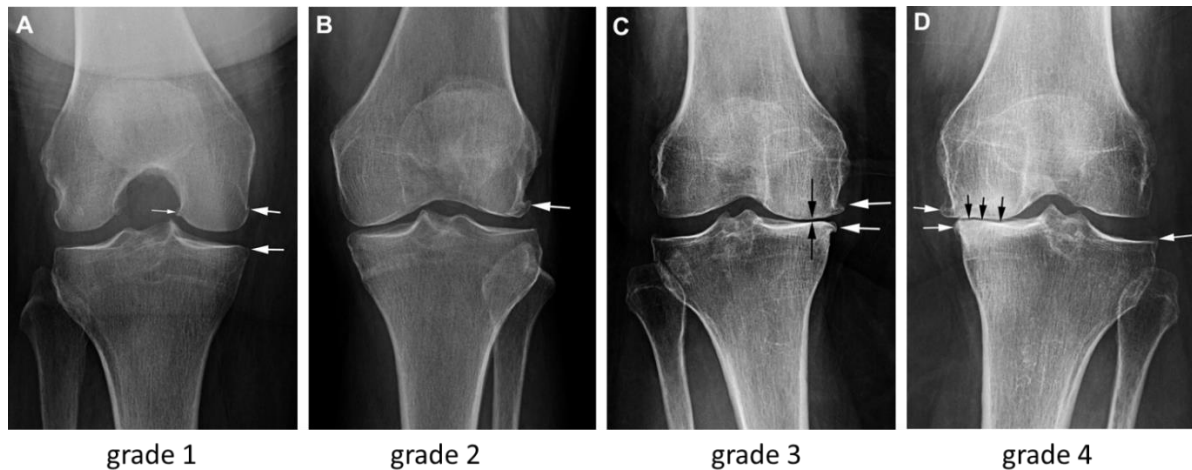


Figure 14 : Classification radiologique de la sévérité de l'arthrose (échelle Kellgren-Lawrence)

A Grade 1 : Arthrose minime, des ostéophytes potentiels sont observés au niveau des bordures médiales (flèches blanches). B, Grade 2 : Présence d'au moins un osteophyte bien défini (flèche) sans modification de l'interligne articulaire. C, Grade 3 : Rétrécissement de l'interligne articulaire (flèches noires) et présence d'ostéophytes (flèches blanches). D, Grade 4 : Pincement sévère de l'interligne articulaire (flèches noires) et présence d'ostéophytes (flèches blanches). Adapté de Hayashi et al. 2016. (Hayashi et al. 2016)

2.1.3 Traitements

À l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif contre l'arthrose. Seuls les symptômes de la maladie notamment la douleur et l'inflammation sont traités par des anti-douleurs et anti-inflammatoires (Mobasher 2013). Ces traitements symptomatiques n'ont peu ou pas d'effets sur un grand nombre de patients.

En cas d'arthrose sévère, l'arthroplastie des articulations touchées peut-être requise afin de réduire la douleur et le handicap des patients. Le nombre d'arthroplastie de genoux a considérablement augmenté ces dernières années (Cram et al. 2012).

Le remplacement par chirurgie des articulations n'est cependant pas la panacée. En effet, les patients opérés ne récupèrent bien souvent pas en totalité leurs capacités physiques. 20 à 30% d'entre eux continuent à ressentir de la douleur et un handicap après la chirurgie. La durée de vie de ces prothèses est estimée à une dizaine d'années avant de devoir être à nouveau remplacées (OARSI 2016).

De nombreuses études et essais cliniques ont été réalisés afin de trouver des traitements permettant de ralentir ou d'inhiber la progression de la maladie, les DMOADs (Disease-modifying osteoarthritis drugs) (Karsdal et al. 2016). Différentes approches ont été testées :

- Anti-cytokiniques

Les cytokines $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ et α et $IL-6$ jouent un rôle majeur dans l'arthrose faisant d'elles des cibles thérapeutiques. De nombreuses études cliniques utilisant des inhibiteurs de ces molécules n'ont malheureusement pas montré d'efficacité dans la réduction de la douleur, de la dégradation tissulaire et le ralentissement de la progression (Verbruggen et al. 2012; Karsdal et al. 2016).

- Inhibiteurs des MMPs :

Les Métalloprotéases matricielles (MMPs) étant extrêmement impliquées dans la dégradation du cartilage, certaines études ont testé des inhibiteurs de ces enzymes. Malheureusement durant les dernières décennies, la plupart n'ont pas abouti à cause de la non spécificité des produits ou leur toxicité (Rudek et al. 2002; Vandenbroucke and Libert 2014). Cependant, cette stratégie est à nouveau en vogue et de nouveaux essais cliniques sont en cours (Jain et al. 2017; Mohanty et al. 2017)

- Biphosphonates

Ces molécules inhibant la résorption osseuse ont été longuement testées et certaines études ont montré leur capacité à protéger l'os et le cartilage de modifications liées à l'arthrose (Zhang et al. 1999; Strassle et al. 2010). Toutefois, certaines méta-analyses récentes ont remis en cause les effets bénéfiques de ces traitements et ont démontré que les biphosphonates ne réduisaient pas la douleur, la progression radiographique de l'arthrose et n'amélioraient pas les fonctions articulaires comparés au placebo chez les patients souffrant d'arthrose du genou (Bingham et al. 2006; Vaysbrot et al. 2018).

De nombreuses autres approches sont testées (régulation des hormones, facteurs de croissance, inhibition d'autres protéases).

La Société Française de Rhumatologie a récemment établi des recommandations pour la gestion pharmacologique de patients atteints de gonarthrose. Ces recommandations suivent plusieurs principes notamment d'associer à la fois une prise en charge pharmacologique et non pharmacologique des patients, d'adapter le traitement en fonction de chaque patient et suivre l'évolution de la maladie de manière régulière. 6 recommandations de médicaments avec une prise orale ont été données et préconisent l'utilisation raisonnée du paracétamol, des anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAIDs) utilisés le plus brièvement possible, l'emploi d'opioïdes, de SYSADOAs (slow acting drugs for OA) et de duloxétine. 2 autres recommandations de traitements intra-articulaires ont été préconisés (injections de corticostéroïdes, d'acide hyaluronique (Sellam et al. 2019).

2.1.4 Prévention

L'impact de certains facteurs de risques peut être réduit. La gestion du poids et l'exercice physique modéré sont des moyens efficaces de lutter contre la progression de l'arthrose (Messier et al. 2004; Owens and Conaghan 2016). Non seulement, la perte de poids diminue la douleur des patients et les problèmes fonctionnels de l'articulation mais ils engendrent de nombreuses améliorations de la qualité de vie des patients et réduisent les risques de maladies cardiovasculaires et diabètes de type 2.

Jusqu'à présent les essais cliniques tentant de trouver des traitements contre l'arthrose n'ont pas donné de résultats concluants. Cependant la complexité de l'arthrose et la diversité de phénotypes observés a rarement été prise en compte (Van Spil et al. 2019). De fait, considérer l'arthrose comme une seule et même pathologie est réducteur et ne permet pas de prendre en compte toutes les subtilités de la maladie en fonction des différents facteurs de risques (Musumeci et al. 2015). Il n'existe pas une mais des arthroses (Deveza and Loeser 2018; Berenbaum 2019). Identifier les phénotypes d'arthrose est crucial car cela permettrait à l'avenir d'identifier les mécanismes impliqués dans chaque type et de sélectionner les patients ayant le plus de chance de répondre aux traitements dans des études cliniques. Par exemple, l'échec de l'étude clinique portant sur l'effet des bisphosphonates pour ralentir la progression de la maladie est sans doute dû à l'inclusion non sélective de patients avec une arthrose symptomatique au lieu de choisir des patients chez lesquels l'os sous-chondral joue un rôle majeur dans la progression (Spector et al. 2005; Buckland-Wright et al. 2007). Classifier les phénotypes d'arthrose permettrait d'apporter des solutions préventives et thérapeutiques ciblées aux patients (Felson 2010; Bierma-Zeinstra and van Middelkoop 2017).

2.2 Les phénotypes d'arthrose

L'arthrose est une pathologie complexe, très hétérogène et possède de nombreuses composantes. Compte tenu de l'importante variabilité entre patients arthrosiques, les chercheurs et cliniciens se sont attachés à classifier les phénotypes d'arthrose selon des points de vue moléculaires et cliniques.

Pour comprendre ce qu'est un phénotype il est nécessaire de comprendre ses définitions biologiques et médicales. En biologie les phénotypes sont définis de la manière suivante : « Ce sont les propriétés observables d'un organisme vivant produites par l'interaction de son génotype et de l'environnement ». Cette définition est différente en médecine où le terme phénotype désigne les caractéristiques observables chez un individu (comportement, morphologie, développement, propriétés physiques et biochimiques) sans relations directes avec un processus pathologique associé à des voies de signalisations ou mécanismes particuliers.

L'endotype est le concept complémentaire du phénotype. Il désigne une sous-catégorie de maladie dans laquelle l'étiologie ou les mécanismes moléculaires physiopathologiques sont bien définis.

Le phénotype permet donc de décrire les caractéristiques visibles d'une maladie sans pouvoir y associer de mécanisme précis alors que l'endotype implique un mécanisme physiopathologique défini (Lötvall et al. 2011; Lin 2014; Mobasher et al. 2019).

Les études de la physiopathologie et des différentes manifestations de l'arthrose ont largement progressé durant la dernière décennie. Ces avancées ont permis de mettre en évidence la multitude de mécanismes et changements moléculaires et cellulaires impliqués dans la destruction des articulations. L'implication de chaque tissu atteint (cartilage, membrane synoviale, os) est variable en fonction des patients et mène à des manifestations de l'arthrose très différentes comme le degré d'inflammation, les altérations osseuses, les lésions méniscales et la douleur. (Loeser et al. 2012a; Neogi 2013).

Plusieurs approches ont été imaginées pour classifier les phénotypes d'arthrose et sont basées sur différents aspects comme les signes cliniques, structurels, étiologiques et les analyses biomédicales. Les avantages d'établir des phénotypes sont multiples. Ils permettraient d'identifier les patients en fonction du risque de progression de la maladie, de leurs réponses à

des traitements spécifiques et de l'identification des mécanismes physiopathologiques (ou endotypes).

Trois approches utilisées pour classifier les phénotypes d'arthrose sont présentées ici : la première en fonction des facteurs de risques de l'arthrose (**Figure 15**), la deuxième en fonction des symptômes cliniques d'arthrose et la 3^{ème} par une approche non supervisée permettant une classification par endotypes.

2.2.1 Classification des phénotypes par facteurs de risques

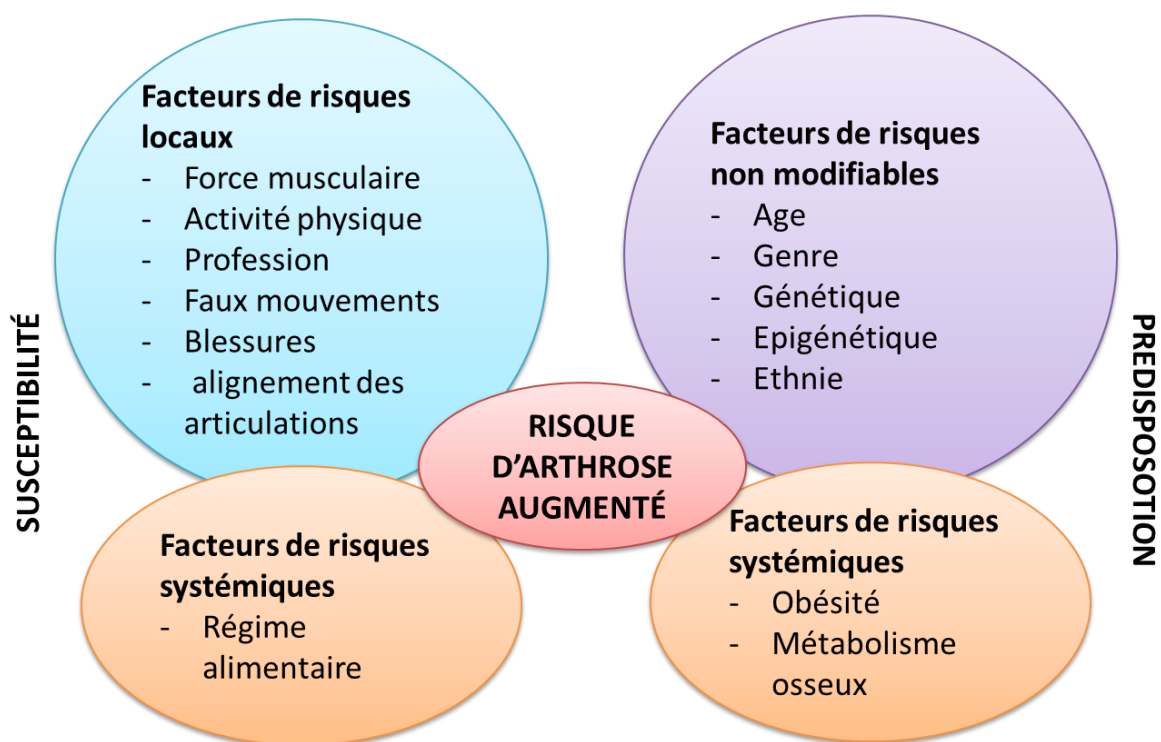


Figure 15 : Présentation des différents facteurs de susceptibilité et prédisposition de l'arthrose

Adapté de Musumeci et al. 2015 (Musumeci et al. 2015)

2.2.1.1 L'âge

L'âge est le principal facteur de risque de l'arthrose (Nielsen et al. 2019). Cependant, bien qu'étroitement liés, arthrose et vieillissement sont deux processus indépendants (Loeser et al. 2016).

Le vieillissement est caractérisé par des modifications tissulaires et cellulaires présentées dans la **Figure 16** (López-Otín et al. 2013) ainsi que par l'établissement d'une inflammation

chronique, stérile et de bas grade connue sous le nom d' « inflammaging » (Franceschi et al. 2000b). Les modifications cellulaires apparaissant au cours du vieillissement sont liées à une instabilité génomique, principalement due au raccourcissement des télomères et aux altérations épigénétiques ; à une dérégulation du métabolisme associée à des dysfonctions mitochondriales, une détection des nutriments dérégulée ; un épuisement des cellules souches et à la sénescence cellulaire (López-Otín et al. 2013). La faculté des cellules sénescents (SnCs) à se diviser et à résister à l'apoptose est altérée. L'accumulation de cellules sénescents et la baisse d'efficacité du système immunitaire sont responsables du processus d'inflammaging, (Franceschi et al. 2000b). Les cellules sénescents subissent de nombreuses modifications de leurs mécanismes intra-cellulaires et évoluent vers un phénotype appelé « senescence-associated secretory phenotype »(SASP) (Coppé et al. 2008). Elles produisent alors de nombreux médiateurs pro-inflammatoires tels que des cytokines (IL6 et IL-1 α/β), des chemokines (MCP1, IL-8, GRO α), des facteurs de croissance (TGF β , VEGF) et des protéases (MMP3) (Soto-Gamez and Demaria 2017). Ces facteurs sont responsables de l'activation du système immunitaire et de la progression de la dégradation de l'articulation (Jeon et al. 2018). La quantité de SnCs est positivement corrélée à la sévérité de l'arthrose (McCulloch et al. 2017). Dans un modèle murin, l'élimination sélective des SnCs au sein du cartilage a réduit le développement d'arthrose post-traumatique (Jeon et al. 2017).

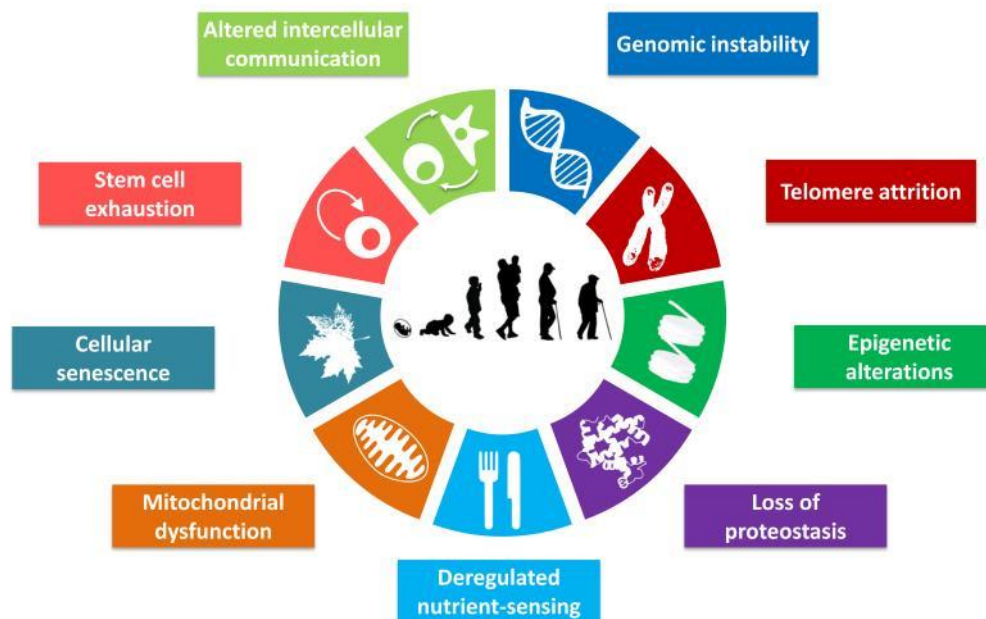


Figure 16 : Les caractéristiques du vieillissement
Adapté de Lopez-Otín et al. 2013 (López-Otín et al. 2013)

2.2.1.2 L'obésité/ Syndrome métabolique

Le syndrome métabolique (Metabolic syndrome : MetS) est défini comme un ensemble de troubles qui ont pour conséquence le développement de différentes maladies dont les maladies cardiovasculaires et le diabète de type II. Ce syndrome regroupe des facteurs provoquant des dérégulations métaboliques comme l'obésité, le diabète, l'insulino-résistance, la dyslipidémie et l'hypertension (Kassi et al. 2011). Le MetS augmente le risque d'arthrose sans distinction entre les différentes localisations (Puenpatom and Victor 2009; Monira Hussain et al. 2014). L'association de plusieurs désordres métaboliques a un effet cumulatif et négatif sur l'apparition et le développement de l'arthrose (Li et al. 2016). Parmi ces troubles, l'obésité, caractérisée par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30 constitue un risque majeur de développement de l'arthrose. La surcharge mécanique due au poids explique en partie l'évolution de la maladie chez les patients obèses (Widmyer et al. 2013). Les patients obèses ont plus de risques de développer de l'arthrose aux genoux et aux mains mais pas au niveau des hanches (Grotle et al. 2008). Dans le cas d'arthrose des mains, les facteurs mécaniques seuls ne peuvent expliquer les atteintes observées ce qui suggère une étiologie beaucoup plus complexe de la maladie. Le rôle du tissu adipeux dans l'arthrose due à un phénotype lié à l'obésité a été suggéré. Ce tissu, organe endocrine, sécrète de multiples cytokines et adipokines (Kershaw and Flier 2004; Courties et al. 2019). De plus, l'obésité est associée à une dérégulation du métabolisme et une dyslipidémie caractérisées par une augmentation systémique des HDLs (high density lipoproteins), FFAs (Free fatty acids), triglycérides (TGs) et LDL oxydés (Klop et al. 2013). Ces facteurs engendrent le développement d'une inflammation de bas grade qui soutient le développement de l'arthrose. La perte de poids chez les patients atteints d'arthrose du genou permet des améliorations fonctionnelles avec une diminution de la douleur et une meilleure mobilité (Messier et al. 2004).

Le diabète est également un des troubles majeurs du MetS. Son implication dans l'arthrose fait toujours débat car différentes études ont présenté des conclusions opposées sur l'association entre les deux pathologies (Louati et al. 2015; Frey et al. 2016; Nielen et al. 2016; Williams et al. 2016). Cependant des effets délétères de l'hyperglycémie, associée au diabète, ont été décrits. La présence excessive de glucose provoque l'augmentation de nombreux médiateurs comme IL-6 et PGE2, les métalloprotéases et le développement du stress oxydatif chez les chondrocytes (Laiguillon et al. 2015).

La dyslipidémie définie par une hypercholestérolémie et hypertriglycémie est associée à

l'augmentation du risque d'arthrose. L'accumulation de cholestérol et de ox-LDL (lipoprotéine de faible densité oxydée) impacte l'ensemble des tissus de l'articulation (cartilage, os sous-chondral et membrane synoviale) (de Munter et al. 2013, 2016).

Enfin l'hypertension est plus prévalente chez les patients arthrosiques que dans le reste de la population non atteinte. Cependant, les mécanismes reliant l'hypertension à l'arthrose sont encore méconnus (Li et al. 2016; Veronese et al. 2016).

2.2.1.3 Le stress mécanique

Le stress mécanique est un facteur majeur du développement de l'arthrose (Buckwalter et al. 2013). On observe deux mécanismes particuliers provoquant un stress mécanique. Celui-ci peut être dû à une blessure sévère et ponctuelle ou bien à une usure plus modérée mais répétée au cours du temps. La pratique d'activités intenses liés au sport ou à certaines activités professionnelles augmente les risques de développer une arthrose post-traumatique (post traumatic osteoarthritis : PTOA) (Jones et al. 2003; Showery et al. 2016). D'autre part, des blessures articulaires comme la rupture des ligaments croisés (anterior cruciate ligament : ACL), la ménisectomie, et les fractures peuvent aussi mener à une PTOA (Roos et al. 1995). Le mauvais alignement des articulations peut être un facteur de risque de l'arthrose. Par exemple le mode varus augmente les risques d'arthrose fémoro-tibiale (Sharma et al. 2010; Owens and Conaghan 2016) (**Figure 17**).

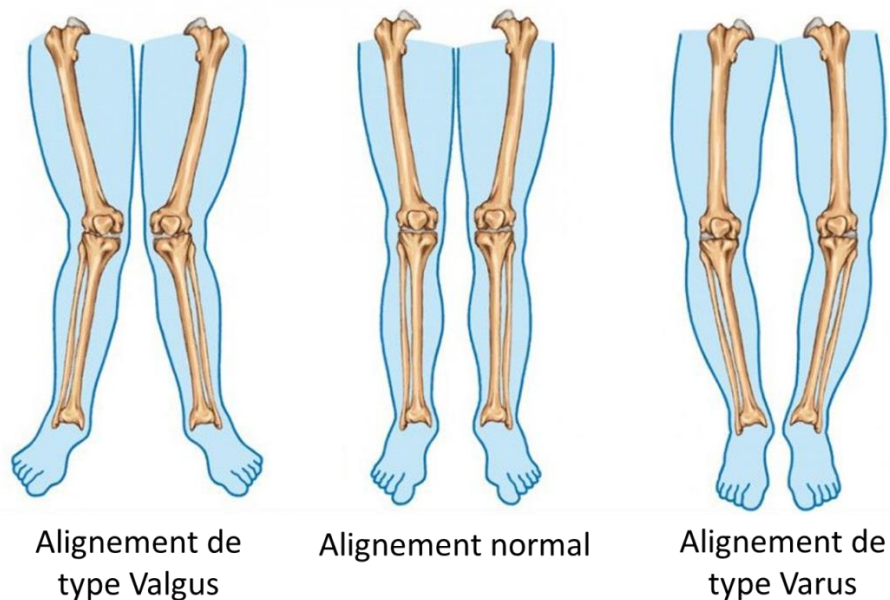


Figure 17 : Les différents alignements de l'articulation du genou
Adapté de <https://reversebowtactic.review>

D'autres facteurs agissent comme l'âge (articulations vulnérables à cause de la perte de force musculaire) et l'obésité (excès de charge sur les articulations) augmentant le stress mécanique et multipliant ainsi les risques de développer de l'arthrose.

2.2.1.4 Le genre

L'arthrose n'atteint pas de manière égale les hommes et les femmes. Ces dernières sont plus touchées par l'arthrose des mains, du genou et des pieds que les hommes (Srikanth et al. 2005). Cette augmentation de l'arthrose chez les femmes est surtout visible après la ménopause (Lawrence et al. 1966; Tsai and Liu 1992). Les hormones sexuelles sont impliquées dans cette différence. Les récepteurs aux œstrogènes sont exprimés par les cellules de l'os et du cartilage suggérant une sensibilité de ces tissus à ces hormones (Ushiyama et al. 1999; Richmond et al. 2000; Braidman et al. 2001). Des disparités morphologiques entre hommes et femmes au niveau de la structure des os, l'alignement des articulations, la laxité des ligaments ou bien le volume de cartilage articulaire peuvent également être impliqués (Faber et al. 2001; O'Connor 2006).

2.2.1.5 Facteurs génétiques, épigénétiques et ethniques

Avec la progression des outils d'analyses du génome et l'étude des modifications épigénétiques ces dernières années, de nombreux facteurs génétiques ont montré leur implication dans la physiopathologie de l'arthrose (Jeffries 2019). De récentes études ont mis en évidence plus de 80 mutations de gènes ayant un rôle dans sa pathogenèse arthrosique (Ryder et al. 2008). La majeure partie des altérations génétiques impliquées affectent le métabolisme et l'homéostasie des tissus de l'articulation (Musumeci et al. 2015). Par exemple, des altérations du gène MGP impliqué dans l'inhibition de la calcification du cartilage (matrix Gla protein) augmentent le risque de développer de l'arthrose des mains (den Hollander et al. 2017) et les patients possédant des mutations dans le gène COMP (Cartilage oligomeric matrix protein) sont davantage sujets à des arthroplastie de hanche (Styrkarsdottir et al. 2017). Par ailleurs, des différences épigénétiques sont observées entre personnes saines et patients arthrosiques. Au niveau des chondrocytes articulaires, certains gènes présentent une hypométhylation chez les patients atteints d'arthrose comparés à des personnes saines (Zhao et al. 2017). Des déméthylations géniques au niveau de chondrocytes humains sont associées à de hauts niveaux d'expression de MMP13, l'enzyme impliquée dans la dégradation de la MEC (Hashimoto et al. 2013). Bien que de nombreux gènes soient impliqués dans la maladie, l'arthrose ne montre pas de gènes à fort impact dans la

pathogénèse mais plutôt une combinaison de différentes mutations/altérations du génome (Musumeci et al. 2015).

Certaines études se sont intéressées à l'origine ethnique des patients arthrosiques pour déterminer si ce facteur pouvait être lié à la progression de la maladie. Une étude menée par Nelson et al. a montré que la population Afro-américaine développe moins d'arthrose des mains mais présente un risque plus de deux fois plus grand de développer de l'arthrose aux niveau des genoux que la population Caucasienne (Nelson et al. 2011). De plus, une étude a montré des différences significatives au niveau de l'alignement des genoux entre les populations Caucasienne et Chinoise. Les sujets Chinois présentent majoritairement la forme valgus au niveau distal du fémur, ce qui pourrait expliquer la plus forte prévalence d'arthrose tibio-fémorale latérale chez cette population (Harvey et al. 2008). Cependant, l'impact des différences ethniques sur l'arthrose divise les chercheurs. Il est parfois difficile de déterminer si les différences observées entre les populations sont liées au facteur ethnique ou liées à l'environnement social et économique et au mode de vie des individus (Wright et al. 2008; Allen 2010).

2.2.2 Classification des phénotypes par symptômes cliniques

Des équipes se sont intéressées à la classification des patients par phénotypes en se basant sur la définition suivante : « Le phénotype peut être défini comme une collection de traits observables qui peuvent permettre d'identifier et caractériser un sous-groupe dans une population définie ». Les phénotypes cliniques d'arthrose pourraient être l'expression physique visible de différents endotypes moléculaires se chevauchant.

Les phénotypes cliniques identifiés par l'équipe de Dell'Isola sont présentés dans la **Figure 18** (Dell'Isola et al. 2016).

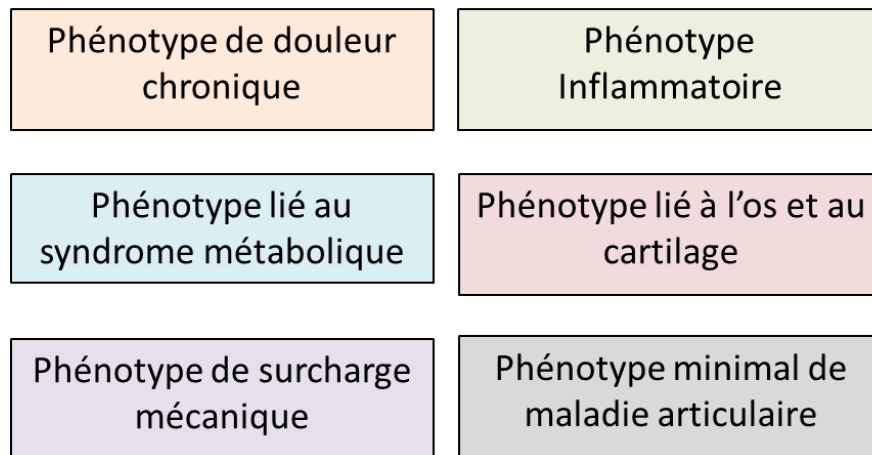


Figure 18 : Phénotypes cliniques de l'arthrose de genoux selon Dell'Isola et al.
Adapté de Mobasheri et al.2019 (Mobasheri et al. 2019)

Cette étude a été réalisée pour classifier les patients atteints d'arthrose du genou. La classification choisie repose sur l'utilisation de différentes variables comme les facteurs de risques de l'arthrose (IMC, alignement varus/valgus), l'analyse de prélèvements urinaires et sanguins, les scores radiographiques (Kellgren & Lawrence) et le score de la douleur. (Felson 2010; Knoop et al. 2011; Dell'Isola et al. 2016). D'autres études se sont aussi intéressées à la classification des patients et ont défini des phénotypes relativement similaires (Deveza et al. 2017). Par exemple, l'OARSI (The Osteoarthritis Research Society International) a élaboré des recommandations pour l'utilisation de biomarqueurs qui sont les équivalents des « variables » choisies dans les autres études. Ces biomarqueurs peuvent être solubles, (analyte biochimique présents dans des prélèvements) ou bien « physiques » (imagerie, examen clinique physique, échelles) (Kraus et al. 2015).

2.2.2.1 Phénotype de douleur chronique

L'identification de ce phénotype repose sur différentes études (majoritairement réalisées sur des patients atteints d'arthrose du genou) montrant que le système nerveux central (SNC) et les altérations neurophysiologiques de la sensibilité à la douleur étaient des facteurs majeurs de la physiopathologie de l'arthrose (Murphy and Sambanis 2001; Knoop et al. 2011; Cruz-Almeida et al. 2013; Kittelson et al. 2016). Les variables utilisées sont liées au syndrome de sensibilité centrale (affection neurologique entraînant une sensibilisation du système nociceptif), la douleur et le profil psychologique (Murphy et al. 2011; Cruz-Almeida et al. 2013; King et al. 2013; Kittelson et al. 2016). La sensibilité centrale est évaluée par test de sensibilité quantitative (QST) (Cruz-Almeida et al. 2013). Ces études suggèrent que des

altérations de la sensibilité centrale à la douleur sont caractéristiques des patients atteints d'arthrose symptomatique modérée à sévère (Murphy et al. 2011; Cruz-Almeida et al. 2013). En parallèle des atteintes articulaires, ces patients peuvent aussi présenter une détresse psychologique, des troubles du sommeil, de la fatigue, des douleurs étendues à d'autres parties du corps. Ce phénotype de la douleur est donc soutenu par des mécanismes complexes qui affectent non seulement les articulations mais le corps tout entier et implique une prise en charge adaptée des patients.

2.2.2.2 Phénotype inflammatoire

Différentes cohortes ont montré une surexpression génique de certaines cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, COX2, GRO 2, MIP-1 α et MIP-1 β) chez des patients arthrosiques (Attur et al. 2011; Tsuchida et al. 2012). Dans l'étude réalisée par Attur et al. les patients arthrosiques surexprimant ces cytokines avaient un plus haut niveau de douleur et une progression radiographique de l'arthrose plus rapide que ceux avec une plus faible expression. Une autre étude s'est intéressée à la relation entre des biomarqueurs sanguins et urinaires et a mis en évidence 5 clusters dont un très inflammatoire caractérisé par des marqueurs comme la protéine C-réactive (C-RP), Tumor necrosis receptor type I et II, IL-6, eosinophilic cationic protein (ECP) (Otterness et al. 2000). D'autres biomarqueurs définissant un sous-groupe de patients ont été caractérisés par l'équipe de Van Spil et al (van Spil et al. 2012).

2.2.2.3 Phénotype lié au syndrome métabolique

Le phénotype lié au syndrome métabolique (Metabolic syndrome-associated osteoarthritis : Met-OA) a été mis en évidence chez des patients montrant une plus forte implication de facteurs métaboliques (obésité, diabète, hypertension, dyslipidémie) et des biomarqueurs spécifiques (leptine plasmatique (pLeptin), C-RP, le taux de sédimentation érythrocytaire (ESR) (Sowers et al. 2002; Knoop et al. 2011; van Spil et al. 2012; van der Esch et al. 2015). Une autre étude proposant d'autres définitions des phénotypes propose un sous-groupe composé de « personnes obèses et avec une faible musculature ». Ce sous-groupe se rapproche de celui du phénotype métabolique. Les patients de ce sous-groupe sont notamment caractérisés par de fortes limitations physiques (d'après les échelles WOMAC de fonction physique et échelle indiquant les limitations d'activité) (Knoop et al. 2011). La plupart des autres études définissant le Met-OA ont des définitions proches des caractéristiques qui peuvent être partagées par ce sous-groupe de patients (implication des adipokines et médiateurs lipidiques, stress oxydatif, hyperglycémie insulino-résistance et hypertension)

(Courties et al. 2019). Certaines études considèrent que ce phénotype désigne simplement des patients obèses arthrosiques et que la corrélation entre l'arthrose et les mécanismes du syndrome métabolique n'est pas significative (Berenbaum et al. 2018).

2.2.2.4 Phénotype de stress mécanique

Ce phénotype est encore débattu car tous les phénotypes d'arthrose présentent une composante mécanique. Néanmoins, certaines équipes ont défini ce phénotype comme mettant en jeu des facteurs biomécaniques fortement impliqués dans la progression de la maladie. Par exemple, une étude menée par Gelber et al. a montré que les jeunes adultes ayant subi des traumatismes articulaires (genoux et hanches) avaient un risque fortement augmenté de développement d'arthrose (Gelber et al. 2000). Le stress mécanique peut être provoqué par deux types de mécanismes, l'un causé par une blessure sévère et ponctuelle et l'autre lié à une usure progressive de l'articulation (mauvais alignement) (Buckwalter et al. 2013). Ces différentes étiologies peuvent se recouper au cours de la vie, ce qui rend difficile la classification de ce phénotype. Des équipes ont donc proposé leur moyen de répartition dans des sous-groupes. Une étude menée par Waarsing et al. a identifié 2 sous-groupes, le premier regroupant des patients présentant des dégénérescences au niveau du compartiment latéral, un alignement de type valgus et un IMC faible, le second caractérisé par une dégradation sévère du compartiment médial, un alignement de type varus et une haute prévalence de traumatismes antérieurs (Waarsing et al. 2015). D'autres études ont proposé d'autres caractéristiques associées à ce phénotype (force musculaire élevée, forte dégradation articulaire et faible IMC) (van der Esch et al. 2015).

2.2.2.5 Phénotype lié au cartilage et à l'os

Comme pour le phénotype de stress mécanique, celui lié aux tissus comme le cartilage et l'os est en discussion puisque le cartilage et l'os sont tous les deux des tissus impliqués dans la progression de l'arthrose. Il est donc surprenant de séparer ce phénotype des autres. Cependant l'équipe de Dell'Isola a défini ce phénotype grâce à l'analyse d'études cliniques qui définissent des sous-groupes de patients présentant des altérations du métabolisme du cartilage et de l'os (Otterness et al. 2000; Berry et al. 2010a; Roemer et al. 2012; van Spil et al. 2012; Blumenfeld et al. 2013). Par exemple, une étude de Otterness et al. a identifié 3 sous-groupes de biomarqueurs liés à l'os (sialoprotéine de l'os : BSP, la pyridinoline hydroxylysyl : HP et la pyridinoline lysyl LP), à la synthèse du cartilage (carboxypeptide de type II CPII, HA, et l'épitope 846) ou à sa dégradation (keratan sulfate : KS, COMP)

(Otterness et al. 2000). Une étude a pu identifier deux clusters de patients présentant des affections rares où l'os subit une hypertrophie ou une atrophie (Roemer et al. 2012). Ce phénotype est donc composé de plusieurs sous-groupes qui restent encore à déterminer plus précisément.

2.2.2.6 Phénotype minimal d'arthrose

Ce phénotype a été observé chez des patients qui présentent une arthrose à progression lente, des symptômes cliniques modérés et une faible progression au cours du temps (2 à 10 ans) (Berry et al. 2010b; Knoop et al. 2011; van der Esch et al. 2015; Waarsing et al. 2015). C'est le seul phénotype parmi ceux décrits par Dell'Isola qui n'est pas défini par une étiologie particulière. Pour définir ce phénotype, de nombreuses variables sont prises en compte (imagerie par résonance magnétique MRI, biomarqueurs, rayons X, données cliniques, IMC, et temps d'évolution de la maladie).

2.2.3 Classification par endotypes :

2.2.3.1 Endotype lié à l'âge ou la sénescence cellulaire

Cet endotype a été suggéré par plusieurs études pré-cliniques chez des modèles animaux. Dans une de ces études, de grandes différences d'expression génique au niveau des tissus articulaires ont été observées entre des souris jeunes et âgées ayant subi une déstabilisation méniscale (DMM) pour induire une arthrose (Loeser et al. 2012b). Un même modèle d'arthrose pourrait donc mener vers différents phénotypes d'arthrose en fonction de la sénescence cellulaire. Cette approche d'endotype lié à la sénescence pourrait permettre de développer des traitements ciblant ces cellules sénescents. Des recherches sur des molécules sénolytiques sont en cours afin d'éliminer spécifiquement les cellules sénescents (Nogueira-Recalde et al. 2019)

2.2.3.2 Endotype inflammatoire

Définir et comprendre cet endotype permettraient d'identifier des cytokines cibles et leurs voies de signalisation impliquées. Etant donné le rôle prépondérant de ces molécules dans l'arthrose, cela constituerait une avancée majeure dans les stratégies thérapeutiques. Cependant, les nombreux essais cliniques impliquant des anti-cytokines n'ont pas été concluants pour les patients arthrosiques. Une étude récente portant sur les effets du lutikizumab, un inhibiteur de l'IL-1 β , n'a montré que de faibles améliorations des scores de

douleurs et aucun changement sur l'inflammation synoviale chez les patients ayant recevant le traitement comparé à ceux recevant le placebo (Fleischmann et al. 2019). D'autres cibles que l'IL-1 β devront être étudiées.

2.2.3.3 Endotype lié à la douleur

La douleur n'est pas liée à la gravité de l'arthrose. Chaque patient ressent la douleur de façon spécifique avec une plus ou moins forte intensité en fonction de sa sensibilité et de ses propriétés neurophysiologiques. Les patients qui ont une sensibilité accrue ont davantage de risques de développer et ressentir une douleur persistante après 2 ans de progression de l'arthrose (Cardoso et al. 2016; Frey-Law et al. 2016; Carlesso and Neogi 2019; Carlesso et al. 2019). Ces patients nécessitent une prise en charge particulière dans la gestion de la douleur. Identifier l'endotype de la douleur, c'est-à-dire le mécanisme sous-jacent de la douleur impliqué dans l'arthrose serait donc une avancée majeure dans la classification des patients.

En conclusion, les patients arthrosiques peuvent être répartis dans différents phénotypes en fonction de la définition donnée à ce terme. Les phénotypes peuvent s'appuyer sur l'étiologie de la pathologie, les caractéristiques fonctionnelles et les symptômes présentés. Les différents phénotypes se recoupent tous à un certain point ce qui rend leur identification complexe. Le prochain défi est donc de s'accorder sur les différents phénotypes arthrosiques et d'identifier les facteurs les plus discriminants pour chacun afin de pouvoir utiliser ces classifications dans le cadre de la pratique clinique.

2.2.4 Big Data et thérapies ciblées

Avec les dernières avancées technologiques, le nombre de données récoltées a augmenté de manière exponentielle et est connu sous le nom de Big Data. L'utilisation de ces mines d'informations nécessite le développement de méthodologies statistiques spécifiques afin d'extraire des tendances à partir de ces données. Ces méthodologies reposent sur l'apprentissage automatique et l'intelligence artificielle. Elles commencent à faire leur apparition dans la recherche sur l'arthrose (Jamshidi et al. 2019; Rajkomar et al. 2019). Elles permettent de classifier les patients en sous-groupes en fonction de paramètres choisis.

Certaines études ont proposé une répartition des patients en fonction du pronostic de l'évolution de la pathologie. Cette répartition s'appuie sur des bases de données permettant d'identifier des clusters d'évolution différentes de l'arthrose. Les données récoltées sont des

paramètres simples à mesurer soit par examen clinique ou radiographique. La progression de l'arthrose est définie ici par plusieurs de ces facteurs dont un score élevé sur l'échelle de Kelgrenn et Lawrence ainsi que le pincement de l'interligne articulaire. Différents sous-groupes ont pu être mis en évidence.

Le premier regroupait des patients qui avaient de plus grands risques de ressentir une douleur au cours de l'évolution de l'arthrose et de subir une arthroplastie. D'autres sous-groupes ont été définis en fonction d'un pronostic sévère d'évolution de la maladie associé à un IMC élevé, un niveau d'éducation, des facteurs psychologiques (dépression), des symptômes radiographiques sévères et la présence de comorbidités (Deveza et al. 2017).

La récolte de données auprès d'individus ne présentant pas d'arthrose au niveau radiographique est également importante car elle permet de mettre en évidence la progression plus ou moins rapide et sévère de la pathologie en fonction des patients. Grâce à ces données, une étude a montré que les patients ayant de nombreuses lésions sévères avaient un plus grand risque de progression de l'arthrose que ceux ayant des lésions plus modérées (Niu et al. 2015).

La recherche de biomarqueurs spécifiques de l'arthrose est toujours en cours car aucune molécule n'a permis de diagnostic efficace de l'arthrose. Le développement exponentiel actuel des Big Data pourrait aider dans cette recherche. L'analyse des prélèvements sanguins, urinaires et synoviaux collectés dans des biobanques est une source importante d'informations qui pourraient permettre d'identifier plus efficacement de nouveaux biomarqueurs. Une étude regroupant 194 participants a déjà permis d'identifier des biomarqueurs candidats prédictifs de la douleur et de l'aggravation de l'arthrose au niveau structurel. Les plus prédictifs sont le telopeptide C terminal du collagène de type II (CTXII) libéré lors de la dégradation du collagène ; l'acide hyaluronique et le telopeptide N-terminal du collagène de type I (NTXI) (Kraus et al. 2017).

Au vu de la forte variabilité existante entre les patients arthrosiques, il semble nécessaire d'adapter les traitements à chacun en fonction de son phénotype/endotype. Par exemple, une étude a montré que des patients ressentant des douleurs sévères répondaient mieux à court terme à l'effet des glucocorticoïdes que des patients avec des douleurs moins prononcées (van Middelkoop et al. 2016). Une autre étude clinique a sélectionné des patients présentant un phénotype d'arthrose impliquant plutôt l'os et montré qu'un traitement ciblant spécifiquement ce tissu (traitement par un biphosphonate) réduisait la douleur et la gravité des lésions de la

moëlle. Une méta-analyse est en cours afin de déterminer si des sous-groupes bien spécifiques de patients répondent mieux aux biphosphonates que d'autres (Deveza et al. 2018).

La prise en charge précoce de la maladie est également à adapter en fonction des patients. En effet, les patients ne répondent pas de la même manière aux traitements au cours du temps. Une recherche sur l'effet de l'exercice physique sur l'arthrose durant 12 semaines a montré que les patients pouvaient être divisés en 4 sous-groupes en fonction de leur degré d'amélioration au niveau de la douleur (WOMAC) et de l'aspect fonctionnel. Plus de 70% des patients ressentaient une amélioration précoce de ces paramètres, 15% une amélioration plus tardive et 10% ne voyaient pas d'amélioration (Lee et al. 2018). Identifier les patients qui ont le plus de chance d'amélioration de leurs symptômes à la suite d'un traitement donné permettrait d'adapter leur prise en charge thérapeutique en les dirigeant vers des traitements moins coûteux (exercice et régime alimentaire équilibré) ou plus complexes et demandant un niveau de soins supérieur.

L'utilisation des Big Data dans l'arthrose représente donc une avancée considérable qui permettra d'identifier des facteurs communs dans des sous-groupes de patients et ainsi d'optimiser leur traitement.

2.3 Altérations tissulaires et cellulaires au cours de l'arthrose

2.3.1 Cartilage arthrosique

Le cartilage arthrosique est le siège de nombreux changements structuraux au cours de l'arthrose.

2.3.1.1 Changements macroscopiques

Au niveau macroscopique, les couches de cartilage se modifient. Au cours de l'arthrose, la dégradation du cartilage est caractérisée par des fibrillations et l'érosion de la surface articulaire (Sandell and Aigner 2001). La dégradation des protéoglycanes au sein de la MEC par les protéases (MMPs et ADAMTS) fait diminuer la rigidité du cartilage ce qui accélère la perte du collagène (Falah et al. 2010). Par ailleurs, les chondrocytes diminuent la synthèse de collagène de type II et augmentent la synthèse de collagène de type X (Poole et al. 2002; Dreier 2010). Le cartilage articulaire sain perd son aspect lisse et blanc et laisse la place à du cartilage de plus en plus calcifié. La dégradation progressive du cartilage peut aller jusqu'à la mise à nu de l'os dans des stades tardifs de la pathologie. L'ensemble des altérations subies

provoque la perte des propriétés physiques du cartilage. Celui-ci perd sa résistance (Poole et al. 2002). En réponse au stress mécanique, le cartilage subit une combinaison de stress généré par des forces de tension, compression et cisaillement (Kempson et al. 1973; Akizuki et al. 1986). Au cours de l'arthrose, la tidemark se dédouble. Plusieurs tidemarks sont même observées chez certains patients (Lane and Bullough 1980) (**Figure 19**). De nouvelles structures appelées chenaux vasculaires et microfractures apparaissent dans la couche profonde. Ces structures rompent l'étanchéité qui existait entre l'os et le cartilage en condition physiologique et permettent la communication entre les deux compartiments (**Figure 22 et Figure 23**) (Sokoloff 1993; Shibakawa et al. 2005).

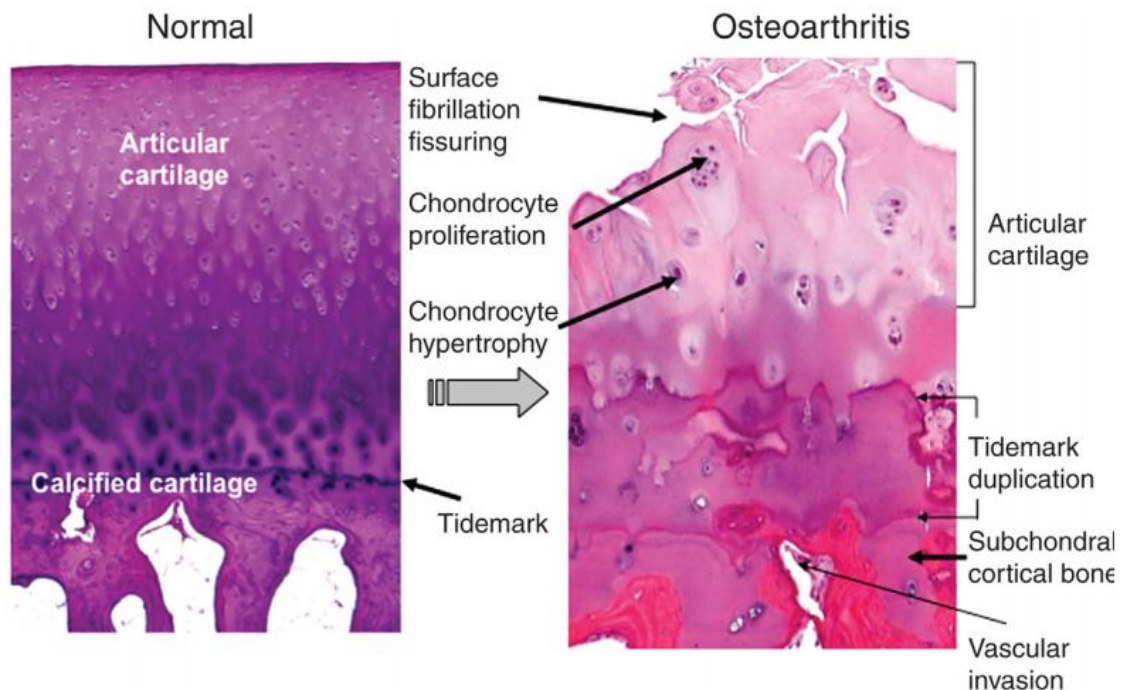


Figure 19 : Coupes histologiques de genou provenant de donneur sain (gauche) ou de patient arthrosique (droite)

Adapté de Loeser et al. 2012 (Loeser et al. 2012a)

2.3.1.2 Au niveau cellulaire

- Changement de la balance entre anabolisme et catabolisme

En réponse aux facteurs inflammatoires présents dans l'articulation en condition arthrosique, les chondrocytes modifient leur phénotype en augmentant le remodelage de MEC dans le but

de maintenir l'homéostasie. La balance entre anabolisme et catabolisme de la matrice extracellulaire penche en faveur du catabolisme ce qui entraîne la dégradation progressive de la MEC par les enzymes protéolytiques (MMPS et ADAMTS)(Bondeson et al.). Au cours de la maladie, les chondrocytes surexpriment de nombreuses MMPs comme MMP-1, 3, 8, 9 et 13 (Okada et al. 1992; Vu et al. 1998; Wu et al. 2008; Wang et al. 2013b). MMP-13 est la plus connue des MMPs impliquée dans l'arthrose car elle joue un rôle majeur dans la dégradation du collagène de type II (Wang et al. 2013b). L'expression de MMP-13 est activée par l'IL-1 et TNF α dont la concentration augmente au cours de l'arthrose (Vincenti and Brinckerhoff 2002). MMP3 est la protéase la plus exprimée par le cartilage arthrosique dans les stades précoces d'arthrose (Bau et al. 2002). ADAMTS4 et ADAMTS5 sont fortement impliquées dans l'arthrose et dégradent l'aggrécane (Sandy and Verscharen 2001; Little et al. 2007). Au cours de l'arthrose, le taux protéique des TIMPs, les inhibiteurs des MMP et des ADAMTs, diminue ce qui accélère la dégradation du cartilage (Morris et al. 2010).

➤ Modulations phénotypiques

Les chondrocytes présents dans le cartilage subissent de nombreuses modifications de leur phénotype en réponse aux facteurs de stress environnants lié à l'inflammation de bas grade. Au cours de l'arthrose, les chondrocytes augmentent leur prolifération et subissent une différenciation qui les conduit vers un phénotype hypertrophique. Cette différenciation observée dans l'arthrose, et donc en condition pathologique, se calque sur le même phénomène qui a lieu durant le processus d'ossification endochondrale lors de la croissance. Au cours de ce processus, le cartilage subit une calcification ainsi qu'une néo-vascularisation provenant de l'os sous-chondral (Dreier 2010). La différenciation chondrocytaire est régulée par des facteurs de croissance tels que BMPs, FGF-2, TGF- β , Wnt et les protéines hedgehogs (Dreier 2010). Bien que BMP-2 ait plutôt une activité anabolique, il a été montré que ce facteur stimule MMP-13 dans l'arthrose (van der Kraan et al. 2010). Le TGF- β a également des particularités fonctionnelles en fonction des tissus. La supplémentation en TGF- β a été imaginée comme potentielle outil thérapeutique car elle augmente la réparation du cartilage. Cependant cette même supplémentation augmente par ailleurs la fibrose et la formation d'ostéophytes dans un modèle murin d'arthrose (Blaney Davidson et al. 2007).

L'arthrose provoque des modifications de la régulation transcriptionnelle chez les chondrocytes. Le facteur de transcription RUNX2 est normalement impliqué dans l'ossification endochondrale et régule la maturation des chondrocytes (COL10A1, collagène X), la dégradation de la MEC (MMP13) et la vascularisation (VEGFA) (Jiménez et al. 1999;

Zelzer et al. 2001; Tetsunaga et al. 2011). RUNX2 n'est pas exprimé dans le cartilage adulte normal mais son expression augmente dans les stades précoces d'arthrose (Wang et al. 2004) ce qui provoque l'activation de ces cibles comme MMP13 (Tetsunaga et al. 2011).

- Chondroptose

Il existe une forte corrélation entre l'apoptose chondrocytaire et les altérations de la MEC (Thomas et al. 2007; Musumeci et al. 2011). La mort cellulaire des chondrocytes a été définie comme la « chondroptose » car ces cellules présentent une apoptose différente de celle observée classiquement. Contrairement à l'apoptose classique, la chondroptose implique une augmentation du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, signe d'une intense synthèse protéique, la présence de vacuoles autophagiques et de lysosomes permettant de digérer les composants cellulaires (Roach et al. 2004; Kim and Blanco 2007).

2.3.2 Membrane synoviale arthrosique :

La membrane synoviale est un des acteurs majeurs de l'inflammation au cours de l'arthrose. Ce tissu subit une hyperplasie au cours de l'arthrose, définie par une infiltration de cellules immunitaires et une augmentation de l'épaisseur de la membrane synoviale (Sellam and Berenbaum 2010). La membrane synoviale arthrosique contribue à l'épanchement de synovie dans la capsule et au gonflement de l'articulation (synovite).

Au cours de l'inflammation, des changements histologiques se déroulent au sein de la membrane synoviale. Le nombre de cellules de l'intima augmente fortement. Une infiltration de macrophages et lymphocytes a lieu au sein de la membrane. (**Figure 20**)

De nombreuses études ont montré la forte infiltration de cellules immunitaires qui a lieu au sein de la membrane et la prolifération et modification phénotypique des cellules résidentes. Les macrophages de l'intima sont capables de changer rapidement de morphologie en cas d'inflammation. Cette propriété a été montrée dans le cas de la RA pour les macrophages CXCR1+. Ces macrophages mettent fin aux contacts cellules/cellules ce qui produit une modification structurale de l'intima (Culemann et al. 2019).

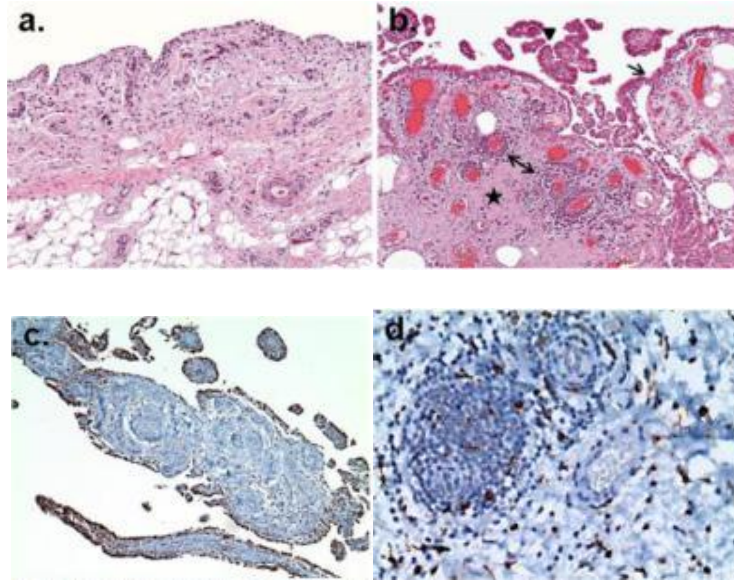


Figure 20 : Changements histopathologiques de la membrane synoviale au cours de l'arthrose

Sections de membrane synoviale provenant de patients arthrosiques : Coloration H&E (a, b), Marquage immunohistochimique des macrophages (c, d, anti-CD68, 10× and 40×), lymphocyte T. a, membrane synoviale normale : la couche de cellules de l'intima est fine et le tissu conjonctif subintimal est relâché. b, hyperplasie de l'intima (flèche), villosités hyperplasiques (pointe de flèche), fibrose (étoile) et infiltrat de cellules mononucléaires autour des vaisseaux (double flèche) caractéristiques de l'arthrose. c, d, Distribution des cellules CD68+ dans une membrane synoviale arthrosique. (c) concentrées dans l'intima, et (d) dispersées dans la sous-intima. Adapté de Scanzello et al. (Scanzello and Goldring 2012)

L'inflammation de la membrane synoviale est la conséquence de la présence de facteurs inflammatoires, cytokines (IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL-15, IL-17) et molécules d'alarme, les DAMPS (damage associated molecular patterns) dans le liquide synovial sécrétés en majeure partie par les cellules de l'immunité dans l'articulation en réponse aux débris cellulaires et matriciels (Sellam and Berenbaum 2010; Loeser et al. 2012a).

Les deux principaux types cellulaires de la membrane synoviale, les macrophages et FLS participent à la réponse immunitaire. Les macrophages de la membrane synoviale jouent leur rôle de cellules phagocytaires de l'immunité innée et s'activent en détectant les débris de MEC et alarmines du liquide synovial.

La détection des signaux est réalisée par des récepteurs impliqués dans la reconnaissance de facteurs inflammatoires et de signaux d'alarmes, les PRRs (Pathogen Recognition Receptors). Les macrophages et FLS expriment ces récepteurs. Parmi ces PRRs, les plus connus sont les TLRs, RAGE et les NLRs. En parallèle de ces mécanismes, d'autres systèmes se mettent en place pour participer à l'inflammation comme le complément et les inflammasomes.

L'activation des PRRs présents chez les macrophages de la membrane synoviale par l'IL-1 et

TNF α activent des voies de l'inflammation comme NF- κ B et MAPK (Liu-Bryan and Terkeltaub 2015). Ces cellules vont alors sécréter des facteurs pour soutenir l'inflammation. En parallèle, les FLS participent grandement au relargage de cytokines dans la cavité articulaire (Jones et al. 2017).

Au cours de l'arthrose, les FLS activent également l'angiogenèse via différentes cytokines dont le TGF β , l'IL-8 et le VEGF (Cantagrel and Constantin 2013).

Une méta-analyse a montré récemment que 41.5% des patients ayant une arthrose de genou présentaient une hypertrophie de la membrane synoviale comparé aux contrôles (14.5%) (Sarmanova et al. 2016). L'évaluation des lésions articulaires a montré que la synovite et les lésions de la moelle osseuse sont prédictives de l'incidence de l'arthrose et la sévérité de l'inflammation synoviale est prédictive de sa progression (Felson et al. 2016; Damman et al. 2017).

Différents scores permettant de scorer l'inflammation de la membrane synoviale ont été mis en place. Chronologiquement, le premier score à avoir été créé a été proposé par l'équipe de Salvati pour caractériser la réponse inflammatoire dans la coxarthrose (Arnoldi et al. 1980). Puis en 2002 l'équipe de Krenn développa un score destiné à tous le spectre des maladies rhumatismales et a permis de discriminer une synovite légère d'une synovite sévère (Krenn et al. 2002). (altérations morphologiques : Hyperplasie/épaisseur de la couche de cellules bordantes (LCs) activation des cellules résidentes/ Infiltration inflammatoire). Ce score est désormais très utilisé dans l'arthrose (Pessler et al. 2008).

2.3.3 Os sous-chondral arthrosique :

Au cours de l'arthrose l'os sous chondral subit de nombreuses détériorations associées à la dégradation du cartilage (Madry et al. 2010). Ces altérations sont caractérisées par des anomalies du remodelage osseux et de la minéralisation de l'os, l'épaississement de la plaque sous-chondrale et le développement d'ostéophytes (excroissances osseuses).

À des stades précoces d'arthrose, l'os sous-chondral a tendance à s'affiner que ce soit chez l'homme (Reichenbach et al. 2008) ou l'animal (Sniekers et al. 2008; Intema et al. 2010) alors que son épaisseur augmente à des stades avancés chez l'homme (Nielsen et al. 2019). L'os sous-chondral devient scléreux et est moins minéralisé qu'en condition physiologique (Burr 2004). Des lésions de la moelle osseuse (*bone marrow lesions* : BML) apparaissent (Burr

2004) et augmentent fortement le risque de progression de l'arthrose (Felson et al. 2003). Les altérations de l'os sous-chondral affectent ses propriétés mécaniques, ce qui le rend moins apte à absorber les forces de pression (Buckland-Wright 2004).

De nombreuses études utilisant des modèles animaux ont montré l'importance de l'os sous-chondral dans la progression de l'arthrose et notamment son impact sur le cartilage sus-jacent. Différents modèles animaux ont montré que l'os sous-chondral évolue rapidement dès les premiers stades de la maladie et que l'augmentation de la rigidité de l'os scléreux joue un rôle dans la dégénérescence du cartilage (Radin and Rose 1986; Wu et al. 1990; Carlson et al. 1994). Les lésions de l'os prédisent la dégradation du cartilage, il existe donc une communication entre les deux compartiments.

2.4 Communication entre les tissus au cours de l'arthrose

Dans l'arthrose, la compréhension des mécanismes impliqués dans l'initiation et la progression de la dégradation du cartilage a beaucoup évolué. L'arthrose implique tous les tissus de l'articulation, le cartilage, la membrane synoviale, l'os et les autres structures (Loeser et al. 2012a).

2.4.1 Communication os/cartilage

L'hypothèse d'une participation de l'os sous-chondral dans le développement arthrosique est soutenue par de nombreuses études (Mansell and Bailey 1998). L'os sous-chondral et le cartilage arthrosique subissent des changements physiques et biologiques qui mènent à des altérations de leur composition, structure et propriétés fonctionnelles. L'apparition de microfractures et chenaux vasculaires au cours de l'arthrose permet le passage de facteurs biochimiques d'un compartiment à l'autre contribuant à la communication entre l'os (osteoblastes/osteoclastes) et le cartilage (chondrocytes) (**Figure 21**).

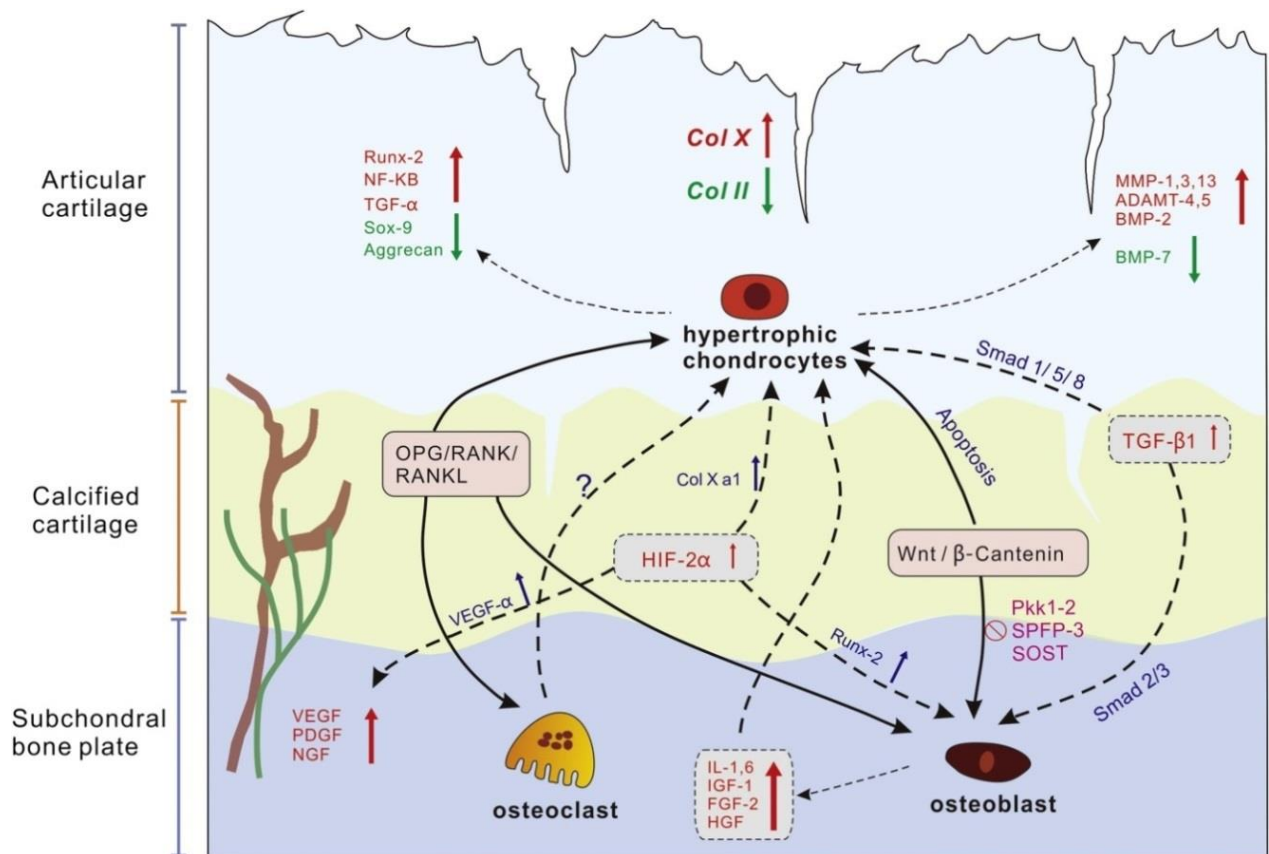


Figure 21 : Communication cellulaire et moléculaire entre l'os et le cartilage dans l'arthrose

D'après Yuan et al. 2014 (Yuan et al. 2014)

2.4.1.1 Les chenaux vasculaires

En condition physiologiques, l'os et le cartilage calcifié sont reliés par des chenaux vasculaires permettant le passage de molécules nutritives de l'os vers le cartilage (oxygène, glucose, eau) (Imhof et al. 2000) (**Figure 22**). En condition pathologique, ces chenaux traversent la tidemark et pénètrent dans le cartilage articulaire (Walsh and Pearson 2001). Des études sur des modèles animaux d'arthrose montrent que le nombre de chenaux vasculaires augmente au cours de l'arthrose (Pan et al. 2012).

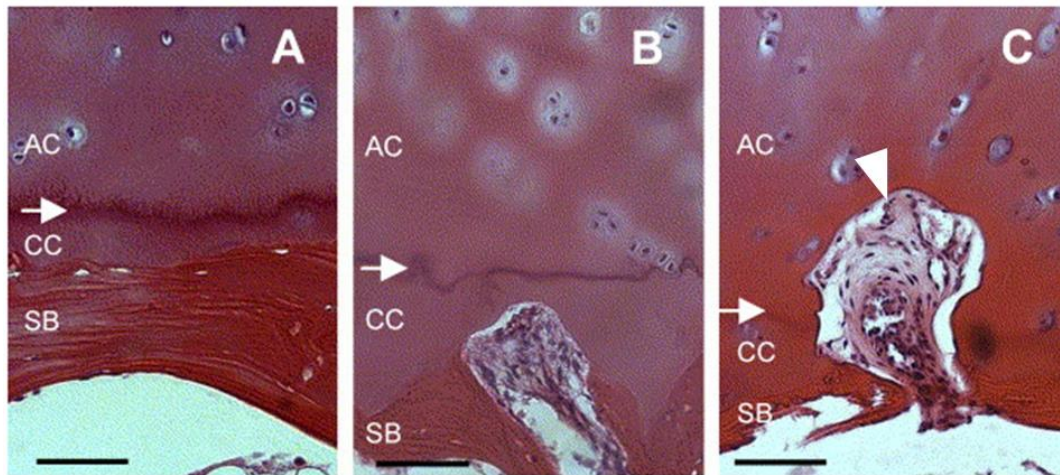


Figure 22 : Coupes histologiques de la jonction ostéochondrale montrant l'invasion du cartilage par les chenaux vasculaires au cours de l'arthrose

Coloration H&E (A) Grade 0 : Pas d'invasion de la plaque sous-chondrale (B) Grade I : la résorption de l'os sous-chondral est limitée au cartilage calcifié. (C) Grade II : la moelle osseuse s'infiltré au-delà de la tidemark dans le cartilage artulaire. Flèche : tidemark, pointe de flèche : chenal vasculaire, AC: cartilage artulaire, CC: cartilage calcifié, SB: Os sous-chondral, échelle = 100 µm. D'après Shibakawa et al. 2005. (Shibakawa et al. 2005)

2.4.1.2 Les microfractures

Les microfractures apparaissent au cours de l'arthrose entre la tidemark et la plaque d'os sous-chondral sous l'action des contraintes mécaniques excessives subies par l'articulation (Sokoloff 1993; Burr 2004) (**Figure 23**). Ces microfissures mesurent entre 2 et 7 µm. Elles sont décrites chez les patients arthrosiques et les personnes âgées mais pas chez les individus jeunes et sain, ce qui sous-entend un développement favorisé par le vieillissement et des conditions pathologiques (Sokoloff 1993). Leur présence pourrait contribuer à l'invasion du cartilage calcifié par des vaisseaux ce qui réactiverait le processus d'ossification endochondrale et mènerait à l'amincissement du cartilage artulaire sus-jacent (Burr and Radin 2003).

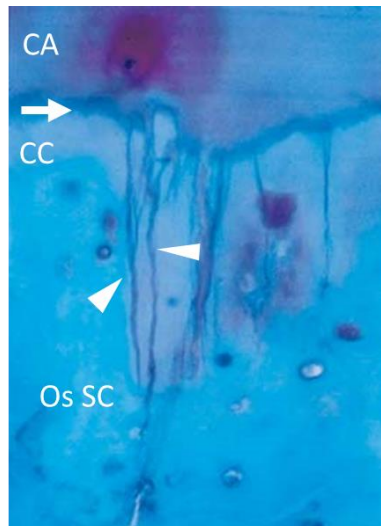


Figure 23 : Coupe histologique de la jonction ostéochondrale montrant des microfractures en condition arthrosique

Flèche : tidemark, pointe de flèche : chenal vasculaire, CA: cartilage articulaire, CC: cartilage calcifié, Os SC: Os sous-chondral. Adapté de Sokoloff et al. 1993 (Sokoloff 1993)

2.4.2 Communication cartilage/os et membrane synoviale

Le liquide synovial permet la communication entre la membrane synoviale, le cartilage et l'os. Au cours de l'arthrose, ce liquide se remplit de débris de MEC provenant du cartilage (Petersson et al. 1997) ainsi que de cristaux (cristaux d'apatite et cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté, acide urique) (Gibilisco et al. 1985; Denoble et al. 2011). La présence de ces fragments est captée par les cellules de la membrane synoviale et active l'immunité innée. L'inflammation de la membrane synoviale au cours de l'arthrose provoque la libération de nombreux médiateurs inflammatoires qui vont être libérés dans le liquide synovial. En retour, le cartilage et l'os vont aussi sécréter des facteurs pro-inflammatoires dans la capsule articulaire. De nombreux facteurs inflammatoires comme les cytokines IL-1 β et TNF α sont retrouvés dans le liquide synovial des patients arthrosiques (Mannami et al. 1989; Westacott et al. 1990). D'autres facteurs comme les chemokines (MCP-1, MIP-1) (Cuellar et al. 2009; Endres et al. 2010) sont également présents. Chaque compartiment contribue donc à l'augmentation de la concentration de médiateurs inflammatoires et participe donc à l'amplification du cercle vicieux d'inflammation mis en place au cours de l'arthrose (Loeser et al. 2012a).

3. Immunité innée et Arthrose

L'arthrose est reconnue comme une maladie chronique dégénérative caractérisée par une inflammation de bas grade persistante. Sa progression est due à l'association de facteurs biochimiques, biomécaniques et en grande partie à l'immunité innée en réponse à un environnement inflammatoire. Les débris de cartilage et molécules inflammatoires libérées dans l'articulation suite à des dommages mécaniques ou à des facteurs systémiques vont être détectés par des récepteurs membranaires, exprimés par les cellules impliquées dans l'immunité innée. L'activation de tous les acteurs de l'immunité innée comme les macrophages et autres cellules présentes dans la membrane synoviale, le système du complément et l'inflammasome vont participer à la réponse inflammatoire afin de tenter de résoudre les altérations. Cependant, au lieu de passer à la phase de résolution de l'inflammation et de guérison, ces mécanismes inflammatoires vont persister dans l'articulation menant à la destruction progressive du cartilage et à un cercle vicieux d'inflammation affectant l'ensemble de l'articulation.

Comment l'immunité innée, première ligne de défense de l'organisme, conduit à la progression de l'arthrose ?

3.1 Vue générale du système immunitaire

3.1.1 Immunité innée, immunité adaptative et réaction inflammatoire

Le système immunitaire est constitué de deux composantes : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ces deux composantes ont pour rôle de protéger l'organisme contre les agressions provenant de l'extérieur ou internes à l'organisme. L'immunité innée est décrite comme la première ligne de défense, reconnaissant les motifs conservés associés aux pathogènes (Pathogen associated molecular patterns : PAMPS) ou aux molécules issus de dommages cellulaires et tissulaires (Damage associated molecular patterns : DAMPS) (Riera Romo et al. 2016). Cette première réponse est non spécifique et implique de nombreux acteurs cellulaires notamment les monocytes et macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques, les mastocytes, les cellules NK (natural killer) et le système du complément. Elle est suivie par l'activation de l'immunité innée afin d'élaborer une réponse spécifique à l'aide d'un arsenal cellulaire et moléculaire incluant, les lymphocytes B et T et les anticorps produits (Woodell-May and Sommerfeld 2019) (**Figure 24**).

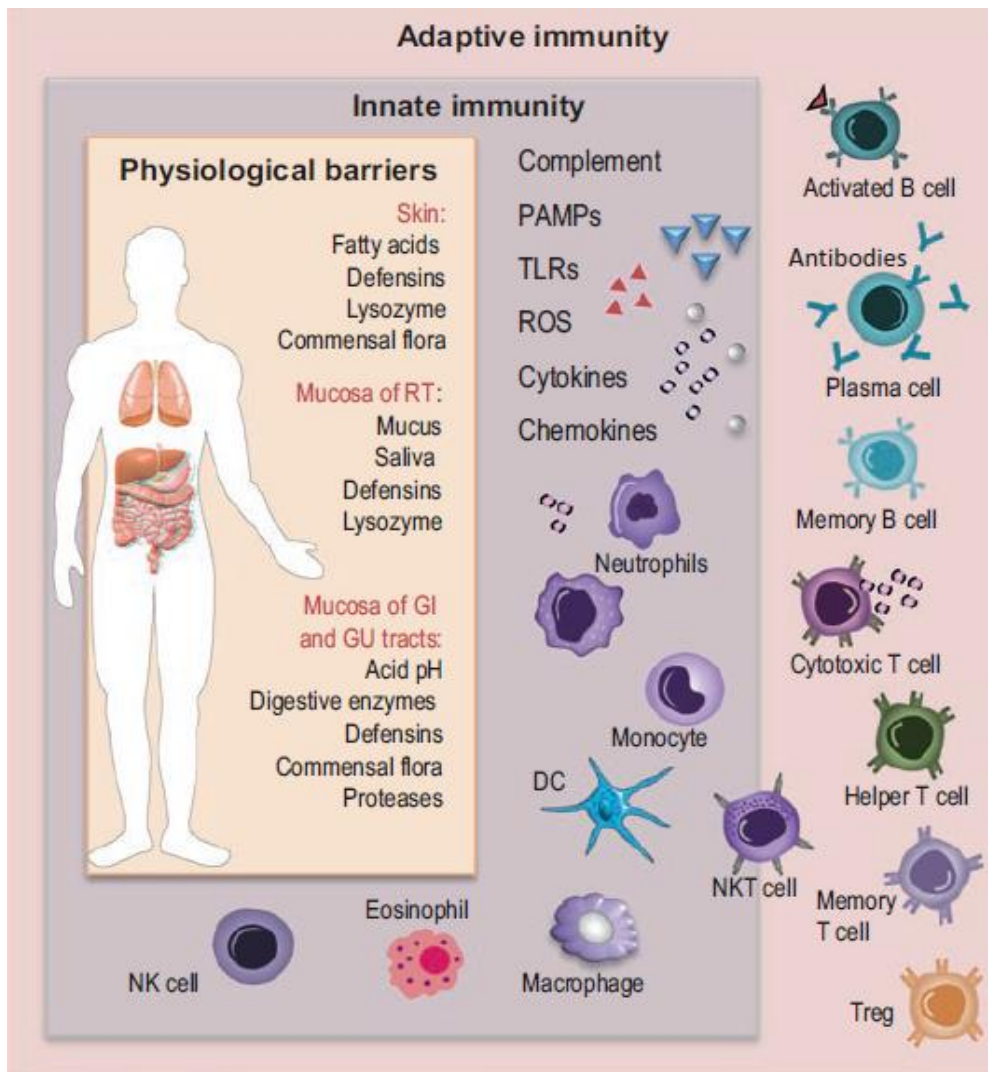


Figure 24 : Vue d'ensemble du système immunitaire

D'après Müller et al. 2019 (Müller et al. 2019)

Ces deux réponses immunitaires sont associées à la réaction inflammatoire qui est l'ensemble de la réponse mise en place lors d'une blessure due aux pathogènes, aux dommages cellulaires ou bien à des substances irritantes. Celle-ci provoque une rougeur, un gonflement, une chaleur et une douleur au niveau du site touché. La réaction inflammatoire nécessite l'implication de différents acteurs afin de répondre à l'agression : les inducteurs, les senseurs, les médiateurs et les effecteurs (Medzhitov 2008) (**Figure 25**).

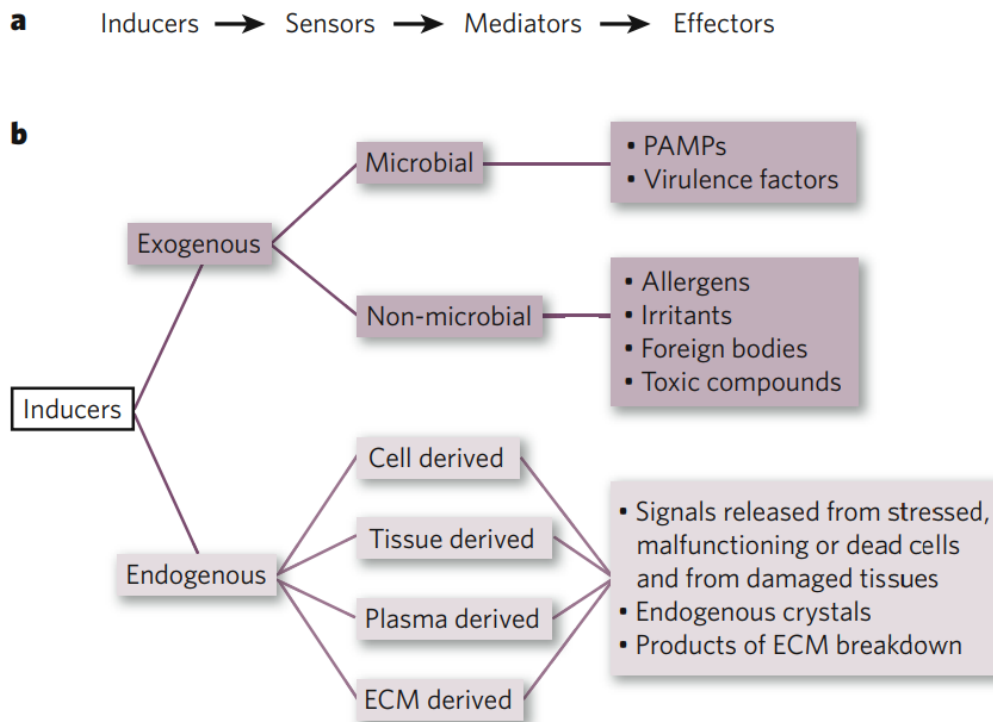


Figure 25 : Vue d'ensemble de l'inflammation

a, Le processus d'inflammation nécessite différents acteurs : les inducteurs (inducers), les senseurs (sensors), les médiateurs (mediators) et les effecteurs (effectors). b, Les induceurs peuvent être classés en 2 sous-groupes : les induceurs exogènes ou endogènes. Ces 2 sous-groupes s'organisent comme décrit dans le schéma ci-dessus. ECM : extracellular matrix; PAMP : pathogen-associated molecular pattern. D'après Medzhitov, Nature 2008 (Medzhitov 2008)

3.1.2 Immunité adaptative et arthrose

Il est désormais bien reconnu que l'immunité innée joue un rôle majeur dans l'arthrose. Néanmoins, l'immunité adaptative est également modifiée au cours de cette pathologie. Des études ont montré que les quantités et profils des lymphocytes B (producteurs d'anticorps) et T cytotoxiques (liés à l'élimination des cellules cibles) ou T helper (lié à la stimulation de la prolifération et différenciation des cellules de l'immunité) évoluent en condition arthrosique (Woodell-May and Sommerfeld 2019). Les patients arthrosiques présentent une augmentation du nombre de lymphocytes (cellules CD4+), notamment les lymphocytes T helper (Th1), comparé aux personnes saines (Ishii et al. 2002; Saito et al. 2002). Une autre étude a mis en évidence une corrélation positive entre la présence de lymphocytes Th17 et le score de douleur WOMAC chez des patients arthrosiques (Zhu et al. 2020). La capacité des lymphocytes T helper à influencer la polarisation des macrophages par le biais des cytokines sécrétées (IL-4, IFN- γ , TNF- α) est un mécanisme important dans l'arthrose (Li et al. 2017).

La compréhension de l'implication des cellules de l'immunité adaptative dans le développement de l'arthrose a évolué ces dernières années mais n'a pas encore été totalement élucidée.

3.2 Implication de l'immunité innée dans l'arthrose :

Contrairement à des pathologies très inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrose présente plutôt une inflammation de bas grade. Cependant malgré de plus faibles quantités de molécules inflammatoires détectées, des acteurs de l'immunité innée sont activés et jouent un rôle majeur dans la progression de cette maladie. En effet, l'arthrose peut être considérée comme une blessure stérile, interne nécessitant l'action de ce système de reconnaissance des affections tissulaires et cellulaires pour stopper la lésion puis cicatrifier les tissus. Cependant au cours de la pathologie, l'immunité innée échoue à résoudre l'inflammation, déclenchée en partie par la reconnaissance de débris de cartilage et molécules d'alarmes libérées (DAMPs) dans la cavité articulaire par les différents tissus. La présence anormale de ces molécules va être reconnue comme une agression et activer l'immunité innée des récepteurs de type Pathogen recognition receptors (PRRs) présents à la surface des leucocytes (macrophages, cellules dendritiques et mastocytes). Parmi ces récepteurs, les Toll Like receptors (TLRs majoritairement 2 et 4) et les Nod like receptor (NLRs) sont les plus décrits dans l'arthrose et sont exprimés par de nombreuses cellules immunitaires présentes dans la membrane synoviale et cellules de l'articulation (Chen and Nuñez 2010). Leur activation déclenche de nombreux mécanismes inflammatoires impliquant les voies de signalisation des MAPK, NF- κ B, le système du complément et l'inflammasome. L'association de ces événements provoque la production de médiateurs pro-inflammatoires (cytokines, chemokines, métabolites lipidiques, alarmines) qui sont chargées de recruter de nouveaux acteurs comme les neutrophiles et monocytes/macrophages. Cependant dans l'arthrose, la résolution de l'inflammation échoue et un cercle vicieux d'inflammation se met en place menant à la destruction progressive de l'articulation (Nathan 2002; Chen and Nuñez 2010).

3.2.1 Les alarmines

3.2.1.1 Définition

Le terme d'alarmine ou DAMPS (Damage associated molecular pattern) a été proposé en 2005 par l'équipe d'Oppenheim pour désigner les molécules servant de signaux d'alarmes libérés lors de lésions tissulaires et cellulaires dans l'organisme. Ces molécules de petites tailles remplissent en temps normal des fonctions intra-cellulaires physiologiques (Bertheloot and Latz 2017; Fleshner and Crane 2017) (régulation de la transcription, prolifération cellulaire, différenciation et homéostasie calcique). Cependant en cas d'inflammation ou de lésions internes, elles sont libérées activement ou passivement dans le milieu extracellulaire et vont alors déclencher et soutenir la réponse inflammatoire (Nefla et al. 2016) (**Figure 26**).

Les caractéristiques des alarmines sont :(Bianchi 2006; Bidwell et al. 2008)

- La libération rapide dans le milieu extracellulaire par les cellules mortes ou endommagées
- La libération de manière active par les cellules de l'immunité
- La capacité de recruter et activer des cellules de l'immunité innée (macrophages, DCs)
- L'initiation de la réparation tissulaire

De nombreuses alarmines sont impliquées dans les maladies articulaires (Foell et al. 2007). Les plus connues dans l'arthrose sont HMGB1 (High mobility group box 1), les protéines S100, les Heat shock proteins (HSP), l'ATP et l'acide urique (Sunahori et al. 2006; Boyd et al. 2008; Harris et al. 2012; Siebelt et al. 2013; Wang et al. 2013a; Bertheloot and Latz 2017).

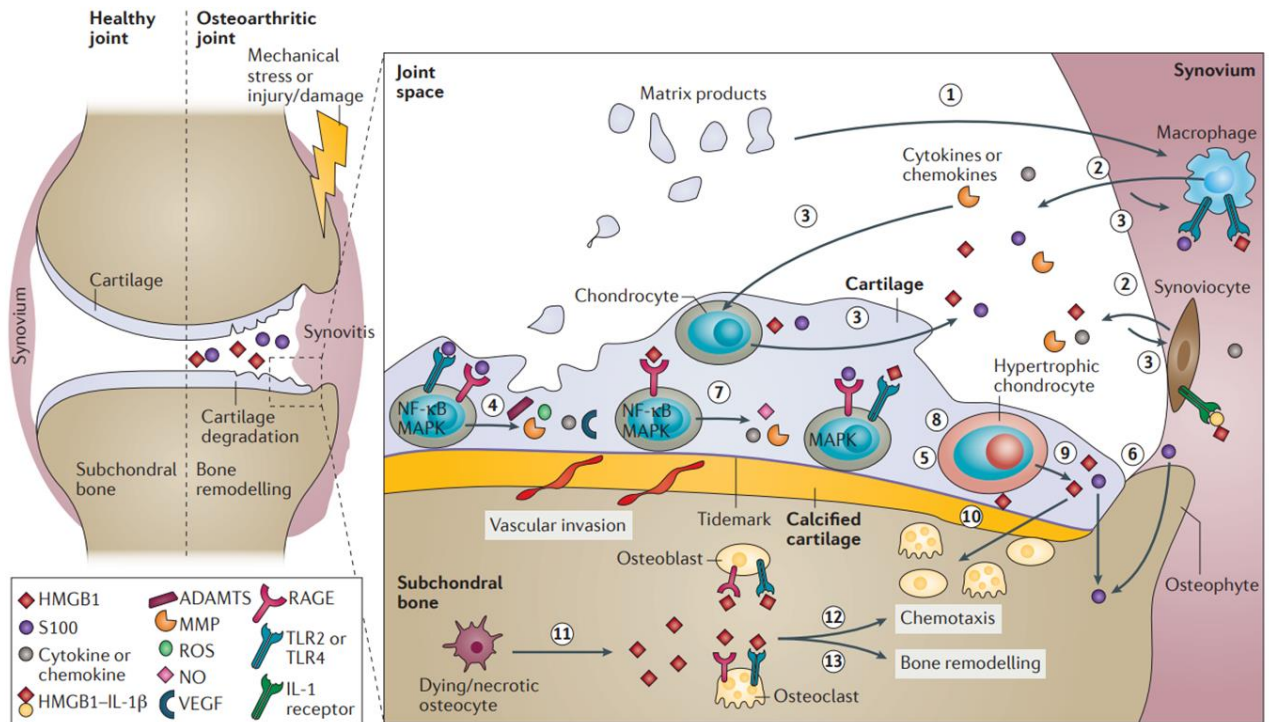


Figure 26 : Implication des alarmines dans l'articulation synoviale

1- Les débris de cartilage libérés durant l'arthrose stimulent les cellules de la membrane synoviale qui devient inflammatoire. 2- Les synoviocytes macrophagiques et fibroblastiques produisent des facteurs inflammatoires (S100, HMGB1), 3- qui déclenchent une auto-réactivation de la membrane synoviale. 4- Les alarmines intensifient la dégradation du cartilage en induisant la production de MMPs et ADAMTS, de ROS et VEGF qui stimule l'angiogenèse. 5- Les chondrocytes subissent une différenciation vers un phénotype hypertrophique. 6- Des ostéophytes se forment. 7- Les récepteurs des alarmines sont les TLRs et RAGE qui activent les voies MAPK et NF-κB. 8- La différenciation hypertrophique est médiée par TLR2 et TLR4. 9- Les chondrocytes hypertrophiques libèrent à leur tour des alarmines (HMGB1) 10- cela active l'ossification endochondrale et la formation d'ostéophytes à cause du rôle chemo-attractant de HMGB1 sur les cellules osseuses. 11- HMGB1 est aussi libéré par les cellules nécrotiques 12- et agit comme chemo-attractant via RAGE, TLR2 et TLR4. 13- HMGB1 induit le remodelage osseux. D'après Neftali et al. 2016 (Neftali et al. 2016)

D'autres molécules sont considérées comme des alarmines alors qu'elles ne proviennent pas du milieu intracellulaire. Il s'agit notamment de fragments de matrice extracellulaire (COMP, fibronectine). Leur présence sous forme de débris dans l'articulation est également reconnue par l'immunité innée et enclenche une réponse inflammatoire. Certaines publications présentent aussi certaines cytokines comme étant des alarmines (IL-1 β , IL-33) en considérant leur rôle dans l'activation de l'immunité innée et de l'inflammation.

En condition arthrosique, on observe une augmentation de la concentration de ces DAMPS dans le liquide synovial.(Liu-Bryan 2013). Les effets de ces alarmines ont été étudiés *in vivo* et *in vitro* et ont permis de montrer leur rôle dans l'hyperplasie synoviale,

3.2.1.2 Mode de libération active et passive

Les alarmines sont libérées de deux manières différentes dans le milieu extracellulaire : soit par voie passive par libération à partir de cellules nécrotiques ou par voie active à partir de cellules de l'immunité impliquant les exosomes (New et al. 2013; Fleshner and Crane 2017).

Les exosomes sont de petites vésicules (30 à 100 nm de diamètre) libérées par de nombreux types cellulaires et retrouvées dans le plasma, l'urine et la salive (Cheng et al. 2014). Des alarmines comme S100A9 ont été trouvés dans des exosomes provenant de macrophages (New et al. 2013).

En 2019, une équipe chinoise a mis en évidence des rôles opposés de l'alarmine HMGB1 en fonction de son mode de libération dans le milieu extracellulaire. En effet, HMGB1 faisait diminuer l'expression de SASH1, un suppresseur de tumeur lorsqu'il était libéré de manière passive mais avait un rôle inverse lorsqu'il était libéré par des exosomes (Ma et al. 2019). Ce mécanisme serait dépendant de TLR4. Des études comme celles-ci montrent que les mécanismes moléculaires des alarmines restent à élucider.

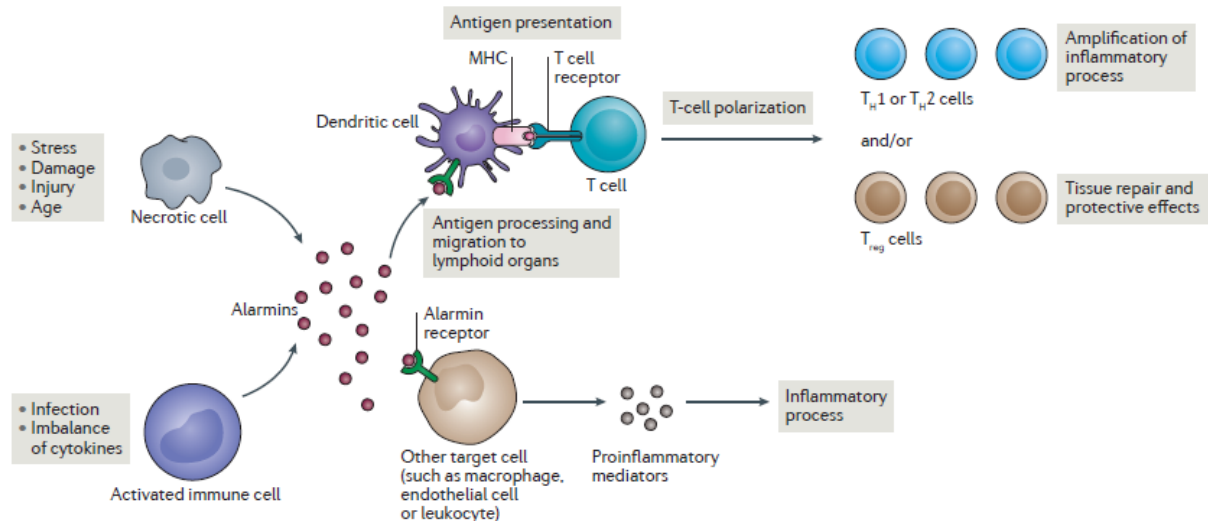


Figure 27 : Mode de libération et d'action des alarmines

Les alarmines peuvent être libérées passivement à partir de cellules nécrotiques ou ayant subi un stress ou bien activement par les cellules de l'immunité. Une fois libérées dans le milieu extracellulaire, elles se fixent à leurs récepteurs et activent l'immunité innée. D'après Neftali et al. 2016 (Neftali et al. 2016)

3.2.1.3 Libération des alarmines par les différents tissus de l'articulation

En condition arthrosique, les chondrocytes subissent de nombreux stress, à la fois biochimiques et mécaniques et leur nombre décroît dans les stades les plus tardifs de la maladie. (Sohn et al. 2012) Les chondrocytes meurent par apoptose (Kim et al. 2000; Thomas et al. 2007), chondroptose (Roach et al. 2004), nécrose (Chen et al. 2001), autophagie (Chang et al. 2013) ou par la combinaison de ces différents processus (Almonte-Becerril et al. 2010; Charlier et al. 2016). Le cartilage se dégrade progressivement sous l'action d'enzymes de dégradation de la MEC (MMPs et aggrecanases) (Aigner et al. 2003; Song et al. 2007; Zeng et al. 2015). Ces altérations provoquent la libération de fragments de MEC (fibronectine, acide hyaluronique, dérivés d'aggrecane) (Lohmander et al. 1993; Homandberg et al. 1998; Jiang et al. 2007) et d'alarmines (S100/calgranulin, HMGB1) dans le liquide synovial. L'augmentation de ces médiateurs dans la synovie est corrélée positivement avec la sévérité de l'arthrose, la douleur et l'inflammation de la membrane synoviale (Lohmander et al. 1993; Ohno et al. 2006; Wang et al. 2013a; Hwang et al. 2015; Ke et al. 2015).

- Alarmines impliquées dans l'arthrose

Alarmins	Localization of secreted forms	Roles in OA	Receptors in joint cells
S100 proteins (A4, A8, A9, A10, A11, A12, B)	Serum and synovial fluid	<ul style="list-style-type: none"> • S100A4 is highly expressed in the cartilage of patients with OA and that from an experimental model of OA. It stimulates MMP13 production in chondrocytes via activation of PYK2, MAPK and NF-κB • Calprotectin (S100A8–S100A9) is overexpressed in the synovium and cartilage of patients with OA. It induces production of interleukins by immune cells and aggravates osteophyte formation in an experimental model of OA • S100A8 contributes to pain generation in a mouse model of OA • S100A10 induces production of inflammatory cytokines in human chondrocytes via MAPK and NF-κB • S100A11 is upregulated in cartilage from patients with OA, where it promotes hypertrophic differentiation of chondrocytes via p38 MAPK and induces cartilage degradation • S100A12 expression is increased in human osteoarthritic articular cartilage compared with normal cartilage. Synovial fluid levels of S100A12 correlate with symptomatic and radiographic severity of OA. It upregulates the expression and production of MMP13 and VEGF via p38 MAPK and NF-κB • S100B stimulates MMP13 production in human chondrocytes via activation of ERK and NF-κB 	RAGE and TLR4
HMGB1	Synovial fluid	<ul style="list-style-type: none"> • Highly expressed in the cartilage and synovium in a spontaneous mouse model of OA and in patients with OA • Expression in human osteoarthritic cartilage correlates with OARSI histological score • Levels in synovial fluid of patients with OA are correlated with disease severity, synovitis and pain • Induces the release of chemokines, cytokines and NO • Induces MMP13 expression via activation of ERK and NF-κB • Promotes chondrocyte hypertrophic differentiation and endochondral ossification in mice • Forms proinflammatory and procatabolic extracellular complexes with cytokines and lipopolysaccharide in cultures of synovial cells from patients with OA 	RAGE, TLR2 and TLR4
HSPs (HSP70, HSP90, HSPB5, HSPB1)	Not known	<ul style="list-style-type: none"> • HSP70 is upregulated in cartilage from patients with severe OA and protects rabbit chondrocytes from NO-induced apoptosis • HSP90 inhibits HSP70 expression and has an important role in the onset of biomechanically-induced OA in rats • Decreased expression of HSPB5 and HSPB1 might contribute to an altered chondrocyte metabolism in patients with OA 	Not known
Annexins (II, V, VI)	Extracellular matrix of cartilage	<ul style="list-style-type: none"> • Overexpressed in cartilage from patients with OA • Released by hypertrophic human chondrocytes • Annexin V induces apoptosis in calf chondrocytes 	TLR4*
ATP	Synovial fluid	<ul style="list-style-type: none"> • Released by porcine chondrocytes in response to mechanical load • Stimulates PGE₂ release from rabbit articular chondrocytes via activation of MAPKs • High levels induce mineralization of porcine cartilage • Levels in synovial fluid in patients with OA are correlated with knee pain 	P2X and P2Y ₂ purino-receptors
Galectin 3	Extracellularly in the joint (synovial fluid)*	<ul style="list-style-type: none"> • Increased level of expression in human osteoarthritic articular cartilage compared with normal cartilage • Markedly present in synovial tissue of patients with OA during inflammatory phases • Induces joint swelling and OA-like lesions in the knee joints of mice 	Integrin β 1
IL-1 α	Synovial fluid	<ul style="list-style-type: none"> • Secreted mostly by macrophages, with lesser amounts secreted by chondrocytes and synovial fibroblasts • Produced in the early stages of OA in humans, and acts in autocrine and paracrine manner • Increases porcine cartilage and meniscus catabolism by upregulating NO production and total MMP activity 	IL-1R
Thymosin β 4	Serum and synovial fluid	<ul style="list-style-type: none"> • Increased expression in bovine cartilage after mechanical loading • Enhances MMP expression and activity in bovine chondrocytes • Positive correlation between serum and synovial fluid levels and radiographic severity in patients with knee OA 	Not known
Uric acid	Serum and synovial fluid	Synovial fluid level is correlated with IL-18 and IL-1 β production and OA severity in patients with knee OA	TLR2* and TLR4*

Fibronectin fragments	Synovial fluid	<ul style="list-style-type: none"> • Increased expression in cartilage and synovial fluid from patients with OA • Activate pro-catabolic responses in human chondrocytes 	TLR2, integrin $\alpha 5\beta 1$ and CD44
Low-molecular-weight hyaluronan	Synovial fluid*	<ul style="list-style-type: none"> • Stimulates matrix catabolism in bovine and human cartilage • Regulates hypertrophic differentiation in mouse chondrocytes 	TLR2, TLR4 and CD44
Biglycan	Synovial fluid	<ul style="list-style-type: none"> • Increases catabolic marker expression in human cartilage • Decreases anabolic marker expression in human cartilage • Induces release of NO, interleukins, glycosaminoglycans and collagen by human chondrocytes 	TLR4
Laminins	Chondrocyte pericellular matrix	<ul style="list-style-type: none"> • Increased levels found in human osteoarthritic cartilage matrix • Laminin subunit $\alpha 4$ aggravates human cartilage degeneration • Laminin subunit $\alpha 1$ and laminin subunit $\alpha 5$ might have regenerative activities in human osteoarthritic cartilage • Promote chondrogenesis, upregulate collagen type II and downregulate collagen type I in human chondrocytes 	Syndecan 4
Tenascin	Synovial fluid	<ul style="list-style-type: none"> • Upregulated expression in human osteoarthritic cartilage • Promotes release of inflammatory mediators, upregulation of ADAMTS4 by human and bovine chondrocytes and release of proteoglycan by bovine cartilage explants • Correlation between synovial fluid tenascin levels and cartilage degradation and disease severity in patients with OA • Promotes cartilage repair in a mouse model 	TLR4
Aggrecan-derived fragments	Synovial fluid	Exacerbate inflammation and catabolic activities in mouse and human joint cells via activation of NF- κ B	TLR2

Tableau 3 : Les différentes alarmines impliquées dans l'arthrose
D'après Neftali et al. 2016. (Neftali et al. 2016)

• HMGB1

HMGB1 est une protéine nucléaire de type non-histone de petit poids moléculaire (30 kDA) très conservée au cours de l'évolution (Huang et al. 2015). Elle possède deux régions de liaisons à l'ADN ce qui lui permet de jouer le rôle de facteur de transcription architecte et de moduler les interactions entre l'ADN et d'autres facteurs (Bidwell et al. 2008). HMGB1 peut être libérée passivement par les cellules nécrotiques ou activement par les cellules de l'immunité. La quantité d'HMGB1 extracellulaire est plus élevée dans les liquides synoviaux de patients arthrosiques comparés aux individus contrôles (Ke et al. 2015). Son augmentation de concentration dans les liquides synoviaux est associée à la sévérité de la maladie, à l'inflammation de la membrane synoviale et à la douleur (Li et al. 2011; Ke et al. 2015). La libération d'HMGB1 par les chondrocytes ou les FLS est stimulée par des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 β et TNF α (García-Arnandis et al. 2010; Liu-Bryan and Terkeltaub 2010; Terada et al. 2011). HMGB1 extracellulaire peut lier de nombreux récepteurs de l'immunité comme TLR2, TLR4 et RAGE (van Beijnum et al. 2008; Al-Ofi and Al-Ghamdi 2018) ce qui provoque l'augmentation de production de MMP13 chez les chondrocytes stimulés par l'intermédiaire des voies inflammatoires NF- κ B et ERK (Loeser et al. 2005). HMGB1 coopère avec d'autres cytokines sous forme de complexe. C'est le cas de l'IL-1 β dans des cultures de FLS de patients arthrosiques (García-Arnandis et al. 2010).

HMGB1 peut aussi se complexer avec IL-1 α , IL-1 β et le LPS et promouvoir l'inflammation des FLS (Wähämaa et al. 2011).

- **S100**

Les protéines S100 font partie d'une famille de protéines de liaison du calcium. Elles ont un faible poids moléculaire (10-14 kDa) et leurs variabilités au niveau de l'extrémité carboxyle et dans la région entre les 2 EF-hand expliquent les spécificités de chaque membre de cette famille. Ces protéines sont présentes sous forme d'homodimères, hétérodimères ou multimères dans le cytosol des cellules. Leurs rôles intracellulaires sont nombreux (homéostasie calcique, croissance cellulaire, prolifération). Comme les autres alarmines, ces molécules ont des effets pro-inflammatoires lorsqu'elles sont libérées dans le milieu extracellulaire (Yammani et al. 2009; Donato et al. 2013). Dans le milieu extracellulaire, elles sont capables d'activer les cellules immunitaires en se liant à RAGE et aux TLRs (Sunahori et al. 2006). S100A4 est surexprimée en condition arthrosique (Erlandsson et al. 2013). La liaison de S100A4,8 et 9 à TLR4 déclenche l'activation de la voie pro-inflammatoire NF-kB et des voies MAPK. S100A4 inhibe la minéralisation de l'os, l'expression des marqueurs ostéoblastiques et stimule la formation d'ostéoclastes (Erlandsson et al. 2013; Verma et al. 2018). Les protéines S100 peuvent également se lier au récepteur RAGE (Leclerc et al. 2009). S100A8 et S100A9 s'assemblent en hétérodimère et forment un complexe, la calprotectine. Ce complexe a un effet pro-catabolique sur les chondrocytes qui augmentent fortement leur production de MMPs (1, 3, 9, 13) et l'expression d'IL6, IL8 et MCP1 (Schelbergen et al. 2012). Ces molécules ont été envisagées comme biomarqueur reflétant la destruction de l'articulation (van den Berg 2011). C'est le cas de l'alarmine S100A8/A9 dont l'expression est corrélée à l'inflammation de la membrane synoviale, la dégradation de l'os et du cartilage (Kang et al. 2014)

- **HSPs**

En conditions physiologiques, les Heat shock proteins (HSPs) sont des protéines chaperonnes intracellulaires de petite taille. Des facteurs tels que l'IL-1 β et TNF α induisent la sécrétion de HSP60. En réponse à ces facteurs inflammatoires, les HSPs activent la formation d'ostéoclastes dans l'os via des mécanismes RANK-RANKL dépendants en se liant au récepteur TLR2 (Koh et al. 2009). HSP70 est surexprimé par les chondrocytes arthrosiques (Kubo et al. 1985) et le cartilage de patients atteints d'arthrose sévère (Takahashi et al. 1997). Cette HSP70 a un rôle plutôt protecteur. En effet il a été montré que HSP70 protégeait les

chondrocytes de l'apoptose induite par NO (acide nitrique) en bloquant l'activité de la caspase 3 (Terauchi et al. 2003). Cependant d'autres HSP90 prennent le dessus dans l'arthrose et soutiennent la progression de la maladie (Siebelt et al. 2013).

- **Acide urique**

L'acide urique est un composé intra-cellulaire résultant de la dégradation et l'excrétion des purines. L'acide urique est produit en condition physiologique par les cellules et peut être trouvé dans le noyau et le cytoplasme. Lorsque sa concentration excède sa limite de solubilité (6.8 mg/dL), il forme des cristaux qui activent les macrophages de l'immunité innée via l'inflammasome NALP3 (Martinon et al. 2006; Denoble et al. 2011). L'activation de cet inflammasome est nécessaire pour l'activation de IL-1 β et IL-18 et leur libération (Martinon et al. 2006). Les effets de ces cytokines déclenchent la production d'autres facteurs inflammatoires (PGE2, NO, cytokines, chemokines) conduisant à la destruction du cartilage par les MMP et aggrecanases (Jacques et al. 2006). La présence d'acide urique et de ces cytokines dans le liquide synovial est associée à la sévérité de l'arthrose de genou étudiée par radiographie et scintigraphie (Denoble et al. 2011).

Une étude réalisée en Chine sur 4000 participants a montré que les femmes présentant des taux élevés d'acide urique dans le sérum présentaient les plus grandes caractéristiques radiographiques d'arthrose de genou (Ding et al. 2016).

- Produits de dégradation de la matrice :

Les débris de MEC comme les fragments de fibronectine, protéoglycanes, HA de faible poids moléculaires sont libérés dans la capsule articulaire et leur présence active l'immunité innée et amplifie la dégradation du cartilage, ce qui alimente le cercle vicieux d'inflammation. Une étude a montré que la présence de fragments de fibronectine déclenchait le relargage de TNF α , IL-1 β et la sécrétion de MMP3 provoquant ainsi la dégradation de protéoglycanes sur des explants de cartilage (Homandberg and Hui 1996).

3.2.2 Récepteurs de l'immunité innée : Les *Pathogen recognition receptors* (PRR)

Les PRR sont les récepteurs permettant d'activer l'immunité innée en reconnaissant des signaux de dangers. Les PRR comprennent plusieurs familles de récepteurs membranaires, endosomaux ou bien cytosoliques. Ces récepteurs sont connus pour reconnaître de nombreux motifs antigéniques ce qui leur permet de détecter le moindre signal et activer l'immunité

innée. La structure des récepteurs leur permet de reconnaître les nombreux types d'alarmines qui diffèrent grandement au niveau de leurs chaînes peptidiques.

- Les Toll Like receptors (TLR):

Ces récepteurs sont les principaux membres de la famille des PRR et jouent un rôle prépondérant dans la reconnaissance des signaux de dangers provenant de pathogènes (PAMPS) ou de molécules d'alarmes endogènes (DAMPS). Ce sont des glycoprotéines transmembranaires de type I (Akira and Takeda 2004). Leur domaine extracellulaire est constitué de séquences riches en leucines appelées « *Leucine rich-repeat* » (LRR) prenant la forme de fer à cheval. Ces séquences de 19 à 25 acides aminés juxtaposées sont constituées de nombreux résidus leucine et permettent la reconnaissance des ligands (**Figure 28**). Dix isoformes ont été identifiées chez l'humain. Ces récepteurs sont majoritairement exprimés par les cellules de l'immunité notamment les macrophages (Scanzello and Goldring 2012; Butcher et al. 2018). TLR2 peut s'associer en hétérodimère avec TLR1 et TLR6 (Ozinsky et al. 2000). Les autres isoformes s'associent en homodimères (Takeda 2005; Lee et al. 2012).

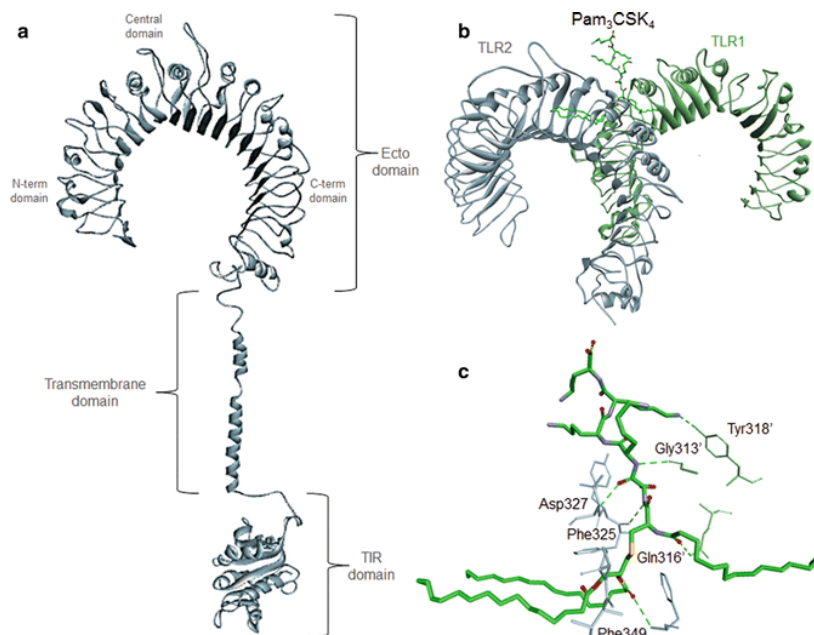


Figure 28 : Représentation cristallographique de l'hétérodimère TLR2/TLR1

a) Monomère de TLR2 b) Dimère de TLR2 et TLR1 c) Ligand Pam₃CSK₄. D'après Durai et al. 2016 (Durai and Choi 2016)

Ces récepteurs sont capables de reconnaître de nombreux motifs présents sur les pathogènes et molécules d'alarmes. Cependant les différentes isoformes de TLRs ne reconnaissent pas les mêmes ligands. La fixation de ces ligands à leurs TLRs spécifiques active des voies de

signalisation pro-inflammatoires comme la voie NF- κ B par l'intermédiaire de protéines adaptatrices comme MyD88, TIRAP, TRIF and TRAM au niveau du domaine *Toll/Interleukin Receptor* (TIR) intracellulaire (Fitzgerald et al. 2001; Horng et al. 2001; Bin et al. 2003; Sato et al. 2003; Takeda et al. 2003; Yamamoto et al. 2003) (**Figure 29**). L'activation de ces cascades de signalisation conduit à la production de cytokines et chemokines.

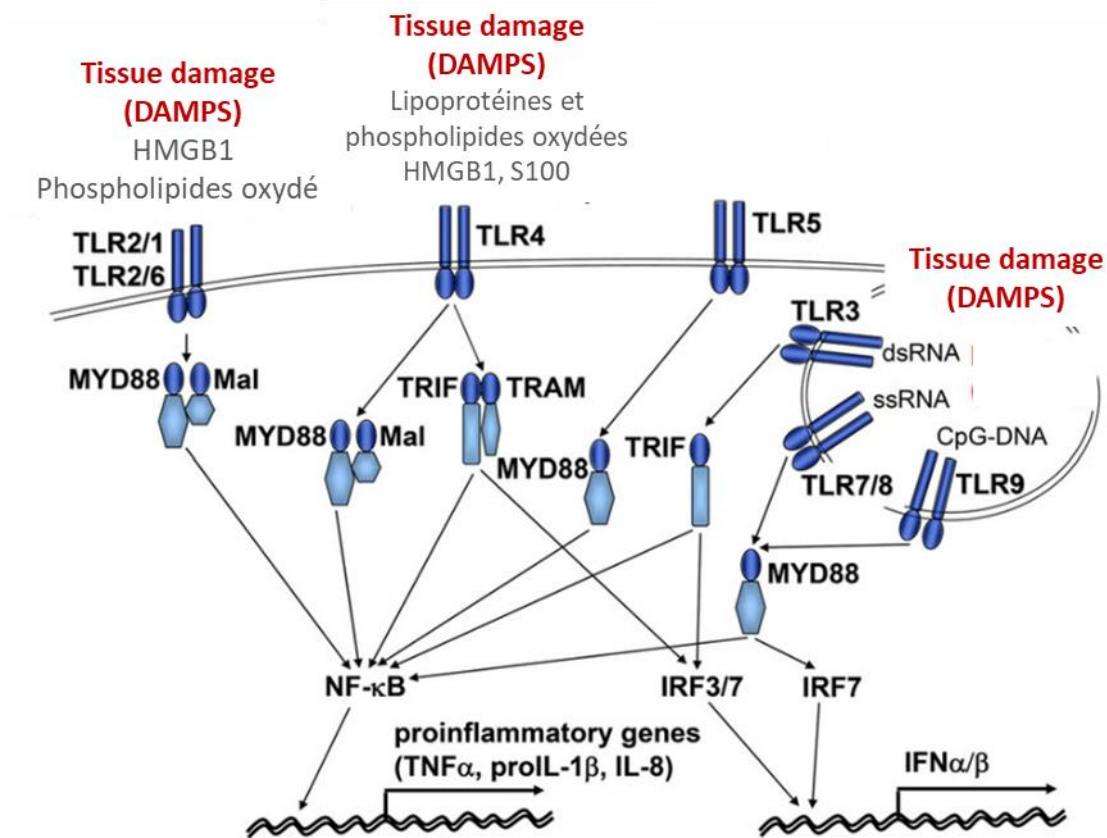


Figure 29 : Schéma de l'activation de la signalisation intracellulaire par les DAMPS via TLR2 et TLR4

Vue d'ensemble des TLRs humains. Les TLRs sont situés soit à la surface des cellules, soit dans le cytoplasme à la surface des endosomes. Ils réagissent aux agressions par la détection de molécules endogènes (damage associated molecular pattern [DAMP]) libérées après une lésion tissulaire. Les TLRs recrutent différentes molécules adaptatrices et initient des voies de signalisation conduisant à l'activation de l'expression de gènes pro-inflammatoires dépendant de NF- κ B et/ou à l'expression d'IFN α/β par l'intermédiaire d'IRF3/7. Adapté de Sugiura et al. 2009 (Sugiura et al. 2009)

Les récepteurs TLRs sont des acteurs majeurs dans le développement de l'arthrose car ce sont les principaux récepteurs permettant d'activer l'immunité innée suite à la reconnaissance de molécules d'alarmes endogènes dans l'articulation. Différents TLRs sont exprimés par les cellules de l'articulations, notamment les TLR2/1, TLR2/6, TLR4 et TLR9 par les chondrocytes, les FLS et les cellules immunitaires présentes dans l'articulation (Shen et al.

2019). Ils sont exprimés de manière différentielle entre les différentes localisations d'arthrose (genoux, mains) (Barreto et al. 2017) et également en fonction du stade de la maladie (Takakubo et al. 2014). Ces différences peuvent être dues aux facteurs de risques spécifiques associés aux différentes localisations comme l'obésité et le stress mécanique. En condition arthrosique, les récepteurs TLRs reconnaissent de nombreuses alarmines dont HMGB1, les protéines S100, les protéines HSP, des fragments de MEC et d'ARNm (Pisetsky et al. 2008; Schelbergen et al. 2012; Ma et al. 2017; Al-Ofi and Al-Ghamdi 2018; Aucott et al. 2018). Leurs différents ligands endogènes sont listés dans la **figure 30**.

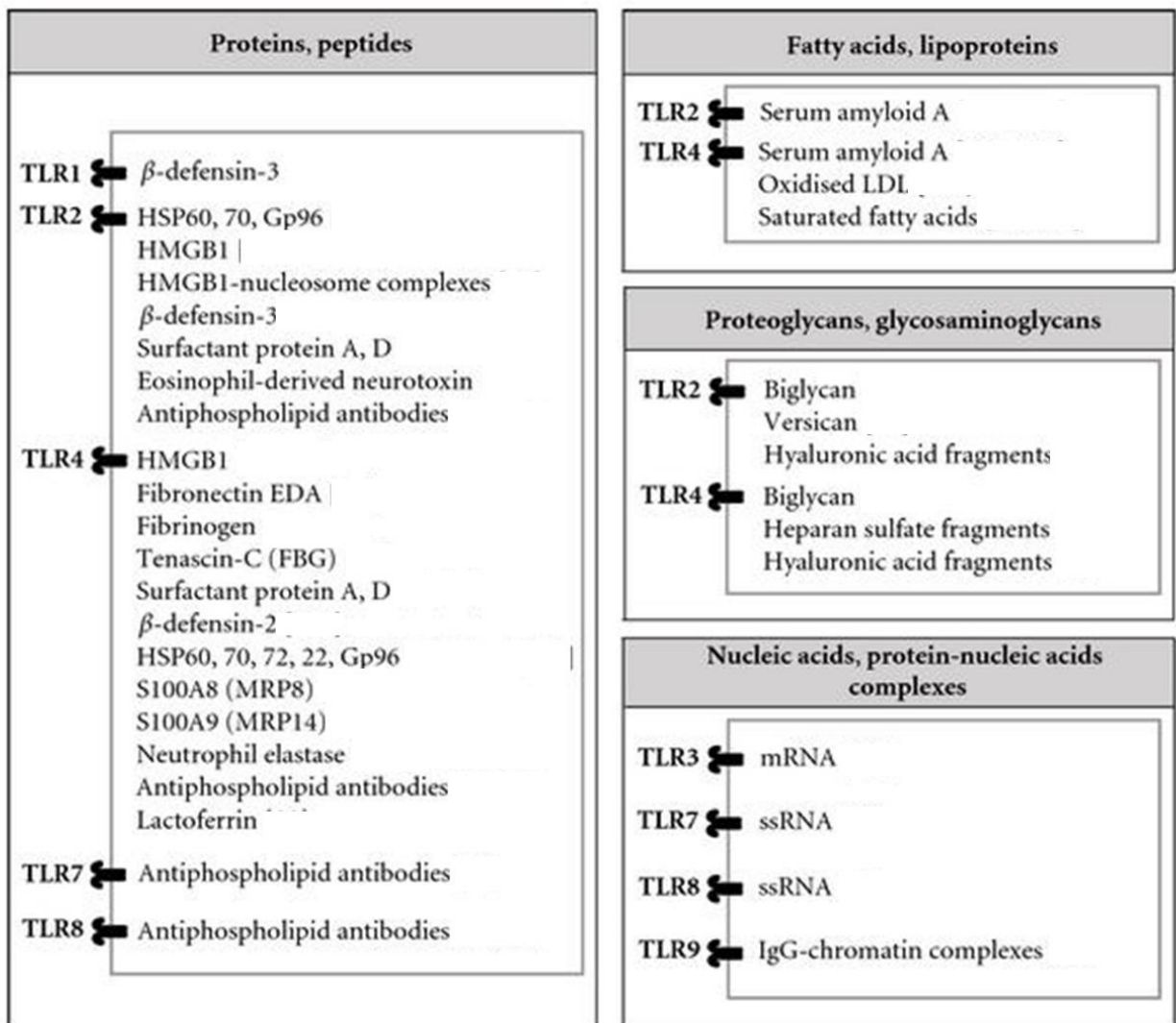


Figure 30 : Activateurs endogènes (DAMPs) des récepteurs TLRs regroupés en fonction de leur nature biochimique

Adapté de Piccinini et al. 2010. (Piccinini and Midwood 2010)

Bien que les TLRs activent l'immunité et participent donc à l'augmentation des facteurs inflammatoires dans l'articulation, des études effectuées sur des modèles de souris arthrosiques (ménisectomie du genou) déficientes pour les récepteurs TLR1, 2, 4 et 6 ou MyD88 n'ont pas montré de protection contre l'arthrose (Nasi et al. 2014).

- RAGE

RAGE est le récepteur des produits de glycations avancés (advanced glycation end products : AGEs). Ce récepteur fait partie de la famille des immunoglobulines et est une protéine transmembranaire (Alexiou et al. 2010). Ce récepteur est exprimé par de nombreux types cellulaires. Son expression varie en condition pathologique. RAGE est plus exprimé en condition arthrosique (Loeser et al. 2005). RAGE n'est pas seulement le récepteur des AGEs, il reconnaît également de nombreuses alarmines tels que HMGB1, S100 (Alexiou et al. 2010).

Le récepteur RAGE et certains TLRs partagent des ligands communs. Ils reconnaissent HMGB1 (Sims et al. 2010; Al-Ofi and Al-Ghamdi 2018), le complexe S100A8/A9 (Boyd et al. 2008; Schelbergen et al. 2012). La coopération entre les RAGE et TLRs a été montrée par différentes études. L'une d'entre elles a montré que RAGE, TLR9 et MyD88 interagissaient physiquement après stimulation par la protéine HMGB1 (Tian et al. 2007). L'activation de ces récepteurs déclenche des cascades de signalisation telles que la voie NF- κ B (**Figure 31**).

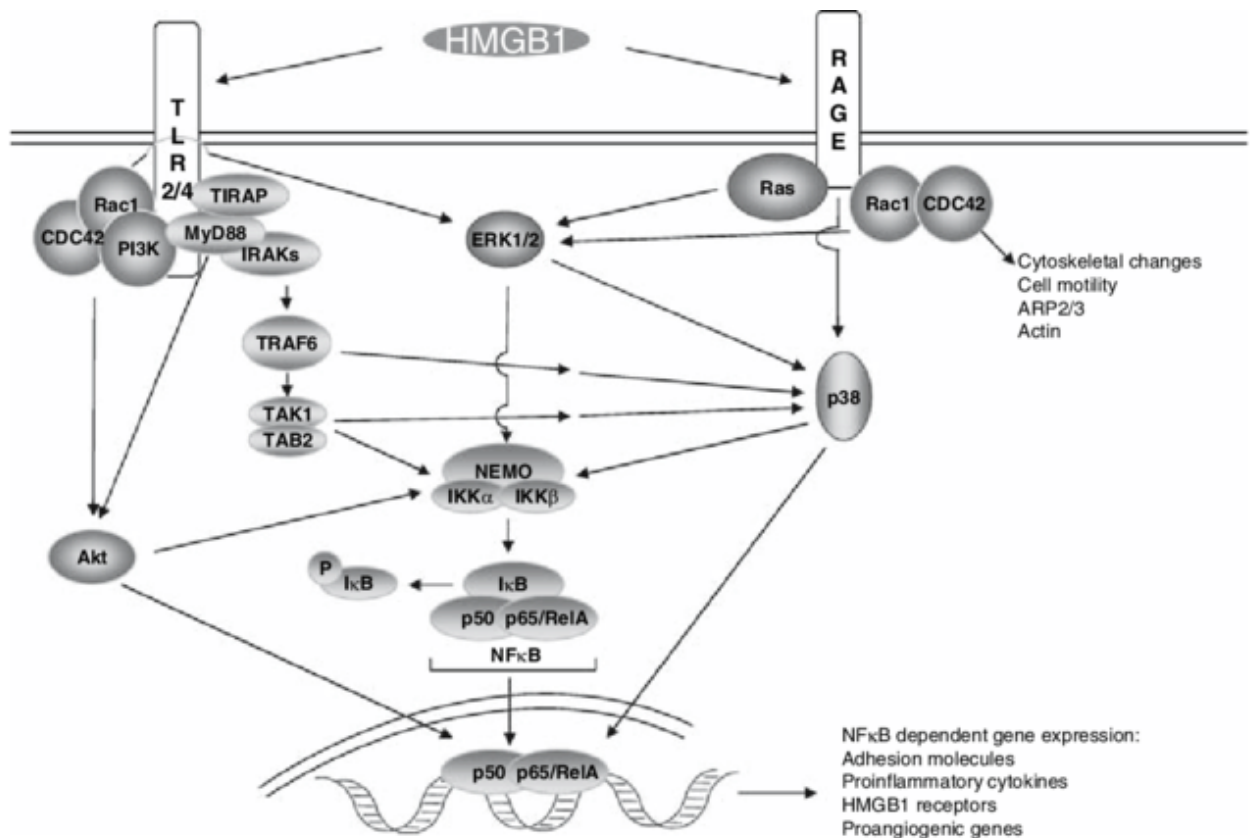


Figure 31 : Exemple de convergence des voies de signalisation entre TLR et RAGE activés par HMGB1

D'après Van Beijnum et al. 2008 (van Beijnum et al. 2008)

- Les NLRs :

Ces récepteurs NLRs (*nucleotide-binding and oligomerization domains like receptors*) peuvent être divisés en deux sous-groupes, les NODs (*nucleotide-binding and oligomerization domains*) et NLRP (*Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing*). Ces récepteurs sont des sentinelles intra-cellulaires opérant via les inflammasomes ou par des voies inflammatoires alternatives. (Barbé et al. 2014)

- Inflammasome

Les inflammasomes sont composés d'un assemblage de protéines : Une protéine NLRP ayant un rôle senseur, une protéine adaptatrice appelée ASC (apoptosis- associated Speck-like) et la procaspase 1. Le plus connu dans l'arthrose est NLRP3 (*nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptor containing protein 3*), exprimé par les macrophages, FLS, ostéoblastes et chondrocytes (Latz and Duewell 2018; McAllister et al. 2018).

Les alarmines majoritairement impliquées dans l'activation de NLRP3 sont les cristaux comme l'acide urique ou encore le phosphate de calcium (McAllister et al. 2018).

3.2.3 Facteurs pro-inflammatoires (Cytokines, chémokines)

La libération des cytokines inflammatoires dans le liquide synovial contribue à la dérégulation de l'homéostasie tissulaire, à la destruction du cartilage. Les cytokines activent les chondrocytes qui sécrètent des enzymes pro-cataboliques et dégradent la matrice. Parmi ces molécules, les plus connues sont l'IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-15, IL-18. L'IL-1 β est la cytokine majeure dans l'arthrose. Elle est fortement exprimée par les tissus articulaires en condition arthrosique ce qui comprend les chondrocytes, ostéoblastes, les FLS et macrophages et provoque la destruction du cartilage par l'intermédiaire de TNF α (Rahmati et al. 2016).

3.2.4 Le système du complément

Composant majeur de l'immunité innée, le complément comprend plus d'une trentaine d'acteurs protéiques liée à la membrane ou présentes dans le plasma. Après l'activation d'une des voies de signalisation (classique, alternative, liée à la lectine : MBL), les protéines s'assemblent pour former le complexe d'attaque membranaire (MAC) (**Figure 32**). Le complément a pour rôle de reconnaître les molécules « étrangères » et de les éliminer par lyse ou opsonisation (Carroll and Sim 2011). Les molécules provenant des différentes étapes de clivage (C3a, C4a et C5a) sont libérées et se fixent à leurs récepteurs (C3aR, C4aR et C5aR) provoquant l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la libération d'histamine par les mastocytes, la contraction des cellules musculaires et la synthèse de facteurs angiogéniques par les cellules souches mésenchymateuses (Siraganian and Hook 1976; DiScipio et al. 2006; Barnum 2015; Vlaicu et al. 2016).

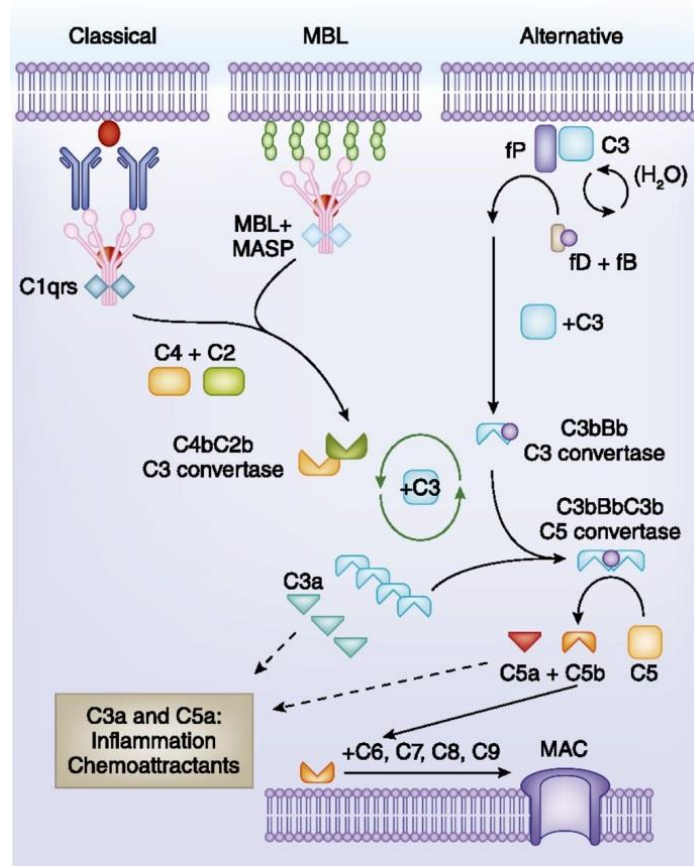


Figure 32 : Schéma du système du complément

L'activation du système du complément peut suivre trois voies, la voie classique, la voie du mannose-binding lectin (MBL) et la voie alternative. Les interactions entre les acteurs du complément aboutissent à la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) qui crée des pores dans les membranes cellulaires pour induire la lyse cellulaire. fB, factor B; fD, factor D; fP, factor P; MASP, mannose-binding lectin-associated serine protease. D'après Mathern et al. 2015. (Mathern and Heeger 2015)

En condition pathologique, le complément peut causer des dommages au niveau des tissus lorsque son activation est dérégulée (Carroll and Sim 2011). Le cartilage et la membrane synoviale expriment les composants du complément de la voie classique en condition physiologique (C1q, C1s, C4 et C2) (Bradley et al. 1996). Il a été montré que le facteur B du complément (CFB), spécifique de la voie alternative, était surexprimé par le cartilage et la membrane synoviale arthrosiques suggérant un rôle important de cette voie dans l'arthrose (Assirelli et al. 2016). Une étude réalisée chez des souris déficientes pour des composants du complément (C5, C6 ou CD59a) a montré que ces facteurs étaient nécessaires dans le développement d'une arthrose (Wang et al. 2011). Des analyses protéomiques et transcriptomiques de liquides synoviaux de patients arthrosiques ont montré que l'expression des molécules du complément et son activité étaient anormalement fortes dans les

articulations arthrosiques (Wang et al. 2011). D'autres approches ont permis de confirmer l'implication du complément dans le développement de l'arthrose comme les travaux de Wang et al. qui ont mis en évidence le rôle protecteur contre l'arthrose de la protéine CD59 qui est capable d'inhiber le MAC (Wang et al. 2011).

3.2.5 Les macrophages

Nous avons vu précédemment que les macrophages jouaient un rôle majeur dans l'arthrose. Les macrophages de la membrane synoviale sont ceux qui sont le plus étudiés. Les macrophages présents dans la membrane synoviale présentent une grande plasticité et s'adaptent en fonction des signaux provenant de leur environnement. Cette capacité à modifier leur phénotype en fonction des signaux externes donne naissance à une multitude de types de macrophages. Leur classification est toujours en débat au fur et à mesure que les recherches progressent. Pendant longtemps, une échelle linéaire a été utilisée pour classer les macrophages allant d'un profil M1, pro-inflammatoire, activés de manière classique ou M2, à tendance anti-inflammatoire et activés de manière alternative (Mills et al. 2000). Le profil M2 a été ensuite divisé en différents sous-groupe (M2a, M2b, M2c, M2d) car différentes études ont mis en évidence différents phénotypes et la dichotomie entre M1/M2 n'était pas suffisamment élaborée pour refléter les différences de polarisation des macrophages (Martinez and Gordon 2014) (**Tableau 4**).

Phenotype	Stimuli	Cell expression markers	Cytokines, chemokines, and other secreted mediators	Functions
M1	IFN- γ , TNF α , LPS	CD80, CD86, CD68, MHC-II, IL-1R, TLR-2, TLR-4, iNOS, IL-10 low, IL-12 high	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, IL-27, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL16, CCL5, Arg-2 (mouse), iNOS (mouse), ROS	Pro-inflammatory Th1 response, tumor resistance
M2a	IL-4, IL-13	Human: MMR/CD206, IL1Ra; IL-1R II Mouse: Arg-1, FIZZ1, Ym1/2	IL-10, TGF- β , CCL17, CCL18, CCL22, CCL24	Anti-inflammatory, tissue remodeling
M2b	Immune complexes, TLR ligands, IL-1 β	IL-10 high, IL-12 low, CD86	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, CCL1	Th2 activation, immunoregulation
M2c	IL-10, TGF- β , glucocorticoids	Human: MMR/CD206, TLR-1, TLR-8 Mouse: Arg-1	IL-10, TGF- β , CCL16, CCL18, CXCL13	Phagocytosis of apoptotic cells
M2d	TLR ligands, adenosine receptor ligands	VEGF, IL-12 low, TNF- α low, IL-10 high	IL-10, VEGF	Angiogenesis, tumor progression

Arg-1, arginase-1; LPS, lipopolysaccharide; ROS, reactive oxygen species; FIZZ1, found in inflammatory zone 1; IL1-ra, IL-1 receptor antagonist; TGF-beta, transforming growth factor-beta; TNF-alpha, tumor necrosis factor alpha; TLR, Toll-like receptor; MMR (CD206), macrophage mannose receptor; iNOS, inducible nitric oxide synthase; VEGF, vascular endothelial growth factor; Ym1 or chitinase-3-like protein-3 (Chi3l3).

Tableau 4 : Diversité des phénotypes de macrophages

Adapté de Röszer et al. 2015 et Duluc et al. 2007 (Duluc et al. 2007; Röszer 2015)

Désormais, on représente la polarisation des macrophages comme un large spectre de possibilités dépendant de leurs interactions avec des signaux comme les cytokines présentes dans le milieu ou les lymphocytes présents dans le tissu. Leurs rôles permettent également de départager des profils différents. Certaines études parlent à présent de macrophages activés de manières classique, réparateurs ou encore régulateurs (Mosser and Edwards 2008).

Les macrophages sont présents dans les différents tissus de l'articulation comme le tissu adipeux, l'os, la moelle osseuse et la membrane synoviale. Ils ont des rôles bien spécifiques en fonction de leur localisation (Orlowsky and Kraus 2015; Geurts et al. 2016; Russo and Lumeng 2018) (**Figure 33**).

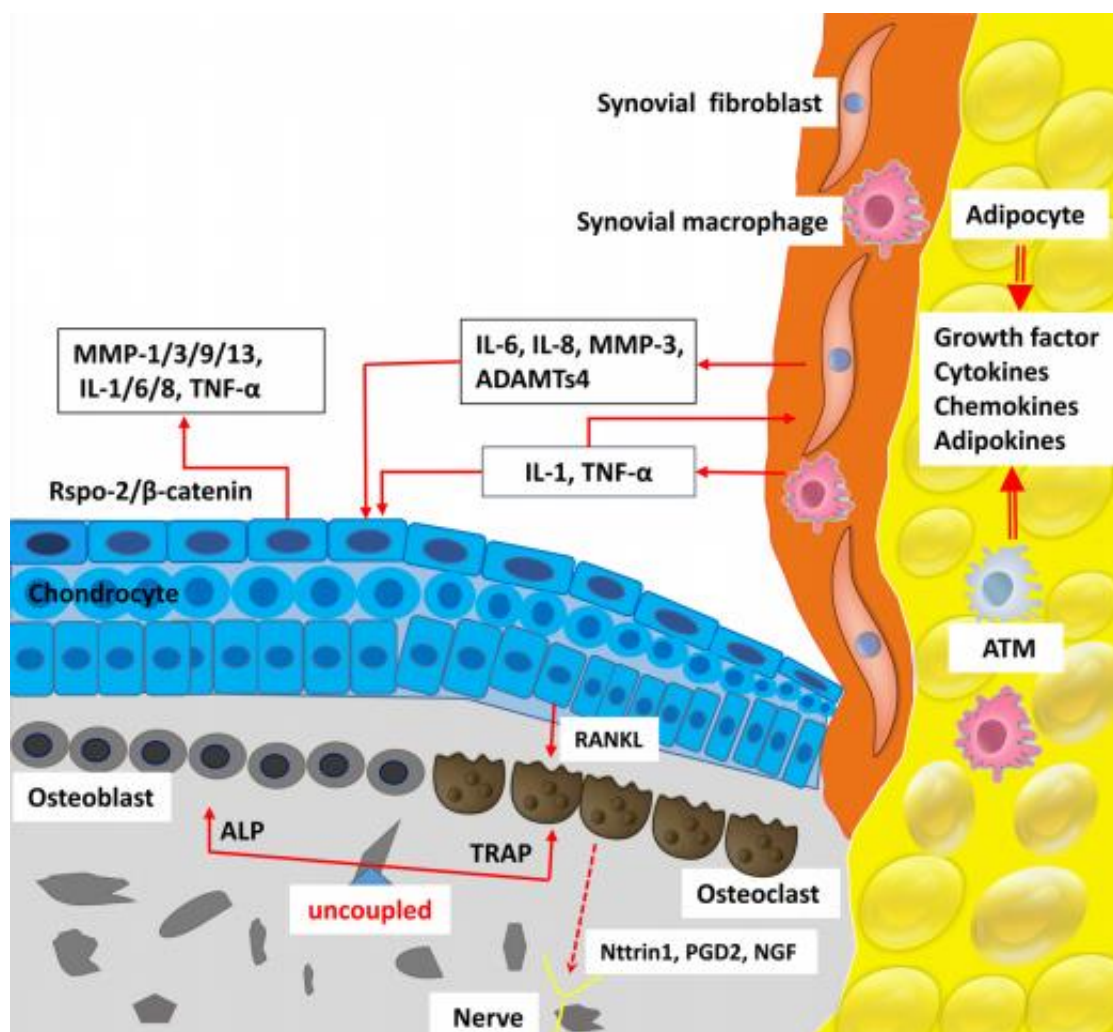


Figure 33 : Schéma du rôle central des macrophages avec les différents tissus de l'articulation au cours de l'arthrose

Au cours de l'arthrose différents macrophages sont présents dans les tissus de l'articulation. Les macrophages synoviaux sont des macrophages présents dans la membrane synoviale. Les macrophages du tissu adipeux (Adipose tissue macrophages : ATM) communiquent avec les cellules adipocytaires environnantes. Les ostéoclastes présentent des marqueurs des

macrophages comme CD68+ et participent au remodelage osseux. En cas d'arthrose, les macrophages de chaque tissu produisent des facteurs pro-inflammatoires qui permettent des communications entre compartiments. D'après Xie et al. 2019 (Xie et al. 2019)

Les macrophages présents dans la membrane synoviale sont sensibles à tous les changements qui surviennent dans la composition du liquide synovial et s'activent par la reconnaissance de fragments de cartilage et de DAMPS en cas d'atteinte des tissus (Orlowsky and Kraus 2015). La balance entre les deux phénotypes M1 et M2 joue un rôle crucial dans l'arthrose car le premier groupe (M1) est impliqué dans l'initiation de l'inflammation tandis que le deuxième (M2) est plutôt impliqué dans la résolution de l'inflammation. La déplétion des macrophages chez un modèle murin arthrosique a provoqué une baisse du nombre de macrophages M1 et M2 et une baisse du nombre d'ostéophytes. Cependant, cette déplétion n'a pas diminué la sévérité de l'arthrose et a surtout induit une inflammation systémique avec une forte augmentation de la concentration en cytokines pro-inflammatoires. Ces résultats montrent que la sévérité de l'arthrose n'est pas forcément liée au nombre de macrophages activés mais à l'échec de l'immunité à faire pencher la balance vers le phénotypes M2 plutôt que M1 (Wu et al. 2017). D'autres études ont également montré que les macrophages présentant un phénotype M1 s'accumulaient dans la membrane synoviale de patients arthrosiques ou de modèles murins d'arthrose. L'accumulation de macrophages M1 dans la membrane synoviale était associée à une exacerbation de l'arthrose chez les souris avec une arthrose induite par déstabilisation du ménisque médial (DMM) ou par collagénase (Zhang et al. 2018). L'effet délétère des macrophages de la membrane synoviale est en partie dû à leur communication avec les FLS de la membrane synoviale et l'induction de la production de MMPs, facteurs de croissance et cytokines par ces cellules (Blom et al. 2007; Bondeson et al. 2010). Les macrophages ont également des effets paracrines sur le cartilage. La co-culture de macrophages et de chondrocytes a induit la production de facteurs pro-inflammatoires par les chondrocytes (MMPs, IL-1 β , TNF- α , IL-6 et IL-8) (Samavedi et al. 2017).

Le tissu adipeux de Hoffa contient également des macrophages spécifiques présentant un profil M2 en condition physiologique. Au cours de l'arthrose, les macrophages résidents et les monocytes circulants recrutés dans le tissu adipeux se polarisent et évoluent vers un phénotype appelé « macrophages à métabolisme activé » (Amano et al. 2014; Russo and Lumeng 2018). Les interactions entre le système immunitaire et le métabolisme (concentration de glucose et taux d'insuline élevés et acides gras libres) seraient responsables

de cette polarisation en contexte d'obésité. Des travaux de l'équipe de Barboza et al. sur des souris obèses (induit par régime riche en graisse : *high fat diet*), ont montré que ces souris présentaient des signes précoces d'arthrose (présence d'ostéophytes, duplication de la tidemark et fibrose du tissu adipeux) (Barboza et al. 2017). De nouvelles études sont nécessaires afin de comprendre comment les macrophages du tissu adipeux affectent l'intégrité des tissus de l'articulation.

Enfin, les ostéoclastes présents dans l'os sous-chondral présentent des caractéristiques et marqueurs des macrophages (CD68+/TRAP+) (Geurts et al. 2016). Ces cellules jouent un rôle dans le développement de la douleur en condition arthrosique et provoquent l'invasion de chenaux vasculaires entre l'os sous-chondral et le cartilage (Nwosu et al. 2017).

3.2.6 Les neutrophiles

Les neutrophiles sont les cellules phagocytaires majeures de l'immunité innée. Ces cellules sont en première ligne lors des infections et leur rôle est d'éliminer les agents pathogènes. Ces cellules proviennent de la moelle osseuse et s'y différencient. Suite aux dégradations tissulaires, les DAMPS libérées activent les TLRs et récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) présents sur les neutrophiles. En réponse, les neutrophiles migrent au niveau du site inflammatoire et secrètent un certain nombre de protéinases comme l'élastase (Korkmaz et al. 2010) capable de dégrader l'élastine, les collagènes et les protéoglycanes et participe donc à la dégradation des tissus articulaires (Muley et al. 2017). De plus l'élastase est capable d'augmenter l'expression des récepteurs PARs (Proteinase-activated receptors), un sous-groupe de récepteurs couplés aux protéines G présents sur les FLS, les neutrophiles et les macrophages, qui soutiennent l'inflammation de la membrane synoviale, la dégradation du cartilage, la formation d'ostéophyte et l'hyperalgésie (Russell and McDougall 2009; Zhou et al. 2013; Huesa et al. 2016).

La présence d'alarmines dans l'articulation est donc un des mécanismes majeurs dans l'établissement de l'inflammation de bas grade présente dans l'arthrose. En réponse aux débris de MEC du cartilage, les cellules de la membrane synoviale, les macrophages et FLS s'activent via la reconnaissance des signaux de dangers et débris par les TLRs et RAGE puis produisent à leur tour des médiateurs pro-inflammatoires (cytokines, DAMPS). Ces signaux inflammatoires vont activer les chondrocytes, FLS, cellules de l'os par l'intermédiaire des TLRs, RAGE et l'inflammasome et les faire évoluer vers des phénotypes pro-

cataboliques/inflammatoires via des cascades de signalisation (NF- κ B, MAPK). Cette activation va déclencher la libération de cytokines (IL-1 β et IL-8) et MMPs dans l'articulation et alimenter ainsi l'inflammation (Millerand et al. 2019) (**Figure 34**).

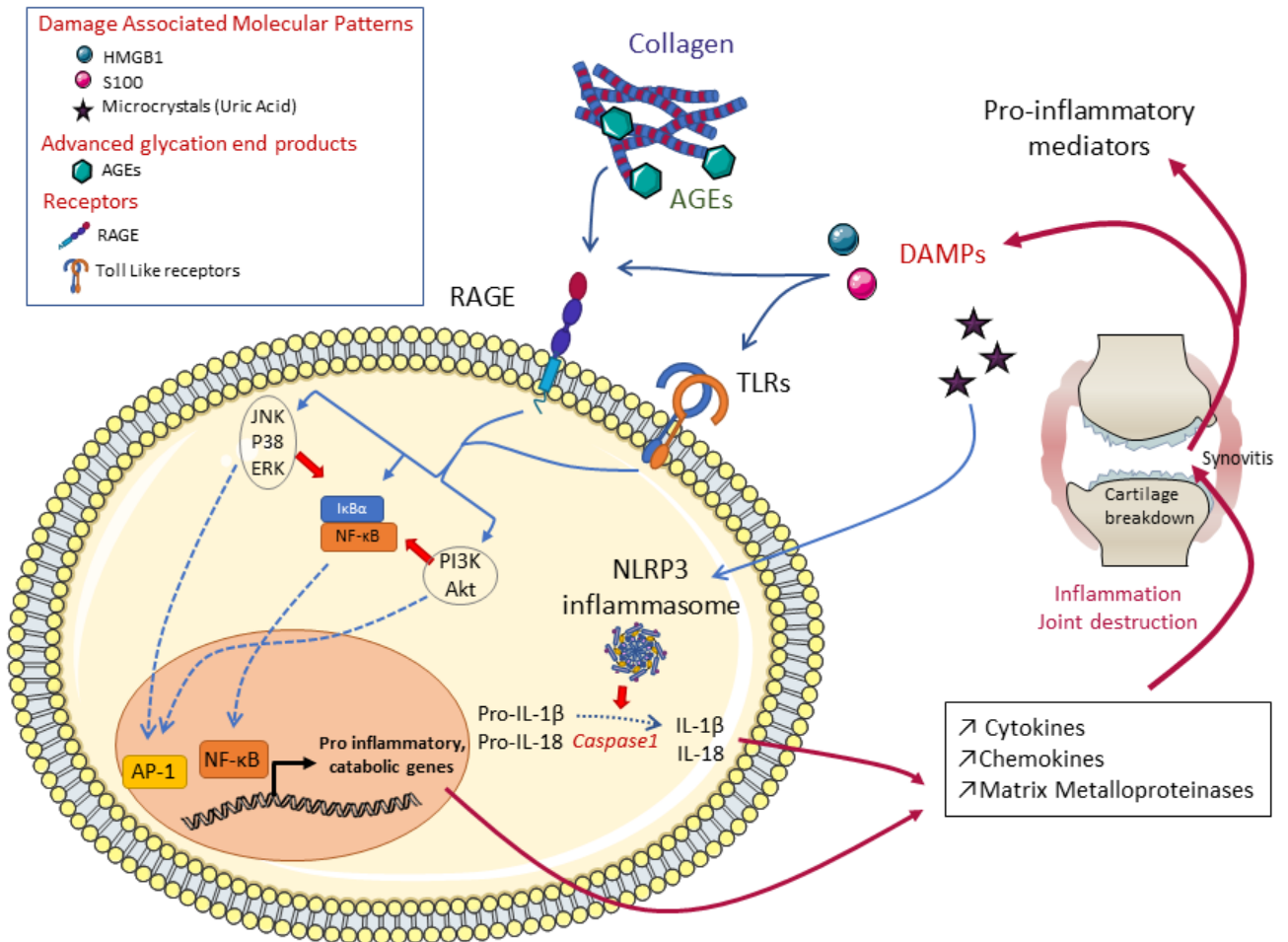


Figure 34 : Instauration d'un cercle vicieux d'inflammation par les alarmines dans l'arthrose

Adapté de Millerand et al. 2019 (Millerand et al. 2019)

3.3 Immunité innée et phénotypes d'arthrose

Précédemment, nous avons abordé les différents phénotypes et endotypes d'arthrose. Chacun d'eux est lié à des étiologies et acteurs moléculaires différents. Ces différents phénotypes affectent de manières différentes l'immunité innée qui est un acteur majeur de la progression de l'arthrose.

3.3.1 Dérégulation de l'immunité innée et phénotype lié au vieillissement

L'inflammation de bas-grade qui se développe au cours du vieillissement est en partie liée à l'immunosénescence. Ce phénomène d'inflammaging est caractérisé notamment par la baisse

de la capacité du système immunitaire à répondre à une agression et la baisse de tolérance aux auto-antigènes (Cannizzo et al. 2011). D'après certaines études, les détériorations du système immunitaire affecteraient plus la partie adaptative que la partie innée. En effet, le système immunitaire adaptatif se détériorerait plus au cours du temps suite à l'accumulation de contacts avec de nombreux antigènes. Ces stress répétés épuiserait le système adaptatif et réduirait le pool de lymphocytes naïfs alors que les mécanismes de défense de l'immunité innée comme la cytotoxicité des cellules NK, la chimiotaxie, la phagocytose et l'activité du complément seraient moins touchées par le vieillissement (Bellavia et al. 1999; Franceschi et al. 2000a; Alonso-Fernández et al. 2008). Cependant, de nombreuses études démontrent que les acteurs de l'immunité innée sont affectés par le vieillissement. Le vieillissement altère certaines fonctions des cellules et facteurs liés à l'immunité innée (**Tableau 5**) (Weiskopf et al. 2009). Chez les neutrophiles, les activités phagocytaires et antimicrobiennes diminuent (Wenisch et al. 2000). L'activité phagocytaire des macrophages diminue également au cours du temps (Lloberas and Celada 2002). Des études *in vivo* ont montré des altérations fonctionnelles des monocytes et macrophages, une diminution de l'expression des TLRs chez les macrophages et de la sécrétion de cytokines et chemokines lors du vieillissement (Lloberas and Celada 2002; Renshaw et al. 2002).

Type cellulaire/ facteur inflammatoire	Augmentation liée à l'âge	Diminution liée à l'âge	Références
<i>Neutrophiles</i>		Production de ROS Capacité phagocytaire Activités anti-bactériennes	Wenish et al. 2000
<i>Macrophages</i>		Activité phagocytaire	Lloberaj et al. 2002 Swift et al. 2001
<i>Cellules NK</i>	Nombre de cellules total	Réponse proliférative à l'IL-2 Cytotoxicité	Borrego et al. 1999
<i>Cellules dendritiques</i>		Capacité à stimuler les lymphocytes Guidage au niveau des nœuds lymphatiques	Grolleau-Julius et al. 2008 Agrawal et al. 2007
<i>Cytokines et chemokines</i>	Concentration sériques de IL-6, IL-1 β et TNF α		Ershler et al. 2000 Michaud et al. 2013

Tableau 5 : Modifications des activités des cellules immunitaires au cours du vieillissement
Adapté de Weiskopf et al. 2009 (Weiskopf et al. 2009)

La dérégulation de l'immunité innée est liée à l'augmentation des cellules sénescentes au cours du vieillissement. Les cellules sénescentes présentent un profil de sécrétion particulier appelé le *Senescent-associated secreted phenotype* (SASP) qui produit de nombreux facteurs pro-inflammatoires comme les cytokines IL-6, IL-1 α/β ; les chimiokines (MCP-1, IL-8, GRO α), les facteurs de croissance (TGF- β , VEGF, IGFBP7), et des protéases (MMP3) (Coppé et al. 2010; Loeser et al. 2016). L'ensemble de ces mécanismes associant le vieillissement et l'immunité innée sont impliqués dans le phénotype d'arthrose lié à l'âge.

3.3.2 Dérégulation de l'immunité innée en cas d'obésité/syndrome métabolique

L'obésité est un facteur de risque majeur de l'arthrose (Felson et al. 1988) et le syndrome métabolique est associé à un risque plus élevé de déclencher de l'arthrose des genoux et des mains (Yoshimura et al. 2012; Tomi et al. 2016). Le phénotype d'arthrose lié à l'obésité comporte également une composante de dérégulation de l'immunité innée. La forte prévalence d'arthrose digitale chez les patients obèses ne peut s'expliquer uniquement par le stress mécanique dû au poids (Tomi et al. 2016). D'autres facteurs, notamment systémiques entrent en jeu. Les patients obèses présentent une inflammation de bas grade caractérisée par l'augmentation de facteurs pro-inflammatoires circulants (IL-6, TNF α , MCP-1, la leptine et la résistine) (Straub et al. 2000; Lafontan 2005). Par ailleurs, le risque d'arthrose chez ces patients peut également être due à la dysbiose au niveau du microbiote intestinal des personnes obèses ou avec un syndrome métabolique. La présence d'endotoxines (Lipopolysaccharide : LPS) dans la circulation de ces patients est liée à la progression de l'arthrose (Huang et al. 2016). Une étude a montré que la modification du microbiote chez un modèle de rat obèses prédisait la sévérité de l'arthrose (Collins et al. 2015). L'augmentation de pathogènes/bactéries au niveau du microbiote et les altérations de la barrière intestinale entraîne une augmentation de l'inflammation de bas grade. La présence de facteurs inflammatoires libérés dans la circulation active les récepteurs de l'immunité innée, notamment les TLRs engendrant des risques de progression de l'arthrose (Liu et al. 2019) **(Figure 35)**.

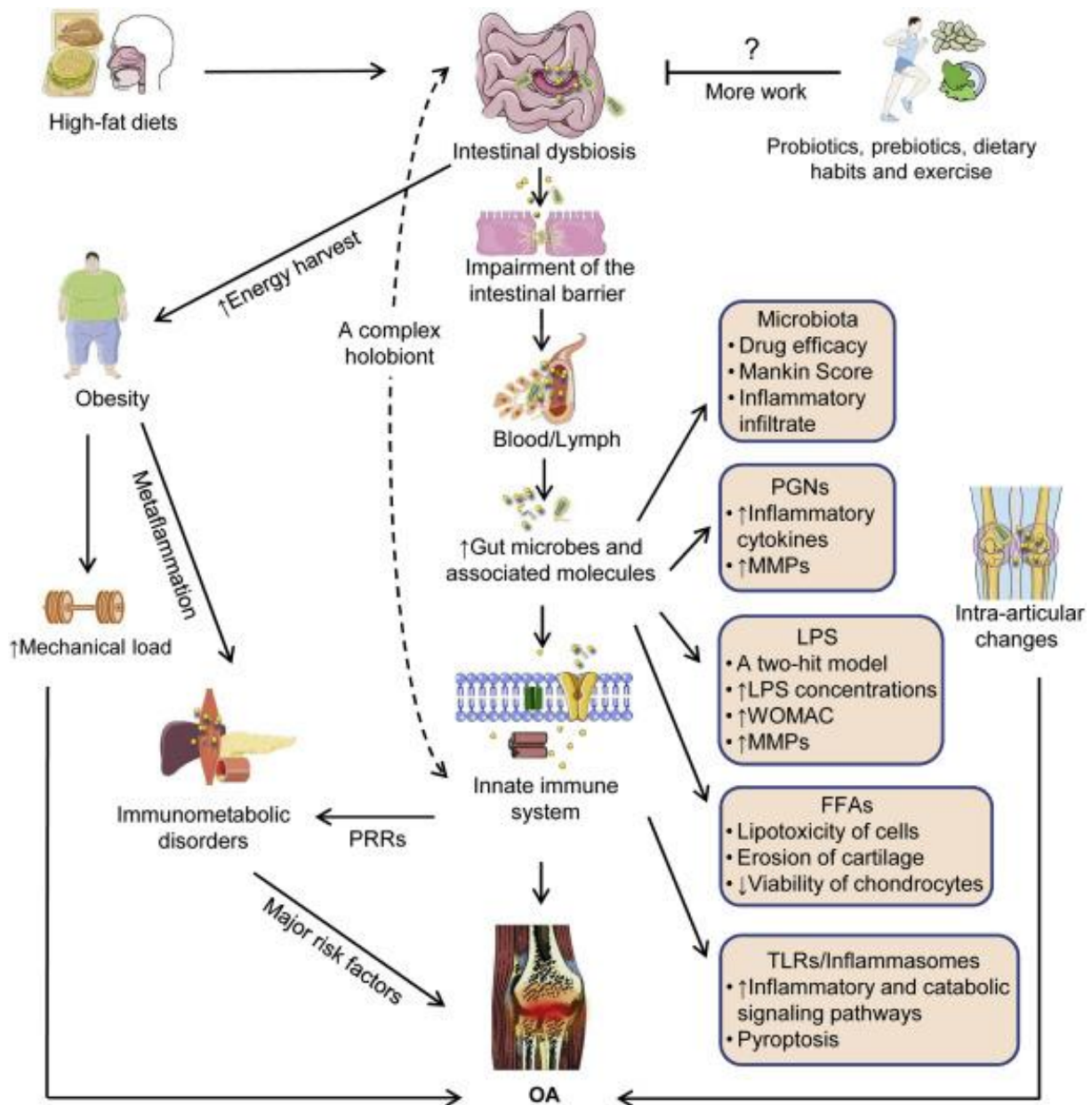


Figure 35 : Schéma des mécanismes impliqués dans le risque d'arthrose lié à une dysbiose du microbiote notamment chez les personnes obèses
Adapté de Liu et al. 2019 (Liu et al. 2019)

3.3.3 Immunité innée et stress mécanique

Le stress mécanique est un facteur majeur dans la progression de l'arthrose.

Il est détecté par des mécanorécepteurs présents sur les ostéocytes et d'autres cellules de l'articulation. Cet excès de pression va conduire à la dégradation du cartilage articulaire menant à l'arthrose (Inoue 2010). Des études *in vitro* ont montré que les chondrocytes augmentent leur expression de MMP 1,2,3,9 et 13, des métalloprotéases de la MEC en réponse à un stress mécanique (Fujisawa et al. 1999; Honda et al. 2000; Gosset et al. 2006,

2008; Tetsunaga et al. 2011). Par ailleurs, les chondrocytes soumis à un stress mécanique évoluent vers un phénotype pro-catabolique et inflammatoire. Ils augmentent l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 β , TNF α , COX2 qui induit une augmentation de prostaglandine E2 (PGE2) (Fujisawa et al. 1999; Honda et al. 2000; Fermor et al. 2002; Gosset et al. 2006). Ces changements d'expressions sont dépendants de la voie de signalisation NF-kB (Nam et al. 2009; Marcu et al. 2010; Chang et al. 2019).

L'os sous-chondral est sensible aux pressions mécaniques excessives. Des études suggèrent qu'une communication biochimique, facilitée par les chenaux vasculaires et les microfractures au niveau de la jonction ostéochondrale permettrait le passage de médiateurs solubles de l'os vers le cartilage.

Le laboratoire s'est intéressé à l'arthrose liée au stress mécanique et à la compréhension de la communication entre l'os et le cartilage dans le développement de l'arthrose. Pour cela, le laboratoire a mis en place un modèle de communication entre l'os et le cartilage (**Figure 36**). Des cultures primaires d'ostéoblastes/ostéocytes murins subissent une compression de façon cyclique par un système Flexercell permettant de mimer un stress mécanique. Les milieux conditionnés obtenus sont utilisés pour stimuler des cultures primaires de chondrocytes articulaires murins (Priam et al. 2013).

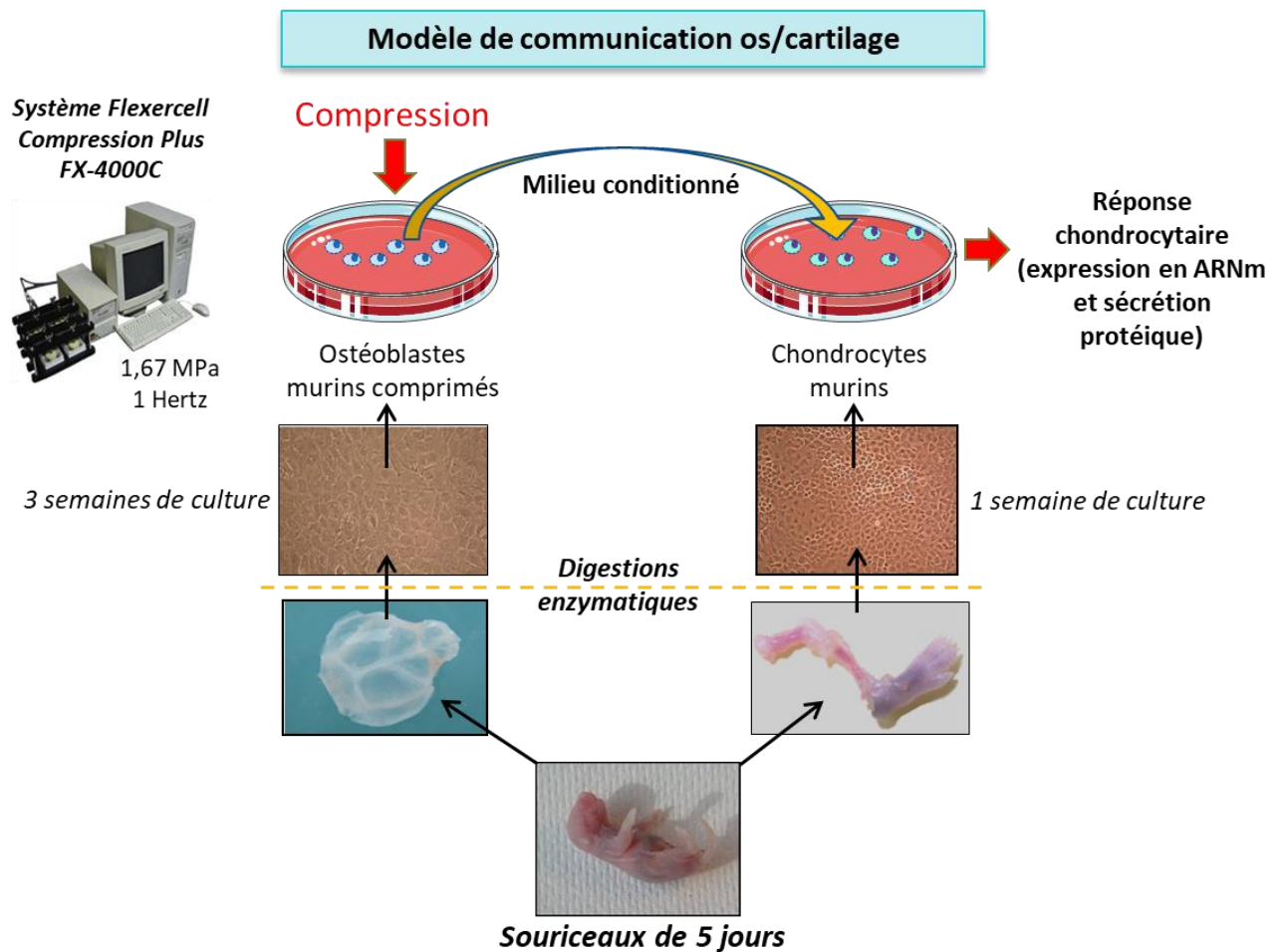


Figure 36 : Modèle de de communication os/cartilage mis au point par le laboratoire

Des ostéoblastes provenant de calvaria de souriceaux (5 à 6 jours) sont mis en culture primaire durant 3 semaines. Ces cellules se différencient progressivement et forment des nodules. Les cultures obtenues sont comprimées grâce à un système Flexercell exerçant une pression de 1.67 MPa – 1Hz) de manière cyclique durant 24h. Les milieux conditionnés obtenus sont utilisés pour stimuler des cultures de chondrocytes articulaires, obtenus à partir des têtes fémorales et tibias de souriceaux (5 à 6 jours). Après 24h de traitement, le phénotype des chondrocytes est analysé grâce à l’expression en ARNm et la sécrétion protéique associée à des gènes impliqués dans la dégradation du cartilage.

Les paramètres choisis pour la compression proviennent des résultats d’une étude réalisée par Sanchez et al. (Sanchez et al. 2009) montrant qu’une compression d’intensité de 1.67 MPa exercée à une fréquence de 1Hz provoque un stress mécanique délétère chez les ostéoblastes comprimés. En réponse, ces cellules sécrètent des médiateurs inflammatoires comme l’IL-6. Des tests de viabilités (test MTT) et de cytotoxicité (dosage de la LDH) ont été effectués au laboratoire afin de vérifier que cette expérience ne provoque pas de mort cellulaire.

Les résultats de cette expérience ont montré que les chondrocytes stimulés par les milieux conditionnés d'ostéoblastes comprimés augmentent leur expression en ARNm et leur sécrétion protéique des protéases MMP3 et MMP13. De plus la stimulation diminue leur synthèse de collagène de type II et d'aggrécane (Priam et al. 2013). La stimulation par des milieux conditionnés d'ostéoblastes non comprimés ne produit pas de changement significatif par rapport aux contrôles non stimulés.

Les milieux conditionnés provenant d'ostéoblastes comprimés contiennent donc des facteurs induisant la production d'enzymes de dégradation de la MEC du cartilage et la baisse de sa synthèse de composants matriciels. Les ostéoblastes comprimés libèrent des facteurs pro-cataboliques en réponse au stress mécanique.

Pour identifier les médiateurs solubles présents dans les milieux conditionnés d'ostéoblastes comprimés, le contenu de ces milieux a été analysé par une étude protéomique différentielle iTRAQ (**Figure 37**). 104 protéines ont été identifiées et 25 étaient différentiellement présentes dans les milieux comprimés vs non comprimés. 10 protéines étaient surexprimées dans les milieux comprimés comparé aux milieux non comprimés. Parmi ces protéines, 6 étaient spécialisées dans le stockage du calcium (calmoduline, calumenine, annexin A5) et 3 autres liées à la synthèse de la MEC (Col I, lumican, galectine 1). Ces résultats étaient attendus, le stress mécanique étant un stimulus ostéoformateur puissant et un régulateur des protéines matricielles qui ont été trouvées induites (Priam et al. 2013). En revanche, la découverte de la protéine restante, identifiée comme la protéine 14-3-3 ϵ , appartenant à la famille des protéines architectes 14-3-3 était inattendue. En condition physiologique, cette protéine est intracellulaire. Certaines isoformes ont été identifiées dans le milieu extracellulaire en condition pathologiques (polyarthrite rhumatoïde, Alzheimer, Creutzfeldt Jacob).

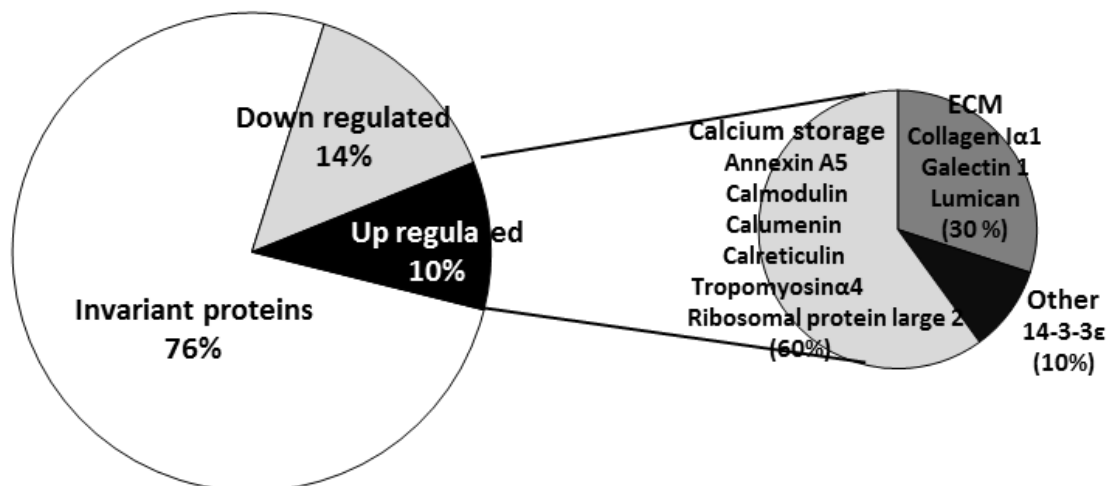


Figure 37 : Analyse de la présence différentielle de protéines présentes dans les milieux conditionnés d'ostéoblastes comprimés et non comprimés (iTRAQ)
Adapté de Priam et al. 2013 (Priam et al. 2013)

Pour étudier son effet, le laboratoire a traité des cultures primaires de chondrocytes murins par la protéine 14-3-3ε recombinante. Cette stimulation a provoqué l'augmentation significative de l'expression et de la sécrétion de MMP3 et MMP13 comparé aux cellules non stimulées.

Au contraire l'immuno-déplétion de 14-3-3ε dans les milieux conditionnés d'ostéoblastes comprimés a provoqué une forte réduction de l'expression de MMP-3 et MMP-13 par les chondrocytes (Priam et al. 2013).

La présence de 14-3-3ε dans le milieu extracellulaire ainsi que son effet pro-catabolique sur les chondrocytes rappellent les caractéristiques des alarmines. On s'intéresse donc à cette protéine qui pourrait constituer une nouvelle DAMPS dans l'arthrose.

4. Les protéines 14-3-3

Les protéines 14-3-3 sont une famille de molécules ubiquitaires très conservées au cours de l'évolution. Ces protéines ont été découvertes en 1967 par Moore et Perez dans des extraits de cerveau de bovins et isolées par chromatographie bidimensionnelle sur gel (DEAE cellulose) suivie d'une électrophorèse sur gel d'amidon. Elles doivent leur nom à leur position lors de la migration (Moore and Perez 1967). Cette famille est composée de 7 isoformes différentes chez les mammifères : β (beta), γ (gamma), ε (epsilon), ζ (zeta), η (eta), τ (tau), σ (delta) codées par différents gènes (Obsil and Obsilova 2011) (**Figure 38**). Deux autres

formes de 14-3-3, α et δ ont également été décrites mais correspondraient aux formes phosphorylées de β et ζ (Aitken et al. 1995). Ces protéines sont majoritairement exprimées dans le cerveau où elles représentent près d'1% des protéines solubles totales (Moore and Perez 1967; Boston et al. 1982; Umahara et al. 2011; Foote and Zhou 2012). Cependant, elles sont aussi exprimées par de nombreux autres tissus comme les ovocytes, des cellules pulmonaires ou encore rénales (Qi and Martinez 2003; Liang et al. 2009; De et al. 2012). En condition physiologique, les protéines 14-3-3 sont intracellulaires et sont localisées majoritairement au niveau du cytoplasme (Liao and Omary 1996) mais quelques isoformes ont été identifiées dans le noyau de cellules animales et végétales (Bihn et al. 1997; Imhof and Wolffe 1999; Zhang et al. 1999).

4.1 Structure

Les monomères de 14-3-3 ont une masse moléculaire comprise entre 28 et 30 kDa (Baxter et al. 2002). L'étude des structures cristallographiques a permis de comprendre l'architecture des monomères et dimères de 14-3-3 (Yang et al. 2006). Chaque monomère se compose de 9 hélices α anti-parallèles (H1 à H9) et contient un sillon amphipatique créé par les hélices H3, H5, H7 et H9.

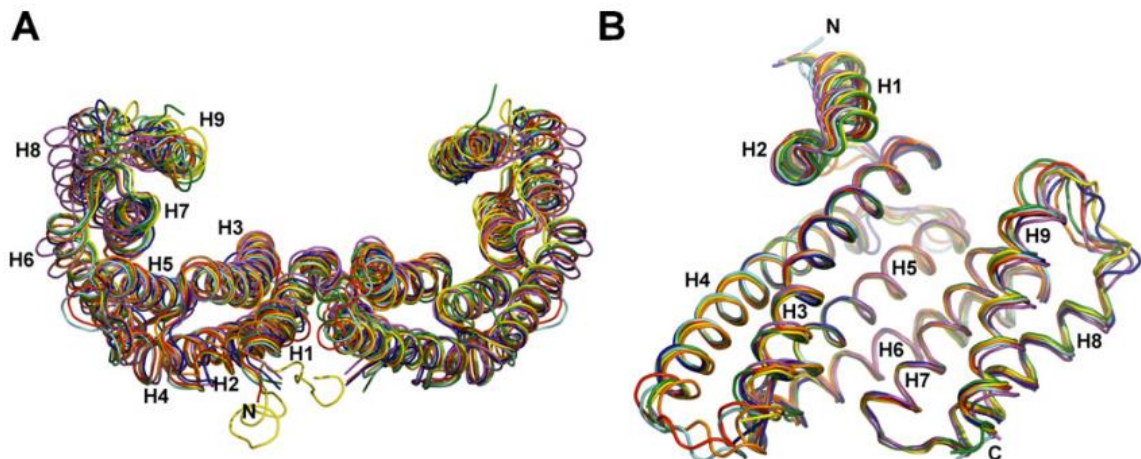


Figure 38 : Comparaison structurelle des différentes isoformes de protéines 14-3-3

(A) Superposition des 7 isoformes de 14-3-3 sous forme de dimères (β : magenta , γ : rouge, ε : orange, ζ : vert, η : cyan , τ : jaune, σ : bleu). (B) Superposition des 7 isoformes sous forme de monomères. Adapté de Obsil et Obsilova 2011 (Obsil and Obsilova 2011)

Les monomères s'assemblent par l'intermédiaire des extrémités N-terminales et forment une structure en forme en coupe. Les sillons présentent des chaînes latérales d'acides aminés

chargés positivement (Lys49, Arg56, Arg127) et des résidus provoquant des interactions hydrophobes (Leu172, Val 176, Leu216, Ile217, Leu220, Leu 227 et Trp 228) qui permettent la liaison et le bon positionnement des ligands (Liu et al. 1995; Xiao et al. 1995; Yaffe et al. 1997; Sluchanko and Gusev 2012) (**Figure 39**). Les homo ou hétérodimères peuvent donc lier 2 motifs simultanément qu'ils proviennent du même partenaire ou de deux partenaires différents (Kostecky et al. 2009; Johnson et al. 2010). Les interactions entre les hélices α procurent une rigidité aux dimères de 14-3-3. Celle-ci permet à la protéine de constituer une plate-forme rigide sur laquelle la cible peut être remodelée alors que la structure de la protéine 14-3-3 n'est que très peu modifiée (Yaffe 2002).

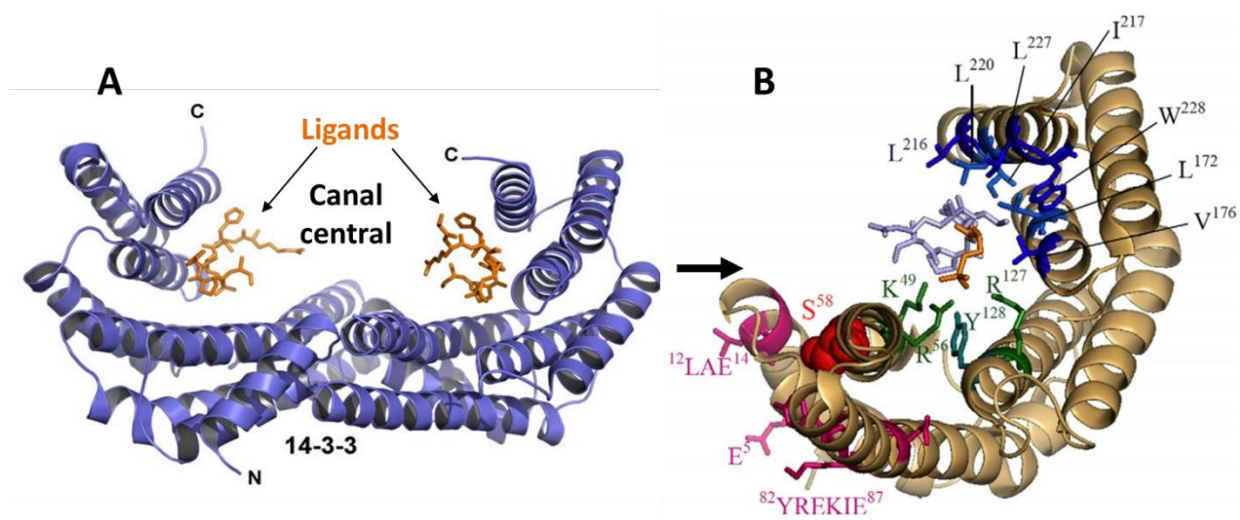


Figure 39 : Dimère de 14-3-3 et la liaison de 2 ligands représenté en structure cristallographique et focus sur les résidus permettant l'interaction entre un ligand phosphorylé et un monomère de 14-3-3 zeta.

Positionnement d'un ligand (sticks violet clair) comportant un résidu phosphosérine (sticks orange) dans le sillon amphipatique d'un monomère de 14-3-3 zeta (rubans beiges).

Adapté de Rezabkova et al. 2012 et Sluchanko et al. 2012 (Rezabkova et al. 2012; Sluchanko and Gusev 2012)

À cause de leurs structures très proches, les isoformes de 14-3-3 ont d'abord été considérées comme potentiellement interchangeables. Cependant, des études utilisant des souris KO spécifiques des 14-3-3 ont montré que ces isoformes possédaient leurs propres spécificités.

Les isoformes de 14-3-3 s'assemblent sous forme d'homo ou hétéro-dimères pour remplir leurs fonctions (Han et al. 2010). La plupart des isoformes forment des hétérodimères, mis à part la forme σ qui nécessite d'être sous forme homodimérique pour remplir ses fonctions (Verdoodt et al. 2006). Les préférences entre isoformes sont liées aux légères variations de

séquences qui conditionnent les interactions entre monomères. Par exemple la protéine 14-3-3 ϵ montre une affinité plus forte pour les autres isoformes que pour elle-même. Cette isoforme présente une plus forte affinité pour l'isoforme γ (Aghazadeh and Papadopoulos 2016). Cela est dû à la présence de plus nombreuses interactions ioniques au niveau de la zone d'interface avec d'autres isoformes qu'avec l'isoforme ϵ (Gardino et al. 2006). Cependant, les monomères de 14-3-3 s'associent en homo ou hétéro-dimères avec les formes disponibles dans leur environnement proche et pas nécessairement avec leurs formes préférées car ces protéines sont plus stables thermodynamiquement sous forme dimérique que monomérique. Certains ligands comme Raf se fixent à la fois à des homo ou hétérodimères de 14-3-3 (Fischer et al. 2009).

Les motifs les plus variables d'une isoforme à l'autre sont distribués sur la partie extérieure de la protéine, c'est-à-dire à l'opposé de la poche formée par les deux sillons. Les régions les plus conservées se situent à l'interface entre les dimères et à l'intérieur des sillons (Liu et al. 1995). Les parties les plus variables se trouvent aux extrémités C-terminales (Obsil and Obsilova 2011) (**Figure 40**). Cette région a des fonctions régulatrices permettant à chaque isoforme de contrôler ses interactions (Visconti et al. 2008). La partie N terminale des monomères est aussi variable entre les isoformes. Ces terminaisons étant nécessaires à la dimérisation, la variabilité conditionnerait les combinaisons entre homo et hétérodimères (Chaudhri et al. 2003; Kligys et al. 2009). Malgré une structure protéique très proche, les différentes isoformes de 14-3-3 sont légèrement différentes compte tenu des angles qui conditionnent la position des monomères.

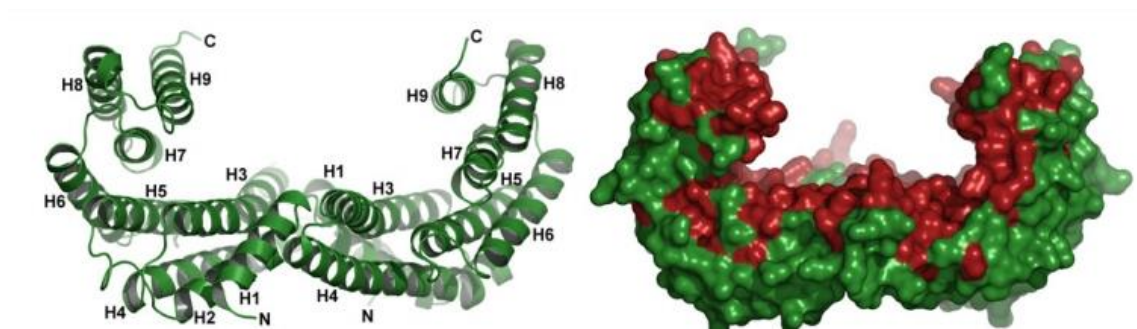


Figure 40 : Structure cristallographique de 14-3-3 zeta

(A) Représentation en ruban (B) Représentation en surface. Les parties conservées entre les 7 isoformes sont représentées en rouge, les parties variables en vert. Adapté de Obsil et Obsilova, 2011 (Liu et al. 1995; Obsil and Obsilova 2011)

4.2 Fonctions intracellulaires

Les protéines 14-3-3 sont des protéines chaperonnes. Leur rôle est de fixer des protéines intracellulaires cibles et de moduler leurs interactions. Elles n'ont pas d'activités enzymatiques propres.

Les protéines 14-3-3 interagissent avec plus de 700 partenaires intracellulaires (Yaffe et al. 1997). Elles sont impliquées dans une multitude de fonctions intracellulaires comme le cycle cellulaire, l'apoptose, la prolifération/différenciation, la survie et le trafic cellulaire. Leurs interactions avec leurs partenaires passent principalement par la reconnaissance de résidus sérines/thréonines phosphorylés présents sur la cible. Les interactions au niveau de ces résidus se font suivant la reconnaissance de certains motifs consensus comme le mode I : RSX(pS/T)XP et le mode II : RXY/FX(pS/T)XP (pS/T: Sérine ou Thréonine phosphorylée, F : Tryptophane, P : Proline, R : Arginine, X : autre acide aminé (non Cystéine) (Muslin et al. 1996; Yaffe et al. 1997). Un 3^{ème} motif a été récemment identifié et permet la liaison entre les protéines 14-3-3 et l'extrémité C-terminale phosphorylée des protéines cibles (Coblitz et al. 2006). Toutefois, les protéines 14-3-3 peuvent également lier certaines molécules indépendamment de sites phosphorylés. C'est le cas pour le facteur p75^N et la toxine Exoenzyme S (Masters et al. 1999; Kimura et al. 2001; Henriksson et al. 2002). Cette dernière est capable d'interagir avec plusieurs isoformes de 14-3-3.

Les protéines 14-3-3 sont impliquées dans de nombreux processus biologiques en tant que molécules chaperonnes. Elles se lient à de nombreux partenaires impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, comme Cdc25 (Peng et al. 1997), p53 (Waterman et al. 1998), CDC2 (Chan et al. 1999); la signalisation intracellulaire : Raf (Fantl et al. 1994), IGF1-R (Craparo et al. 1997), IRS-1 (Ogihara et al. 1997), PI3K (Bonney-Bérard et al. 1995); l'apoptose : Bad et d'autres ligands (Masters and Fu 2001; Masters et al. 2001) la prolifération/différenciation, la survie et le trafic cellulaire.

Les dimères 14-3-3 ont de nombreux rôles intracellulaires liés à leur activité de liaison avec leurs protéines cibles. Les protéines 14-3-3 peuvent réguler les fonctions de leurs partenaires par les procédés suivants (**Figure 41**).

➤ Masquage de site d'interactions sur les protéines partenaires

Les protéines 14-3-3 peuvent altérer les facultés des protéines cibles à interagir avec leurs partenaires. 14-3-3 lie la molécule et l'empêche physiquement de se lier à ces partenaires.

C'est le cas pour IRS-1 qui est fixé par 14-3-3 et qui perd donc sa capacité à recruter et activer PI3K (Ogihara et al. 1997).

- Changement de localisation cellulaire de la protéine cible :

Les protéines 14-3-3 peuvent réguler la localisation cellulaire de leurs partenaires. Cette fonction est réalisée par 2 mécanismes : 14-3-3 peut faciliter l'export de la cible du noyau vers le cytoplasme grâce à une séquence présente sur sa région C-terminale (Lopez-Girona et al. 1999).

- Rapprochement de 2 molécules cibles

Ce rôle de molécule chaperonne permet aux protéines 14-3-3 de lier 2 molécules et leur permettre d'interagir plus facilement.

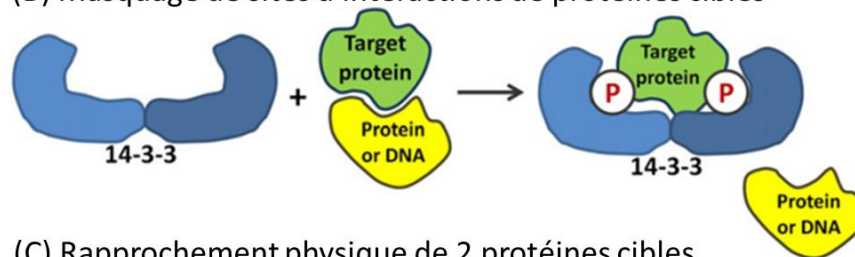
- Protection de la molécule cible contre des changements post-traductionnels

La liaison aux protéines 14-3-3 peut permettre à différentes molécules de subir des modifications post-traductionnelles comme des déphosphorylations. Elles sont protégées par la structure de 14-3-3.

(A) Changement conformationnel de la protéine cible



(B) Masquage de sites d'interactions de protéines cibles



(C) Rapprochement physique de 2 protéines cibles

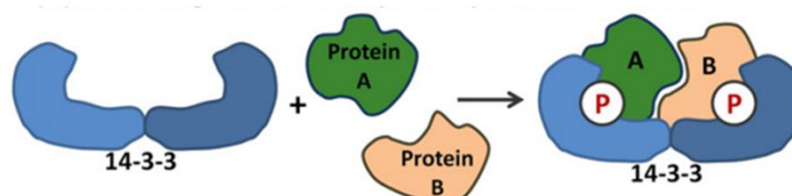


Figure 41 : Exemples de régulation de protéines cibles par un dimère de 14-3-3
Adapté de Obsil et Obsilova 2011 (Obsil and Obsilova 2011)

- Régulation de l'activité des protéines 14-3-3

L'implication des protéines 14-3-3 dans de nombreux mécanismes intracellulaires nécessite une régulation fine de leur activité. Ces régulations passent notamment par la modulation de l'expression d'isoformes spécifiques, la localisation sub-cellulaire des protéines 14-3-3, leur degré de phosphorylation et les spécificités de liaison des partenaires (Fu et al. 2000).

4.3 Les protéines 14-3-3 extracellulaires

4.3.1 Protéines 14-3-3 extracellulaires et implications dans différentes pathologies

La présence des protéines 14-3-3 dans le milieu extracellulaire est impliquée dans de nombreuses pathologies (Kaplan et al. 2017) (**Tableau 6**). La présence de protéines 14-3-3 dans le liquide céphalorachidien (LCR) est corrélée à des maladies neuronales. Certaines isoformes sont associées à des maladies neurodégénératives spécifiques (Foote and Zhou 2012). La maladie d'Alzheimer est caractérisée par la présence de plaques amyloïdes et d'une dégénérescence neuro-fibrillaire qui mènent à des dysfonctions neuronales. Les nœuds neuro-fibrillaires formés sont composés d'agrégats de protéine tau. Plusieurs études ont montré que des protéines 14-3-3 colocalisent avec ces nœuds et pourraient servir de biomarqueur pour cette maladie (Layfield et al. 1996). L'isoforme 14-3-3 γ est retrouvée dans le LCR dans de fortes concentrations chez les patients atteints de la maladie de Creutzfeldt Jakob (Humpel and Benke 2017). Par conséquent cette isoforme est utilisée comme biomarqueur de la maladie (Peoc'h et al. 2001; Van Everbroeck et al. 2005).

La présence de 2 isoformes de 14-3-3 (eta et gamma) a également été observée dans le liquide synovial de patients présentant une inflammation articulaire (Kilani et al. 2007). Une étude plus récente propose 14-3-3 eta comme un nouveau marqueur de la polyarthrite rhumatoïde (Maksymowych et al. 2014b).

La forme 14-3-3 σ est libérée par les kératinocytes et provoque la surexpression de MMP-1 par les fibroblastes du derme par l'intermédiaire, au moins en partie, de la voie de signalisation des MAPK. Cette isoforme est aussi responsable de l'augmentation d'expression des MMP-3, MMP-8, et MMP-10.

Les protéines 14-3-3 extracellulaires sont libérées soit par voie exosomale, soit par des cellules apoptotiques ou subissant un stress (Medina et al. 2007). Certaines isoformes sont capables de se lier à des récepteurs membranaires comme l'isoforme sigma qui se lie au récepteur CD13 et régule l'activité de MMP-1 (Ghaffari et al. 2010).

Isoforme	Activités	Applications cliniques/pré-cliniques
<i>Sigma</i>	Stimulation de MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-10, MT5-MMP Stimulation de la migration des fibroblastes Suppression de l'expression du collagène en complexe avec SARC Diminution de cicatrisation fibrotique et de l'inflammation Liaison à APN (CD13)	Prevention/traitement de la fibrose Traitement des blessures Petites molécules inhibitrices de 14-3-3 : interaction avec APN
<i>Epsilon</i>	Stimulation de MMP-1, MMP-13, MMP-13 Neuro-protection Liaison à APN (CD13) Libération de LRRK2 par exosomes	Agent Neuro-protecteur Cible pour le traitement de l'arthrose
<i>Eta</i>	Stimulation de MMP-1, MMP-9, RANKL, IL1 β , IL-6, TNF α	Biomarqueur et cible dans la PR
<i>Zeta</i>	Stimulation de MMP-1 Induction de phénotypes oncogéniques Suppression of collagen deposition Inhibition de la migration trans-endothéliale des cellules T (PEPITEM fragment) Liaison à la cadherin-15 (PEPITEM)	Biomarqueur pou la maladie de CJD Biomarqueur de neurodégénération et altérations du système nerveux
<i>Beta</i>	Stimulation de MMP-1	Remodelage des voies respiratoires

Tableau 6 : Présentation des activités et application thérapeutiques potentielles des protéines 14-3-3 extracellulaires

Adapté de Kaplan et al. 2017 (Kaplan et al. 2017)

Les protéines 14-3-3 ont été identifiées dans des exosomes libérés par les cellules immunitaires activées (macrophages, lymphocytes T et B, cellules dendritiques et épithéliales) (Théry et al. 2009). Cette découverte suggère que les protéines 14-3-3 extracellulaires puissent se retrouver dans le milieu extracellulaire par libération à partir des exosomes.

4.3.2 14-3-3 epsilon et caractéristiques communes avec les alarmines

Au cours de l'arthrose, l'étanchéité entre le cartilage et l'os disparaît et des structures se mettent en place permettant le passage de molécules d'un tissu à l'autre. 14-3-3 ϵ a été identifiée par le laboratoire comme un médiateur soluble sécrété par les ostéoblastes en réponse à un stress mécanique mimant un phénotype d'arthrose traumatique. La stimulation de cultures de chondrocytes murins par la protéine 14-3-3 ϵ recombinante a provoqué l'augmentation de l'expression et la sécrétion de protéases matricielles et donc l'acquisition d'un phénotype pro-catabolique par les chondrocytes. Par ailleurs il a été montré que 14-3-3 ϵ peut se lier à CD13/APN, récepteur présent à la surface des chondrocytes (Nefla et al. 2015). Ainsi, 14-3-3 ϵ possède à la fois de nombreux rôles intracellulaires en condition physiologique (Carreno et al. 2005; Rivero et al. 2019; Yin et al. 2019; Zhong et al. 2020) mais exerce également des rôles extracellulaires majoritairement impliqués dans des conditions pathologiques. 14-3-3 ϵ présente de nombreuses caractéristiques des alarmines.

Objectifs

L'immunité innée joue un rôle majeur dans l'arthrose. De nombreuses alarmines (DAMPs) sont libérées suite à un stress et activent les récepteurs PRR notamment TLR2 et TLR4 présents à la surface des cellules immunitaires. Celles-ci vont libérer des médiateurs inflammatoires (alarmines, cytokines et chimiokines) qui vont amplifier l'inflammation dans l'articulation.

Le laboratoire a mis en place un modèle de communication os/cartilage mimant le stress mécanique ayant lieu au cours de l'arthrose. Ce modèle a permis d'identifier la protéine 14-3-3 ϵ comme un nouveau médiateur soluble, libéré sous l'effet du stress mécanique et capable d'activer un phénotype catabolique chez les chondrocytes. 14-3-3 ϵ semble donc posséder des caractéristiques communes avec les alarmines.

Nous posons donc l'hypothèse que 14-3-3 ϵ pourrait agir comme une alarmine en induisant une inflammation et un phénotype catabolique chez les des cellules de l'articulation en se fixant aux récepteurs TLR2 et TLR4.

Notre objectif a été de déterminer *in vitro* les effets de la protéine 14-3-3 ϵ sur les chondrocytes et FLS et sa capacité à polariser les macrophages vers un phénotype inflammatoire. TLR2 et TLR4 étant des récepteurs des alarmines et donc potentiellement de 14-3-3, nous avons étudié leur implication sur les effets de 14-3-3 ϵ chez des chondrocytes et macrophages grâce à 2 approches : l'inhibition pharmacologique ou l'utilisation de cellules KO pour ces récepteurs (*résultats soumis*). Au cours de cette étude s'est posée la question de l'effet possible d'une contamination par des endotoxines présentes dans les lots de notre protéine recombinante. Nous avons utilisé un antibiotique (la polymyxineB), inhibiteur du LPS pour caractériser l'effet propre de notre protéine.

Nous avons également réalisé un travail de modélisation informatique *in silico* de l'interaction de 14-3-3 ϵ avec TLR2 dans le but d'identifier la zone d'interaction entre ces deux partenaires (*résultats non soumis*).

Enfin, par une approche *in vivo*, nous avons réalisé des injections intra-articulaires de la protéine 14-3-3 ϵ dans la cavité articulaire de genoux de souris C67BL6 afin de déterminer si la protéine est capable d'induire à elle seule une dégradation du cartilage et/ou une inflammation de la membrane synoviale (*résultats non soumis*).

Résultats

1. Etude des effets de 14-3-3 ϵ sur les différents tissus de l'articulation et de son interaction avec les récepteurs TLR2 et TLR4

1.1 Principaux résultats soumis

L'immunité innée joue un rôle majeur dans l'arthrose. Au cours de la maladie, les alarmines (DAMPs) sont libérées par les cellules de l'immunité et des tissus affectés et activent l'inflammation. 14-3-3 ϵ , un nouveau médiateur soluble identifié par le laboratoire présente de nombreuses caractéristiques avec ces molécules de danger. Cette protéine est libérée par les ostéoblastes dans le milieu extracellulaire sous l'effet d'un stress mécanique pathologique. Des premières études ont montré que la présence de 14-3-3 ϵ extracellulaire pouvait stimuler la production de métalloprotéases (MMP3 et MMP13) par les chondrocytes murins (Priam et al. 2013).

Dans cette étude, les effets de 14-3-3 ϵ sur les différents types cellulaires de l'articulation sont étudiés dans le but de déterminer si cette protéine a les mêmes effets pro-inflammatoires que les alarmines. Des explants de membrane synoviale humaine sont obtenus à partir de prélèvements de patients subissant une pose de prothèse totale de genou (**Figure 42**). Des cultures primaires de FLS sont réalisées à partir de ces explants. Des cultures de macrophages humains sont effectuées grâce à une lignée de monocyte THP1 différenciés en macrophages par le facteur M-CSF.

Des cultures primaires de chondrocytes murins sont obtenues à partir de genoux et têtes fémorales de souris C57BL6 WT de 5 jours.

Après environ une semaine de culture pour chaque type cellulaire, les cellules et explants sont stimulés par la protéine 14-3-3 ϵ recombinante durant 24h. Les milieux conditionnés sont récupérés, les cellules sont lysées et les ARNm sont extraits. L'expression génique et la sécrétion protéique de différents gènes sont étudiées par RT-qPCR et ELISA.

- La stimulation d'explants de membrane synoviale humaine issue de patients arthrosiques, composés majoritairement de FLS et de macrophages, par la protéine 14-3-3 ϵ durant 24h est capable d'induire la libération de facteurs pro-inflammatoires dans les milieux (augmentation de la sécrétion de MCP1 et IL6).

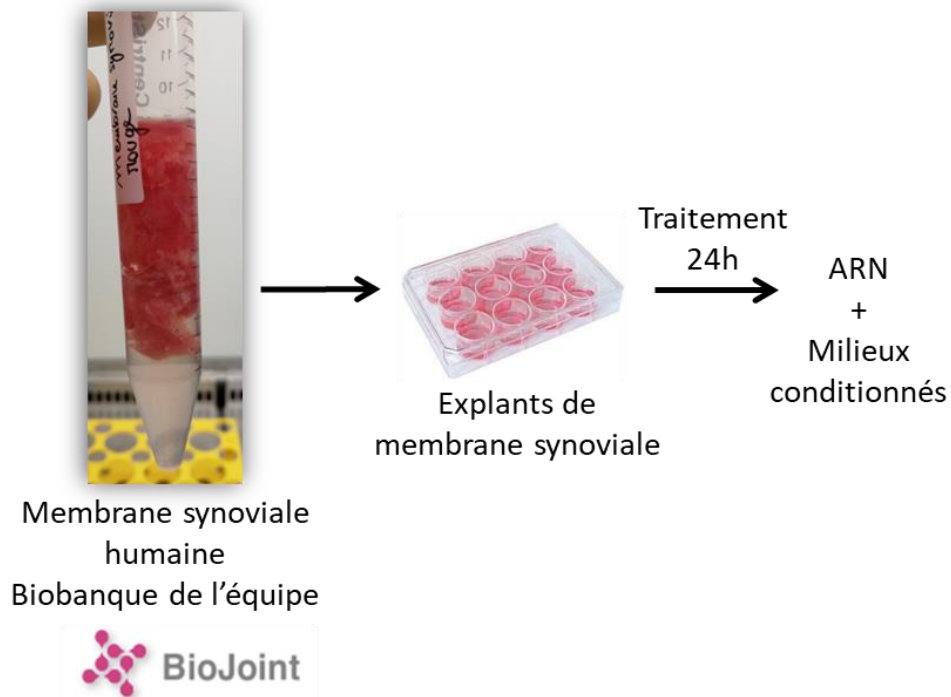


Figure 42 : Stimulation d'explants de membrane synoviale humaine (biobanque Biojoint)

Pour étudier l'implication des macrophages ou des FLS dans cette réponse, des cultures de FLS (**Figure 43**) et de macrophages humains sont stimulées séparément par la 14-3-3ε recombinante. Les FLS sont obtenues après digestion enzymatique des prélèvements de membrane synoviale humaine (biobanque Biojoint) et incubation jusqu'à confluence (Eymard et al. 2014).

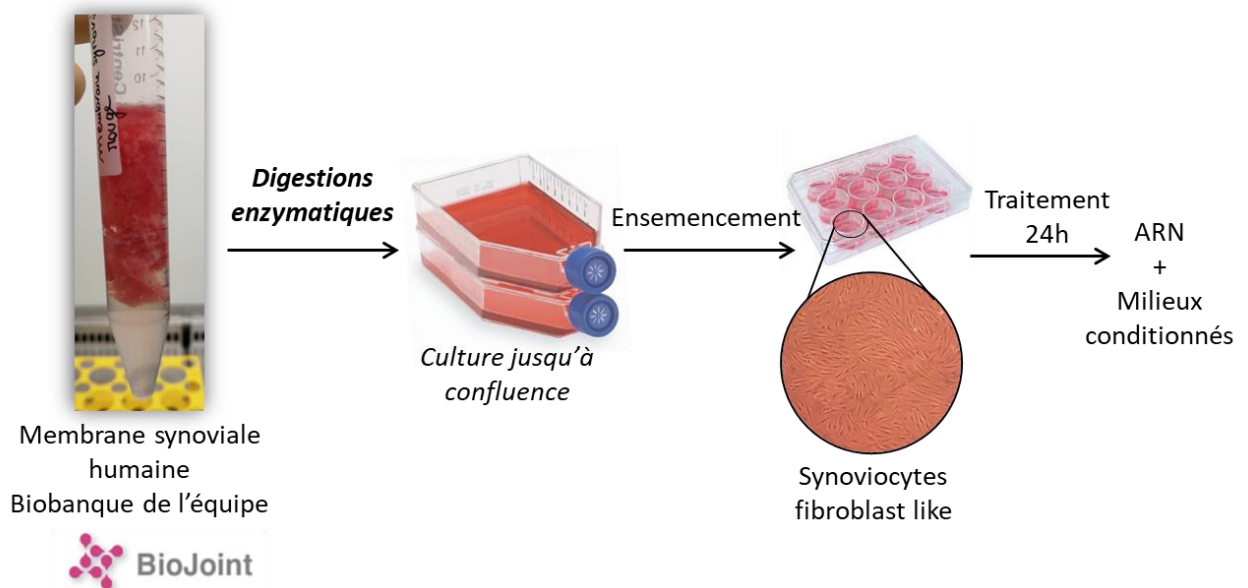


Figure 43 : Culture primaire de synoviocytes fibroblast like (FLS)

Les cultures de macrophages sont obtenues par différenciation d'une lignée de monocytes humains THP1 fourni par l'équipe du Pr M. Ruiz (Jussieu, Sorbonne Université).

- Les FLS isolés à partir d'explants de membrane synoviale stimulés par 14-3-3ε augmentent significativement l'expression génique et la sécrétion protéique d'IL6 et MCP1.
- La stimulation de cultures de macrophages (issus d'une lignée THP1) par 14-3-3ε provoque un changement de phénotype. Les macrophages humains stimulés sécrètent des facteurs pro-inflammatoires (IL6, MCP1 et TNFα) comparés à ceux non stimulés. Par ailleurs les expressions en ARNm d'IL6, MCP1 et le marqueur pro-inflammatoire CD38 sont également augmentées chez les macrophages stimulés.

Pour rappel, la protéine 14-3-3ε est sécrétée par les ostéoblastes sous l'effet d'un stress mécanique et a montré des effets pro-cataboliques sur les chondrocytes articulaires (Priam et al. 2013). Dans cette étude, nous montrons que 14-3-3ε a également des effets pro-inflammatoires sur les types cellulaires (FLS et les macrophages) présents dans la membrane synoviale.

Afin d'étudier l'implication des récepteurs TLR2 et TLR4 dans l'effet pro-inflammatoire de 14-3-3ε, des cultures primaires de macrophages (Bone marrow macrophages : BMM) provenant de souris adultes WT, TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} sont réalisées (**Figure 44**). Ces souris déficientes pour TLR2 ou TLR4 ont été fournies par l'équipe du Pr F. Pène (Institut Cochin) et proviennent à l'origine de l'équipe de S. Akira (Osaka University, Osaka, Japan) (Hoshino et al. 1999; Takeuchi et al. 1999). Les macrophages sont obtenus à partir de moelle osseuse de souris. La moelle est flushée avec une seringue remplie de PBS et centrifugée. Les précurseurs monocytaires présents dans la moelle sont ensuite différenciés en macrophages grâce à un facteur, le macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) durant 1 semaine. Les macrophages obtenus sont ensuite stimulés par 14-3-3ε durant 24h (Weischenfeldt and Porse 2008; Manzanero 2012).

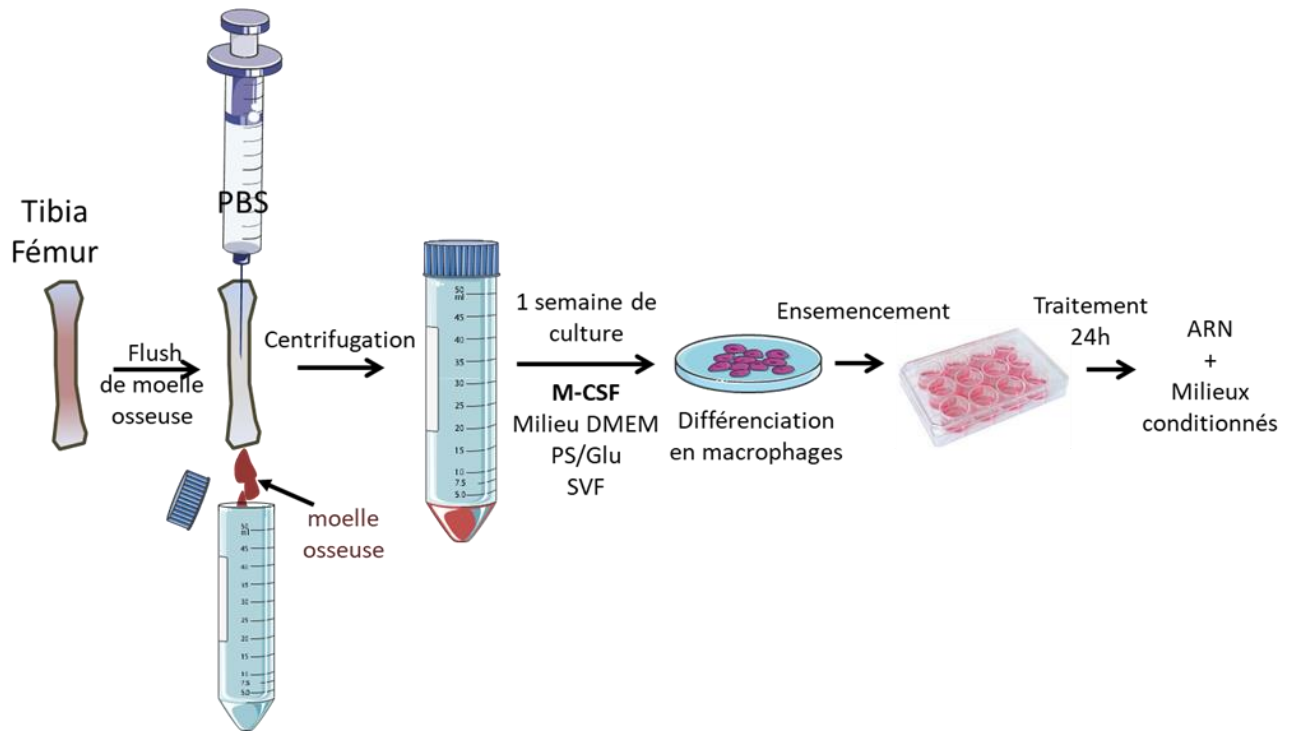


Figure 44 : Culture primaire de macrophages issus de moelle osseuse murine (technique de flush)

Les souris TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} sont également utilisées pour réaliser des cultures primaires de chondrocytes KO (**Figure 45**).

De plus, des cultures primaires de chondrocytes murins WT sont pré-traitées par des anticorps bloquant dirigés contre TLR2 ou TLR4 ou par un inhibiteur spécifique des 2 récepteurs, OxPAPC (Oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). Ces cultures sont ensuite stimulées par 14-3-3ε durant 24h.

Souriceau de 5 jours

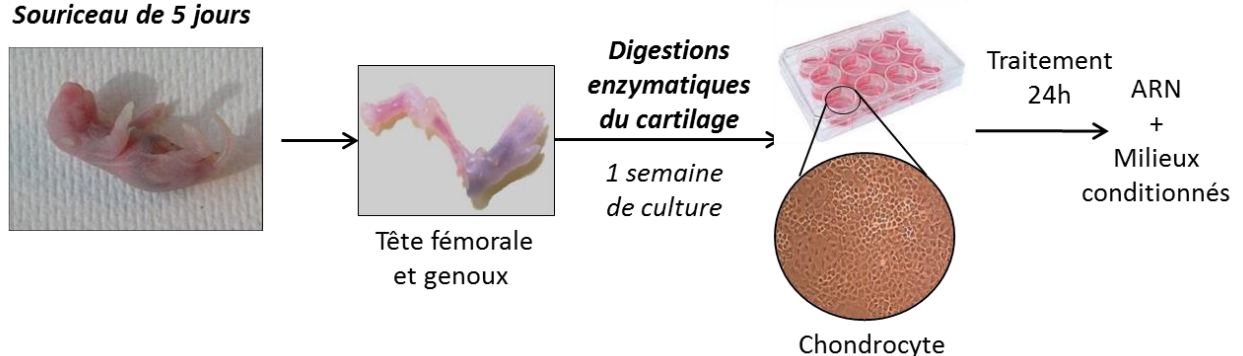


Figure 45 : Culture primaire de chondrocytes murins

- Les cultures de macrophages contrôles (WT), TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} non stimulées ne produisent pas de facteurs inflammatoires. En revanche, la stimulation par 14-3-3ε augmente significativement la production d'IL6 et MCP1 par les macrophages contrôles. Comparé à ces derniers, les macrophages TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} libèrent significativement moins d'IL6 et MCP1. La perte de l'effet inflammatoire de 14-3-3ε est plus importante chez les macrophages TLR4^{-/-} que les macrophages TLR2^{-/-}.

- Les mêmes résultats sont observés chez les chondrocytes TLR2^{-/-} et TLR4^{-/-}. L'expression de IL6, MMP3 et MMP13 et la sécrétion d'IL6 des chondrocytes TLR2^{-/-} et TLR4^{-/-} en réponse à 14-3-3ε est significativement réduite comparée aux chondrocytes contrôles. La perte de l'effet inflammatoire et catabolique de 14-3-3ε est plus importante chez les macrophages TLR4^{-/-} que les macrophages TLR2^{-/-}.

- L'inhibition des récepteurs TLR2 et TLR4 par anticorps bloquants spécifiques ou par l'inhibiteur pharmacologique OxPAPC (inhibant les deux à la fois) diminue drastiquement la libération protéique et l'expression en ARNm d'IL6 et de MMP3 par les chondrocytes murins en réponse à 14-3-3ε.

La protéine 14-3-3ε a donc des effets pro-inflammatoires et pro-cataboliques sur les différents types cellulaires de l'articulation. Ces effets impliquent les récepteurs de l'immunité TLR2 et TLR4. Ces nouvelles caractéristiques de 14-3-3ε extracellulaire s'ajoutent à celles déjà connues et permettent de définir la protéine 14-3-3ε comme une nouvelle alarmine impliquée dans l'arthrose.

1.2 Article soumis à Osteoarthritis and Cartilage (Minor Revision)

Article :

“Activation of innate immunity by 14-3-3 ϵ , a new potential alarmin in osteoarthritis”

Soumis à *Osteoarthritis & Cartilage*, 2019

Auteurs : M. Millerand, L. Sudre, M. Nefla, F. Pène,
C. Rousseau, A. Pons, A. Ravat, G. Andre-Leroux,
S. Akira, T. Satoh, F. Berenbaum, C. Jacques

ACTIVATION OF INNATE IMMUNITY BY 14-3-3 ϵ , A NEW POTENTIAL ALARMIN IN OSTEOARTHRITIS

Marion MILLERAND⁽¹⁾, Laure SUDRE⁽¹⁾, Meriam NEFLA⁽¹⁾, Frédéric PÈNE⁽²⁾,
Christophe ROUSSEAU⁽²⁾, Anna PONS⁽¹⁾, Arnaud RAVAT⁽¹⁾, Gwenaëlle ANDRE-
LEROUX⁽³⁾, Shizuo Akira⁽⁵⁾, Takashi Satoh⁽⁵⁾, Francis BERENBAUM^(1,4) and Claire
JACQUES⁽¹⁾

(1) Sorbonne Université, INSERM (UMR S938) and Labex Transimmunom, Paris,
France

(2) Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Paris, France ; Université
Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris France

(3) MaIAGE, INRA, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

(4) Sorbonne Université, Department of Rheumatology, AP-HP, Hôpital Saint-
Antoine, and Labex Transimmunom, Paris, France

(5) Laboratory of Host Defense, WPI Immunology Frontier Research Center (IFReC),
Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

Address correspondence to:

Dr. F. Berenbaum: UMR_S938, CDR Saint-Antoine - INSERM - Sorbonne Université,
184 Rue du Faubourg Saint-Antoine - 75012 Paris, France.

Tel : +33 149-28-25-20, Fax: +33 149-28-25-13

E-mail: francis.berenbaum@sat.aphp.fr

Abstract

Objective: The innate immune system plays a central role in osteoarthritis (OA). We identified 14-3-3 ϵ as a novel mediator that guides chondrocytes toward an inflammatory phenotype. 14-3-3 ϵ shares common characteristics with alarmins. These endogenous molecules, released into extracellular media, are increasingly incriminated in sustaining OA inflammation. Alarmins bind mainly to TLR2 and TLR4 receptors and polarize macrophages in the synovium. We investigated the effects of 14-3-3 ϵ in the joint and its interactions with TLRs to define it as a new alarmin involved in OA.

Design: Chondrocyte, synoviocyte and macrophage cultures from murine or OA human samples were treated with 14-3-3 ϵ . To inhibit TLR2/4 in chondrocytes, blocking antibodies were used. Moreover, chondrocytes and bone marrow macrophage (BMM) cultures from KO TLRs mice were stimulated with 14-3-3 ϵ . Gene expression and release of inflammatory mediators (IL-6, MCP-1, TNF α) were evaluated via RT-qPCR and ELISA.

Results: *In vitro*, 14-3-3 ϵ induced gene expression and release of IL6 and MCP1 in the treated cells. The inflammatory effects of 14-3-3 ϵ were significantly reduced following TLRs inhibition or in TLRs KO chondrocytes and BMM.

Conclusions: 14-3-3 ϵ is able to induce an inflammatory phenotype in synoviocytes, macrophages and chondrocytes in addition to polarizing macrophages. These effects seem to involve TLR2 or TLR4 to trigger innate immunity. Our results designate 14-3-3 ϵ as a novel alarmin in OA and as a new target either for therapeutic and/or prognostic purposes.

Keywords : 14-3-3 ϵ , alarmin, osteoarthritis, Innate immunity, TLR, synovitis

Running headline : 14-3-3 ϵ : a new alarmin in osteoarthritis

Abbreviations

BMM: bone marrow derived macrophages

BSA: bovine serum albumin

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

DAMP: damage-associated molecular pattern

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

FBS: fetal bovine serum

FLS: Fibroblast-like synoviocyte

Glu: glutamine

H&E: Hematoxylin and eosin

HPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase

IL : interleukin

KO: Knockout

LPS: lipopolysaccharides

mAB: monoclonal antibody

MCP1 : monocyte chemoattractant protein-1

MMP: matrix metalloproteinases

mRNA: messenger ribonucleic acid

OA: osteoarthritis

OxPAPC: Oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

PBS: phosphate buffered saline

PRRs: pattern-recognition receptors

PS: penicillin/streptomycin

RA: rheumatoid arthritis

RNA: ribonucleic acid

RT-PCR: real-time polymerase chain reaction

TLR: toll like receptor

TNF α : Tumor necrosis factor alpha

WT: wild-type

Introduction

Osteoarthritis (OA) is a highly complex and the most prevalent joint disorder with a total of 242 million people affected worldwide(2015). Clinical symptoms include severe pain, joint stiffness and reduced function, which seriously decrease quality of life(Felson 2006). Unfortunately, only a few drugs are weakly effective for treating symptoms, and no disease-modifying osteoarthritis drugs (DMOADs) are available to date. Initially considered cartilage driven, OA is a much more complex disease with inflammatory mediators released by cartilage, bone and synovium(Hügle and Geurts 2017). Increasing evidence suggests that inflammation is present in OA and has raised the possibility that inflammation and the innate immune system could be active players in the development and progression of OA (Berenbaum 2013; Herrero-Beaumont et al. 2019). Innate immune responses involve the activation of resident leukocytes such as macrophages, production of inflammatory mediators (cytokines, chemokines, and lipid metabolites), recruitment of neutrophils and monocytes/macrophages, and aims to eliminate invading microorganisms and injured tissues(Chen and Nuñez 2010). Histopathological studies have confirmed that immune cell infiltration is extremely common in OA histological specimens(Furman et al. 2015). The innate immune system participates in inflammation triggered by host molecules or fragments collectively called DAMPS (danger-associated molecular patterns) or alarmins (Oppenheim and Yang 2005; Chen and Nuñez 2010; Nefla et al. 2016).

The term “alarmin” was proposed by Oppenheim and co-workers in 2005 to classify proteins that are rapidly released during infection or tissue damage, activating immune cells after interaction with their specific receptors(Oppenheim and

Yang 2005). Alarmins are now considered to be markers of destructive processes in joints(Liu-Bryan and Terkeltaub 2015). Because of their fast release as a result of cell stressor nonprogrammed cell death, alarmins are among the first factors to be secreted and, as such, act as first responders to stimuli. In addition to their role in disease initiation, alarmins also amplify and sustain inflammatory processes and, thus, play a notable role in the pathogenesis of inflammatory conditions(Manfredi et al. 2009; Tamaki et al. 2011). A number of alarmins have been detected at high levels in OA tissues and synovial fluid, including HMGB1, UA, ATP, thymosin β 4 and various S100 proteins, enhancing catabolic processes and inflammatory responses that contribute to disease progression(Sunahori et al. 2006; Wang et al. 2013a; Ke et al. 2015; Nefla et al. 2016).

Synovitis, the inflammation of the synovium, can occur in early stages of OA(Sellam and Berenbaum 2010). OA synovitis directly contributes to several clinical signs and symptoms including joint swelling and effusion, and reflects the structural progression of the disease(Sellam and Berenbaum 2010; Loeser et al. 2012a). Moreover, synovitis is significantly associated with OA severity(Raghu et al. 2017). Macrophages are the main immune cell type in the healthy synovium and are likely the front-line cells that sense joint damage. These cells also contribute to OA progression in response to alarmins by producing MMPs and cytokines(Bondeson et al. 2010). The main morphological characteristic of synovitis is macrophage accumulation in the intimal lining(Daghestani et al. 2015). Macrophages are characterized by heterogeneity and plasticity in response to stimuli from their microenvironment, leading to a continuum of phenotypes where M1/M2 are the 2 extremes (Sica and Mantovani 2012). M1 macrophages are activated by interferon- γ

and lipopolysaccharide (LPS) or tumor necrosis factor alpha (TNF- α), resulting in the secretion of large amounts of proinflammatory cytokines and mediators such as TNF- α , interleukin (IL)-1 and IL-6(Lopa et al. 2015). M2 macrophages have been further divided into specific subtypes and possess anti-inflammatory activity(Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Studies have shown that macrophages accumulate and become polarized (M1 or M2) in the synovium during OA development (Manferdini et al. 2017). However, the role of macrophages, their polarization in OA development and the underlying mechanisms are still unknown.

Activated synovial cells (synoviocytes or macrophages) secrete several degenerative enzymes and inflammatory mediators, as well as alarmins(Sunahori et al. 2006; van Lent et al. 2012). These alarmins activate pattern-recognition receptors (PRRs) including TLRs (toll-like receptor) in the OA-affected cartilage and synovium(Liu-Bryan and Terkeltaub 2012; Loeser et al. 2012a), which in turn amplifies inflammation and degeneration of cartilage. TLRs are transmembrane receptors that display binding affinity for a variety of DAMPs. According to their ligands, location and signaling pathways, ten different genes can be distinguished in humans(Liu-Bryan 2013). TLRs activate signaling pathways that result in the production of cytokines, chemokines, and various inducible molecules associated with the immune response. TLR2 and TLR4 are overexpressed in OA cartilage, and their presence correlates with histopathological damage(Kim et al. 2006; Bobacz et al. 2007).

Our team identified 14-3-3 ϵ as a novel soluble mediator that is critical in the communication between subchondral bone and cartilage in OA(Priam et al. 2013). The 14-3-3 proteins, a family of seven isoforms (β , ϵ , γ , η , θ , σ , ξ), are involved in a wide range of vital regulatory processes by binding to more than 200 intracellular

proteins(Sun et al. 2009). Under normal conditions, these proteins reside intracellularly; however, some reports indicate its presence extracellularly. Externalization of 14-3-3 appears to be mediated by a non-classical pathway, similar to IL1- β , due to the absence of a signal peptide sequence(Nickel 2003). 14-3-3 proteins are released into the extracellular space through an exosomal pathway(Chavez- Muñoz et al. 2008). Extracellular 14-3-3s are now thought to play an important role in the pathogenesis of certain inflammatory conditions. In OA, our team showed that 14-3-3 ϵ , released by osteoblasts in response to mechanical stress, skews chondrocytes toward a pro-catabolic phenotype by strongly inducing the expression of MMPs in an CD13/APN-dependent manner(Priam et al. 2013; Nefla et al. 2015). 14-3-3 ϵ seems to share common characteristics with other alarmins (such as ATP and thymosin β 4) in inducing degradation of the cartilage matrix(Nefla et al. 2016). Extracellular 14-3-3 ϵ proteins could, therefore, be classified as alarmins that are derived from activated or damaged osteoblasts.

Our aim is to investigate the effects of 14-3-3 ϵ on the different cell types of the joint and its role in the activation of innate immunity by studying interactions with its potential receptors TLR2 and TLR4.

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 TM and complete protease inhibitor mixture were from Roche Diagnostics (Meylan, France). Recombinant human 14-3-3 ϵ was from Enzo Life Sciences. Anti-TLR2 antibody and OXPAPc (oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) were from InvivoGen (Toulouse, France). Anti-TLR4 antibody was from Santa Cruz Technology (Heidelberg, Germany).

Collection of human OA synovium

Human OA knee explants were obtained from patients undergoing total knee arthroplasty due to OA at Saint-Antoine Hospital (Paris) or at the Maussins clinic (Paris) (BioJOINT, a biobank of OA human knee , legal authorization: CPP Paris Ile de France V, CNIL reference: MMS/ HGT/AR177404). Informed consent for the use of tissue and clinical data was obtained from each patient before surgery. Experiments with human samples were approved by a French Institutional Review Board (Comité de Protection des Personnes, Paris Ile de France V and Commission Nationale de Informatique et des Libertés).

Mice

Mice on a C57BL/6 J background, 8–12 weeks old, were used in all experiments. Wild-type (WT) mice were purchased from Janvier Laboratories. The animal housing facility was granted approval (C 75-12-01) by the French Administration. All experiments were conducted according to the European Communities Council

Directive (2010/63/UE) and approved by the Regional Animal Care and Use Committee (Ile-de-France, Paris, n°5; agreement number 00917.02 and 4625).

Tlr2^{-/-}, and *Tlr4*^{-/-} mice were kind gifts from Professor Shizuo Akira (Osaka University, Japan) and with the collaboration of Professor F. Pene (Institut Cochin, France). All knockout (KO) were maintained in the specific pathogen-free (SPF) animal facility of the Cochin Institute.

Cell cultures

Detailed protocols are described in supplemental data and (35).

Synovial explants and fibroblasts: For explants, synovium from OA patients was cut into small pieces aseptically and incubate in 24-well plate before treatment. For synovial fibroblasts, synovial tissue samples from OA patients were digested, cultured in 6-well plate until cell confluence.

Primary culture of murine articular chondrocytes: Mouse primary chondrocytes were isolated from the articular cartilage of 5 to 6-day-old C57Bl6 mice from Janvier (St. Berthevin, France). All experiments were performed according to protocols approved by the French and European ethics committees (Comité Régional d'Ethique en Expérimentation Animale N°3 de la région Ile de France). Each littermate among the mice was used for one experiment. After 1 week, the cells were incubated in fasting medium for 24h before treatment.

In addition, experiments were also performed using *TLR2*^{-/-} and *TLR4*^{-/-} mice.

Primary culture of murine bone marrow mononuclear (BMM) cells: Bone marrow mononuclear (BMM) phagocytic precursor cells were isolated from femurs and tibiae of *WT* and *TLR2*^{-/-} and *TLR4*^{-/-} mice. These precursors were differentiated into

adherent mature macrophages (BMM) for 7 days in complete medium containing 10 ng/mL of macrophage colony stimulating factor (PeproTech, Neuilly-sur-Seine, France).

Culture of the THP-1 cell line: Human monocytic THP1 cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) were kind gifts from Professor Rouis (Sorbonne University, France). Cells were routinely grown to a primary macrophage culture following differentiation from monocytes with a 24h treatment with Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (50 nM) PMA, Sigma, Saint-Louis, USA). After 72h, the macrophages were starved before treatment.

Treatment by recombinant 14-3-3ε: All cell cultures were stimulated with recombinant 14-3-3ε at 1 µg/ml for 24h. Supernatants and total mRNA collected after cell lysis were harvested and stored at -80°C.

For blocking antibody and pharmacological experiments, murine articular chondrocytes were pretreated for 20 minutes with increasing concentrations (1 and 5 µg/ml) of a mouse TLR2 or TLR4 antibody or oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (OxPAPC) at 0.3, 3 and 30 µg/ml before the treatment by recombinant 14-3-3ε.

RNA extraction and quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from murine chondrocytes using the ReliaPrep RNA Cell Miniprep System kit (Promega, Madison, WI, USA) from human synovial fibroblasts, BMM and THP1 by Trizol chloroform. Concentrations were determined by spectrophotometry (Eppendorf, Le Pecq, France). Reverse transcription was performed with 500 ng of total RNA with the Omniscript RT kit (Qiagen). mRNA levels were quantified with the Light Cycler LC480 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN,

USA). PCR amplification conditions are described in supplemental data. Product formation was detected at 72°C in the fluorescein isothiocyanate channel. The mRNA levels were normalized to those of murine HPRT or Human 18S. Specific primer sequences are presented in Table S1.

Protein secretion quantification by ELISA

Total mouse and human IL6, MCP1, TNF α , MMP-3 and 14-3-3 ϵ secretion were assayed in cell-free supernatants using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems and Abxbexa) according to the manufacturer's instructions. Concentrations were analyzed in duplicate at serial dilutions and determined by comparison against a standard curve.

Endotoxin tests:

Protocol of the experiments is described in supplemental data

Statistical Analysis

Data are expressed as the mean \pm s.e.m fold induction compared to control (set to 1) unless stated otherwise. Statistical analysis was performed with the Mann Whitney test to compare mean values between 2 groups. One way analysis of variance (ANOVA) and two way ANOVA with the Bonferroni multiple comparisons test were used to compare mean values using GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA). $P < 0.05$ was considered statistically significant. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns: not significant.

Results

Stimulation of synovium explants from OA patients by 14-3-3 ϵ elicits the release of pro-inflammatory factors.

To verify whether 14-3-3 ϵ is able to induce synovium inflammation in humans, we used synovium explants from OA patients to mimic the pathophysiological environment as closely as possible. Stimulation of these human synovium explants with recombinant 14-3-3 ϵ (1 μ g/ml) induced the secretion of MCP1 and IL6 protein (Fig. 1A, B). Indeed, the release of IL6 induced by 14-3-3 ϵ was significantly higher than those in controls (5.7-fold increase) (Fig. 1A). The level of MCP1 secretion was also significantly increased in supernatants of 14-3-3 ϵ -treated explants compared with the control (9.6-fold increase) (Fig. 1B).

14-3-3 ϵ elicits a pro-inflammatory phenotype in fibroblast-like synoviocytes (FLS).

To more precisely study the impact of 14-3-3 ϵ on the two main cell types residing in the synovium, FLS and macrophages, we stimulated primary cultures of FLS from OA patients with 14-3-3 ϵ recombinant protein (1 μ g/ml) for 24h. The levels of IL-6 and MCP1 in controls samples are below the detection threshold. We found that stimulated synoviocytes had increased mRNA expression and secretion of both IL6 and MCP1 (Fig. 2 A-D). IL6 mRNA expression showed a fold increase of 7.5 between control and 14-3-3 ϵ stimulation and MCP1 mRNA expression fold increase was 4.4 superior compared to control (Fig. 2A, B). Protein secretion of IL6 and MCP1 showed a fold increase of 4.3 and 32 respectively (Fig. 2C, D).

14-3-3 ϵ skews macrophages toward a pro-inflammatory phenotype involving Toll-like receptors signaling.

Stimulation of human macrophages derived from the THP1 cell line with 14-3-3 ϵ induced mRNA expression and secretion of both IL6 and MCP1 (Fig. 3A, B, D, E). The mRNA expression levels of IL6 and MCP1 showed a fold increase of 7.2 and 3.1 respectively compared with the controls. Similarly, the release of IL6, MCP1 and TNF α protein was increased in the supernatants of macrophages stimulated with 14-3-3, showing a fold increase of 17.8, 18.9 and 15.1 respectively (Fig. 3D, E, F). Moreover, macrophages subjected to 14-3-3 ϵ stimulation displayed increased mRNA expression of CD38 (6.1-fold increase) (Fig. 3C), another marker associated with the M1 pro-inflammatory phenotype.

To assess the implications of TLR2 and TLR4 in the cellular response to 14-3-3 ϵ , we used primary cultures of bone marrow macrophages (BMM) from TLR2 or TLR4 KO mice and stimulated them with recombinant 14-3-3 ϵ . Levels of IL6 and MCP1 levels of protein release showed no differences between unstimulated cells either for WT or TLR2 KO or TLR4 KO BMM, whereas IL-6 level was significantly decreased in the supernatants of TLR2 and TLR4 KO BMM treated with 14-3-3 ϵ compared with the WT BMM (Fig. 4). The 14-3-3 ϵ induction of IL6 protein release was greatly attenuated in TLR4 KO BMM supernatants (by 83%) compared with WT BMM and there is a tendency to a lesser extent for MCP1 (70% inhibition) (Fig. 4A, B). KO TLR2 BMM also showed decreased levels of IL6 and MCP1 protein release (by 64%) (Fig. 4A, B).

14-3-3 ϵ elicits a catabolic and inflammatory phenotype in murine articular chondrocytes involving TLR2 and TLR4.

Murine chondrocytes were sensible to stimulation with 14-3-3 ϵ recombinant protein and showed increased mRNA expression and secretion of pro-catabolic (MMP3) and pro-inflammatory (IL6) factors.

To confirm the involvement of TLR2 and TLR4 in 14-3-3 ϵ signaling, murine articular chondrocytes were pre-treated with specific TLR2, TLR4 blocking antibody or the pharmacologic inhibitor (OxPAPC) inhibiting both receptors followed by 14-3-3 ϵ stimulation. MMP3 mRNA expression and protein secretion induced by 14-3-3 ϵ were significantly and dose-dependently reduced by TLR4 blocking antibody treatment (MMP3 mRNA expression inhibition fold: 78% (1 μ g/ml), 77% (5 μ g/ml) (Fig. 5A); secretion: 69% (1 μ g/ml), 84% (5 μ g/ml) (Fig. 5D)). Anti-TLR2 blocking antibody reproduced the same pattern (mRNA expression: 79% (1 μ g/ml), 83% (5 μ g/ml) (Fig. 5B); secretion 73% (1 μ g/ml), 74% (5 μ g/ml) (Fig. 5E)). Furthermore, the pharmacologic inhibitor OxPAPC, inhibiting both receptors, markedly decreased MMP3 mRNA expression and protein release in a dose-dependent manner (mRNA expression: from 71% (0.3 μ g/ml) to 98% (30 μ g/ml) (Fig. 5C); secretion: from 64% (0.3 μ g/ml) to 96% (30 μ g/ml) (Fig. 5F)).

Inhibition of TLR2 and/or TLR4 also impacted the mRNA and protein expression of the pro-inflammatory cytokine IL6 by murine chondrocytes. (IL6 mRNA expression: anti-TLR4 treatment: 73% (1 μ g/ml) and 71% (5 μ g/ml) (Fig. 5G), secretion: 79% (1 μ g/ml) and 81% (5 μ g/ml) (Fig. 5J); anti-TLR2 treatment: IL6 mRNA expression 53% (1 μ g/ml) and 51% (5 μ g/ml) (Fig. 5H); secretion 69% (1 μ g/ml) and 78% (5 μ g/ml) (Fig. 5K)). Inhibiting both receptors simultaneously with OxPAPC resulted in decreases IL6 expression and secretion (IL6 mRNA expression: from 69% (0.3

µg/ml) to 92% (30 µg/ml) (Fig. 5I); secretion: from 69% (0.3 µg/ml) to 96% (30 µg/ml) (Fig. 5L)).

To confirm the results obtained in KO BMM, we also stimulated TLR2 or TLR4 KO murine articular chondrocytes with 14-3-3ε. TLR2 and TLR4 KO murine chondrocytes exhibited decreased mRNA expression and protein release of IL6 but also mRNA expression of MMP3 and MMP13 compared to wt chondrocytes (Fig. 6). IL6 mRNA expression was significantly decreased in TLR2 (by 75%) and TLR4 (by 97%) KO chondrocytes (Fig. 6B), and its release was greatly attenuated in TLR2 (by 77%) and TLR4 (by 97%) KO chondrocytes in response to 14-3-3ε stimulation (Fig. 6A). Similarly, MMP3 and MMP13 mRNA expression levels were also decreased in TLR2 (by 60% and 22% respectively) or TLR4 (by 94% and 77% respectively) KO chondrocytes (Fig. 6C and 6D); Taken together, these results demonstrate the involvement of both TLR2 and TLR4 receptors in 14-3-3ε signaling.

Discussion

We have recently identified 14-3-3ε as a new soluble mediator involved in deleterious biochemical interactions between bone and cartilage (Priam et al. 2013).

In the present study, we showed that 14-3-3ε is a new alarmin and can act particularly in the synovium during OA pathogenesis. Its role in the activation of innate immunity leading to synovitis could be due to interactions with its potential receptors, TLR2 and TLR4.

It is now established that up to 50% of OA patients have synovitis, as demonstrated by magnetic resonance imaging, ultrasonography and arthroscopy³⁶.

Based on these results and to study the involvement of 14-3-3ε in the synovium of the OA joint, we analyzed the effects of 14-3-3ε on whole synovial tissue explants from OA patients by measuring the release of pro-inflammatory factors. We found that IL6 and MCP1 release in culture media was significantly increased after 14-3-3ε stimulation compared with the control explants. In these complete synovial explants from OA patients, the pathophysiological environment was conserved. There was obvious heterogeneity in the degree of inflammation of the synovium between patient samples, which could be due to the different pathological mechanisms leading to OA among patients^{37,38}. Although fewer synovial macrophages are present in OA compared with RA, they are crucial for the production of proinflammatory cytokines such as IL6 (Bondeson et al. 2010). Previous studies have shown that selective depletion of synovial macrophages during experimental OA largely reduces cartilage damage and osteophyte formation, which are 2 major hallmarks of OA³⁹. Thus, we would like to separately analyze the role in synovitis of 2 main cell types residing in the synovium: fibroblast-like synoviocytes (FLS) and macrophages. We found that 14-3-3ε was able to increase the mRNA expression and protein secretion of IL6 (7.5 and 4.3-fold increase respectively) and MCP1 (4.4 and 32-fold increase) in FLS. These cells were able to respond to 14-3-3ε resulting in an inflammatory phenotype. Moreover, Thp1 cells, a human monocyte cell line, were used to address whether 14-3-3ε could polarize these cells toward a pro-inflammatory macrophage phenotype. In our current study, we showed that 14-3-3ε increased the mRNA expression and protein secretion of IL6 (7.2 and 17.8-fold increase respectively) and MCP1 (3.1 and 19-fold increase). Thus, these pro-inflammatory factors are mainly produced by macrophages in response to 14-3-3ε and this protein subsequently appears to polarize macrophage toward the M1 phenotype. In the case of knee OA, a study

analyzing M1 macrophages and M2 macrophages in synovial fluid in normal versus OA knees found a higher ratio of M1/M2 in OA versus normal knees, and the ratio was significantly correlated to the Kellgren-Lawrence grade⁴⁰. These results suggest that macrophage polarization may indeed play a role in the control and even progression of OA disease. Our study indicates that 14-3-3ε can induce a proinflammatory environment in the OA synovium through stimulation of macrophages which possibly contributes to the joint destruction that occurs during OA. Similar results have been obtained previously for the alarmin S100A9 in the synovium⁴¹.

Interestingly, high levels of many alarmins have been described in the synovial fluid of OA patients(Ke et al. 2015). Numerous studies have shown that these DAMPs stimulate synovial cell proliferation, influence hypertrophic chondrocyte differentiation and induce inflammatory and pro-catabolic events *in vitro*, and they promote synovitis and cartilage degradation *in vivo* in murine OA models⁴². We hypothesized that 14-3-3ε is a new alarmin involved in OA. Our results showed that this protein was able to lead to an inflammatory and catabolic response in joint similarly to other alarmins. Moreover, OA is mainly linked to activation of innate immunity by the binding of damage-associated molecular patterns (DAMPs) to so-called pattern recognition receptors (PRRs)⁴³. Of central importance in the PRR family are the Toll-like receptors (TLRs)⁴³. TLR2 and TLR4 are overexpressed in OA cartilage, and their presence correlates with histopathological damage(Kim et al. 2006). Blockade of TLR signaling -as shown in TLR2/TLR4 and in MyD88 knockout mice- downregulates cartilage catabolic response *in vitro*, and it can protect animals from experimental OA⁴⁴. Moreover, synovial fluid proteins from patients with OA activate macrophages via TLR2/TLR4 receptors, in turn translocating NF-κB to the

nucleus(Liu-Bryan and Terkeltaub 2015). Synovial fibroblasts are sensitive to both mechanical alterations and DAMPs due to the expression of different TLRs on the cell membrane, resulting in increased synthesis of pro-inflammatory mediators(Liu-Bryan 2013). In particular, TLR-2 and TLR-4 are used by many alarmins⁴⁵.

To examine whether 14-3-3 response was driven by TLR, we used TLR2 and TLR4 KO mice to study their potential involvement in macrophage and chondrocyte responses. Our results showed that these two receptors were involved in the inflammatory and catabolic phenotype after stimulation with 14-3-3 ϵ , with TLR4 showing predominant involvement. To further investigate the involvement of TLR2 and TLR4, we used blocking antibodies against them and a pharmacological inhibitor (OXPAPC) that is able to inhibit both TLR2 and TLR4. Our results validated the results obtained in the KO mice and confirmed that 14-3-3 ϵ could elicit a catabolic and inflammatory phenotype in murine articular chondrocytes and a pro-inflammatory phenotype in BMM macrophages. Interestingly, a TLR4 monoclonal antibody has recently been demonstrated to have an adequate safety profile, and a phase II clinical trial in patients with RA has been launched⁴⁶.

In the present study, we used recombinant 14-3-3 ϵ protein produced in *Escherichia coli*, similarly to many commercially available recombinant proteins. Although this expression system has many advantages, including rapid expression, high yields, ease of culture and low cost⁴⁷, the proteins recovered may be contaminated with endotoxin, a highly complex lipopolysaccharide (LPS) constitutive of the outer membrane of most gram-negative bacteria⁴⁸. LPS is recognized by a receptor complex composed of TLR4, CD14 and MD-2^{49,50}. Consequently, using recombinant 14-3-3 ϵ in this study, we wanted to be sure that the effects of 14-3-3 ϵ on joint tissues were due to the protein itself and not to endotoxin contamination. Low

levels of endotoxins measured by a LAL kit (14-3-3 ϵ contained less than 0.15 ng/ml of LPS, data not shown) and no significant inhibition by the PMB on 14-3-3 ϵ chondrocyte stimulation (supplemental data) and 14-3-3 ϵ macrophages stimulation (data not shown) confirmed the proper effect of 14-3-3 ϵ recombinant protein. Moreover, in our previous study (Priam et al. 2013), we demonstrated that immunodepletion and blocking of 14-3-3 ϵ in conditioned media of compressed osteoblasts inhibited its catabolic effect on chondrocytes confirming that 14-3-3 ϵ itself is involved in the establishment of a pro-catabolic phenotype in chondrocytes. Thus, although we cannot rule out that a small component of the effects observed herein were due to endotoxin contamination, we are confident that the cellular responses resulted from the activity of 14-3-3 ϵ protein itself.

Taken together, our results designate 14-3-3 ϵ as a novel alarmin for further exploration in OA for either therapeutic or prognostic purposes.

Acknowledgements

The authors thank the Department of Orthopaedic Surgery and Traumatology of Saint-Antoine Hospital for providing human OA tissues. The authors thank Dr. F. Pène (Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Paris, France ; Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris France) for his kind gift of TLR2 and TLR4 KO mice. The authors thank T. Ledent, L. Dinard, A. Guyomard, T. Coulais, and Q. Pointout (animal housing facility, INSERM, Saint-Antoine Research Center, Sorbonne University, Paris) for their excellent work.

Contributions

- Conception and design: MM, FB, CJ, FP
- Collection and assembly of data: MM, LS, AR, AP, MN, CR
- Analysis and interpretation of the data: MM, CJ, FB
- Drafting of the article: MM, CJ, FB,
- Critical revision of the article for important intellectual content: MM, CJ, FB, FP, GA-L,
- Final approval of the article: MM, LS, MN, FP, CR, AR, AP, GA-L, FB, CJ

Role of the funding source

This work was supported by grants from INSERM, Sorbonne University, French Society of Rheumatology (Société Française de rhumatologie) and foundation Arthritis - Courtin . M.M. was supported by a doctoral fellowship from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Conflict of interest

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported. All authors disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could potentially and inappropriately influence their work and conclusions.

Figure 1

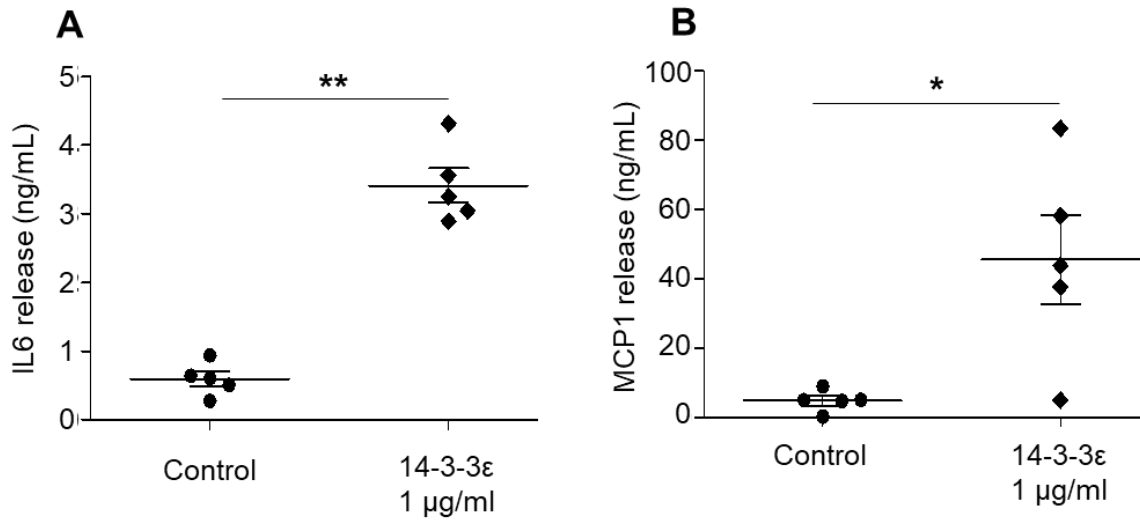


Fig. 1: Stimulation of MCP1 and IL6 protein release by synovium explants from OA patients with 14-3-3ε.

Synovium explants from OA patients were incubated with medium in the presence or absence of 14-3-3ε (1 µg/ml) for 24 hours. A, B: Protein levels of MCP1 (A) (n=5) and IL6 (B) (n=5) released by human synovium explants treated with the control or 14-3-3ε were measured using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Bars show the mean ± s.e.m. (Mann Whitney test) *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001, ns, not significant.

Figure 2

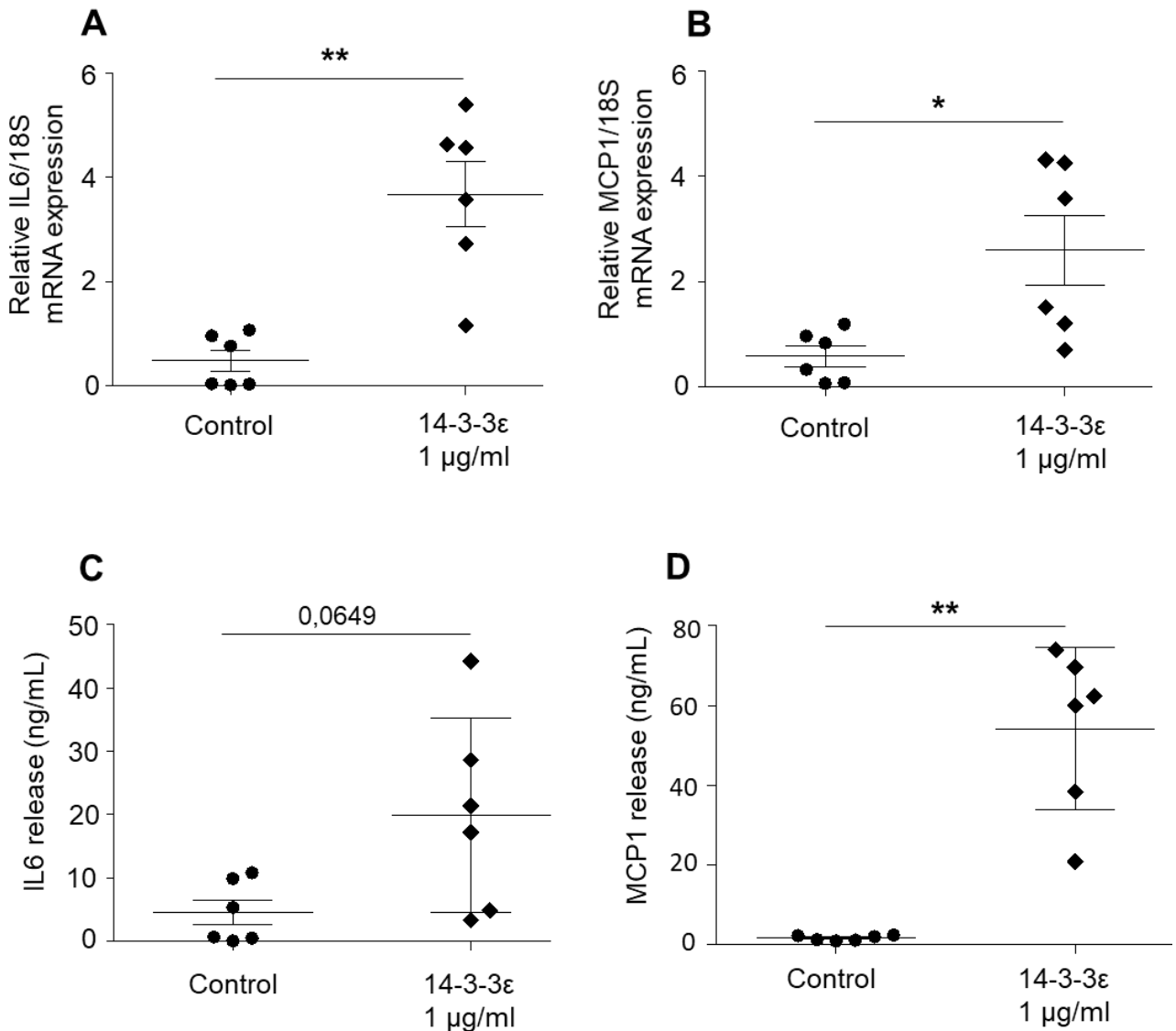


Fig. 2: Stimulation of IL6 and MCP1 expression and protein release in response to 14-3-3ε in primary cultures of human fibroblast-like synoviocytes.

Synovium explants from OA patients were digested and seeded in 6-well culture plates until confluence. The primary cultures were then stimulated with the control medium in the presence or absence of recombinant 14-3-3ε (10 μg/ml) for 24 hours. A,B: Total RNA was extracted, and mRNA levels of IL6 (A) (n=6) and MCP1 (B) (n=6) were determined by qRT-qPCR. Protein levels of IL6 (C) (n=6) and MCP1 (D) (n=6) in cell supernatants were measured by ELISA. Bars show the mean ± s.e.m. (Mann Whitney test) *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ns, not significant.

Figure 3

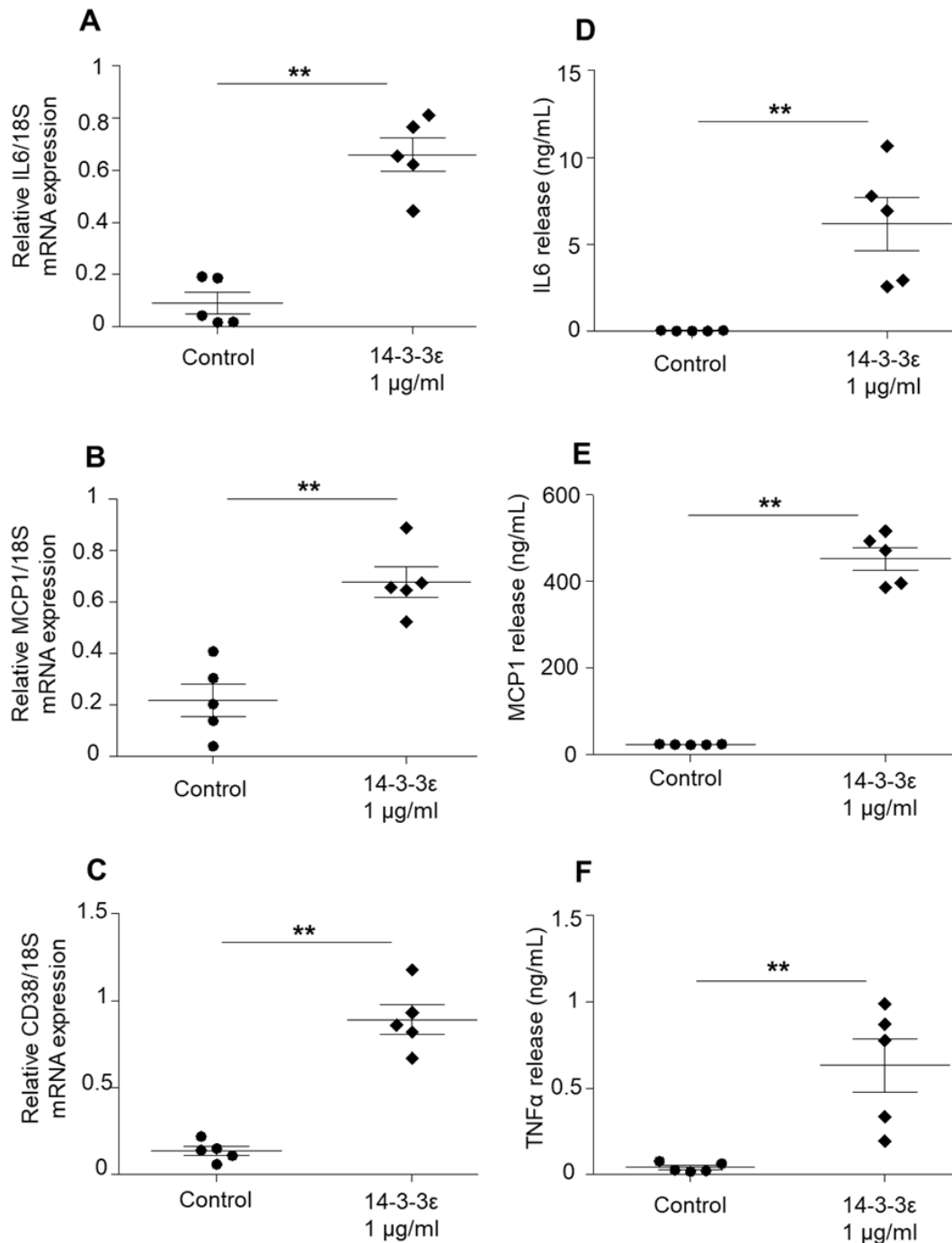


Fig. 3: Stimulation of IL6, MCP1 and CD38 mRNA expression and IL6, MCP1, and TNF α protein release in human macrophages (derived from the THP1 cell line).

Stimulation of macrophages (THP1 cells) was performed using control medium or 14-3-3 ϵ (1 μ g/ml) treatment. A,B,C: Total RNA was extracted, and mRNA levels of IL6 (A) (n=5), MCP1 (B) (n=5), and CD38 (C) (n=5) were determined by qRT-PCR. D, E, F: Protein levels of IL6 (D) (n=5), MCP1 (E) (n=5) and TNF α (F) (n=5) in cell supernatants were measured by ELISA. Bars show the mean \pm s.e.m. (Mann Whitney test) *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ns, not significant.

Figure 4

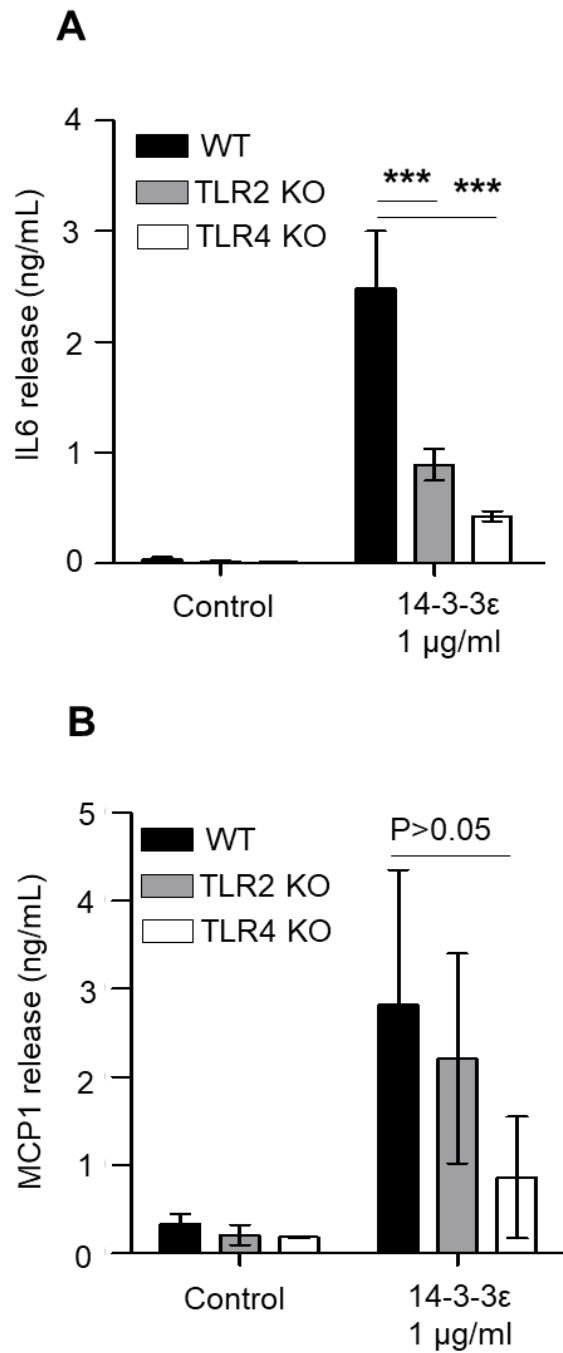


Fig. 4: Stimulation of IL6 and MCP1 protein release by bone marrow macrophages from WT, TLR2 or TLR4 KO mice in response to 14-3-3ε treatment. Stimulation of bone marrow macrophages (BMM) were performed using control medium or 14-3-3ε (1 μg/ml) treatment. Protein levels of IL6 (A) (n=4) and MCP1 (B) (n=4) in cell supernatants were measured by ELISA. Bars show the mean ± s.e.m. (Two way ANOVA with a Bonferroni post test) *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ns, not significant.

Figure 5a

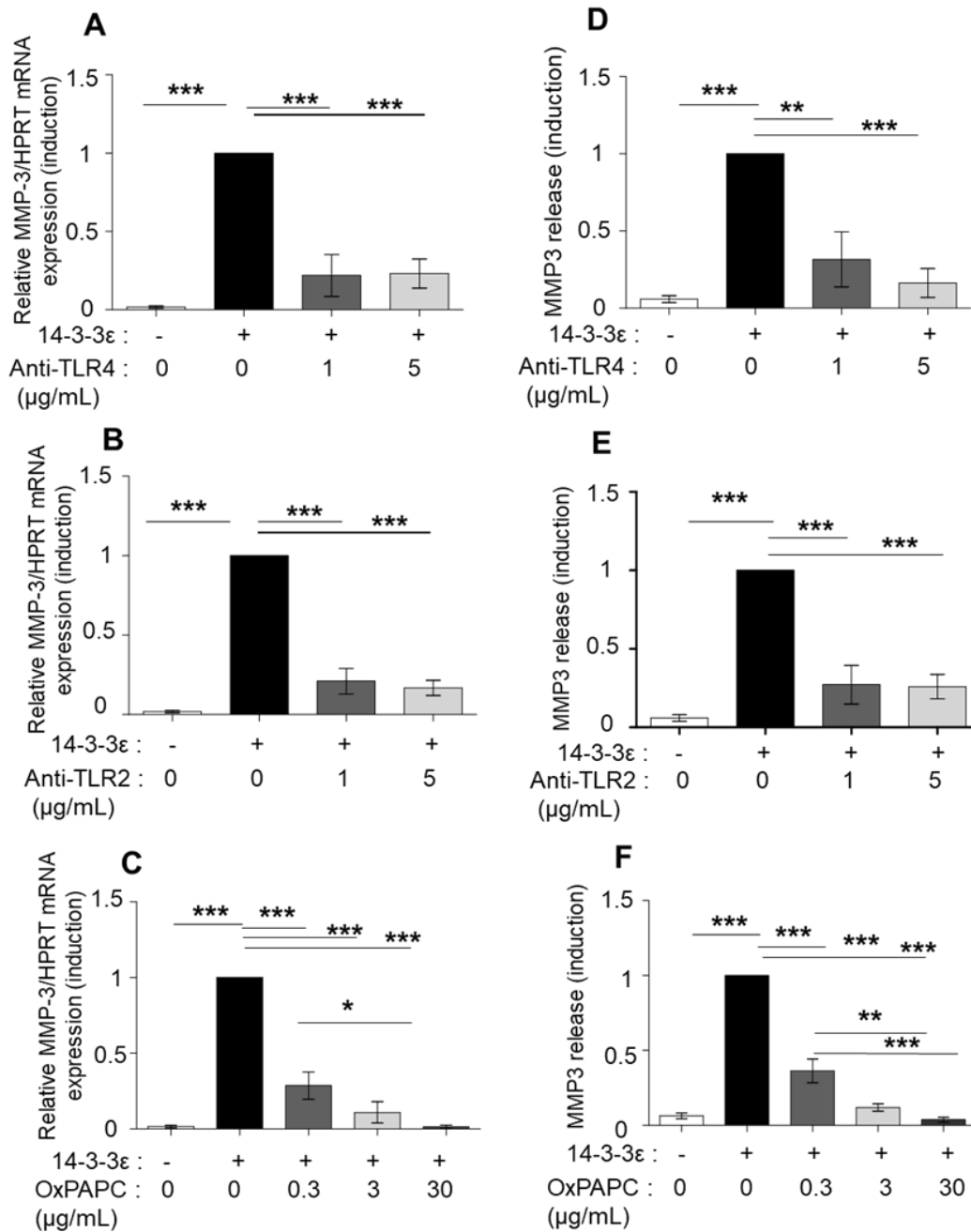


Fig. 5a: Involvement of TLR2 and TLR4 in 14-3-3ε-induced MMP-3 (degradative enzyme) release by murine articular chondrocytes.

Murine articular chondrocytes were treated with TLR2, TLR4 blocking antibodies or the pharmacologic inhibitor OxPAPC for 15 minutes and then stimulated with recombinant 14-3-3ε (1 µg/ml) for 24 h. (A, B, C) Total RNA was extracted, and mRNA levels of MMP-3 were determined by qRT-PCR to examine the inhibitory effects of anti-TLR4 (A) (n=5), anti-TLR2 (C) (n=5), and OxPAPC (E) (n=5). (D, E, F) Protein levels of MMP-3 in cell supernatants were measured by ELISA to examine the inhibitor effects of anti-TLR4 (B) (n=5), anti-TLR2 (D) (n=5), and OxPAPC (F) (n=5). 14-3-3ε-stimulated cells released an average of 350 ng/ml of MMP-3. Bars show the mean ± s.e.m.-fold decrease un the inhibitory anti-TLR and OxPAPC conditions compared with the stimulatory condition with 14-3-3ε alone (1 µg/ml). (One-way ANOVA with a Bonferroni post test) *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ns, not significant.

Figure 5b

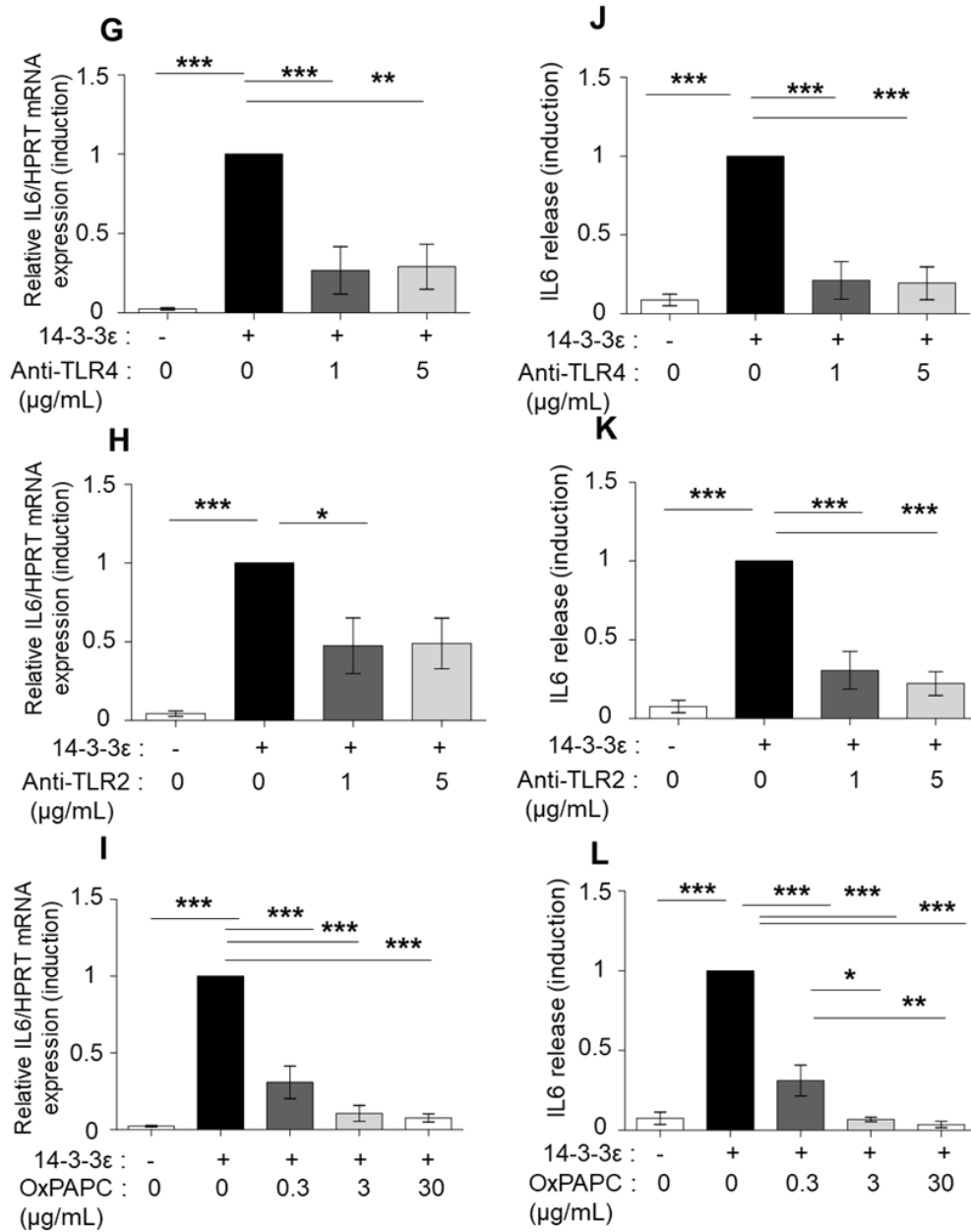


Fig 5b: Involvement of TLR2 and TLR4 in 14-3-3ε-induced IL-6 (pro-inflammatory cytokine) release by murine articular chondrocytes.

Murine articular chondrocytes were treated with TLR2, TLR4 blocking antibodies or the pharmacologic inhibitor OxPAPC for 15 minutes and stimulated with recombinant 14-3-3ε (1 μg/ml) for 24 h. (G, H, I) Total RNA was extracted, and mRNA levels of IL6 were determined by qRT-PCR to examine the inhibitory effects of anti-TLR4 (G) (n=5), anti-TLR2 (H) (n=5), and OxPAPC (I) (n=5). (J, K, L) Protein levels of IL6 in cell supernatants were measured by ELISA to examine the inhibitory effects of anti-TLR4 (J) (n=5), anti-TLR2 (K) (n=5), and OxPAPC (L) (n=5). 14-3-3ε-stimulated cells released an average of 2 ng/ml of MMP-3. Bars show the mean ± s.e.m fold decrease in expression compared with the stimulatory condition with 14-3-3ε (1 μg/ml). (One-way ANOVA with a Bonferroni post test) *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ns, not significant.

Figure 6

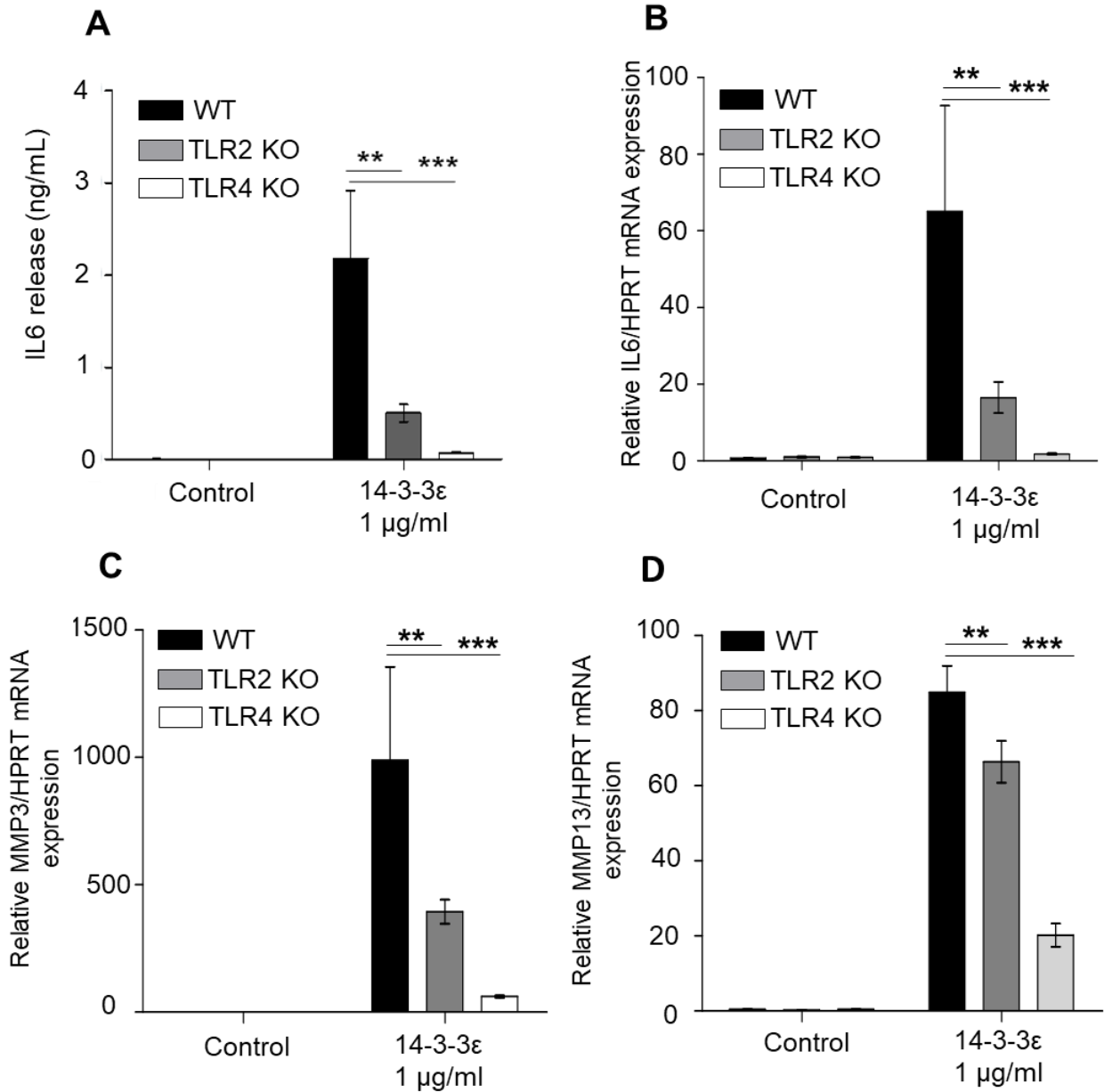


Fig. 6: Stimulation of IL6 mRNA expression and IL6, MMP3 and MMP13 protein release by murine articular chondrocytes from WT, TLR2 or TLR4 KO mice in response to 14-3-3ε treatment.

Stimulation of murine chondrocytes was performed using control medium or 14-3-3ε (1 µg/ml) treatment. Total RNA was extracted, and mRNA levels of IL6 (B) (n=4), MMP3 (C) (n=4) and MMP13 (D) (n=4) were determined by qRT-PCR. Protein levels of IL6 (A) (n=4) in cell supernatants was measured by ELISA. Bars show the mean ± s.e.m. (Two way ANOVA post test)*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ns, not significant.

Supplemental data

S1

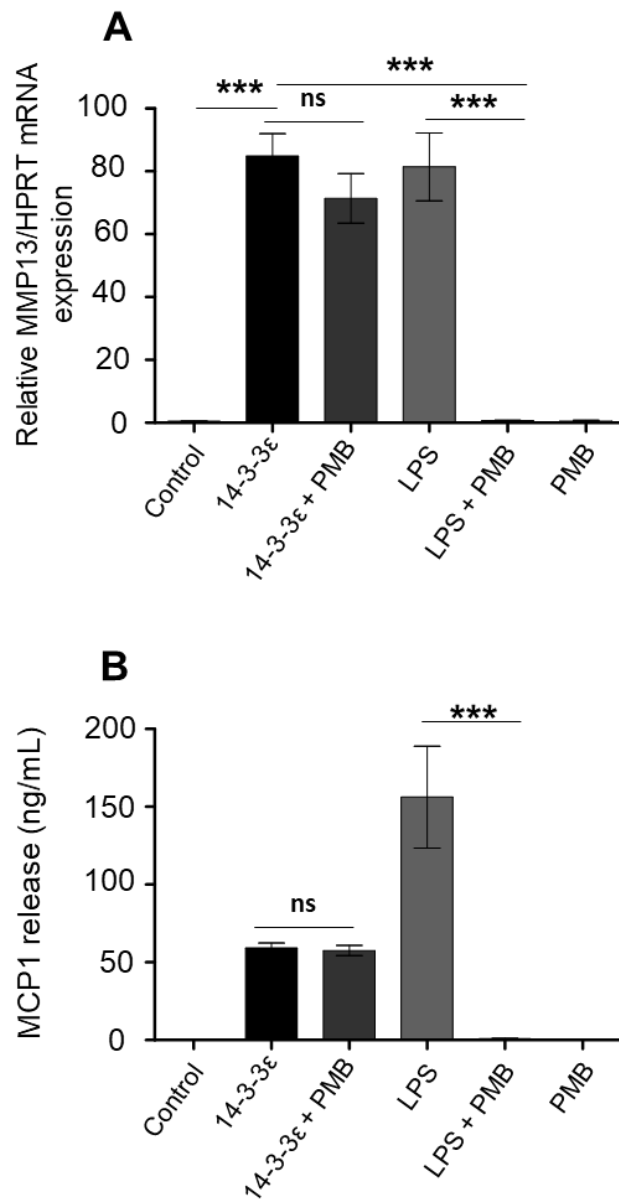


Fig. S1: Assessment of 14-3-3ε recombinant protein proper effect by inhibiting endotoxins with polymyxin B on murine articular chondrocytes.

Murine articular chondrocytes cultures were stimulated with 14-3-3ε (1 µg/ml) or LPS (10 ng/ml) with or without PMB (30 µg/ml). Total RNA was extracted and mRNA levels of MMP13 was determined by qRT-PCR (A) n=3. Protein level of MCP1 in cell supernatants was measured by ELISA (B) n=3. 1% for MCP1 release and 15% for MMP13 mRNA expression, as compared to 100% inhibition between LPS and LPS+PMB in the cellular response, but the major effect of 14-3-3ε was retained even in the presence of polymyxin. (One-way ANOVA with a Bonferroni post test) *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ns : not significant.

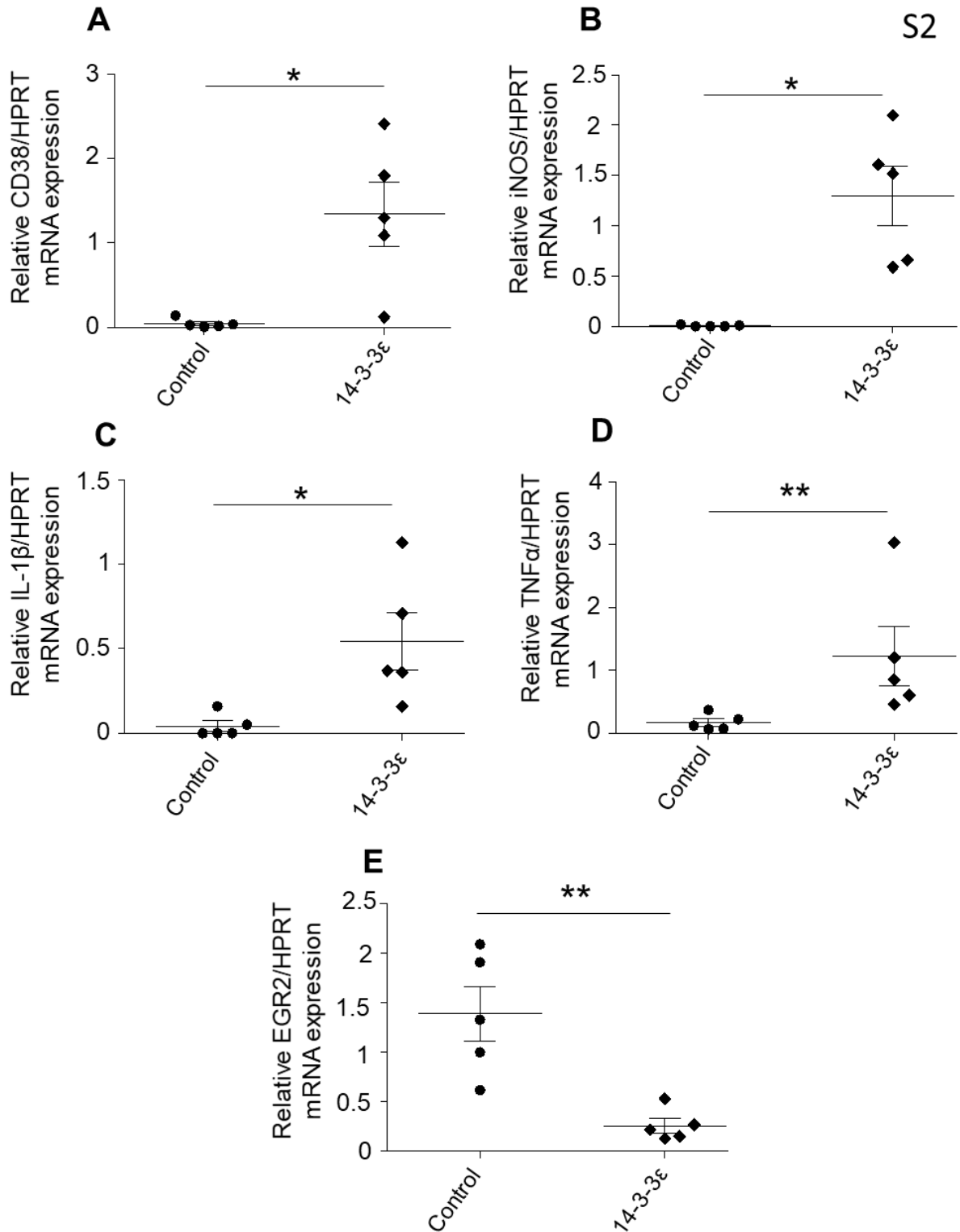


Fig. S2: Stimulation of M1 markers (iNOS, CD38, IL-1β, TNFα) and decrease of M2 marker (EGR2) in response to 14-3-3ε treatment murine bone marrow macrophages. Murine BMM were stimulated with 14-3-3ε (1 μg/ml). Total RNA was extracted and mRNA levels of CD38 (A) n=5, iNOS (B) n=5, IL-1β (C) n=5, TNFα (D) n=5 and EGR2 (E) n=5 were determined by qRT-PCR. Bars show the mean ± s.e.m. (Mann Whitney test) *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ns : not significant.

References

1. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015;386(9995):743-800. doi:10.1016/S0140-6736(15)60692-4
2. Felson DT. Osteoarthritis of the Knee. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(8):841-848. doi:10.1056/NEJMcp051726
3. Hügler T, Geurts J. What drives osteoarthritis?—synovial versus subchondral bone pathology. *Rheumatology (Oxford)*. 2017;56(9):1461-1471. doi:10.1093/rheumatology/kew389
4. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis and Cartilage*. 2013;21(1):16-21. doi:10.1016/j.joca.2012.11.012
5. Herrero-Beaumont G, Pérez-Baos S, Sánchez-Pernaute O, Roman-Blas JA, Lamuedra A, Largo R. Targeting chronic innate inflammatory pathways, the main road to prevention of osteoarthritis progression. *Biochemical Pharmacology*. 2019;165:24-32. doi:10.1016/j.bcp.2019.02.030
6. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):826-837. doi:10.1038/nri2873
7. Furman BD, Kimmerling KA, Zura RD, et al. Articular Ankle Fracture Results in Increased Synovitis, Synovial Macrophage Infiltration, and Synovial Fluid Concentrations of Inflammatory Cytokines and Chemokines. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(5):1234-1239. doi:10.1002/art.39064
8. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current Opinion in Immunology*. 2005;17(4):359-365. doi:10.1016/j.coi.2005.06.002
9. Nefla M, Holzinger D, Berenbaum F, Jacques C. The danger from within: alarmins in arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2016;12(11):669-683. doi:10.1038/nrrheum.2016.162
10. Liu-Bryan R, Terkeltaub R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(1):35-44. doi:10.1038/nrrheum.2014.162
11. Manfredi AA, Capobianco A, Bianchi ME, Rovere-Querini P. Regulation of dendritic- and T-cell fate by injury-associated endogenous signals. *Crit Rev Immunol*. 2009;29(1):69-86.
12. Tamaki Y, Takakubo Y, Hirayama T, et al. Expression of Toll-like Receptors and Their Signaling Pathways in Rheumatoid Synovitis. *The Journal of Rheumatology*. 2011;38(5):810-820. doi:10.3899/jrheum.100732
13. Ke X, Jin G, Yang Y, et al. Synovial Fluid HMGB-1 Levels are Associated with Osteoarthritis Severity. *Clin Lab*. 2015;61(7):809-818.

14. Wang L, Zhang H, Shao L, et al. S100A12 levels in synovial fluid may reflect clinical severity in patients with primary knee osteoarthritis. *Biomarkers*. 2013;18(3):216-220. doi:10.3109/1354750X.2013.766262
15. Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, 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*. 2006;8(3):R69. doi:10.1186/ar1939
16. Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2010;6(11):625-635. doi:10.1038/nrrheum.2010.159
17. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ. *Arthritis Rheum*. 2012;64(6):1697-1707. doi:10.1002/art.34453
18. Raghu H, Lepus CM, Wang Q, et al. CCL2/CCR2, but not CCL5/CCR5, mediates monocyte recruitment, inflammation and cartilage destruction in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(5):914-922. doi:10.1136/annrheumdis-2016-210426
19. Bondeson J, Blom AB, Wainwright S, Hughes C, Caterson B, Berg WB van den. The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2010;62(3):647-657. doi:10.1002/art.27290
20. Daghestani HN, Pieper CF, Kraus VB. Soluble Macrophage Biomarkers Indicate Inflammatory Phenotypes in Patients With Knee Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(4):956-965. doi:10.1002/art.39006
21. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012;122(3):787-795. doi:10.1172/JCI59643
22. Lopa S, Leijts MJC, Moretti M, Lubberts E, Osch GJVM van, Bastiaansen-Jenniskens YM. Arthritic and non-arthritic synovial fluids modulate IL10 and IL1RA gene expression in differentially activated primary human monocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2015;23(11):1853-1857. doi:10.1016/j.joca.2015.06.003
23. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;233(9):6425-6440. doi:10.1002/jcp.26429
24. Manferdini C, Paoletta F, Gabusi E, et al. Adipose stromal cells mediated switching of the pro-inflammatory profile of M1-like macrophages is facilitated by PGE2: in vitro evaluation. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2017;25(7):1161-1171. doi:10.1016/j.joca.2017.01.011
25. van Lent PLEM, Blom AB, Schelbergen RFP, et al. Active involvement of alarmins S100A8 and S100A9 in the regulation of synovial activation and joint destruction during mouse and human osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2012;64(5):1466-1476. doi:10.1002/art.34315
26. Liu-Bryan R, Terkeltaub R. The Growing Array of Innate Inflammatory Ignition Switches in Osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64(7):2055-2058. doi:10.1002/art.34492

27. Liu-Bryan R. Synovium and the Innate Inflammatory Network in Osteoarthritis Progression. *Curr Rheumatol Rep*. 2013;15(5):323. doi:10.1007/s11926-013-0323-5
28. Bobacz K, Sunk IG, Hofstaetter JG, et al. Toll-like receptors and chondrocytes: The lipopolysaccharide-induced decrease in cartilage matrix synthesis is dependent on the presence of toll-like receptor 4 and antagonized by bone morphogenetic protein 7. *Arthritis & Rheumatism*. 2007;56(6):1880-1893. doi:10.1002/art.22637
29. Kim HA, Cho M-L, Choi HY, et al. The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*. 2006;54(7):2152-2163. doi:10.1002/art.21951
30. Priam S, Bougault C, Houard X, et al. Identification of Soluble 14-3-3 ϵ as a Novel Subchondral Bone Mediator Involved in Cartilage Degradation in Osteoarthritis: Soluble 14-3-3 ϵ in Bone-Cartilage Communication. *Arthritis & Rheumatism*. 2013;65(7):1831-1842. doi:10.1002/art.37951
31. Sun S, Wong EWP, Li MWM, Lee WM, Cheng CY. 14-3-3 and its binding partners are regulators of protein–protein interactions during spermatogenesis. *J Endocrinol*. 2009;202(3):327-336. doi:10.1677/JOE-09-0041
32. Nickel W. The mystery of nonclassical protein secretion. *European Journal of Biochemistry*. 2003;270(10):2109-2119. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03577.x
33. Chavez-Muñoz C, Morse J, Kilani R, Ghahary A. Primary human keratinocytes externalize stratifin protein via exosomes. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2008;104(6):2165-2173. doi:10.1002/jcb.21774
34. Nefla M, Sudre L, Denat G, et al. The pro-inflammatory cytokine 14-3-3 is a ligand of CD13 in cartilage. *Journal of Cell Science*. 2015;128(17):3250-3262. doi:10.1242/jcs.169573
35. Gosset M, Berenbaum F, Thirion S, Jacques C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nature Protocols*. 2008;3(8):1253-1260. doi:10.1038/nprot.2008.95
36. Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *The Lancet*. 2011;377(9783):2115-2126. doi:10.1016/S0140-6736(11)60243-2
37. Van Spil WE, Kubassova O, Boesen M, Bay-Jensen A-C, Mobasheri A. Osteoarthritis phenotypes and novel therapeutic targets. *Biochemical Pharmacology*. 2019;165:41-48. doi:10.1016/j.bcp.2019.02.037
38. Blom AB, Lent PL van, Libregts S, et al. Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase–mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis : Involvement of matrix metalloproteinase 3. *Arthritis & Rheumatism*. 2007;56(1):147-157. doi:10.1002/art.22337
39. Ambarus CA, Krausz S, van Eijk M, et al. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *Journal of Immunological Methods*. 2012;375(1):196-206. doi:10.1016/j.jim.2011.10.013

40. Liu B, Zhang M, Zhao J, Zheng M, Yang H. Imbalance of M1/M2 macrophages is linked to severity level of knee osteoarthritis. *Exp Ther Med*. 2018;16(6):5009-5014. doi:10.3892/etm.2018.6852
41. Bosch MH van den, Blom AB, Schelbergen RF, et al. Alarmin S100A9 Induces Proinflammatory and Catabolic Effects Predominantly in the M1 Macrophages of Human Osteoarthritic Synovium. *The Journal of Rheumatology*. 2016;43(10):1874-1884. doi:10.3899/jrheum.160270
42. Schelbergen RFP, Blom AB, van den Bosch MHJ, et al. Alarmins S100A8 and S100A9 elicit a catabolic effect in human osteoarthritic chondrocytes that is dependent on Toll-like receptor 4. *Arthritis & Rheumatism*. 2012;64(5):1477-1487. doi:10.1002/art.3349543.
43. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*. 2010;11(5):373-384. doi:10.1038/ni.1863
44. Nasi S, Ea H-K, Chobaz V, et al. Dispensable role of myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) and MyD88-dependent toll-like receptors (TLRs) in a murine model of osteoarthritis. *Joint Bone Spine*. 2014;81(4):320-324. doi:10.1016/j.jbspin.2014.01.018
45. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, et al. Involvement of Toll-like Receptors 2 and 4 in Cellular Activation by High Mobility Group Box 1 Protein. *J Biol Chem*. 2004;279(9):7370-7377. doi:10.1074/jbc.M306793200
46. Monnet E, Lapeyre G, Poelgeest E van, et al. Evidence of NI-0101 pharmacological activity, an anti-TLR4 antibody, in a randomized phase I dose escalation study in healthy volunteers receiving LPS. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2017;101(2):200-208. doi:10.1002/cpt.522
47. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*. 2009;27(3):297-306. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.01.008
48. Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta*. 2002;323(1):59-72. doi:10.1016/S0009-8981(02)00180-8
49. Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends in Immunology*. 2002;23(6):301-304. doi:10.1016/S1471-4906(02)02233-0
50. Pålsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*. 2004;113(2):153-162. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01976.x

Supplemental Materials :

Culture of human OA synovium explants and synovial fibroblasts

OA synovial tissue samples were cultured for synovial explants or the generation of adherent synovial fibroblasts. For explants, synovium from OA patients was processed aseptically for fat and fibrous tissue removal. Synovium was cut into small pieces (~1 mm³), and the wet weight of synovial tissue explants was aseptically determined. Thirty milligrams of tissue/well was placed into a 24-well plate and stimulated with recombinant 14-3-3ε (1 µg/ml) for 24 h at 37°C, 5% CO² in RPMI-1640 Glutamax (Gibco BRL, Grand Island, NY) culture medium containing 1% penicillin and streptomycin (PS). At the end of the incubation, the tissue-conditioned medium samples were centrifuged and aliquots were stored at -80°C.

For cell culture, synovial fibroblasts were obtained from digested synovial tissues, cultured until confluence, and then stimulated with recombinant 14-3-3ε at 1 µg/ml for 24h. Supernatants and mRNA were harvested and stored at -80°C.

Primary culture of murine articular chondrocytes

Mouse primary chondrocytes were isolated from the articular cartilage of 5 to 6-day-old C57Bl6 mice from Janvier (St. Berthevin, France) and seeded at 8×10^3 cells per cm² as previously described³⁵. After 1 week, the cells were incubated in serum-free DMEM PS/Glu containing 0.1% bovine serum albumin (BSA) for 24 h before treatment (basal experimental medium). Each littermate among the mice was used for one experiment. All experiments were performed according to protocols approved

by the French and European ethics committees (Comité Régional d’Ethique en Expérimentation Animale N°3 de la région Ile de France).

After 24h of incubation in basal experimental medium, murine chondrocytes were stimulated with 14-3-3 ϵ (1 μ g/ml) for 24h. For blocking antibody and pharmacological experiments, chondrocytes were pretreated for 20 minutes with increasing concentrations (1 and 5 μ g/ml) of a mouse TLR2 or TLR4 antibody or oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (OxPAPC) at 0.3, 3 and 30 μ g/ml, and then stimulated with recombinant 14-3-3 ϵ (1 μ g/ml) for 24h. Supernatants and mRNA were harvested and stored at -80°C.

In addition, experiments were also performed using *TLR2*^{-/-} and *TLR4*^{-/-} mice. Chondrocytes were cultured for 24h with or without 14-3-3 ϵ (1 μ g/ml). All measurements were performed in duplicate, and the mean of the duplicates from one littermate of the mice was considered as one experiment for each condition.

Primary culture of murine bone marrow mononuclear (BMM) cells

Bone marrow mononuclear (BMM) phagocytic precursor cells were isolated from femurs and tibiae of *WT* and *TLR2*^{-/-} and *TLR4*^{-/-} mice as previously described³⁸. These precursors were differentiated into adherent mature macrophages (BMM) for 7 days in noncoated Petri dishes in DMEM (4.5 g/L, D-glucose), PS/Glu, with 10% decomplemented FBS containing 10 ng/mL of macrophage colony stimulating factor (PeproTech, Neuilly-sur-Seine, France). BMM were seeded at 1 x10⁶ cells/well in six-well plates and stimulated with 14-3-3 ϵ (1 μ g/ml) for 24h. Cell lysates and supernatants were collected after 24h and stored at -80°C.

Culture of the THP-1 cell line

Human monocytic THP1 cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) were kind gifts from Professor Rouis (Sorbonne University, France). Cells were routinely grown to a primary macrophage culture density of 1×10^6 cells/mL following differentiation from monocytes with a 24h treatment with Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (50 nM) PMA, Sigma, Saint-Louis, USA). Cells were grown in RPMI 1640 medium, PS/Glu, supplemented with 10% decompemented FBS. After 72h, the macrophages were starved (complete medium without FBS) and stimulated with recombinant 14-3-3 ϵ (1 μ g/ml) for 24h. Cell lysates and supernatants were collected after 24h and stored at -80°C

Endotoxin tests

We used the Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay, which is a fast, sensitive, specific and the most commonly used endotoxin detection method approved by the FDA, to quantify the amount of endotoxin in 14-3-3 ϵ recombinant protein. Then, to confirm the proper effect of 14-3-3 ϵ , we coupled 14-3-3 ϵ (1 μ g/ml) or lipopolysaccharide (LPS) (10 ng/ml) with the antibiotic polymyxin B (30 μ g/ml), which inhibits endotoxin, to stimulate murine chondrocyte cultures for 24h. Cell lysates and supernatants were collected after 24h and stored at -80°C.

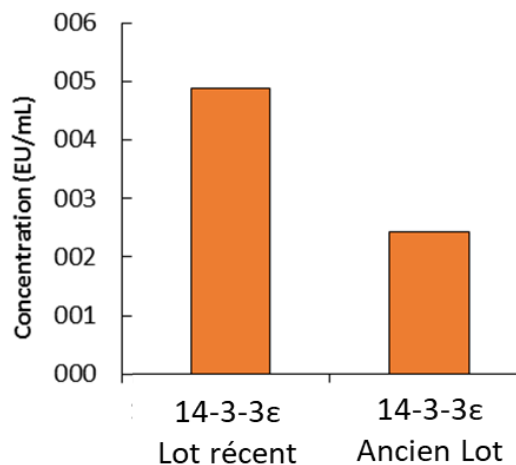
Résultats non publiés

2. Contrôle des endotoxines potentiellement présentes dans la protéine 14-3-3ε recombinante et caractérisation de l'effet propre de la protéine 14-3-3ε recombinante

La plupart des expériences effectuées au cours de ce travail ont été réalisées avec une protéine 14-3-3ε recombinante produite par Escherichia coli provenant de chez Enzo Life Science. Celle-ci a servi de stimulus sur des cultures de différents types cellulaires d'intérêt pour nos expériences (Culture primaire de chondrocytes murins et humains, lignée de monocytes, explants de membrane synoviale et culture de FLS humains).

Malgré les certificats du fournisseur nous assurant la pureté des échantillons, nous avons effectué le dosage des endotoxines sur les différents échantillons de la protéine que nous avons utilisée au cours des derniers mois pour nous assurer de la qualité des lots.

Le dosage des endotoxines par le kit LAL (Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit, Thermofisher) a mis en évidence une concentration de 4,87 EU/mL dans le lot (Enzo Life Science) que nous avons utilisé dernièrement ce qui représente moins de 0.15 ng/ml de LPS. Un ancien lot de cette même entreprise utilisé pour une partie des résultats en début de thèse montre une moins forte quantité d'endotoxine (2,43 EU/mL) (**Figure 46**).



**Figure 46 : Dosage des endotoxines dans les différents lots de 14-3-3ε recombinante
Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit, Thermofisher)**

Afin de nous assurer que les résultats obtenus étaient bien dû à l'effet propre de la protéine 14-3-3ε recombinante et pas au LPS des endotoxines présentes dans les lots, nous avons réalisé des stimulations sur des cultures de chondrocytes et macrophages murins (BMM). Les

résultats obtenus montrent que la protéine 14-3-3ε (1µg/mL) stimule l'expression en ARNm des enzymes de dégradation MMP-3 et MMP-13 par les chondrocytes (**Figure 47**) et de différents marqueurs pro-inflammatoires (CD38, TNFα) chez les macrophages (**Figure 48**). La stimulation par le LPS provoque également l'augmentation de ces facteurs. L'inhibition des endotoxines par un antibiotique (Polymyxine B : PMB) inhibe totalement l'effet du LPS. Le PMB n'a pas montré de réduction significative de l'effet de 14-3-3ε comparé à la condition sans PMB. De plus, avec une stratégie inversée, le facteur anti-inflammatoire EGR2 était significativement réduit par les stimulations par 14-3-3ε et le LPS (**Figure 49**) . Le PMB couplé au LPS a fait augmenter l'expression de ce facteur au même niveau que celui du contrôle non stimulé alors que le PMB n'a eu aucun effet sur l'expression de ce facteur en réponse à 14-3-3ε. Ces expériences montrent donc l'effet propre de la protéine 14-3-3ε recombinante.

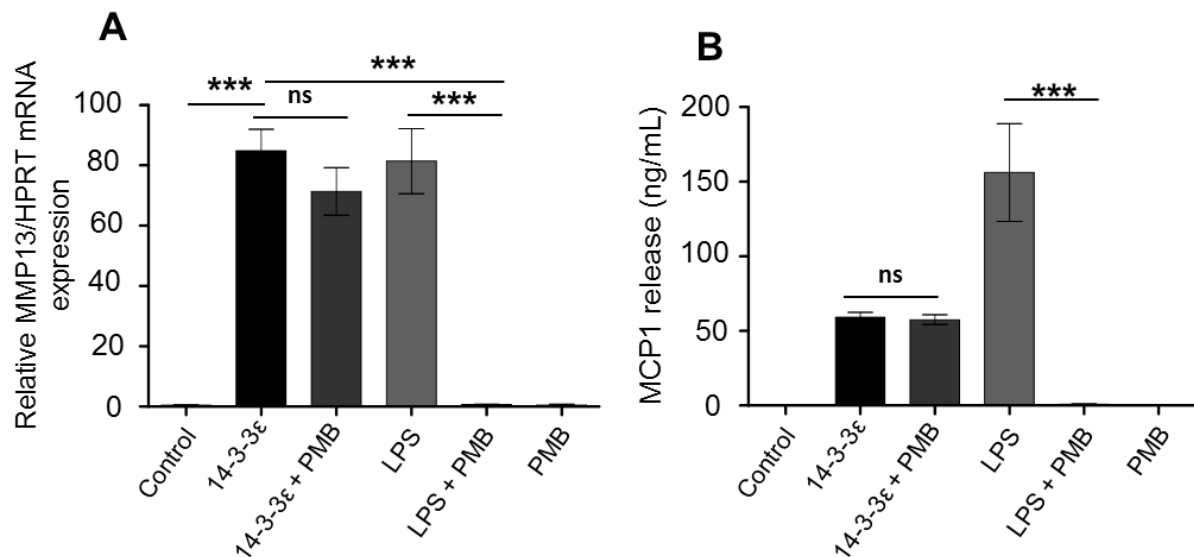


Figure 47 : Caractérisation de l'effet propre de la protéine 14-3-3ε recombinante par inhibition des endotoxines (par la polymyxine B : PMB) dans des chondrocytes murins.

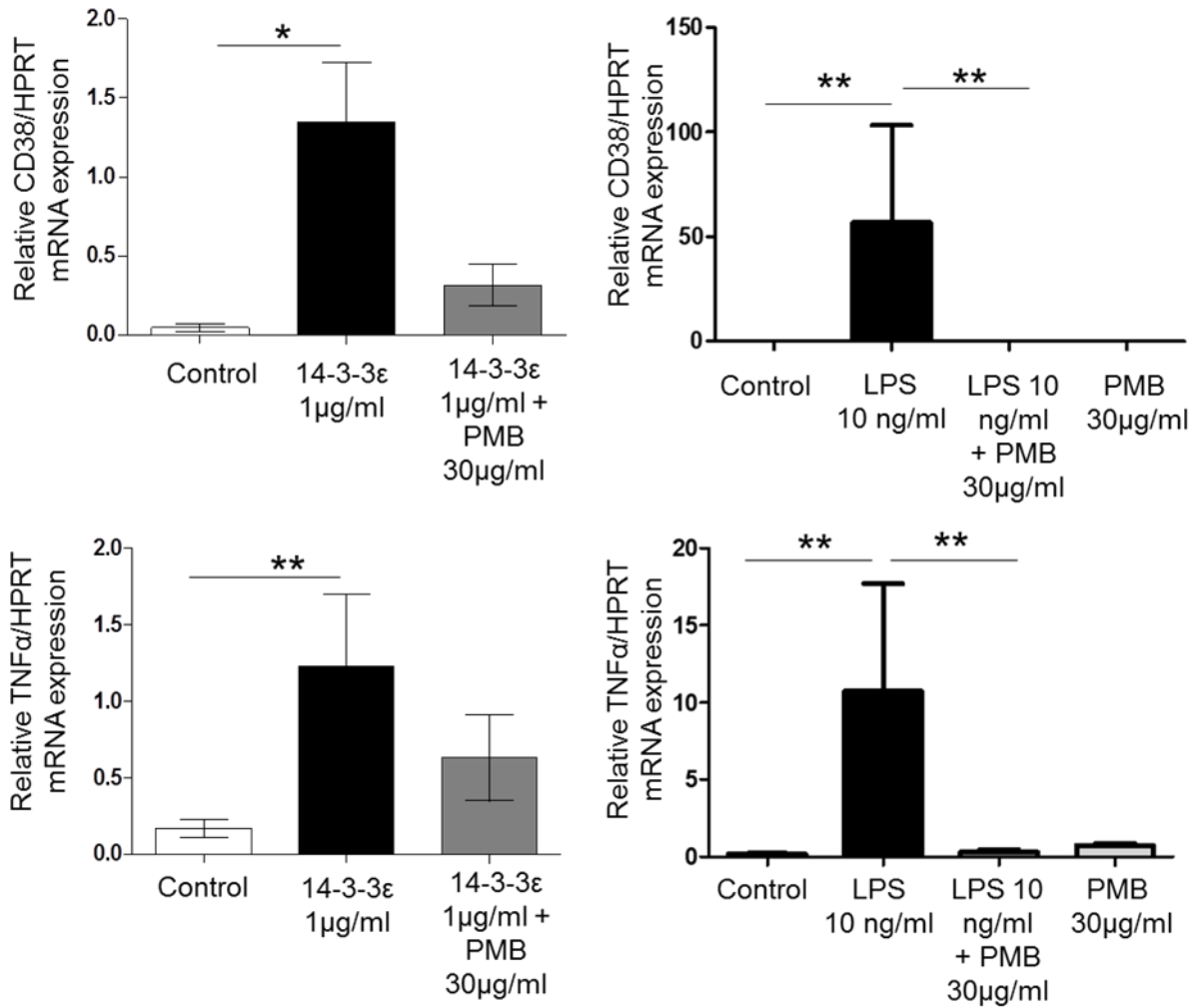


Figure 48 : Caractérisation de l'effet propre de la protéine 14-3-3ε recombinante par inhibition des endotoxines dans des macrophages murins (BMM)

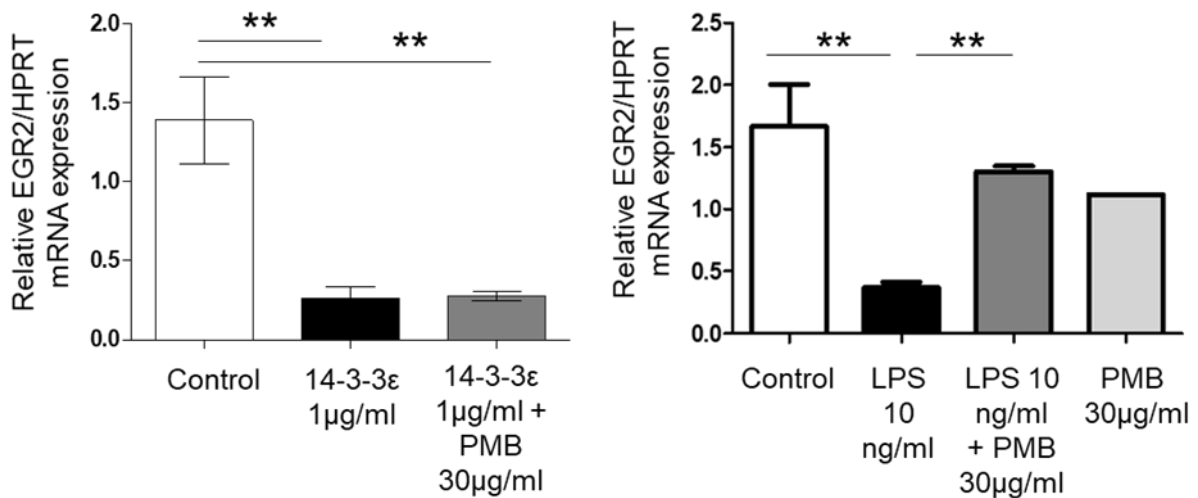


Figure 49 : Caractérisation de l'effet propre de la protéine 14-3-3ε recombinante par inhibition des endotoxines dans des macrophages murins (BMM)

3. Modélisation des interactions entre 14-3-3 et TLR2 (Résultats non soumis)

Nous avons observé que la protéine 14-3-3 ϵ semble induire ses effets par le biais des récepteurs TLR2 et TLR4. Néanmoins, bien que l'inhibition par des anticorps bloquants ou inhibiteur pharmacologique ou le recours à l'utilisation de cellules KO semblent impacter la signalisation de 14-3-3 ϵ , nous ne connaissons pas la nature des interactions entre la protéine et ces potentiels récepteurs.

3.1 Etude des interactions entre 14-3-3 ϵ et les récepteurs TLR2 et TLR4 par Résonance plasmonique de surface

Afin de savoir s'il existe une liaison directe entre 14-3-3 ϵ et les récepteurs TLR2 et TLR4, le laboratoire a eu recours à la technique de Résonance Plasmonique de surface (SPR, Instrument Biacore 3000) de la plateforme IBPS de Sorbonne Université.

➤ Principe de la Résonance Plasmonique de surface (SPR) :

La résonance plasmonique de surface est une technologie permettant de mesurer les interactions entre protéines/ligand et leurs constantes d'affinité. La protéine ligand est fixée à une puce constituée d'une couche de dextran posée sur une feuille d'or le tout reposant sur un plaque de verre (**Figure 50 A**). On fait passer un flux constant de liquide contenant l'autre molécule partenaire. Un faisceau de lumière polarisée monochromatique est réfléchi contre la surface de verre en produisant une onde évanescente perpendiculaire à l'interface. Une résonance s'établit entre les plasmons de l'or et l'onde évanescente ce qui se traduit par un certain angle (appelé angle de résonance). La fixation de la protéine circulante au ligand fixé sur la plaque provoque des modifications cet angle. La mesure des variations de l'angle de réfraction est obtenue grâce à un sensogramme. Celui-ci montre le signal de résonance (en Unité de résonance Ru) en fonction du temps (secondes). 1 Ru représente la liaison d'1 pg de protéine par mm².

L'expérience se déroule en plusieurs phases :

Tout d'abord la phase de fixation où la protéine ligand est fixée au dextran. Ensuite la protéine partenaire est injectée par flux constant. Si les protéines s'associent, le signal de résonance augmente. On observe un plateau puis l'injection de la protéine partenaire se termine, ce qui provoque une dissociation progressive des partenaires et une baisse du signal. Enfin la phase de régénération permet de dissocier complètement les partenaires (**Figure 41 B**).

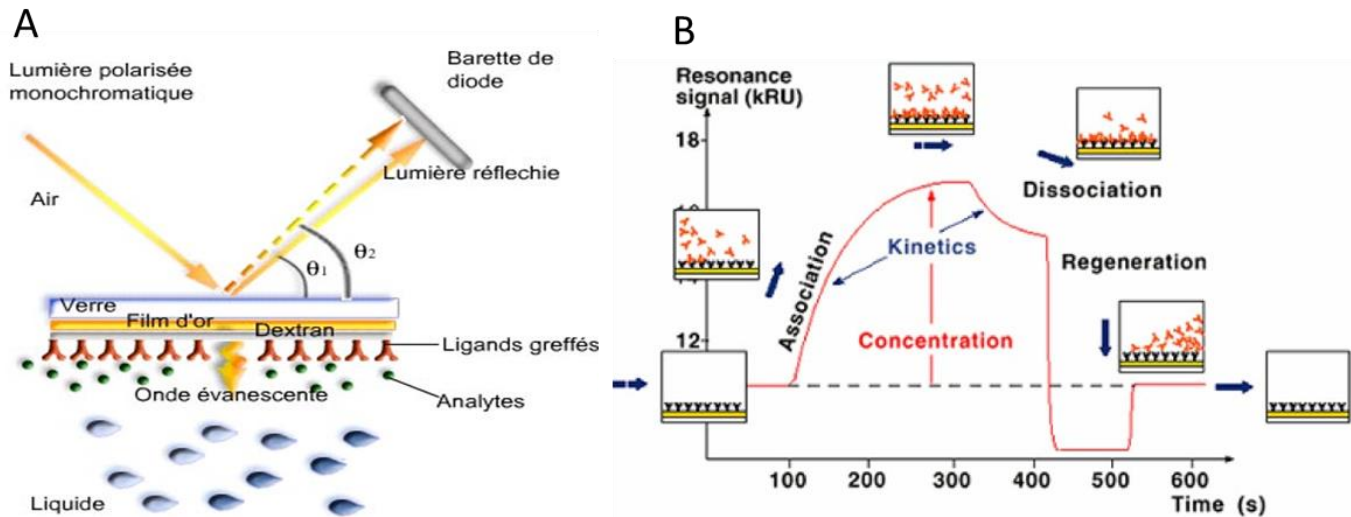


Figure 50 : Principe de la technologie de Résonance Plasmonique de Surface (SPR)

A : Schéma du principe de la technique SPR, B : Suivi cinétique en temps réel de l'association et dissociation des partenaires étudiés. Source : site internet de la plateforme des interactions moléculaires (Biacore), IFR83.

Nous avons étudié la liaison entre la protéine 14-3-3 ϵ et ses potentiels récepteurs TLR2 et TLR4. Les récepteurs sont fixés à la puce et la 14-3-3 ϵ recombinante est diffusée en flux constant.

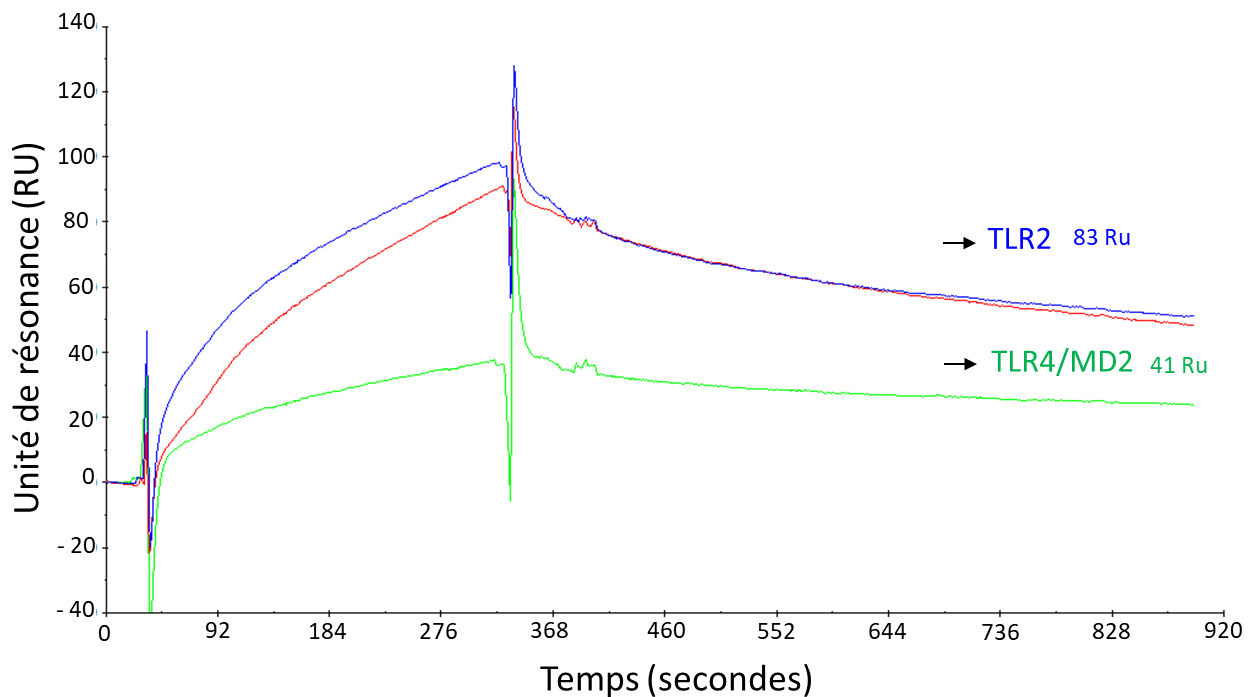


Figure 51 : Interaction entre 14-3-3 ϵ et TLR2, TLR4 analysée par la technique de Résonance Plasmonique de Surface (SPR)

Les résultats obtenus mettent en évidence l'existence d'une liaison directe entre 14-3-3 ϵ et les récepteurs TLR2 et TLR4 (**Figure 51**). L'affinité entre 14-3-3 ϵ et TLR2 est de 83Ru et celle entre 14-3-3 ϵ et TLR4 est de 41 Ru (Responsive Units). TLR2 et 14-3-3 ϵ montrant une meilleure affinité que TLR4 et 14-3-3 ϵ , nous avons sélectionné le récepteur TLR2 pour la suite de l'étude.

3.2 Modélisation informatique des interactions ligand/récepteur par outils numériques (Etude *in Silico*)

Dans le but d'étudier plus précisément l'interaction entre 14-3-3 ϵ et TLR2, nous avons réalisé une collaboration avec le Pr G. André-Leroux, biologiste/modélisatrice de l'INRA à partir de juin 2017. Nous avons travaillé sur l'identification des potentielles zones d'interactions entre les deux molécules par étude *in silico*.

Tout d'abord, nous avons réalisé un travail de recherche bibliographique sur chaque partenaire : le récepteur TLR2 et la protéine 14-3-3 ϵ . Les séquences de TLR2 et de 14-3-3 ϵ ont été obtenues par le site UniProt (<https://www.uniprot.org>). La structure 3D de ces molécules a été étudiée grâce au logiciel PyMOL. Les codes PDB contenant les structures cristallographiques utilisées proviennent de la banque de data RCSB (14-3-3 ϵ humaine : 2BR9; TLR2/TLR6 murin : 3A79; TLR2/TLR1 humain : 2Z7X).

Notre 1^{ère} étape a été d'identifier des zones d'interactions sans a priori à l'aide de 2 logiciels de docking, Z-dock et GrammX. Ces logiciels servent à prédire la liaison des protéines entre elles. Le logiciel place le monomère de 14-3-3 ϵ dans les zones les plus probables pour la liaison avec le monomère de TLR2. Cette première approche a été rapidement abandonnée car le placement du monomère de 14-3-3 ϵ sur le monomère de TLR2 ne prenait pas en compte les paramètres physiologiques du récepteur (encombrement stérique lié à la membrane cytoplasmique ou à la présence de l'autre monomère TLR1 ou TLR6 associé à TLR2).

Nous avons donc établi une 2^{ème} stratégie de placement de 14-3-3 ϵ prenant en compte différents critères :

- L'ancrage à la membrane de TLR2
- La compatibilité avec le dimère TLR1 ou TLR6
- La compatibilité avec l'homo-dimère 14-3-3 ϵ

- L'accessibilité
- Les sites de phosphorylations (sites les plus plausibles de liaison de 14-3-3 ϵ à ses partenaires).

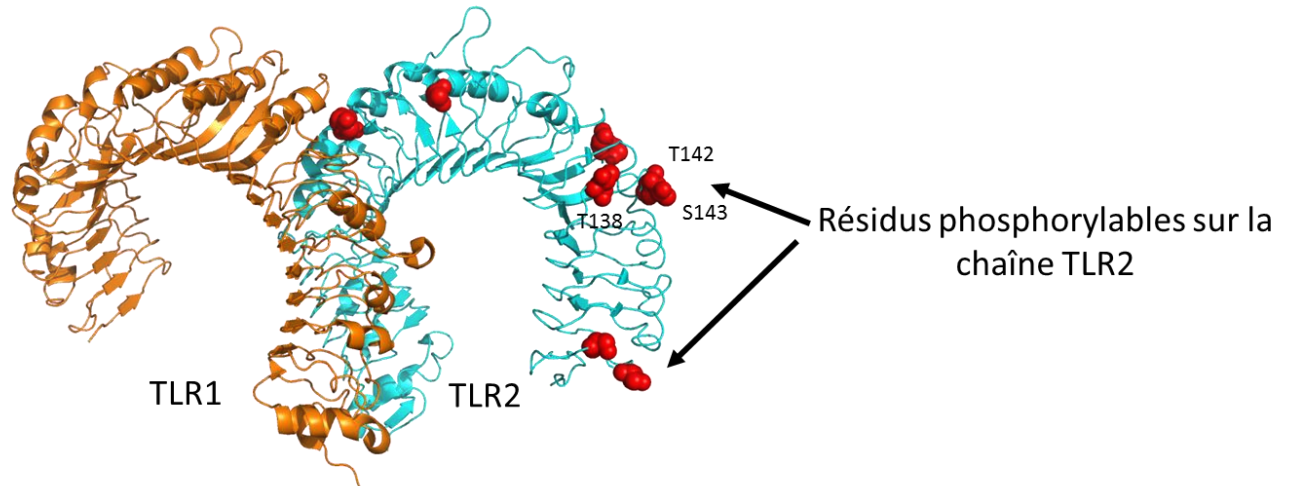


Figure 52 : Sites de phosphorylations présents sur TLR2 et potentiellement reconnus par 14-3-3 ϵ

Les résidus de TLR2 phosphorylables ont été obtenus grâce au site PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosire.org>).

Prenant en compte ces nouveaux paramètres restrictifs, les analyses ont été relancées avec les 2 logiciels. Un complexe nous a semblé pertinent. Le logiciel Rosetta a permis d'affiner l'étude du docking 14-3-3 ϵ /TLR2 et nous a donné deux « modèles » de liaison. Sur ces modèles (#1 et #7), le dimère 14-3-3 ϵ vient se placer sur le récepteur au niveau d'une séquence contenant des résidus phosphorylables, une thréonine et une sérine (**Figure 53**). La thréonine T142 et la sérine S143 présentes sur TLR2 ont donc pu être identifiées comme résidus les plus probables permettant la liaison entre TLR2 et 14-3-3 ϵ .

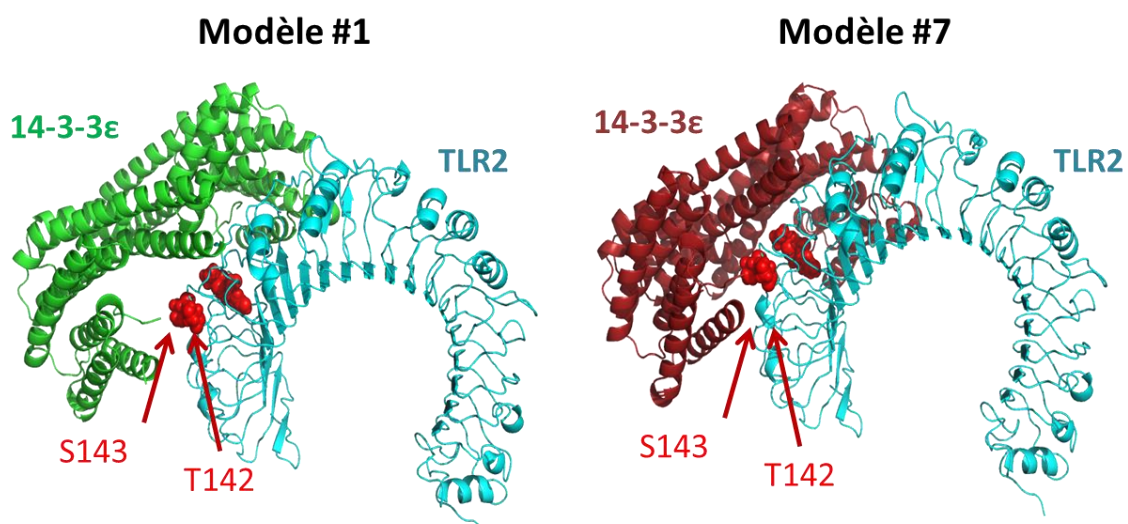


Figure 53 : Schéma de l'interaction entre 14-3-3ε et TLR2

Une analyse plus poussée de la liaison a été effectuée grâce au logiciel Autodock qui permet de calculer les énergies de liaison entre de petits ligands et un partenaire de plus grande taille en analysant la contribution des atomes et des énergies dans la liaison.

Le monomère de 14-3-3ε a servi de molécule support et de petites séquences peptidiques de TLR2 centrées autour de la thréonine T142 et de la sérine S143 ont été identifiées pour servir de ligands (**Figure 54**). Les hexamères suivants ont été utilisés : $L^{139}GVpTSL^{144}$ et $G^{140}VTpSLF^{145}$ pour la séquence murine de TLR2 et $L^{139}GEpTSL^{144}$ et $G^{140}ETpSLF^{145}$ pour la séquence humaine de TLR2 (**pT** et **pS** sont les résidus thréonine 142 et sérine 143 phosphorylés). Ces peptides sont placés dans la poche monomérique de 14-3-3ε et les énergies de liaisons sont analysées (**Tableau 7**).

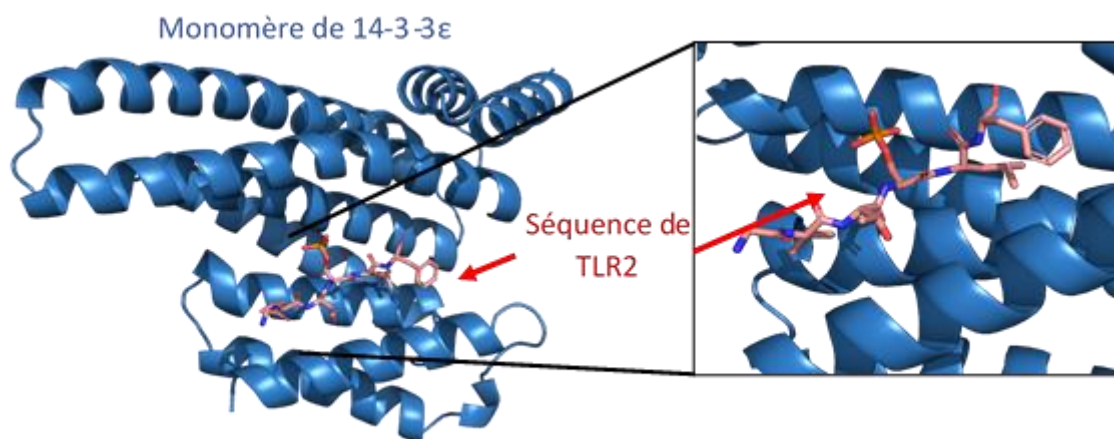


Figure 54 : Modélisation du monomère de 14-3-3 (bleu) et d'une séquence potentielle de liaison sur le récepteur TLR2 (Rose) possédant des résidus phosphorylés (PyMol)

Séquence	Energie (Kcal/mol)	
	Phosphorylée	Non phosphorylée
LGETSL (humaine)	-2,03	-1,61
GETSLF (humaine)	-3,1	-3,1
LGVTSL (souris)	-3,95	-2,9
GVTSLF (souris)	-4,31	-4,1

Tableau 7 : Energies de liaison des peptides mimant des séquences de TLR2 avec le monomère de 14-3-3ε

Calcul des énergies avec les séquences mimiques de TLR2 phosphorylées ou non phosphorylées.

Les résultats ont donné des énergies de liaisons négatives, ce qui veut dire que les partenaires ont tendance à se lier spontanément entre eux alors que des énergies positives auraient été coûteuses en énergie et donc moins probables. Plus les énergies sont négatives, plus l'affinité est grande. Les séquences phosphorylées présentent ici des valeurs d'énergies plus négatives que les séquences non phosphorylées. Ainsi les séquences murines phosphorylées sont plus affines pour 14-3-3ε. Dans le but de tester ces séquences comme potentiels sites de liaison, nous avons fait synthétiser ces séquences peptidiques et les avons utilisées comme séquences

mimant TLR2 dans des cultures de chondrocytes murins pouvant donc entrer en compétition avec le récepteur présent au niveau des chondrocytes en présence de 14-3-3ε.

Nous avons testé uniquement les séquences murines L¹³⁹GVpTSL¹⁴⁴ et G¹⁴⁰VTpSLF¹⁴⁵ pour que la compétition entre les récepteurs membranaires et les séquences mimiques soient identiques et également car ces séquences présentaient la meilleure affinité avec la protéine. Comme dans nos études *in vitro* précédentes, la protéine 14-3-3ε humaine recombinante est utilisée pour stimuler les cultures primaires.

En cas de liaison entre 14-3-3ε et les séquences mimiques de TLR2 phosphorylée, on devrait observer une baisse de l'effet de 14-3-3ε sur l'expression génique des MMP3 et MMP13 à cause de la compétition avec les récepteurs chondrocytaires.

Des cultures primaires de chondrocytes murins sont pré-traitées par les séquences mimiques de TLR2 phosphorylées (peptide LGVpT¹⁴²S et GVTpS¹⁴³LF) ou contrôle non phosphorylé (GVTSLF) à différentes concentrations (0.5, 5 et 50 µg/ml) durant 20 minutes puis stimulées par 14-3-3ε (1µg/ml) durant 24h. L'expression en ARNm de MMP3 et MMP13 ont été analysées par RT-qPCR (**Figure 55**).

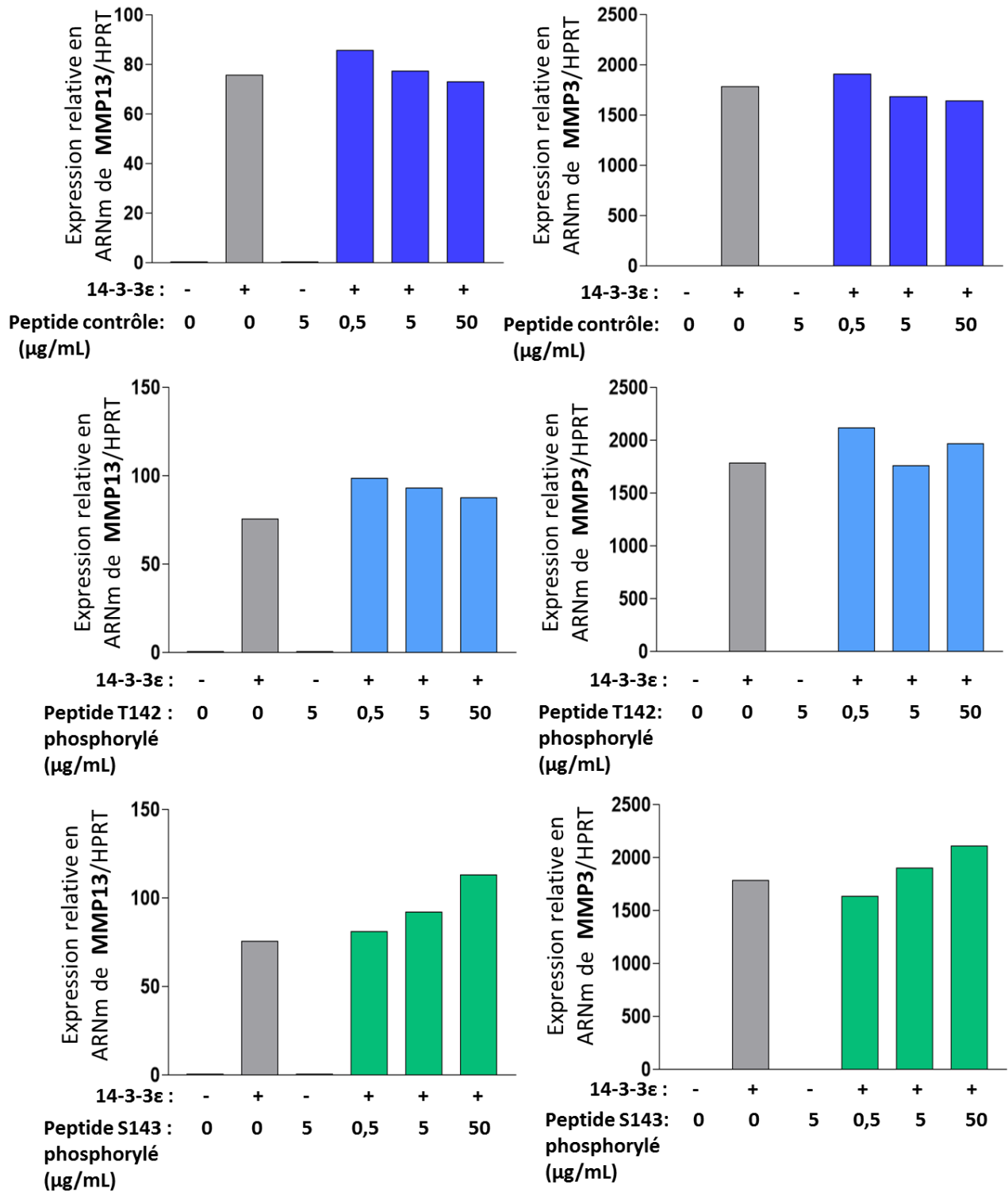


Figure 55 : Test d'inhibition des effets de 14-3-3ε par les peptides mimiques de TLR2 sur des cultures de chondrocytes murins (n=1)

Ces premiers résultats sont préliminaires, une seule expérience ayant été réalisée. La stimulation des cultures de chondrocytes par 14-3-3ε a augmenté l'expression en ARNm de

MMP3 et MMP13. La stimulation par le peptide contrôle GVTSLF non phosphorylé n'a pas eu d'effet sur la stimulation par 14-3-3 ϵ . La pré-incubation des chondrocytes avec les peptides LGVpT¹⁴²S et GVTpS¹⁴³LF phosphorylés n'ont pas provoqué de diminution de l'expression de ces protéases.

Il semble donc que les deux résidus identifiés chez TLR2 comme potentiels sites de liaisons ne soient pas reconnus *in vitro* par la 14-3-3 ϵ recombinante.

4. Présence de la 14-3-3 ϵ dans le liquide synovial de patients arthrosiques (Résultats non soumis)

Nous nous sommes intéressés à la présence de la protéine 14-3-3 ϵ dans les liquides synoviaux de patients arthrosiques.

La présence de la protéine a d'abord été étudiée par western blot au cours de travaux précédents dans le laboratoire. La protéine 14-3-3 ϵ a été détectée dans les liquides synoviaux de patients arthrosiques (**Figure 56**).

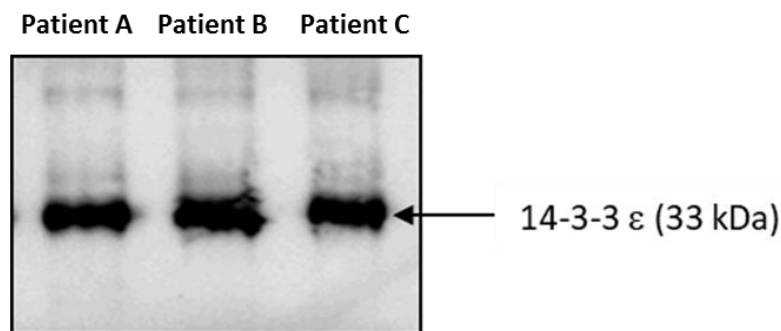


Figure 56 : Etude de la présence de 14-3-3 ϵ dans les liquides synoviaux de 3 patients arthrosiques (western blot)

Des tests ELISA spécifiques pour l'isoforme epsilon de 14-3-3 et nouvellement commercialisés ont été effectués pour essayer de déterminer la quantité de protéine présente mais les gammes de détection des kits n'ont pas permis de déterminer la concentration de la protéine car elle est présente très faiblement dans les liquides synoviaux arthrosiques comparés à ceux de patients atteints de rhumatismes très inflammatoires (Polyarthrite rhumatoïde, goutte).

Nous avons souhaité identifier les acteurs de la présence de 14-3-3 ϵ dans les liquides synoviaux.

L'hypothèse principale des travaux précédents reposait sur la sécrétion de 14-3-3 ϵ par les ostéoblastes soumis à un stress, notamment mécanique (Priam et al. 2013). Si la présence de

microfractures et de chenaux vasculaires permet d'imaginer un passage de 14-3-3ε entre l'os et le cartilage, il semble moins évident que la protéine parvienne de l'os au liquide synovial à part dans des cas sévère d'arthrose. Nous avons donc traité des cultures de FLS humaines afin de savoir si ces cellules de la membrane synoviale pouvaient être capables de produire 14-3-3ε. Des cultures primaires de FLS ont été traitées par un cocktail inflammatoire mimant un stress inflammatoire dans l'arthrose (TNFα + IL-1β). Cette stimulation a provoqué une augmentation de la libération de 14-3-3ε par les FLS (**Figure 57**). La membrane synoviale est donc un des tissus potentiellement capables de produire 14-3-3ε dans le liquide synovial.

14-3-3ε secretion by fibroblast like synoviocytes stimulated with pro-inflammatory cytokines

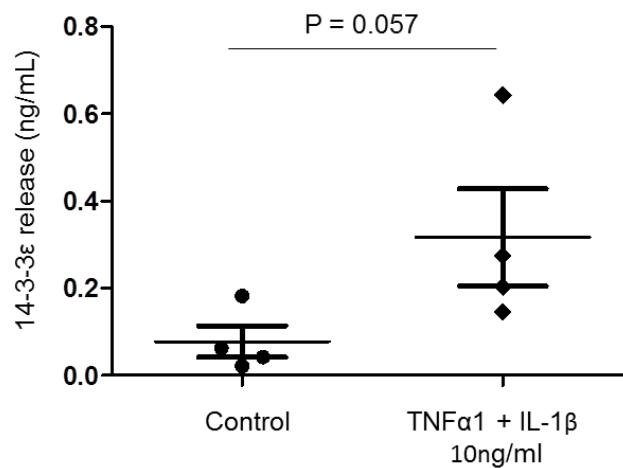


Figure 57 : Sécrétion de la protéine 14-3-3ε par les synoviocytes fibroblast like après stimulation par des facteurs pro-inflammatoires (TNFα et IL-1β)

5. Etude des effets de 14-3-3ε par injections intra-articulaires chez la souris (Etude *in vivo*) Résultats non soumis

Nous avons effectué une expérience *in vivo* dans le but d'observer les effets de 14-3-3ε sur les tissus intra-articulaires chez la souris. Pour cette étude, 16 souris adultes C57/BL6 ont été utilisées (**Figure 58**). Les pattes arrière droites ont été injectées à 3 reprises à 2 semaines d'intervalles par différentes doses de 14-3-3ε (10μg ou 20 μg), les pattes gauches (injectées ou non avec du PBS) ont servi de contrôle négatif. 4 souris ont reçu des injections de collagénase (10U) afin de constituer notre contrôle positif de développement d'arthrose.

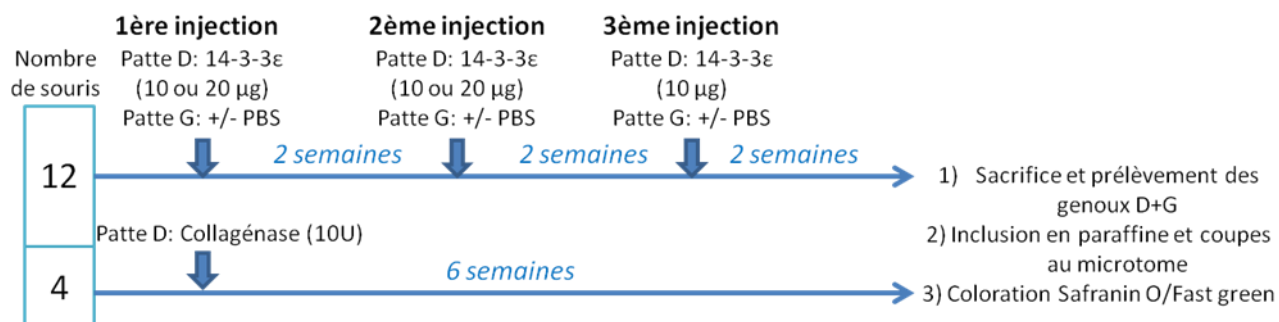


Figure 58 : Protocole d'injections intra-articulaires de 14-3-3ε chez des souris WT

Nous n'avons pas observé de dégradation au niveau du cartilage articulaire chez les souris injectées par 14-3-3ε (**Figure 59**). Les protéoglycanes de la matrice extracellulaire ne semblent pas avoir été dégradés car la coloration par la Safranin O est toujours présente. Le cartilage ne présente pas d'aspérités et il semble lisse à la surface des deux épiphyses. En revanche le contrôle positif (collagénase 10U) montre une très forte dégradation de l'os et du cartilage. En effet, l'érosion a largement rongé la couche de cartilage articulaire et une partie de l'os sous-chondral. On note également la présence d'un ostéophyte en haut à droite de la coupe et une membrane synoviale épaissie.

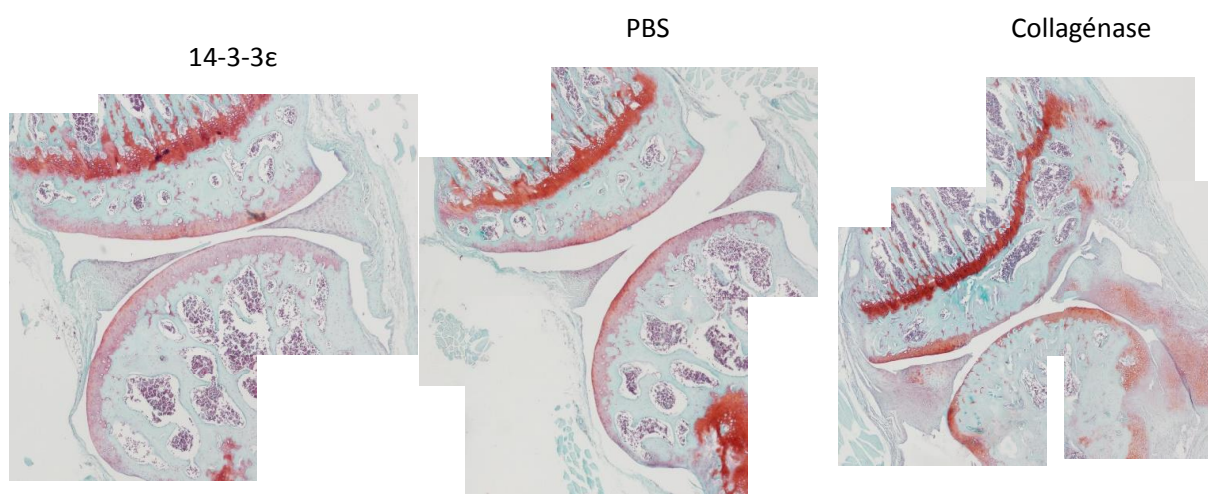


Figure 59 : Coupes longitudinales de genoux de souris injectées en intra articulaire par la 14-3-3ε

À gauche : 14-3-3ε, au milieu : PBS, à droite : collagénase. Coupes histologiques colorées à la Safranin O (cartilage) et au Fast green (fond)

Si au niveau du cartilage, il ne semble pas y avoir d'effet visible de l'injection de 14-3-3ε, en revanche, nous avons remarqué que la membrane synoviale des souris injectées par 14-3-3ε semblait plus épaisse (hyperplasie) que celle des souris contrôles et avons poursuivi cette

étude par une analyse plus approfondie de la membrane synoviale. Pour cela, nous avons effectué un scoring de l'hyperplasie (**Figure 60**) en mesurant l'épaisseur cellulaire de l'intima de la membrane synoviale (scoring basée sur la méthode de Krenn (Krenn et al. 2006) et un marquage des macrophages par un marqueur spécifique CD68 (**Figure 61**).

Le scoring de l'hyperplasie a été réalisé sur des coupes de genoux des souris injectées par du PBS (n=4), la collagénase (n=4) et 14-3-3ε (n=6). 4 souris contrôles non injectées ont également été scorées. Bien que non significative, une tendance à l'augmentation de l'hyperplasie est visible entre les souris 14-3-3ε et les contrôles non injectées et injectées par du PBS (Test de Mann Whitney).

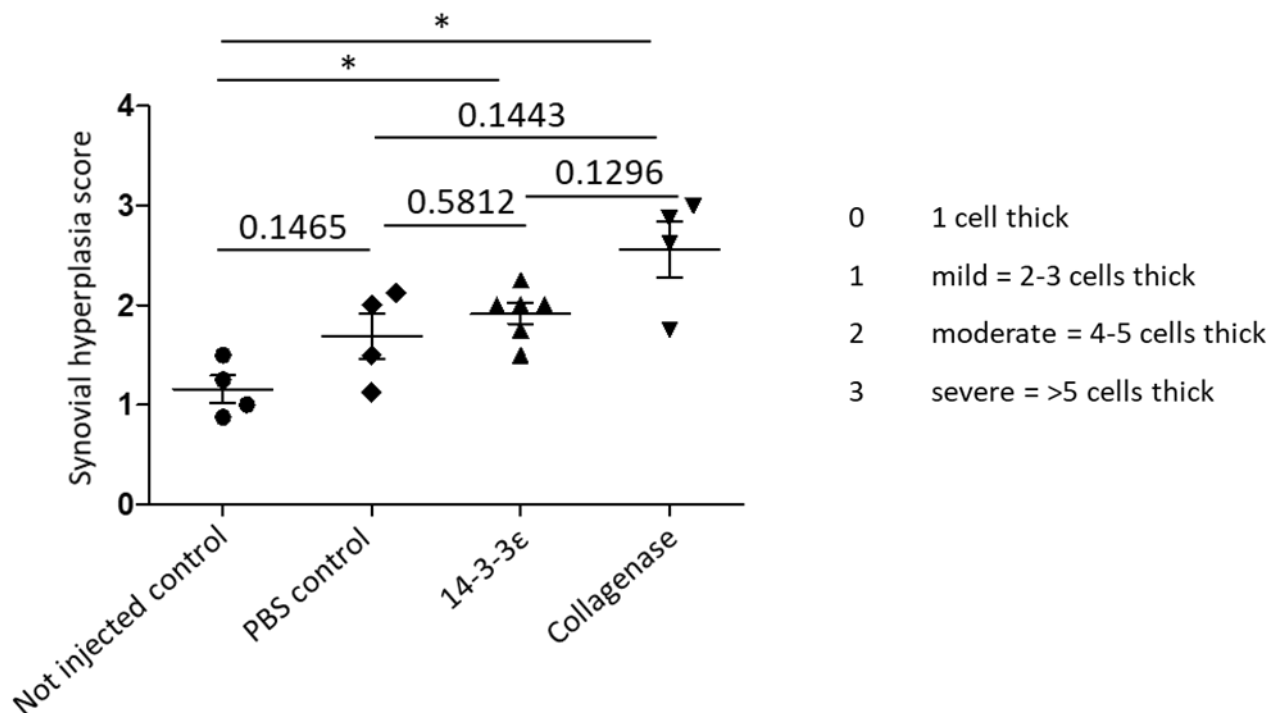


Figure 60 : Résultats du scoring de l'hyperplasie de la membrane synoviale des souris injectées

Souris injectées par du PBS, 14-3-3ε recombinante, la collagénase ou non injectées. Utilisation du score de Krenn (évaluation de l'épaisseur de l'intima de la membrane synoviale).

Nous avons également effectué un marquage des macrophages de la membrane synoviale par le marqueur CD68 (Abcam rabbit polyclonal ab125212, 0.05 µg/ml). Un marquage par

anticorps IgG de lapin (Dako Negative control Rabbit Ig fraction X0903 0.2 µg/ml) a servi de contrôle négatif. Les coupes ont été scorées en double aveugle.

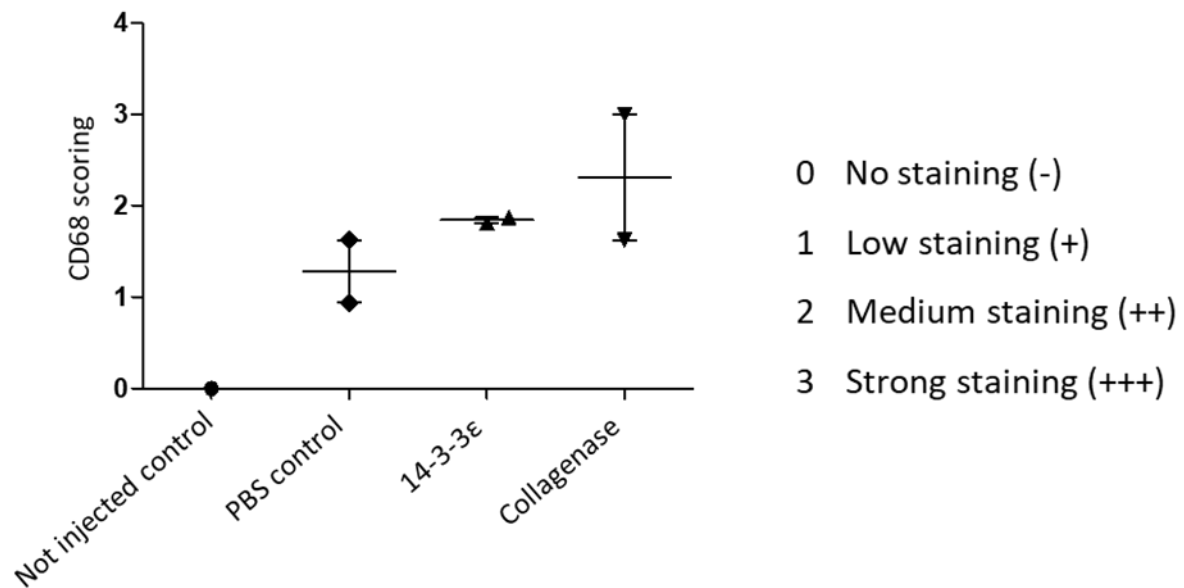


Figure 61 : Résultats du marquage des macrophages présents dans la membrane synoviale par CD68

Souris injectées par du PBS, 14-3-3ε recombinante, la collagénase ou non injectées. Marquage par anticorps IgG de lapin (Dako Negative control Rabbit Ig fraction X0903 0.2 µg/ml) et anticorps CD68 (Abcam rabbit polyclonal ab125212, 0.05 µg/ml).

On observe également une tendance à l'augmentation du marquage CD68 chez les souris injectées par 14-3-3ε comparé aux différents contrôles (injectés PBS ou non injectés).

Cependant ces résultats ne sont que des tendances numériques et nous ne pouvons affirmer qu'une réelle différence existe entre les souris injectées par 14-3-3ε et les souris contrôles. En effet, le contrôle négatif correct pour comparer les effets de la protéine est le contrôle injecté par du PBS. Or les souris PBS montrent une augmentation de l'hyperplasie et du marquage CD68 par rapport aux contrôles non injectés. L'injection en elle-même pourrait être à l'origine de l'inflammation perçue chez les souris 14-3-3ε. Cette expérience nécessite des mises au point du protocole pour limiter cette inflammation due à l'injection.

Discussion

L'ensemble de ces travaux a permis de démontrer que :

- La stimulation par la protéine 14-3-3 ϵ extracellulaire induit la libération de médiateurs pro-inflammatoires par les explants de membrane synoviale humaine composée majoritairement de FLS et de macrophages.
- Les FLS participent à la libération de ces facteurs pro-inflammatoires
- La protéine 14-3-3 ϵ induit l'expression et la libération de marqueurs de type pro-inflammatoire et peut donc polariser les macrophages vers un phénotype « M1 ».
- L'inhibition ou l'absence des récepteurs TLR2 et TLR4 dans des cultures cellulaires de chondrocytes et macrophages murins réduit les effets de 14-3-3 ϵ .

Au cours des dernières années, le laboratoire s'est intéressé à la compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie arthrosique et notamment ceux impliquant la communication entre les différents tissus sous-tendant la progression de l'arthrose. C'est ainsi que la protéine 14-3-3 ϵ a été identifiée dans les milieux conditionnés d'ostéoblastes murins soumis à un stress mécanique et a montré ses effets pro-cataboliques sur les chondrocytes murins. Les différents travaux effectués ont permis de découvrir de nouvelles propriétés extracellulaires de 14-3-3 ϵ montrant de fortes homologues avec celles des alarmines, molécules d'alarmes permettant d'activer l'immunité innée en cas d'agression. Le but de ce travail a été de rechercher les caractéristiques des alarmines et prouver que 14-3-3 ϵ fait partie de cette famille.

- Définition des alarmines

Pour pouvoir répondre à l'hypothèse de notre étude, il a tout d'abord été nécessaire de définir ce qu'est une alarmine. Les alarmines ont été définies par l'équipe d'Oppenheim et al. en 2005 de la façon suivante : « Ces molécules endogènes sont rapidement libérées en réponse à une infection ou à des dommages tissulaires, exercent des effets chemo-attractants et activateurs des cellules présentatrices d'antigène (APC) et activent fortement le système immunitaire » (Oppenheim and Yang 2005). L'équipe d'Oppenheim ne considérait pas les cytokines comme des alarmines car elles possèdent des effets activateurs des APC mais pas de capacité chemo-attractives (Oppenheim and Yang 2005). Cette équipe considère que les

alarmines doivent avoir des propriétés d'adjuvants endogènes. Au fur et à mesure des années, le concept et la liste des alarmines ont progressivement évolué. La définition s'est élargie et a permis d'inclure les molécules générées par une mort cellulaire non programmée et capables d'activer les systèmes immunitaires inné et adaptatif (Yang et al. 2017b). A présent, de nombreuses molécules sont classées comme des alarmines, comme les médiateurs dérivés de granules (défensines, cathelicidines, Granulysines), des médiateurs nucléaires (HMGB1, IL-1 α , IL-33) et cytoplasmiques (HSP, protéines S100, ATP, Acide urique) (Yang et al. 2017b). Une équipe a proposé une nouvelle nomenclature en fonction du mode de libération des molécules par les cellules endommagées différenciant ainsi les cytokines : libérées activement par les cellules de l'immunité majoritairement ; les alarmines : libérées passivement par les cellules somatiques endommagées et les stressorines : libérées par les cellules sous l'effet d'un stress (Rider et al. 2017).

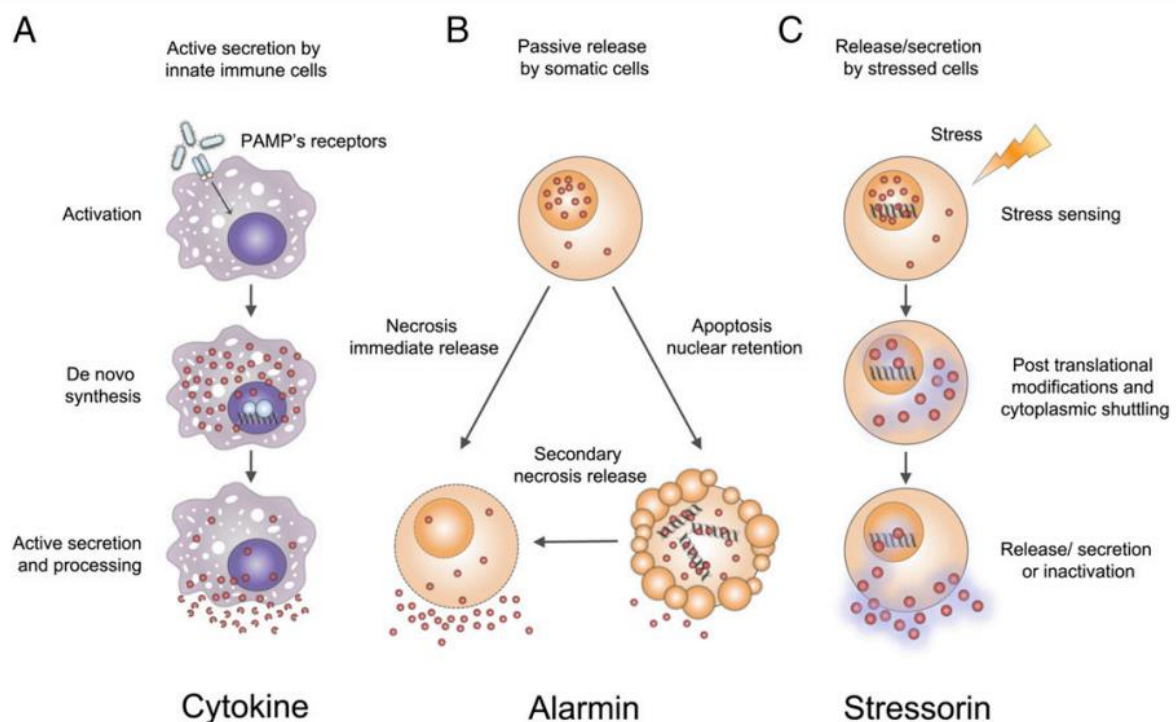


Figure 62 : Nomenclature proposée par Rider et al. pour classer les cytokines, alarmines et stressorines

D'après Rider et al. 2017. (Rider et al. 2017)

La définition des alarmines est donc en constante évolution et ne simplifie par l'identification des molécules candidates. Nous nous sommes donc appuyés sur les propriétés les plus reconnues des alarmines afin de définir la protéine 14-3-3 ϵ comme une nouvelle alarmines dans l'arthrose. Nous avons étudié les propriétés suivantes : sa taille (33kDa), ses rôles intracellulaires physiologiques, son interaction avec les récepteurs connus des alarmines

(TLR2 et TLR4), sa capacité à être libérée dans le milieu extracellulaire et à provoquer l'acquisition de phénotype catabolique et pro-inflammatoires sur les différents types cellulaires de l'articulation.

- Evaluation du rôle de 14-3-3ε *in vivo*

Nous nous sommes inspirés des travaux réalisés *in vivo* avec l'alarmine S100A8/A9 pour concevoir notre étude d'injections intra-articulaires avec la protéine 14-3-3ε (van Lent et al. 2008). L'équipe de Van Lent a montré que l'injection de l'alarmine S100A8/A9 chez des souris S100A9^{-/-} induit une inflammation de l'articulation (infiltration de cellules inflammatoires dans la membrane synoviale, épaissement de l'intima) et la perte de protéoglycanes. Par ailleurs, la stimulation de cultures de macrophages par S100A8/A9 a induit l'expression de MMP2, 3, 9 et majoritairement MMP13.

L'étude des effets *in vivo* par injection intra-articulaire de 14-3-3ε chez des souris WT a montré des tendances à l'augmentation de l'hyperplasie et d'infiltration par des macrophages de la membrane synoviale. Ces résultats appuient le rôle potentiellement chemoattractant de la protéine 14-3-3ε. Cette étude nécessite des modifications du protocole car l'injection elle-même provoque une inflammation ce qui ne permet pas de différencier significativement les souris contrôles injectées par du PBS ou bien par la 14-3-3ε. Nous pourrions augmenter la durée entre les injections pour éviter des stimulations inflammatoires trop proches ou tenter d'augmenter la dose de 14-3-3ε injectée pour éviter de multiples injections.

- Effet propre de la protéine 14-3-3ε recombinante

Au cours de nos travaux, nous avons été confrontés à la présence d'endotoxines dans nos lots de protéine recombinante. Ce problème concerne de nombreuses études utilisant des protéines recombinantes synthétisées par *Escherichia coli* et complique les travaux liés à l'immunité innée, l'inflammation et l'activation des TLRs (Wakelin et al. 2006; Schwarz et al. 2014). Parmi les différentes stratégies possibles afin de discriminer l'effet propre de la protéine 14-3-3ε recombinante de celle de la contamination par les endotoxines, nous avons choisi d'utiliser la Polymyxine B, un anti-bactérien se liant aux lipopolysacharrides (Vesentini et al. 2010) pour inhiber le LPS des endotoxines présent lors de la stimulation par 14-3-3ε. La polymyxine B n'a montré aucun effet sur les cellules contrôles mais a inhibé totalement l'effet des endotoxines lors de stimulations couplées au LPS. En revanche, elle n'a pas ou peu inhibé les effets inflammatoires et cataboliques de 14-3-3ε sur les chondrocytes murins. Au niveau des cultures de macrophages, l'inhibition de 14-3-3ε par le PMB a été un peu plus prononcée. Cette différence peut être due à la plus grande sensibilité des macrophages et la présence de

plus nombreux PRR comme TLR4 à leur surface. L'utilisation du PMB a donc permis de valider l'effet propre de notre protéine 14-3-3 ϵ recombinante.

- Implication des différents récepteurs de 14-3-3 ϵ

14-3-3 ϵ a été identifiée dans les milieux conditionnés d'ostéoblastes ayant subi un stress mécanique. Comme de nombreuses isoformes de 14-3-3 impliquées dans des pathologies, celle-ci provoque l'acquisition d'un phénotype pro-catabolique par les cultures de chondrocytes murins. L'un des récepteurs identifiés de 14-3-3 ϵ est le récepteur CD13 présent à la surface membranaire des chondrocytes (Nefla et al. 2015). L'hypothèse de 14-3-3 ϵ en tant que nouvelle alarmine nous a orientés vers la recherche d'interactions avec les récepteurs de l'immunité innée, les TLRs et particulièrement TLR2 et TLR4 qui lient les alarmines. L'inhibition de ces récepteurs a provoqué une diminution significative des effets de 14-3-3 ϵ . Par ailleurs, des cultures de macrophages et chondrocytes KO pour les récepteurs produisaient également moins de médiateurs pro-inflammatoires et cataboliques en réponse à 14-3-3 ϵ . Il est difficile d'établir la participation de chaque récepteur dans la réponse à 14-3-3 ϵ car les expériences d'inhibition des récepteurs TLR2 et TLR4 ou bien leur absence chez les souris KO ont montré de fortes inhibitions individuelles des effets de 14-3-3 ϵ . Ces résultats suggèrent que les deux récepteurs sont interdépendants. Des études ont soulevé la possibilité que les récepteurs TLRs se coordonnent entre eux ou s'associent avec d'autres récepteurs (comme le récepteur RAGE) lors de stimulation par des alarmines (Ibrahim et al. 2013). L'hypothèse de l'implication de plusieurs récepteurs dans la réponse à 14-3-3 ϵ est supportée par de nombreuses études sur les alarmines et leurs multiples récepteurs. HMGB1 est capable de se lier aux TLRs (TLR2 et TLR4) ainsi qu'à RAGE et d'activer des cascades de signalisation augmentant la libération de TNF α et IL6 (Nogueira-Machado et al. 2011; Zhang et al. 2019). Les protéines S100 extracellulaires possèdent également différents récepteurs. S100B active les voies ERK et NF- κ B chez les chondrocytes par sa liaison au récepteur RAGE (Xia et al. 2018). S100A8 et S100A9 ont des effets pro-inflammatoires dépendants de TLR4 et RAGE (Ma et al. 2017).

Le travail de modélisation a été réalisé pour déterminer si la protéine 14-3-3 ϵ est capable de se lier directement aux récepteurs. L'étude par SPR a montré une affinité entre 14-3-3 ϵ et TLR2 et TLR4. La protéine semble plus affine pour TLR2 que pour TLR4. L'étude *in silico* a permis d'identifier des résidus potentiels de liaison mais les études préliminaires (n=1) *in*

in vitro testant les peptides mimiques de TLR2 n'ont pas permis de montrer d'inhibition des effets de 14-3-3ε. Ces résidus ne semblent donc pas être ceux responsables de la liaison. Cependant, d'autres zones peptidiques de TLR2 contiennent des résidus phosphorylables et accessibles par le dimère de 14-3-3ε qui pourraient permettre la liaison entre les partenaires.

- Présence de 14-3-3ε dans les liquides synoviaux humains

Nous avons voulu déterminer la concentration de la protéine 14-3-3ε dans le liquide synovial des patients arthrosiques. Malgré la disponibilité de nouveau kits de dosage protéique de cette isoforme spécifique, nous n'avons pas pu déterminer la quantité de 14-3-3ε (sensibilité de l'Elisa spécifique de 14-3-3ε >0.34 ng/ml). La faible présence de 14-3-3ε peut être due au fait que la protéine 14-3-3ε pourrait être captée par des récepteurs solubles. Différents récepteurs de l'immunité innée comme les opsonines sont présents extracellulairement et sont capables de capter les pathogènes et les phagocyter. Un autre récepteur soluble comme le récepteur RAGE soluble (sRAGE) a été étudié pour son rôle de leurre dans différentes pathologies. Ce récepteur est capable de lier des alarmines telles que HMGB1 ou les protéines S100 (Chen et al. 2009; Manganelli et al. 2019). Des résultats préliminaires du laboratoire ont montré que l'inhibition de RAGE diminuait les effets de 14-3-3ε sur des cultures de chondrocytes murins. Dans l'hypothèse où la protéine 14-3-3ε pourrait posséder différents récepteurs comme certaines alarmines, elle pourrait être captée par des récepteurs solubles et diminuer sa concentration sous forme libre dans les liquides synoviaux de patients arthrosiques. Par ailleurs, nous avons identifié la protéine 14-3-3ε dans les milieux conditionnés d'ostéoblastes ayant subi une compression et donc associé au phénotype d'arthrose lié au stress mécanique. Afin de mieux évaluer la présence de la protéine dans les liquides synoviaux, une sélection des patients présentant plutôt ce phénotype permettrait peut-être d'améliorer la détection.

Les recherches sur l'implication des alarmines dans les différents phénotypes d'arthrose ont progressé ces dernières années. L'étude de 14-3-3ε a permis de progresser dans la compréhension du rôle des alarmines dans l'arthrose de phénotype mécanique. De nombreuses autres alarmines jouent un rôle dans l'activation de l'immunité et ce de manière différente en fonction des différents phénotypes d'arthrose. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressées également au lien entre les alarmines et l'inflammation due au vieillissement, appelé « inflammaging » et leur lien avec l'arthrose. Le vieillissement et l'arthrose présentent des mécanismes communs comme l'établissement d'une inflammation chronique, stérile et de bas grade. Le processus d'inflammaging est causé par l'accumulation

de cellules sénescents et la baisse d'efficacité du système immunitaire (Franceschi et al. 2000b). Les cellules sénescents subissent de nombreuses modifications de leurs mécanismes intra-cellulaires et évoluent vers un phénotype appelé « senescence-associated secretory phenotype »(SASP) (Coppé et al. 2008). Elles produisent alors de nombreux médiateurs pro-inflammatoires tels que des cytokines (IL6 et Il-1 α/β), des chemokines (MCP1, IL-8, GRO α), des facteurs de croissance (TGF β , VEGF) et des protéases (MMP3) (Soto-Gamez and Demaria 2017). Ces facteurs contribuent à la dégradation des tissus environnants et à la libération des DAMPS (HMGB1, les protéines S100, l'acide urique, l'ATP, les HSPs) par les cellules endommagées et les cellules de l'immunité innée. Ces DAMPS vont activer les récepteurs de l'immunité (RAGE et TLRs) ainsi que l'inflammasome et entretenir l'inflammation de bas grade déjà présente. Différentes stratégies thérapeutiques ciblant les différents mécanismes impliqués dans l'arthrose liée à l'inflammaging sont en cours d'étude. Cette étude a fait l'objet d'une revue « Danger signals and inflammaging in osteoarthritis » publiée dans le journal *Clinical and experimental Rheumatology* 2019 (Millerand et al. 2019).

(Revue en annexe)

Conclusion et perspectives

L'ensemble de ces travaux a été réalisé afin d'étudier les effets de la protéine 14-3-3 ϵ extracellulaire sur les différents types cellulaires présents dans l'articulation (chondrocytes, macrophages, FLS) et déterminer si les récepteurs de l'immunité innée, TLR2 et TLR4 sont impliqués dans ces effets.

Précédemment, la protéine 14-3-3 ϵ a été identifiée dans les milieux conditionnés d'ostéoblastes murins soumis à un stress mécanique et a montré des effets pro-cataboliques sur les chondrocytes murins. Les nouvelles expériences *in vitro* réalisées au cours de ma thèse montrent que la protéine 14-3-3 ϵ recombinante a des effets pro-inflammatoires sur les explants de membranes synoviales humaines ainsi que sur les deux types cellulaires qui la composent, les FLS et les macrophages. De plus, 14-3-3 ϵ induit une polarisation des macrophages humains et murins vers un phénotype pro-inflammatoire M1 en provoquant l'augmentation significative de leurs productions de facteurs inflammatoires. Les récepteurs TLR2 et TLR4 sont impliqués dans les effets de la protéine 14-3-3 ϵ car l'inhibition de ces récepteurs sur des cultures de chondrocytes murins sauvages ou l'absence de ces récepteurs dans des cultures de chondrocytes ou macrophages murins déficients pour ces récepteurs provoque une diminution significative des effets de 14-3-3 ϵ . L'étude des interactions entre 14-3-3 ϵ et les récepteurs TLR2 et TLR4 par la technique de résonance plasmonique de surface a mis en évidence une interaction entre les récepteurs TLR2/TLR4 et 14-3-3 ϵ . L'affinité est plus forte entre TLR2 et 14-3-3 ϵ . Les résidus thréonine T142 et sérine S143 phosphorylés, identifiés par modélisation informatique chez TLR2, ne semblent pas responsables de la liaison TLR2 et 14-3-3 ϵ . Toutefois, d'autres résidus phosphorylés situés sur d'autres zones de TLR2 sont encore à étudier.

L'ensemble de ces résultats s'ajoutent aux données déjà connues ou mises en évidence précédemment par le laboratoire sur la protéine 14-3-3 ϵ et la désignent comme une nouvelle alarmine impliquée dans l'arthrose (**Figure 63**).

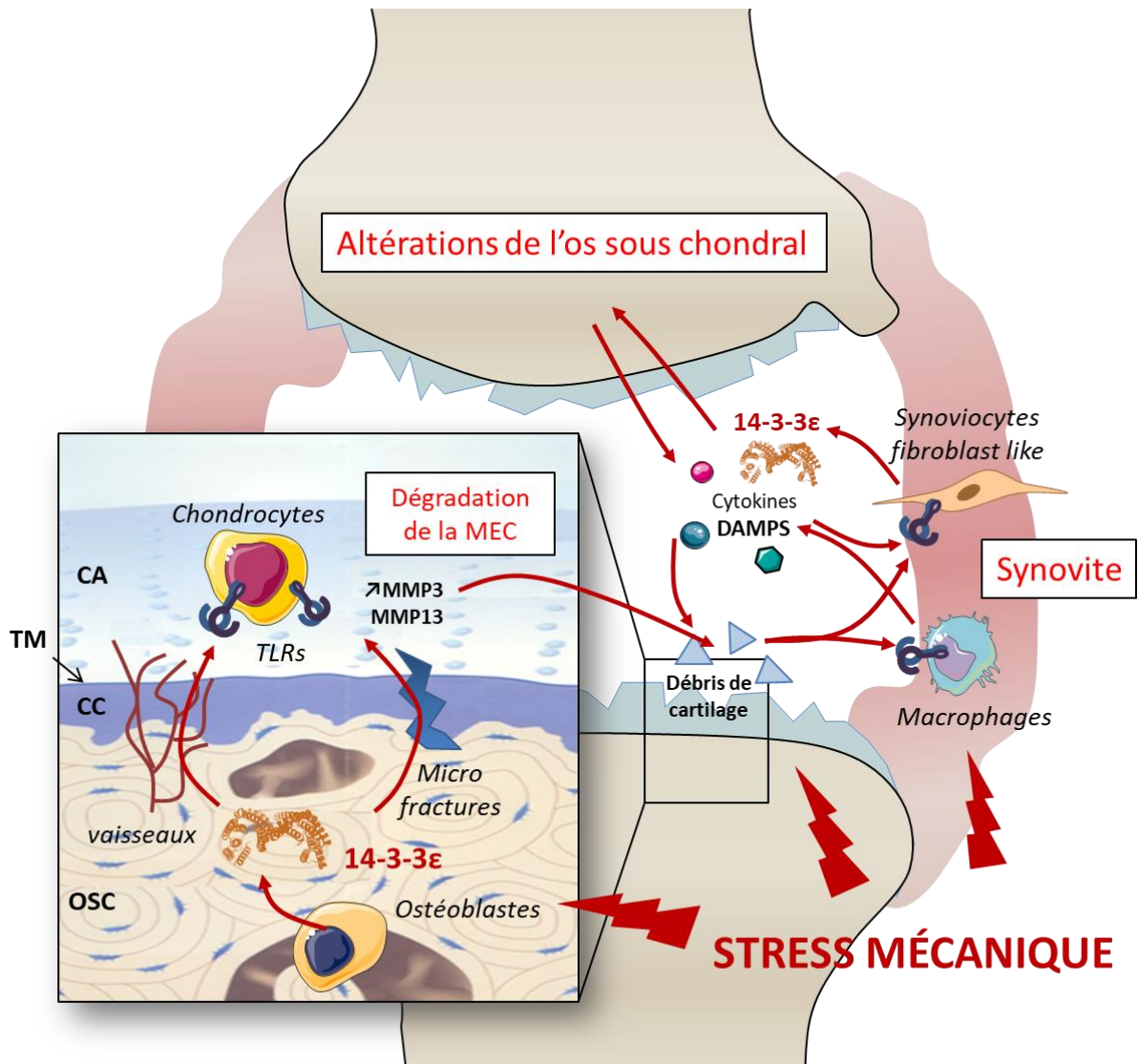


Figure 63 : Résumé schématique de l'action de 14-3-3ε sur les différents types cellulaires de l'articulation dans un contexte d'arthrose mécanique.

- ❖ Etude des interactions directes de l'alarmine 14-3-3ε avec les récepteurs TLR2 et TLR4:

Nous avons montré par des expériences *in vitro* que les effets de 14-3-3ε impliquent les récepteurs de l'immunité, TLR2 et TLR4. Une forte affinité entre 14-3-3ε et le récepteur TLR2 a été mise en évidence par étude *in silico*. Afin de valider la liaison directe entre ces deux partenaires, de nombreux résidus phosphorylés présents dans la séquence peptidique de TLR2 restent à étudier par étude *in silico*. De plus, le récepteur TLR4 présentait également une bonne affinité pour la protéine 14-3-3ε et nous avons montré son implication dans les effets pro-inflammatoires de 14-3-3ε sur les chondrocytes et macrophages murins. L'étude de la liaison entre TLR4 et 14-3-3ε nécessite également

d'être poursuivie. Ces recherches pourront être complétées et confirmées par des études des voies de signalisation activées par les récepteurs de l'immunité et notamment les voies NF- κ B et MAPK en réponse à la protéine 14-3-3 ϵ . Les résultats permettront d'apporter une preuve supplémentaire de la classification de 14-3-3 ϵ en tant que nouvelle alarmine dans l'arthrose.

❖ Effets *in vivo* de l'alarmine 14-3-3 ϵ :

Afin de mieux caractériser les effets pro-inflammatoires de la protéine 14-3-3 ϵ sur les tissus articulaires et notamment l'inflammation de la membrane synoviale, nous souhaitons poursuivre l'étude de ses effets *in vivo*. L'expérience préliminaire d'injections intra-articulaires de 14-3-3 ϵ a montré des résultats encourageants de son effet inflammatoire sur l'augmentation de l'hyperplasie et de l'infiltration de macrophages pro-inflammatoires au niveau de la membrane synoviale. La mise au point d'un nouveau protocole d'injection est nécessaire pour minimiser les effets de l'injection en elle-même et caractériser précisément les effets de la protéine 14-3-3 ϵ *in vivo*.

De plus, un modèle de souris déficiente pour l'isoforme 14-3-3 ϵ a déjà été utilisé pour des études sur le cerveau et le coeur (Toyo-oka et al. 2003; Kosaka et al. 2012). Ces souris 14-3-3 $\epsilon^{-/-}$ pourraient permettre d'étudier l'impact de 14-3-3 ϵ en induisant une arthrose chez ces souris par un modèle de déstabilisation du ménisque médial (DMM). Au vu de nos résultats, l'absence de la protéine devrait avoir un effet protecteur et diminuer la sévérité de l'arthrose et l'inflammation de la membrane synoviale.

❖ Rôle de Biomarqueur de la protéine 14-3-3 ϵ dans l'arthrose :

L'implication des alarmines dans l'arthrose est appuyée par de nombreuses études et montre leur importance dans l'activation de l'immunité innée et le soutien de l'inflammation de bas grade dans l'arthrose. Les alarmines constituent une source de biomarqueurs dans l'arthrose. C'est le cas de l'alarmine S100A8/A9 dont l'expression est corrélée à l'inflammation de la membrane synoviale, la dégradation de l'os et du cartilage (Kang et al. 2014). Différentes isoformes de protéines 14-3-3 extracellulaires servent actuellement de biomarqueurs dans des pathologies telles que la polyarthrite rhumatoïde (Maksymowych et al. 2014a; Kilborn and Bukhari 2018) et la maladie de Creutzfeld-Jacob (Shiga et al. 2006).

Nous avons montré que la protéine 14-3-3 ϵ est présente dans les liquides synoviaux de patients arthrosiques.

Afin de définir 14-3-3 ϵ comme un nouveau biomarqueur dans l'arthrose, l'analyse ciblée de liquides synoviaux de patients arthrosiques présentant un phénotype de stress mécanique sera effectuée afin de quantifier sa concentration. L'analyse de la corrélation entre sa concentration et la sévérité de l'arthrose chez les patients déterminée par les scores radiographiques, nociceptifs et la présence de facteurs liés à la dégradation du cartilage (COMP, MMP-3 et MMP-13) permettrait d'approfondir les connaissances sur cette alarmine et la définir comme un nouveau biomarqueur dans l'arthrose.

❖ Rôle de la protéine 14-3-3 ϵ dans la douleur liée à l'arthrose :

A l'heure actuelle, le lien entre les mécanismes responsables de la douleur et l'arthrose ne sont toujours pas clairement élucidés. Les alarmines constituent un axe majeur de recherche car leurs propriétés activatrices des TLR et notamment TLR4 en font des candidates majeures dans l'activation des voies de la douleur. En effet, il a été montré récemment que les neurones DRG (dorsal Root ganglia) impliqués dans la nociception expriment les récepteurs PRR, TLR2 et TLR4 (Qi et al. 2011; Miller et al. 2015; Berta et al. 2017). De nombreuses recherches portant sur les alarmines et leur rôle dans la douleur dans les maladies articulaires appuient l'effet des alarmines comme HMGB1 et les protéines S100 dans la douleur (Miller et al. 2015; Simkhes et al. 2016; Cher et al. 2018; Syx et al. 2018).

La protéine 14-3-3 ϵ pourrait donc s'ajouter aux effets des nombreuses alarmines et médiateurs pro-inflammatoires soutenant l'inflammation de bas-grade et ainsi participer à la dégradation de l'articulation et potentiellement à la douleur au cours de l'arthrose.

Ce travail a permis d'identifier la protéine 14-3-3 ϵ comme une nouvelle alarmine dans l'arthrose. Les perspectives envisagées pourraient permettre d'améliorer la compréhension de ses mécanismes d'action et la désigner comme un potentiel biomarqueur dans l'arthrose.

Bibliographie

- Aghazadeh Y, Papadopoulos V. The role of the 14-3-3 protein family in health, disease, and drug development. *Drug Discovery Today*. 2016 Feb;21(2):278–87.
- Aigner T, Zien A, Hanisch D, Zimmer R. Gene expression in chondrocytes assessed with use of microarrays. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85-A Suppl 2:117–23.
- Aitken A, Howell S, Jones D, Madrazo J, Patel Y. 14-3-3 alpha and delta are the phosphorylated forms of raf-activating 14-3-3 beta and zeta. In vivo stoichiometric phosphorylation in brain at a Ser-Pro-Glu-Lys MOTIF. *J Biol Chem*. 1995 Mar 17;270(11):5706–9.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jul;4(7):499–511.
- Akizuki S, Mow VC, Müller F, Pita JC, Howell DS, Manicourt DH. Tensile properties of human knee joint cartilage: I. Influence of ionic conditions, weight bearing, and fibrillation on the tensile modulus. *J Orthop Res*. 1986;4(4):379–92.
- Alexiou P, Chatzopoulou M, Pegklidou K, Demopoulos VJ. RAGE: a multi-ligand receptor unveiling novel insights in health and disease. *Curr Med Chem*. 2010;17(21):2232–52.
- Alford JW, Cole BJ. Cartilage Restoration, Part 1: Basic Science, Historical Perspective, Patient Evaluation, and Treatment Options. *Am J Sports Med*. 2005 Feb;33(2):295–306.
- Allen KD. Racial and ethnic disparities in osteoarthritis phenotypes. *Curr Opin Rheumatol*. 2010 Sep;22(5):528–32.
- Almonte-Becerril M, Navarro-Garcia F, Gonzalez-Robles A, Vega-Lopez MA, Lavalley C, Kouri JB. Cell death of chondrocytes is a combination between apoptosis and autophagy during the pathogenesis of Osteoarthritis within an experimental model. *Apoptosis*. 2010 May;15(5):631–8.
- Al-Ofi EA, Al-Ghamdi BS. High-Mobility Group Box 1 (HMGB1), an Endogenous Ligand of Toll-Like Receptors 2 and 4, Induces Astroglial Inflammation via NF- κ B Pathway. *Folia Morphol (Warsz)*. 2018 Aug 14;
- Alonso-Fernández P, Puerto M, Maté I, Ribera JM, de la Fuente M. Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of young adults. *J Am Geriatr Soc*. 2008 Dec;56(12):2244–51.
- Amano SU, Cohen JL, Vangala P, Tencerova M, Nicoloso SM, Yawe JC, et al. Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metab*. 2014 Jan 7;19(1):162–71.
- Anghelina M, Sjostrom D, Perera P, Nam J, Knobloch T, Agarwal S. Regulation of biomechanical signals by NF-kappaB transcription factors in chondrocytes. *Biorheology*. 2008;45(3–4):245–56.
- Arnoldi CC, Reimann I, Bretlau P. The synovial membrane in human coxarthrosis: light and electron microscopic studies. *Clin Orthop Relat Res*. 1980 May;(148):213–20.

- Assirelli E, Dolzani P, Pulsatelli L, Addimanda O, Lisignoli G, Mariani E, et al. Complement factor expression in osteoarthritis joint compartments. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2016 Apr 1;24:S383–4.
- Attur M, Belitskaya-Lévy I, Oh C, Krasnokutsky S, Greenberg J, Samuels J, et al. Increased interleukin-1 β gene expression in peripheral blood leukocytes is associated with increased pain and predicts risk for progression of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2011 Jul;63(7):1908–17.
- Aucott H, Sowinska A, Harris HE, Lundback P. Ligation of free HMGB1 to TLR2 in the absence of ligand is negatively regulated by the C-terminal tail domain. *Mol Med [Internet]*. 2018 May 4 [cited 2020 Feb 2];24. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6016865/>
- Baici A, Hörler D, Lang A, Merlin C, Kissling R. Cathepsin B in osteoarthritis: zonal variation of enzyme activity in human femoral head cartilage. *Ann Rheum Dis*. 1995 Apr;54(4):281–8.
- Barbé F, Douglas T, Saleh M. Advances in Nod-like receptors (NLR) biology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014 Dec;25(6):681–97.
- Barboza E, Hudson J, Chang W-P, Kovats S, Towner RA, Silasi-Mansat R, et al. Profibrotic Infrapatellar Fat Pad Remodeling Without M1 Macrophage Polarization Precedes Knee Osteoarthritis in Mice With Diet-Induced Obesity. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2017;69(6):1221–32.
- Barnum SR. C4a: An Anaphylatoxin in Name Only. *J Innate Immun*. 2015;7(4):333–9.
- Barreto G, Sandelin J, Salem A, Nordström DC, Waris E. Toll-like receptors and their soluble forms differ in the knee and thumb basal osteoarthritic joints. *Acta Orthop*. 2017 Jun;88(3):326–33.
- Bau B, Gebhard PM, Haag J, Knorr T, Bartnik E, Aigner T. Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum*. 2002 Oct;46(10):2648–57.
- Baxter HC, Fraser JR, Liu W-G, Forster JL, Clokie S, Steinacker P, et al. Specific 14-3-3 isoform detection and immunolocalization in prion diseases. *Biochem Soc Trans*. 2002 Aug;30(4):387–91.
- van Beijnum JR, Buurman WA, Griffioen AW. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis*. 2008 Mar;11(1):91–9.
- Bellavia D, Fradà G, Di Franco P, Feo S, Franceschi C, Sansoni P, et al. C4, BF, C3 allele distribution and complement activity in healthy aged people and centenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1999 Apr;54(4):B150-153.
- Bendall AJ, Abate-Shen C. Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development. *Gene*. 2000 Apr 18;247(1–2):17–31.
- Bennell KL, Hunter DJ, Hinman RS. Management of osteoarthritis of the knee. *BMJ*. 2012 Jul 30;345:e4934.
- Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis and Cartilage*. 2013 Jan 1;21(1):16–21.

- Berenbaum F. Deep phenotyping of osteoarthritis: a step forward. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2019 Jan;78(1):3–5.
- Berenbaum F, Wallace IJ, Lieberman DE, Felson DT. Modern-day environmental factors in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(11):674–81.
- van den Berg WB. Osteoarthritis year 2010 in review: pathomechanisms. *Osteoarthr Cartil*. 2011 Apr;19(4):338–41.
- Berry PA, Maciewicz RA, Cicuttini FM, Jones MD, Hellowell CJ, Wluka AE. Markers of bone formation and resorption identify subgroups of patients with clinical knee osteoarthritis who have reduced rates of cartilage loss. *J Rheumatol*. 2010a Jun;37(6):1252–9.
- Berry PA, Maciewicz RA, Wluka AE, Downey-Jones MD, Forbes A, Hellowell CJ, et al. Relationship of serum markers of cartilage metabolism to imaging and clinical outcome measures of knee joint structure. *Ann Rheum Dis*. 2010b Oct;69(10):1816–22.
- Berta T, Qadri Y, Tan P-H, Ji R-R. Targeting dorsal root ganglia and primary sensory neurons for the treatment of chronic pain. *Expert Opin Ther Targets*. 2017;21(7):695–703.
- Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol*. 2017 Jan;14(1):43–64.
- Bhatia A, Blades S, Cambridge G, Edwards JC. Differential distribution of Fc gamma RIIIa in normal human tissues and co-localization with DAF and fibrillin-1: implications for immunological microenvironments. *Immunology*. 1998 May;94(1):56.
- Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet*. 1999 May;22(1):85–9.
- Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*. 2006 Oct 10;81(1):1–5.
- Bidwell JP, Yang J, Robling AG. Is HMGB1 an osteocyte alarmin? *J Cell Biochem*. 2008 Apr 15;103(6):1671–80.
- Bierma-Zeinstra SM, van Middelkoop M. Osteoarthritis: In search of phenotypes. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(12):705–6.
- Bihn EA, Paul AL, Wang SW, Erdos GW, Ferl RJ. Localization of 14-3-3 proteins in the nuclei of arabidopsis and maize. *Plant J*. 1997 Dec;12(6):1439–45.
- Bin L-H, Xu L-G, Shu H-B. TIRP, a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein involved in TIR signaling. *J Biol Chem*. 2003 Jul 4;278(27):24526–32.
- Bingham CO, Buckland-Wright JC, Garner P, Cohen SB, Dougados M, Adami S, et al. Risedronate decreases biochemical markers of cartilage degradation but does not decrease symptoms or slow radiographic progression in patients with medial compartment osteoarthritis of the knee: results of the two-year multinational knee osteoarthritis structural arthritis study. *Arthritis Rheum*. 2006 Nov;54(11):3494–507.
- Blalock D, Miller A, Tilley M, Wang J. Joint Instability and Osteoarthritis. *Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders*. 2015 Jan;8:CMAMD.S22147.

- Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB. TGF-beta and osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2007 Jun;15(6):597–604.
- Blom AB, Lent PL van, Libregts S, Holthuysen AE, Kraan PM van der, Rooijen N van, et al. Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: Involvement of matrix metalloproteinase 3. *Arthritis & Rheumatism.* 2007;56(1):147–57.
- Blumenfeld O, Williams FMK, Hart DJ, Spector TD, Arden N, Livshits G. Association between cartilage and bone biomarkers and incidence of radiographic knee osteoarthritis (RKO) in UK females: a prospective study. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2013 Jul 1;21(7):923–9.
- Bobacz K, Sunk IG, Hofstaetter JG, Amoyo L, Toma CD, Akira S, et al. Toll-like receptors and chondrocytes: The lipopolysaccharide-induced decrease in cartilage matrix synthesis is dependent on the presence of toll-like receptor 4 and antagonized by bone morphogenetic protein 7. *Arthritis & Rheumatism.* 2007 Jun;56(6):1880–93.
- Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, Gomis-Rüth FX, Nagase H, Tschesche H, et al. Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Jun 30;878:73–91.
- Bondeson J, Blom AB, Wainwright S, Hughes C, Caterson B, Berg WB van den. The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism.* 2010;62(3):647–57.
- Bondeson J, Wainwright S, Hughes C, Caterson B. The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis: a review. :7.
- Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011 Feb;26(2):229–38.
- Bonnefoy-Bérard N, Liu YC, von Willebrand M, Sung A, Elly C, Mustelin T, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by association with 14-3-3 proteins in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Oct 24;92(22):10142–6.
- Bonucci E. Bone mineralization. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012 Jan 1;17:100–28.
- Boston PF, Jackson P, Thompson RJ. Human 14-3-3 protein: radioimmunoassay, tissue distribution, and cerebrospinal fluid levels in patients with neurological disorders. *J Neurochem.* 1982 May;38(5):1475–82.
- Boyd JH, Kan B, Roberts H, Wang Y, Walley KR. S100A8 and S100A9 mediate endotoxin-induced cardiomyocyte dysfunction via the receptor for advanced glycation end products. *Circ Res.* 2008 May 23;102(10):1239–46.
- Bradley K, North J, Saunders D, Schwaeble W, Jeziorska M, Woolley DE, et al. Synthesis of classical pathway complement components by chondrocytes. *Immunology.* 1996 Aug;88(4):648–56.
- Braidman IP, Hainey L, Batra G, Selby PL, Saunders PT, Hoyland JA. Localization of estrogen receptor beta protein expression in adult human bone. *J Bone Miner Res.* 2001 Feb;16(2):214–20.
- Brömme D, Bonneau PR, Lachance P, Wiederanders B, Kirschke H, Peters C, et al. Functional expression of human cathepsin S in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of the recombinant enzyme. *J Biol Chem.* 1993 Mar 5;268(7):4832–8.

- Buckland-Wright C. Subchondral bone changes in hand and knee osteoarthritis detected by radiography. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2004 Jan 1;12:10–9.
- Buckland-Wright JC, Messent EA, Bingham CO, Ward RJ, Tonkin C. A 2 yr longitudinal radiographic study examining the effect of a bisphosphonate (risedronate) upon subchondral bone loss in osteoarthritic knee patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2007 Feb 1;46(2):257–64.
- Buckwalter JA, Anderson DD, Brown TD, Tochigi Y, Martin JA. The Roles of Mechanical Stresses in the Pathogenesis of Osteoarthritis: Implications for Treatment of Joint Injuries. *Cartilage*. 2013 Oct 1;4(4):286–94.
- Burr DB. The importance of subchondral bone in the progression of osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl*. 2004 Apr;70:77–80.
- Burr DB, Radin EL. Microfractures and microcracks in subchondral bone: are they relevant to osteoarthrosis? *Rheum Dis Clin North Am*. 2003 Nov;29(4):675–85.
- Butcher SK, O'Carroll CE, Wells CA, Carmody RJ. Toll-Like Receptors Drive Specific Patterns of Tolerance and Training on Restimulation of Macrophages. *Front Immunol [Internet]*. 2018 [cited 2020 Feb 2];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00933/full>
- Caglič D, Repnik U, Jedeszko C, Kosec G, Miniejew C, Kindermann M, et al. The proinflammatory cytokines interleukin-1 α and tumor necrosis factor α promote the expression and secretion of proteolytically active cathepsin S from human chondrocytes. *Biol Chem*. 2013 Feb;394(2):307–16.
- Cannizzo ES, Clement CC, Sahu R, Follo C, Santambrogio L. Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. *J Proteomics*. 2011 Oct 19;74(11):2313–23.
- Cantagrel A, Constantin A. Membrane synoviale : de la physiologie à l'inflammation rhumatoïde. Implications thérapeutiques. 2013.
- Cardoso JS, Riley JL, Glover T, Sibille KT, Bartley EJ, Goodin BR, et al. Experimental pain phenotyping in community-dwelling individuals with knee osteoarthritis. *Pain*. 2016 Sep;157(9):2104–14.
- Carlesso LC, Neogi T. Identifying pain susceptibility phenotypes in knee osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2019 Oct;37 Suppl 120(5):96–9.
- Carlesso LC, Segal NA, Frey-Law L, Zhang Y, Na L, Nevitt M, et al. Pain Susceptibility Phenotypes in Those Free of Knee Pain With or at Risk of Knee Osteoarthritis: The Multicenter Osteoarthritis Study. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2019;71(4):542–9.
- Carlson CS, Loeser RF, Jayo MJ, Weaver DS, Adams MR, Jerome CP. Osteoarthritis in cynomolgus macaques: a primate model of naturally occurring disease. *J Orthop Res*. 1994 May;12(3):331–9.
- Carreno F, Goñi C, Castro L, Ferro E. 14-3-3 epsilon modulates the stimulated secretion of endopeptidase 24.15. *Journal of neurochemistry*. 2005 May 1;93:10–25.
- Carrión M, Juarranz Y, Pérez-García S, Jimeno R, Pablos JL, Gomariz RP, et al. RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide. *Arthritis Rheum*. 2011 Jun;63(6):1626–36.

- Carroll MV, Sim RB. Complement in health and disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011 Sep 16;63(12):965–75.
- Cawston T, Billington C, Cleaver C, Elliott S, Hui W, Koshy P, et al. The regulation of MMPs and TIMPs in cartilage turnover. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Jun 30;878:120–9.
- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem.* 2003 Nov;253(1–2):269–85.
- Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature.* 1999 Oct 7;401(6753):616–20.
- Chang J, Wang W, Zhang H, Hu Y, Wang M, Yin Z. The dual role of autophagy in chondrocyte responses in the pathogenesis of articular cartilage degeneration in osteoarthritis. *Int J Mol Med.* 2013 Dec;32(6):1311–8.
- Chang SH, Mori D, Kobayashi H, Mori Y, Nakamoto H, Okada K, et al. Excessive mechanical loading promotes osteoarthritis through the gremlin-1–NF- κ B pathway. *Nat Commun [Internet].* 2019 Mar 29 [cited 2020 Jan 5];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6441020/>
- Charlier E, Relic B, Deroyer C, Malaise O, Neuville S, Collée J, et al. Insights on Molecular Mechanisms of Chondrocytes Death in Osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2016 Dec 20;17(12).
- Chaudhri M, Scarabel M, Aitken A. Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jan 17;300(3):679–85.
- Chavez-Muñoz C, Morse J, Kilani R, Ghahary A. Primary human keratinocytes externalize stratifin protein via exosomes. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2008;104(6):2165–73.
- Chen CT, Burton-Wurster N, Borden C, Hueffer K, Bloom SE, Lust G. Chondrocyte necrosis and apoptosis in impact damaged articular cartilage. *J Orthop Res.* 2001 Jul;19(4):703–11.
- Chen FH, Rousche KT, Tuan RS. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nature Clinical Practice Rheumatology.* 2006 Jul;2(7):373–82.
- Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 2010 Dec;10(12):826–37.
- Chen Y-S, Yan W, Geczy CL, Brown MA, Thomas R. Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and of S100 proteins are associated with inflammatory, autoantibody, and classical risk markers of joint and vascular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy.* 2009 Mar 11;11(2):R39.
- Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, Hill AF. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J Extracell Vesicles [Internet].* 2014 Mar 26 [cited 2020 Jan 6];3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3968297/>
- Cher JZB, Akbar M, Kitson S, Crowe LAN, Garcia-Melchor E, Hannah SC, et al. Alarmins in Frozen Shoulder: A Molecular Association Between Inflammation and Pain. *Am J Sports Med.* 2018;46(3):671–8.

- Coblitz B, Wu M, Shikano S, Li M. C-terminal binding: an expanded repertoire and function of 14-3-3 proteins. *FEBS Lett.* 2006 Mar 6;580(6):1531–5.
- Collins KH, Paul HA, Reimer RA, Seerattan RA, Hart DA, Herzog W. Relationship between inflammation, the gut microbiota, and metabolic osteoarthritis development: studies in a rat model. *Osteoarthr Cartil.* 2015 Nov;23(11):1989–98.
- Constantin A. *Physiologie du tissu osseux.* 2013;20.
- Coppé J-P, Desprez P-Y, Krtolica A, Campisi J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* 2010 Jan;5(1):99–118.
- Coppé J-P, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *Downward J*, editor. *PLoS Biol.* 2008 Dec 2;6(12):e301.
- Courties A, Berenbaum F, Sellam J. The Phenotypic Approach to Osteoarthritis: A Look at Metabolic Syndrome-Associated Osteoarthritis. *Joint Bone Spine.* 2019 Nov;86(6):725–30.
- Cram P, Lu X, Kates SL, Singh JA, Li Y, Wolf BR. Total knee arthroplasty volume, utilization, and outcomes among Medicare beneficiaries, 1991-2010. *JAMA.* 2012 Sep 26;308(12):1227–36.
- Craparo A, Freund R, Gustafson TA. 14-3-3 (ϵ) Interacts with the Insulin-like Growth Factor I Receptor and Insulin Receptor Substrate I in a Phosphoserine-dependent Manner. *J Biol Chem.* 1997 Apr 25;272(17):11663–9.
- Cruz-Almeida Y, King CD, Goodin BR, Sibille KT, Glover TL, Riley JL, et al. Psychological profiles and pain characteristics of older adults with knee osteoarthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2013 Nov;65(11):1786–94.
- Cuellar JM, Scuderi GJ, Cuellar VG, Golish SR, Yeomans DC. Diagnostic utility of cytokine biomarkers in the evaluation of acute knee pain. *J Bone Joint Surg Am.* 2009 Oct;91(10):2313–20.
- Culemann S, Grüneboom A, Nicolás-Ávila JÁ, Weidner D, Lämmle KF, Rothe T, et al. Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint. *Nature.* 2019 Aug;572(7771):670–5.
- Daghestani HN, Pieper CF, Kraus VB. Soluble Macrophage Biomarkers Indicate Inflammatory Phenotypes in Patients With Knee Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2015 Apr;67(4):956–65.
- Damman W, Liu R, Bloem JL, Rosendaal FR, Reijniere M, Kloppenburg M. Bone marrow lesions and synovitis on MRI associate with radiographic progression after 2 years in hand osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2017 Jan;76(1):214–7.
- Davidson ENB, Remst DFG, Vitters EL, Beuningen HM van, Blom AB, Goumans M-J, et al. Increase in ALK1/ALK5 Ratio as a Cause for Elevated MMP-13 Expression in Osteoarthritis in Humans and Mice. *The Journal of Immunology.* 2009 Jun 15;182(12):7937–45.
- De S, Marcinkiewicz JL, Vijayaraghavan S, Kline D. Expression of 14-3-3 protein isoforms in mouse oocytes, eggs and ovarian follicular development. *BMC Res Notes.* 2012 Jan 23;5:57.

- Dell'Isola A, Allan R, Smith SL, Marreiros SSP, Steultjens M. Identification of clinical phenotypes in knee osteoarthritis: a systematic review of the literature. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016 12;17(1):425.
- Demoor M, Ollitrault D, Gomez-Leduc T, Bouyoucef M, Hervieu M, Fabre H, et al. Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Aug;1840(8):2414–40.
- Denoble AE, Huffman KM, Stabler TV, Kelly SJ, Hershfield MS, McDaniel GE, et al. Uric acid is a danger signal of increasing risk for osteoarthritis through inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Feb 1;108(5):2088–93.
- Deveza LA, Bierma-Zeinstra SMA, Spil WE van, Oo WM, Saragiotto BT, Neogi T, et al. Efficacy of bisphosphonates in specific knee osteoarthritis subpopulations: protocol for an OA Trial Bank systematic review and individual patient data meta-analysis. *BMJ Open* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2020 Jan 17];8(12). Available from: <https://bmjopen.bmj.com/content/8/12/e023889>
- Deveza LA, Loeser RF. Is osteoarthritis one disease or a collection of many? *Rheumatology (Oxford)*. 2018 01;57(suppl_4):iv34–42.
- Deveza LA, Melo L, Yamato TP, Mills K, Ravi V, Hunter DJ. Knee osteoarthritis phenotypes and their relevance for outcomes: a systematic review. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2017 Dec;25(12):1926–41.
- Ding X, Zeng C, Wei J, Li H, Yang T, Zhang Y, et al. The associations of serum uric acid level and hyperuricemia with knee osteoarthritis. *Rheumatol Int*. 2016 Apr;36(4):567–73.
- DiScipio RG, Schraufstatter IU, Sikora L, Zuraw BL, Sriramarao P. C5a mediates secretion and activation of matrix metalloproteinase 9 from human eosinophils and neutrophils. *Int Immunopharmacol*. 2006 Jul;6(7):1109–18.
- Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, et al. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med*. 2013 Jan;13(1):24–57.
- Dreier R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(5):216.
- Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*. 2000 Sep 1;289(5484):1501–4.
- Duerr S, Stremme S, Soeder S, Bau B, Aigner T. MMP-2/gelatinase A is a gene product of human adult articular chondrocytes and is increased in osteoarthritic cartilage. *Clin Exp Rheumatol*. 2004 Oct;22(5):603–8.
- Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles M-P, Grimaud L, Lenoir J, et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood*. 2007 Dec 15;110(13):4319–30.
- Durai P, Choi S. Toll-like Receptor 2. In: Choi S, editor. *Encyclopedia of Signaling Molecules* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2016. p. 1–7. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6438-9_101495-1

- Eguchi T, Kubota S, Kawata K, Mukudai Y, Uehara J, Ohgawara T, et al. Novel transcription-factor-like function of human matrix metalloproteinase 3 regulating the CTGF/CCN2 gene. *Mol Cell Biol*. 2008 Apr;28(7):2391–413.
- Endres M, Andreas K, Kalwitz G, Freymann U, Neumann K, Ringe J, et al. Chemokine profile of synovial fluid from normal, osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients: CCL25, CXCL10 and XCL1 recruit human subchondral mesenchymal progenitor cells. *Osteoarthr Cartil*. 2010 Nov;18(11):1458–66.
- Erlandsson MC, Svensson MD, Jonsson I-M, Bian L, Ambartsumian N, Andersson S, et al. Expression of metastasin S100A4 is essential for bone resorption and regulates osteoclast function. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Dec;1833(12):2653–63.
- van der Esch M, Knoop J, van der Leeden M, Roorda LD, Lems WF, Knol DL, et al. Clinical phenotypes in patients with knee osteoarthritis: a study in the Amsterdam osteoarthritis cohort. *Osteoarthr Cartil*. 2015 Apr;23(4):544–9.
- Eymard F, Pigenet A, Citadelle D, Flouzat-Lachaniette C-H, Pognard A, Benelli C, et al. Induction of an Inflammatory and Prodegradative Phenotype in Autologous Fibroblast-like Synoviocytes by the Infrapatellar Fat Pad From Patients With Knee Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 2014;66(8):2165–74.
- Faber SC, Eckstein F, Lukasz S, Mühlbauer R, Hohe J, Englmeier KH, et al. Gender differences in knee joint cartilage thickness, volume and articular surface areas: assessment with quantitative three-dimensional MR imaging. *Skeletal Radiol*. 2001 Mar;30(3):144–50.
- Falah M, Nierenberg G, Soudry M, Hayden M, Volpin G. Treatment of articular cartilage lesions of the knee. *Int Orthop*. 2010 Jun;34(5):621–30.
- Fam H, Bryant JT, Kontopoulou M. Rheological properties of synovial fluids. *Biorheology*. 2007;44(2):59–74.
- Fantl WJ, Muslin AJ, Kikuchi A, Martin JA, MacNicol AM, Gross RW, et al. Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins. *Nature*. 1994 Oct 13;371(6498):612–4.
- Felson DT. Osteoarthritis of the Knee. *New England Journal of Medicine*. 2006 Feb 23;354(8):841–8.
- Felson DT. Identifying Different Osteoarthritis Phenotypes through Epidemiology. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 May;18(5):601–4.
- Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Walker AM, Meenan RF. Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Ann Intern Med*. 1988 Jul 1;109(1):18–24.
- Felson DT, McLaughlin S, Goggins J, LaValley MP, Gale ME, Totterman S, et al. Bone Marrow Edema and Its Relation to Progression of Knee Osteoarthritis. *Ann Intern Med*. 2003 Sep 2;139(5_Part_1):330.
- Felson DT, Niu J, Neogi T, Goggins J, Nevitt MC, Roemer F, et al. Synovitis and the risk of knee osteoarthritis: the MOST Study. *Osteoarthr Cartil*. 2016 Mar;24(3):458–64.
- Fermor B, Weinberg JB, Pisetsky DS, Misukonis MA, Fink C, Guilak F. Induction of cyclooxygenase-2 by mechanical stress through a nitric oxide-regulated pathway. *Osteoarthr Cartil*. 2002 Oct;10(10):792–8.

- Fernandez-Puente P, Ruiz-Romero C, Blanco F. Discovery of Biomarkers for Osteoarthritis Using Proteomics Technologies. 2015.
- Fischer A, Baljuls A, Reinders J, Nekhoroshkova E, Sibilski C, Metz R, et al. Regulation of RAF activity by 14-3-3 proteins: RAF kinases associate functionally with both homo- and heterodimeric forms of 14-3-3 proteins. *J Biol Chem*. 2009 Jan 30;284(5):3183–94.
- Fitzgerald JB, Jin M, Chai DH, Siparsky P, Fanning P, Grodzinsky AJ. Shear- and compression-induced chondrocyte transcription requires MAPK activation in cartilage explants. *J Biol Chem*. 2008 Mar 14;283(11):6735–43.
- Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*. 2001 Sep;413(6851):78–83.
- Flandry F. Normal Anatomy and Biomechanics of the Knee. 2011;19(2):11.
- Fleischmann RM, Bliddal H, Blanco FJ, Schnitzer TJ, Peterfy C, Chen S, et al. A Phase II Trial of Lutikizumab, an Anti-Interleukin-1 α/β Dual Variable Domain Immunoglobulin, in Knee Osteoarthritis Patients With Synovitis. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2019;71(7):1056–69.
- Fleshner M, Crane CR. Exosomes, DAMPs and miRNA: Features of Stress Physiology and Immune Homeostasis. *Trends Immunol*. 2017 Oct;38(10):768–76.
- Foell D, Wittkowski H, Roth J. Mechanisms of disease: a “DAMP” view of inflammatory arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007 Jul;3(7):382–90.
- Foote M, Zhou Y. 14-3-3 proteins in neurological disorders. *Int J Biochem Mol Biol*. 2012 May 18;3(2):152–64.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine*. 2000a Feb 25;18(16):1717–20.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, Luca MD, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000b;908(1):244–54.
- Frasca D, Blomberg BB, Paganelli R. Aging, Obesity, and Inflammatory Age-Related Diseases. *Frontiers in Immunology [Internet]*. 2017 Dec 7 [cited 2019 Jun 26];8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01745/full>
- Frey N, Hügler T, Jick SS, Meier CR, Spöndlin J. Type II diabetes mellitus and incident osteoarthritis of the hand: a population-based case-control analysis. *Osteoarthr Cartil*. 2016;24(9):1535–40.
- Frey-Law LA, Bohr NL, Sluka KA, Herr K, Clark CR, Noiseux NO, et al. Pain sensitivity profiles in patients with advanced knee osteoarthritis. *Pain*. 2016;157(9):1988–99.
- Fu H, Subramanian RR, Masters SC. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000;40:617–47.

- Fujisawa T, Hattori T, Takahashi K, Kuboki T, Yamashita A, Takigawa M. Cyclic mechanical stress induces extracellular matrix degradation in cultured chondrocytes via gene expression of matrix metalloproteinases and interleukin-1. *J Biochem.* 1999 May;125(5):966–75.
- Furman BD, Kimmerling KA, Zura RD, Reilly RM, Zlowodzki MP, Huebner JL, et al. Articular Ankle Fracture Results in Increased Synovitis, Synovial Macrophage Infiltration, and Synovial Fluid Concentrations of Inflammatory Cytokines and Chemokines. *Arthritis Rheumatol.* 2015 May;67(5):1234–9.
- Gack S, Vallon R, Schmidt J, Grigoriadis A, Tuckermann J, Schenkel J, et al. Expression of interstitial collagenase during skeletal development of the mouse is restricted to osteoblast-like cells and hypertrophic chondrocytes. *Cell Growth Differ.* 1995 Jun;6(6):759–67.
- García-Arnandis I, Guillén MI, Castejón MA, Gomar F, Alcaraz MJ. Haem oxygenase-1 down-regulates high mobility group box 1 and matrix metalloproteinases in osteoarthritic synoviocytes. *Rheumatology (Oxford).* 2010 May;49(5):854–61.
- Gardino AK, Smerdon SJ, Yaffe MB. 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.* 2006 Jun;16(3):173–82.
- Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, Wang NY, Wigley FM, Klag MJ. Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis. *Ann Intern Med.* 2000 Sep 5;133(5):321–8.
- Getgood A, Bhullar TPS, Rushton N. Current concepts in articular cartilage repair. *Orthopaedics and Trauma.* 2009 Jun 1;23(3):189–200.
- Geurts J, Patel A, Hirschmann MT, Pagenstert GI, Müller-Gerbl M, Valderrabano V, et al. Elevated marrow inflammatory cells and osteoclasts in subchondral osteosclerosis in human knee osteoarthritis. *J Orthop Res.* 2016 Feb;34(2):262–9.
- Ghaffari A, Li Y, Kilani RT, Ghahary A. 14-3-3 associates with cell surface aminopeptidase N in the regulation of matrix metalloproteinase-1. *Journal of Cell Science.* 2010 Sep 1;123(17):2996–3005.
- Gibilisco PA, Schumacher HR, Hollander JL, Soper KA. Synovial fluid crystals in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1985 May;28(5):511–5.
- Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma H-L, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature.* 2005 Mar 31;434(7033):644–8.
- Goldring MB, Goldring SR. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Mar;1192:230–7.
- Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):224.
- Gosset M, Berenbaum F, Levy A, Pigenet A, Thirion S, Cavadias S, et al. Mechanical stress and prostaglandin E2 synthesis in cartilage. *Biorheology.* 2008;45(3–4):301–20.

- Gosset M, Berenbaum F, Levy A, Pigenet A, Thirion S, Saffar J-L, et al. Prostaglandin E2 synthesis in cartilage explants under compression: mPGES-1 is a mechanosensitive gene. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(4):R135.
- Grotle M, Hagen KB, Natvig B, Dahl FA, Kvien TK. Obesity and osteoarthritis in knee, hip and/or hand: an epidemiological study in the general population with 10 years follow-up. *BMC Musculoskelet Disord.* 2008 Oct 2;9:132.
- Han D, Ye G, Liu T, Chen C, Yang X, Wan B, et al. 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.* 2010 May 28;396(2):401–6.
- Hardingham TE, Muir H. Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation. *Biochem J.* 1974 Jun;139(3):565–81.
- Harris HE, Andersson U, Pisetsky DS. HMGB1: A multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nature Reviews Rheumatology.* 2012 Jan 31;8(4):195–202.
- Harvey WF, Niu J, Zhang Y, McCree PI, Felson DT, Nevitt M, et al. Knee alignment differences between Chinese and Caucasian subjects without osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008 Nov;67(11):1524–8.
- Hashimoto K, Otero M, Imagawa K, de Andrés MC, Coico JM, Roach HI, et al. Regulated transcription of human matrix metalloproteinase 13 (MMP13) and interleukin-1 β (IL1B) genes in chondrocytes depends on methylation of specific proximal promoter CpG sites. *J Biol Chem.* 2013 Apr 5;288(14):10061–72.
- Hayashi D, Roemer FW, Guermazi A. Imaging for osteoarthritis. *Ann Phys Rehabil Med.* 2016 Jun;59(3):161–9.
- Helminen HJ, Jurvelin J, Kiviranta I, Paukkonen K, Säämänen AM, Tammi M. Joint loading effects on articular cartilage: A historical review. *Joint loading: biology and health of articular structures.* 1987;1–46.
- Henriksson ML, Francis MS, Peden A, Aili M, Stefansson K, Palmer R, et al. A nonphosphorylated 14-3-3 binding motif on exoenzyme S that is functional in vivo. *Eur J Biochem.* 2002 Oct;269(20):4921–9.
- Herrero-Beaumont G, Pérez-Baos S, Sánchez-Pernaute O, Roman-Blas JA, Lamuedra A, Largo R. Targeting chronic innate inflammatory pathways, the main road to prevention of osteoarthritis progression. *Biochemical Pharmacology.* 2019 Jul 1;165:24–32.
- Hirschmann MT, Müller W. Complex function of the knee joint: the current understanding of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2015 Oct;23(10):2780–8.
- den Hollander W, Boer CG, Hart DJ, Yau MS, Ramos YFM, Metrustry S, et al. Genome-wide association and functional studies identify a role for matrix Gla protein in osteoarthritis of the hand. *Ann Rheum Dis.* 2017 Dec;76(12):2046–53.
- Holmdahl DE, Ingelmark BE. The contact between the articular cartilage and the medullary cavities of the bone. *Acta Orthop Scand.* 1950;20(2):156–65.

- Homandberg GA, Hui F. Association of proteoglycan degradation with catabolic cytokine and stromelysin release from cartilage cultured with fibronectin fragments. *Arch Biochem Biophys*. 1996 Oct 15;334(2):325–31.
- Homandberg GA, Wen C, Hui F. Cartilage damaging activities of fibronectin fragments derived from cartilage and synovial fluid. *Osteoarthr Cartil*. 1998 Jul;6(4):231–44.
- Honda K, Ohno S, Tanimoto K, Ijuin C, Tanaka N, Doi T, et al. The effects of high magnitude cyclic tensile load on cartilage matrix metabolism in cultured chondrocytes. *Eur J Cell Biol*. 2000 Sep;79(9):601–9.
- Honold L, Nahrendorf M. Resident and monocyte-derived macrophages in cardiovascular disease. *Circ Res*. 2018 Jan 5;122(1):113–27.
- Hornig T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nature Immunology*. 2001 Sep;2(9):835–41.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product. *The Journal of Immunology*. 1999 Apr 1;162(7):3749–52.
- Hou W-S, Li Z, Büttner FH, Bartnik E, Brömme D. Cleavage site specificity of cathepsin K toward cartilage proteoglycans and protease complex formation. *Biol Chem*. 2003 Jun;384(6):891–7.
- Huang J, Xie Y, Sun X, Zeh HJ, Kang R, Lotze MT, et al. DAMPs, ageing, and cancer: The “DAMP Hypothesis.” *Ageing Res Rev*. 2015 Nov;24(Pt A):3–16.
- Huang W, Zhang L, Cheng C, Shan W, Ma R, Yin Z, et al. Parallel comparison of fibroblast-like synoviocytes from the surgically removed hyperplastic synovial tissues of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *BMC Musculoskelet Disord*. 2019 Dec 7;20(1):591.
- Huang ZY, Stabler T, Pei FX, Kraus VB. Both systemic and local lipopolysaccharide (LPS) burden are associated with knee OA severity and inflammation. *Osteoarthr Cartil*. 2016;24(10):1769–75.
- Huesa C, Ortiz AC, Dunning L, McGavin L, Bennett L, McIntosh K, et al. Proteinase-activated receptor 2 modulates OA-related pain, cartilage and bone pathology. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2016 Nov 1;75(11):1989–97.
- Hügler T, Geurts J. What drives osteoarthritis?—synovial versus subchondral bone pathology. *Rheumatology (Oxford)*. 2017 Sep 1;56(9):1461–71.
- Hui AY, McCarty WJ, Masuda K, Firestein GS, Sah RL. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2012 Feb;4(1):15–37.
- Humpel C, Benke T. Cerebrospinal Fluid Levels of 14-3-3 Gamma: What Does It Tell Us About Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease? *Pharmacology*. 2017;100(5–6):243–5.
- Hurskainen TL, Hirohata S, Seldin MF, Apte SS. ADAM-TS5, ADAM-TS6, and ADAM-TS7, novel members of a new family of zinc metalloproteases. General features and genomic distribution of the ADAM-TS family. *J Biol Chem*. 1999 Sep 3;274(36):25555–63.

- Hwang HS, Park SJ, Cheon EJ, Lee MH, Kim HA. Fibronectin fragment-induced expression of matrix metalloproteinases is mediated by MyD88-dependent TLR-2 signaling pathway in human chondrocytes. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2015 [cited 2019 Dec 30];17. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4643537/>
- Ibrahim ZA, Armour CL, Phipps S, Sukkar MB. RAGE and TLRs: Relatives, friends or neighbours? *Molecular Immunology*. 2013 Dec;56(4):739–44.
- Imhof A, Wolffe AP. Purification and properties of the *Xenopus* Hat1 acetyltransferase: association with the 14-3-3 proteins in the oocyte nucleus. *Biochemistry*. 1999 Oct 5;38(40):13085–93.
- Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, Czerny C, Youssefzadeh S, Kainberger F. Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Invest Radiol*. 2000 Oct;35(10):581–8.
- Inoue D. [Musculoskeletal rehabilitation and bone. Mechanical stress on the skeletal system]. *Clin Calcium*. 2010 Apr;20(4):503–11.
- Intema F, Sniekers YH, Weinans H, Vianen ME, Yocum SA, Zuurmond A-MM, et al. Similarities and discrepancies in subchondral bone structure in two differently induced canine models of osteoarthritis. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010;25(7):1650–7.
- Ishii H, Tanaka H, Katoh K, Nakamura H, Nagashima M, Yoshino S. Characterization of infiltrating T cells and Th1/Th2-type cytokines in the synovium of patients with osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2002 Apr;10(4):277–81.
- Jacques C, Gosset M, Berenbaum F, Gabay C. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. *Vitam Horm*. 2006;74:371–403.
- Jain M, Harburn JJ, Gill JH, Loadman PM, Falconer RA, Mooney CA, et al. Rationalized Computer-Aided Design of Matrix-Metalloprotease-Selective Prodrugs. *J Med Chem*. 2017 May 25;60(10):4496–502.
- Jamshidi A, Pelletier J-P, Martel-Pelletier J. Machine-learning-based patient-specific prediction models for knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2019 Jan;15(1):49–60.
- Jeffries MA. Osteoarthritis year in review 2018: genetics and epigenetics. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2019 Mar 1;27(3):371–7.
- Jennings R, Premanandan C. *Veterinary Histology* [Internet]. The Ohio State University; 2017 [cited 2020 Feb 4]. Available from: <https://ohiostate.pressbooks.pub/vethisto/>
- Jeon OH, David N, Campisi J, Elisseff JH. Senescent cells and osteoarthritis: a painful connection. *Journal of Clinical Investigation*. 2018 Apr 2;128(4):1229–37.
- Jeon OH, Kim C, Laberge R-M, Demaria M, Rathod S, Vasserot AP, et al. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat Med*. 2017 Jun;23(6):775–81.
- Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:435–61.

- Jiménez MJ, Balbín M, López JM, Alvarez J, Komori T, López-Otín C. Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Mol Cell Biol.* 1999 Jun;19(6):4431–42.
- Johnson C, Crowther S, Stafford MJ, Campbell DG, Toth R, MacKintosh C. Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites. *Biochem J.* 2010 Mar 15;427(1):69–78.
- Jones DS, Jenney AP, Swantek JL, Burke JM, Lauffenburger DA, Sorger PK. Profiling drugs for rheumatoid arthritis that inhibit synovial fibroblast activation. *Nat Chem Biol.* 2017 Jan;13(1):38–45.
- Jones G, Ding C, Glisson M, Hynes K, Ma D, Cicuttini F. Knee articular cartilage development in children: a longitudinal study of the effect of sex, growth, body composition, and physical activity. *Pediatr Res.* 2003 Aug;54(2):230–6.
- Jurvelin J, Helminen HJ, Lauritsalo S, Kiviranta I, Säämänen AM, Paukkonen K, et al. Influences of joint immobilization and running exercise on articular cartilage surfaces of young rabbits. A semiquantitative stereomicroscopic and scanning electron microscopic study. *Acta Anat (Basel).* 1985;122(1):62–8.
- Kang KY, Woo J-W, Park S-H. S100A8/A9 as a biomarker for synovial inflammation and joint damage in patients with rheumatoid arthritis. *Korean J Intern Med.* 2014 Jan;29(1):12–9.
- Kaplan A, Bueno M, Fournier AE. Extracellular functions of 14-3-3 adaptor proteins. *Cellular Signalling.* 2017 Feb;31:26–30.
- Karsdal MA, Michaelis M, Ladel C, Siebuhr AS, Bihlet AR, Andersen JR, et al. Disease-modifying treatments for osteoarthritis (DMOADs) of the knee and hip: lessons learned from failures and opportunities for the future. *Osteoarthr Cartil.* 2016;24(12):2013–21.
- Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Med.* 2011 May 5;9:48.
- Ke X, Jin G, Yang Y, Cao X, Fang R, Feng X, et al. Synovial Fluid HMGB-1 Levels are Associated with Osteoarthritis Severity. *Clin Lab.* 2015;61(7):809–18.
- Kelly MA, Shuaib A, Todd KG. Matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier breakdown following thrombolysis. *Exp Neurol.* 2006 Jul;200(1):38–49.
- Kempson GE, Muir H, Pollard C, Tuke M. The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 1973 Feb 28;297(2):456–72.
- Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6):2548–56.
- Kevorkian L, Young DA, Darrah C, Donell ST, Shepstone L, Porter S, et al. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis & Rheumatism.* 2004;50(1):131–41.
- Kiener HP, Watts GFM, Cui Y, Wright J, Thornhill TS, Sköld M, et al. Synovial fibroblasts self-direct multicellular lining architecture and synthetic function in three-dimensional organ culture. *Arthritis Rheum.* 2010 Mar;62(3):742–52.

- Kilani RT, Maksymowych WP, Aitken A, Boire G, St-Pierre Y, Li Y, et al. Detection of high levels of 2 specific isoforms of 14-3-3 proteins in synovial fluid from patients with joint inflammation. *J Rheumatol*. 2007 Aug;34(8):1650–7.
- Kilborn S, Bukhari M. AB0302 The role of the biomarker 14–3–3 eta in rheumatoid arthritis: a review. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2018 Jun 1;77(Suppl 2):1329–1329.
- Kim HA, Blanco FJ. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr Drug Targets*. 2007 Feb;8(2):333–45.
- Kim HA, Cho M-L, Choi HY, Yoon CS, Jhun JY, Oh HJ, et al. The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*. 2006;54(7):2152–63.
- Kim HA, Lee YJ, Seong SC, Choe KW, Song YW. Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. *J Rheumatol*. 2000 Feb;27(2):455–62.
- Kimura MT, Irie S, Shoji-Hoshino S, Mukai J, Nadano D, Oshimura M, et al. 14-3-3 is involved in p75 neurotrophin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem*. 2001 May 18;276(20):17291–300.
- King CD, Sibille KT, Goodin BR, Cruz-Almeida Y, Glover TL, Bartley E, et al. Experimental pain sensitivity differs as a function of clinical pain severity in symptomatic knee osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2013 Sep;21(9):1243–52.
- Kittelson AJ, Stevens-Lapsley JE, Schmiege SJ. Determination of Pain Phenotypes in Knee Osteoarthritis: A Latent Class Analysis Using Data From the Osteoarthritis Initiative. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2016 May;68(5):612–20.
- Kligys K, Yao J, Yu D, Jones JCR. 14-3-3 ζ/τ heterodimers regulate Slingshot activity in migrating keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Jun 12;383(4):450–4.
- Klop B, Elte JWF, Cabezas MC. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*. 2013 Apr 12;5(4):1218–40.
- Knoop J, van der Leeden M, Thorstensson CA, Roorda LD, Lems WF, Knol DL, et al. Identification of phenotypes with different clinical outcomes in knee osteoarthritis: data from the Osteoarthritis Initiative. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011 Nov;63(11):1535–42.
- Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol*. 2001 Apr;12(2):69–78.
- Kodama H, Nose M, Niida S, Yamasaki A. Essential role of macrophage colony-stimulating factor in the osteoclast differentiation supported by stromal cells. *J Exp Med*. 1991 May 1;173(5):1291–4.
- Koh J-M, Lee Y-S, Kim YS, Park S-H, Lee SH, Kim H-H, et al. Heat shock protein 60 causes osteoclastic bone resorption via toll-like receptor-2 in estrogen deficiency. *Bone*. 2009 Oct;45(4):650–60.
- Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol Rev*. 2010 Dec;62(4):726–59.

- Kosaka Y, Cieslik KA, Li L, Lezin G, Maguire CT, Saijoh Y, et al. 14-3-3 ϵ Plays a Role in Cardiac Ventricular Compaction by Regulating the Cardiomyocyte Cell Cycle. *Mol Cell Biol*. 2012 Dec;32(24):5089–102.
- Kostecky B, Saurin AT, Purkiss A, Parker PJ, McDonald NQ. Recognition of an intra-chain tandem 14-3-3 binding site within PKCepsilon. *EMBO Rep*. 2009 Sep;10(9):983–9.
- van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, van den Berg WB. Bone morphogenetic proteins and articular cartilage: To serve and protect or a wolf in sheep clothing's? *Osteoarthr Cartil*. 2010 Jun;18(6):735–41.
- Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Henrotin Y, Lohmander LS, Losina E, et al. OARSI Clinical Trials Recommendations: Soluble biomarker assessments in clinical trials in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2015 May;23(5):686–97.
- Kraus VB, Collins JE, Hargrove D, Losina E, Nevitt M, Katz JN, et al. Predictive validity of biochemical biomarkers in knee osteoarthritis: data from the FNIH OA Biomarkers Consortium. *Ann Rheum Dis*. 2017 Jan;76(1):186–95.
- Krenn V, Morawietz L, Burmester G-R, Kinne RW, Mueller-Ladner U, Muller B, et al. Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. *Histopathology*. 2006 Oct;49(4):358–64.
- Krenn V, Morawietz L, Häupl T, Neidel J, Petersen I, König A. Grading of chronic synovitis—a histopathological grading system for molecular and diagnostic pathology. *Pathol Res Pract*. 2002;198(5):317–25.
- Kubo T, Towle CA, Mankin HJ, Treadwell BV. Stress-induced proteins in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 1985;28(10):1140–5.
- Kuno K, Kanada N, Nakashima E, Fujiki F, Ichimura F, Matsushima K. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem*. 1997 Jan 3;272(1):556–62.
- Labusca L, Zugun-Eloae F. The Unexplored Role of Intra-articular Adipose Tissue in the Homeostasis and Pathology of Articular Joints. *Front Vet Sci* [Internet]. 2018 Mar 5 [cited 2020 Jan 21];5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5845097/>
- Lafontan M. Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:119–46.
- Laiguillon M-C, Courties A, Houard X, Auclair M, Sautet A, Capeau J, et al. Characterization of diabetic osteoarthritic cartilage and role of high glucose environment on chondrocyte activation: toward pathophysiological delineation of diabetes mellitus-related osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2015 Sep;23(9):1513–22.
- Lane JM, Brighton CT, Menkowitz BJ. Anaerobic and aerobic metabolism in articular cartilage. *J Rheumatol*. 1977;4(4):334–42.
- Lane LB, Bullough PG. Age-related changes in the thickness of the calcified zone and the number of tidemarks in adult human articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br*. 1980 Aug;62(3):372–5.

- Latz E, Duewell P. NLRP3 inflammasome activation in inflammaging. *Seminars in Immunology*. 2018 Dec;40:61–73.
- Lawrence JS, Bremner JM, Bier F. Osteo-arthritis. Prevalence in the population and relationship between symptoms and x-ray changes. *Ann Rheum Dis*. 1966 Jan;25(1):1–24.
- Layfield R, Fergusson J, Aitken A, Lowe J, Landon M, Mayer RJ. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease brains contain 14-3-3 proteins. *Neuroscience Letters*. 1996 May 3;209(1):57–60.
- Leclerc E, Fritz G, Vetter SW, Heizmann CW. Binding of S100 proteins to RAGE: An update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2009 Jun 1;1793(6):993–1007.
- Lee AC, Harvey WF, Han X, Price LL, Driban JB, Bannuru RR, et al. Pain and functional trajectories in symptomatic knee osteoarthritis over up to 12 weeks of exercise exposure. *Osteoarthr Cartil*. 2018;26(4):501–12.
- Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol*. 2012 Feb 3;12(3):168–79.
- Lee H-S, Salter DM. Biomechanics of Cartilage and Osteoarthritis. *Osteoarthritis - Progress in Basic Research and Treatment [Internet]*. 2015 Jul 1 [cited 2020 Feb 4]; Available from: <https://www.intechopen.com/books/osteoarthritis-progress-in-basic-research-and-treatment/biomechanics-of-cartilage-and-osteoarthritis>
- Legrand C, Polette M, Tournier JM, de Bentzmann S, Huet E, Monteau M, et al. uPA/plasmin system-mediated MMP-9 activation is implicated in bronchial epithelial cell migration. *Exp Cell Res*. 2001 Apr 1;264(2):326–36.
- van Lent PLEM, Blom AB, Schelbergen RFP, Slöetjes A, Lafeber FPJG, Lems WF, et al. Active involvement of alarmins S100A8 and S100A9 in the regulation of synovial activation and joint destruction during mouse and human osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2012 May;64(5):1466–76.
- van Lent PLEM, Grevers L, Blom AB, Sloetjes A, Mort JS, Vogl T, et al. Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2008 Dec 1;67(12):1750–8.
- Li G, Yin J, Gao J, Cheng TS, Pavlos NJ, Zhang C, et al. Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis Research & Therapy*. 2013 Dec 9;15(6):223.
- Li H, George DM, Jaarsma RL, Mao X. Metabolic syndrome and components exacerbate osteoarthritis symptoms of pain, depression and reduced knee function. *Ann Transl Med [Internet]*. 2016 Apr [cited 2020 Jan 31];4(7). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4842398/>
- Li Y-S, Luo W, Zhu S-A, Lei G-H. T Cells in Osteoarthritis: Alterations and Beyond. *Front Immunol*. 2017;8:356.
- Li Z-C, Cheng G-Q, Hu K-Z, Li M-Q, Zang W-P, Dong Y-Q, et al. Correlation of synovial fluid HMGB-1 levels with radiographic severity of knee osteoarthritis. *Clin Invest Med*. 2011 Oct 1;34(5):E298.

- Liang S, Xu Y, Shen G, Liu Q, Zhao X, Xu Z, et al. Quantitative protein expression profiling of 14-3-3 isoforms in human renal carcinoma shows 14-3-3 epsilon is involved in limitedly increasing renal cell proliferation. *Electrophoresis*. 2009 Dec;30(23):4152–62.
- Liao J, Omary MB. 14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor. *J Cell Biol*. 1996 Apr;133(2):345–57.
- Lin C-Y. Endotypes of Asthma in Children. In 2014.
- Little CB, Meeker CT, Golub SB, Lawlor KE, Farmer PJ, Smith SM, et al. Blocking aggrecanase cleavage in the aggrecan interglobular domain abrogates cartilage erosion and promotes cartilage repair. *J Clin Invest*. 2007 Jun;117(6):1627–36.
- Liu D, Bienkowska J, Petosa C, Collier RJ, Fu H, Liddington R. Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature*. 1995 Jul 13;376(6536):191–4.
- Liu Y, Ding W, Wang HL, Dai LL, Zong WH, Wang YZ, et al. Gut microbiota and obesity-associated osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2019 Sep 1;27(9):1257–65.
- Liu-Bryan R. Synovium and the Innate Inflammatory Network in Osteoarthritis Progression. *Curr Rheumatol Rep*. 2013 May;15(5):323.
- Liu-Bryan R. Inflammation and intracellular metabolism: new targets in OA. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2015 Nov;23(11):1835–42.
- 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*. 2010 Jul;62(7):2004–12.
- Liu-Bryan R, Terkeltaub R. The Growing Array of Innate Inflammatory Ignition Switches in Osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2012 Jul;64(7):2055–8.
- Liu-Bryan R, Terkeltaub R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2015 Jan;11(1):35–44.
- Lloberas J, Celada A. Effect of aging on macrophage function. *Exp Gerontol*. 2002 Dec;37(12):1325–31.
- Loeser RF, Collins JA, Diekmann BO. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Jul;12(7):412–20.
- Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ. *Arthritis Rheum*. 2012a;64(6):1697–707.
- Loeser RF, Olex AL, McNulty MA, Carlson CS, Callahan MF, Ferguson CM, et al. Microarray analysis reveals age-related differences in gene expression during the development of osteoarthritis in mice. *Arthritis Rheum*. 2012b Mar;64(3):705–17.
- Loeser RF, Yammani RR, Carlson CS, Chen H, Cole A, Im H-J, et al. Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: Potential role in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2005 Aug;52(8):2376–85.

- Lohmander LS, Neame PJ, Sandy JD. 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.* 1993 Sep;36(9):1214–22.
- Lopa S, Leijs MJC, Moretti M, Lubberts E, Osch GJVM van, Bastiaansen-Jenniskens YM. Arthritic and non-arthritic synovial fluids modulate IL10 and IL1RA gene expression in differentially activated primary human monocytes. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2015 Nov 1;23(11):1853–7.
- Lopez-Girona A, Furnari B, Mondesert O, Russell P. Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature.* 1999 Jan 14;397(6715):172–5.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013 Jun 6;153(6):1194–217.
- Lötvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjermer L, Casale TB, Custovic A, et al. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Feb;127(2):355–60.
- Louati K, Vidal C, Berenbaum F, Sellam J. Association between diabetes mellitus and osteoarthritis: systematic literature review and meta-analysis. *RMD Open [Internet].* 2015 Jun 2 [cited 2020 Jan 31];1(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4613158/>
- Ma C, Chen H, Zhang S, Yan Y, Wu R, Wang Y, et al. Exosomal and extracellular HMGB1 have opposite effects on SASH1 expression in rat astrocytes and glioma C6 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Oct 15;518(2):325–30.
- Ma L, Sun P, Zhang J-C, Zhang Q, Yao S-L. Proinflammatory effects of S100A8/A9 via TLR4 and RAGE signaling pathways in BV-2 microglial cells. *Int J Mol Med.* 2017 Jul;40(1):31–8.
- Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010 Apr;18(4):419–33.
- Maksymowych WP, van der Heijde D, Allaart CF, Landewé R, Boire G, Tak PP, et al. 14-3-3 η is a novel mediator associated with the pathogenesis of rheumatoid arthritis and joint damage. *Arthritis Research & Therapy.* 2014a;16(2):R99.
- Maksymowych WP, Naides SJ, Bykerk V, Siminovitch KA, van Schaardenburg D, Boers M, et al. Serum 14-3-3 η is a novel marker that complements current serological measurements to enhance detection of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2014b Nov;41(11):2104–13.
- Manferdini C, Paoletta F, Gabusi E, Gambari L, Piacentini A, Filardo G, et al. Adipose stromal cells mediated switching of the pro-inflammatory profile of M1-like macrophages is facilitated by PGE2: in vitro evaluation. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2017 Jul 1;25(7):1161–71.
- Manfredi AA, Capobianco A, Bianchi ME, Rovere-Querini P. Regulation of dendritic- and T-cell fate by injury-associated endogenous signals. *Crit Rev Immunol.* 2009;29(1):69–86.
- Manganelli V, Truglia S, Capozzi A, Alessandri C, Riitano G, Spinelli FR, et al. Alarmin HMGB1 and Soluble RAGE as New Tools to Evaluate the Risk Stratification in Patients With the Antiphospholipid Syndrome. *Front Immunol.* 2019;10:460.

- Mannami K, Mitsuhashi T, Takeshita H, Okada K, Kuzuhara A, Yamashita F, et al. Concentration of interleukin-1 beta in serum and synovial fluid in patients with rheumatoid arthritis and those with osteoarthritis. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi*. 1989 Nov;63(11):1343–52.
- Mansell JP, Bailey AJ. Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J Clin Invest*. 1998 Apr 15;101(8):1596–603.
- Mansfield JC, Mandalia V, Toms A, Winlove CP, Brasselet S. Collagen reorganization in cartilage under strain probed by polarization sensitive second harmonic generation microscopy. *J R Soc Interface*. 2019 31;16(150):20180611.
- Manzanero S. Generation of mouse bone marrow-derived macrophages. *Methods Mol Biol*. 2012;844:177–81.
- Mapp PI. Innervation of the synovium. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1995 May;54(5):398.
- March LM, Bachmeier CJ. Economics of osteoarthritis: a global perspective. *Baillieres Clin Rheumatol*. 1997 Nov;11(4):817–34.
- Marcu KB, Otero M, Olivetto E, Borzi RM, Goldring MB. NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA. *Curr Drug Targets*. 2010 May;11(5):599–613.
- Martinac B. Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction. *J Cell Sci*. 2004 May 15;117(Pt 12):2449–60.
- Martin-Alarcon L, Schmidt TA. Rheological effects of macromolecular interactions in synovial fluid. *Biorheology*. 2016 Jul 29;53(2):49–67.
- Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13.
- Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006 Mar;440(7081):237–41.
- Masters SC, Fu H. 14-3-3 proteins mediate an essential anti-apoptotic signal. *J Biol Chem*. 2001 Nov 30;276(48):45193–200.
- Masters SC, Pederson KJ, Zhang L, Barbieri JT, Fu H. Interaction of 14-3-3 with a nonphosphorylated protein ligand, exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*. 1999 Apr 20;38(16):5216–21.
- Masters SC, Yang H, Datta SR, Greenberg ME, Fu H. 14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136. *Mol Pharmacol*. 2001 Dec;60(6):1325–31.
- Mathern DR, Heeger PS. Molecules Great and Small: The Complement System. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 Sep 4;10(9):1636–50.
- Maurel B, Le Corroller T, Cohen M, Acid S, Bierry G, Parratte S, et al. [Infrapatellar fat pad: anterior crossroads of the knee]. *J Radiol*. 2010 Sep;91(9 Pt 1):841–55.
- McAllister MJ, Chemaly M, Eakin AJ, Gibson DS, McGilligan VE. NLRP3 as a potentially novel biomarker for the management of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2018 May;26(5):612–9.

- McCulloch K, Litherland GJ, Rai TS. Cellular senescence in osteoarthritis pathology. *Aging Cell*. 2017 Apr;16(2):210–8.
- Medina A, Ghaffari A, Kilani RT, Ghahary A. The role of stratifin in fibroblast-keratinocyte interaction. *Mol Cell Biochem*. 2007 Nov;305(1–2):255–64.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008 Jul;454(7203):428–35.
- Messier SP, Loeser RF, Miller GD, Morgan TM, Rejeski WJ, Sevick MA, et al. Exercise and dietary weight loss in overweight and obese older adults with knee osteoarthritis: the Arthritis, Diet, and Activity Promotion Trial. *Arthritis Rheum*. 2004 May;50(5):1501–10.
- van Middelkoop M, Arden NK, Atchia I, Birrell F, Chao J, Rezende MU, et al. The OA Trial Bank: meta-analysis of individual patient data from knee and hip osteoarthritis trials show that patients with severe pain exhibit greater benefit from intra-articular glucocorticoids. *Osteoarthr Cartil*. 2016;24(7):1143–52.
- Miller RE, Belmadani A, Ishihara S, Tran PB, Ren D, Miller RJ, et al. Damage-Associated Molecular Patterns Generated in Osteoarthritis Directly Excite Murine Nociceptive Neurons Through Toll-like Receptor 4. *Arthritis & Rheumatology*. 2015;67(11):2933–43.
- Millerand M, Berenbaum F, Jacques C. Danger signals and inflammaging in osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2019 Oct;37 Suppl 120(5):48–56.
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000 Jun 15;164(12):6166–73.
- Mobasheri A. The future of osteoarthritis therapeutics: targeted pharmacological therapy. *Curr Rheumatol Rep*. 2013 Oct;15(10):364.
- Mobasheri A, Saarakkala S, Finnilä M, Karsdal MA, Bay-Jensen A-C, van Spil WE. Recent advances in understanding the phenotypes of osteoarthritis. *F1000Res*. 2019;8.
- Mohanty S, Chen Z, Li K, Morais GR, Klockow J, Yerneni K, et al. A Novel Theranostic Strategy for MMP-14-Expressing Glioblastomas Impacts Survival. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(9):1909–21.
- Monira Hussain S, Wang Y, Cicuttini FM, Simpson JA, Giles GG, Graves S, et al. Incidence of total knee and hip replacement for osteoarthritis in relation to the metabolic syndrome and its components: a prospective cohort study. *Semin Arthritis Rheum*. 2014 Feb;43(4):429–36.
- Moore B, Perez V. Physiological and biochemical aspects of nervous integration. 1967;343–59.
- Morris KJ, Cs-Szabo G, Cole AA. Characterization of TIMP-3 in human articular talar cartilage. *Connect Tissue Res*. 2010 Dec;51(6):478–90.
- Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008 Dec;8(12):958–69.
- Muley MM, Krustev E, Reid AR, McDougall JJ. Prophylactic inhibition of neutrophil elastase prevents the development of chronic neuropathic pain in osteoarthritic mice. *J Neuroinflammation*. 2017 Aug 23;14(1):168.

- Müller L, Di Benedetto S, Pawelec G. The Immune System and Its Dysregulation with Aging. In: Harris JR, Korolchuk VI, editors. *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part II Clinical Science* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2019 [cited 2019 Dec 19]. p. 21–43. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-3681-2_2
- de Munter W, Blom AB, Helsen MM, Walgreen B, van der Kraan PM, Joosten LAB, et al. Cholesterol accumulation caused by low density lipoprotein receptor deficiency or a cholesterol-rich diet results in ectopic bone formation during experimental osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2013 Nov 4;15(6):R178.
- de Munter W, van den Bosch MH, Slöetjes AW, Croce KJ, Vogl T, Roth J, et al. High LDL levels lead to increased synovial inflammation and accelerated ectopic bone formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2016 May 1;24(5):844–55.
- Murphy CL, Sambanis A. Effect of oxygen tension and alginate encapsulation on restoration of the differentiated phenotype of passaged chondrocytes. *Tissue Eng*. 2001 Dec;7(6):791–803.
- Murphy SL, Lyden AK, Phillips K, Clauw DJ, Williams DA. Subgroups of older adults with osteoarthritis based upon differing comorbid symptom presentations and potential underlying pain mechanisms. *Arthritis Res Ther*. 2011 Aug 24;13(4):R135.
- Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*. 1996 Mar 22;84(6):889–97.
- Musumeci G, Aiello FC, Szychlinska MA, Di Rosa M, Castrogiovanni P, Mobasher A. Osteoarthritis in the XXIst Century: Risk Factors and Behaviours that Influence Disease Onset and Progression. *Int J Mol Sci*. 2015 Mar 16;16(3):6093–112.
- Musumeci G, Loreto C, Carnazza ML, Strehin I, Elisseeff J. 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*. 2011;26(10):1265–78.
- Näkki A, Rodriguez-Fontenla C, Gonzalez A, Harilainen A, Leino-Arjas P, Heliövaara M, et al. Association study of MMP8 gene in osteoarthritis. *Connect Tissue Res*. 2016;57(1):44–52.
- Nam J, Aguda BD, Rath B, Agarwal S. Biomechanical thresholds regulate inflammation through the NF-kappaB pathway: experiments and modeling. *PLoS ONE*. 2009;4(4):e5262.
- Nasi S, Ea H-K, Chobaz V, van Lent P, Lioté F, So A, et al. Dispensable role of myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) and MyD88-dependent toll-like receptors (TLRs) in a murine model of osteoarthritis. *Joint Bone Spine*. 2014 Jul 1;81(4):320–4.
- Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002 Dec 19;420(6917):846–52.
- Nefla M, Holzinger D, Berenbaum F, Jacques C. The danger from within: alarmins in arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2016 Nov;12(11):669–83.
- Nefla M, Sudre L, Denat G, Priam S, Andre-Leroux G, Berenbaum F, et al. The pro-inflammatory cytokine 14-3-3 is a ligand of CD13 in cartilage. *Journal of Cell Science*. 2015 Sep 1;128(17):3250–62.

- Nelson AE, Renner JB, Schwartz TA, Kraus VB, Helmick CG, Jordan JM. Differences in multi-joint radiographic osteoarthritis phenotypes among African Americans and Caucasians: The Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Rheum*. 2011 Dec;63(12):3843–52.
- Neogi T. The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2013 Sep;21(9):1145–53.
- New SEP, Goettsch C, Aikawa M, Marchini JF, Shibasaki M, Yabusaki K, et al. Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circ Res*. 2013 Jun 21;113(1):72–7.
- Nickel W. The mystery of nonclassical protein secretion. *European Journal of Biochemistry*. 2003;270(10):2109–19.
- Nielen JTH, Emans PJ, Dagnelie PC, Boonen A, Lalmohamed A, de Boer A, et al. Severity of Diabetes Mellitus and Total Hip or Knee Replacement: A Population-Based Case-Control Study. *Medicine (Baltimore)*. 2016 May;95(20):e3739.
- Nielsen AW, Klose-Jensen R, Hartlev LB, Boel LWT, Thomsen JS, Keller KK, et al. Age-related histological changes in calcified cartilage and subchondral bone in femoral heads from healthy humans. *Bone*. 2019 Dec 1;129:115037.
- Niu J, Felson DT, Neogi T, Nevitt MC, Guermazi A, Roemer F, et al. Patterns of Coexisting Lesions Detected on Magnetic Resonance Imaging and Relationship to Incident Knee Osteoarthritis: The Multicenter Osteoarthritis Study. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2015 Dec;67(12):3158–65.
- Nogueira-Machado JA, Volpe CM de O, Veloso CA, Chaves MM. HMGB1, TLR and RAGE: a functional tripod that leads to diabetic inflammation. *Expert Opin Ther Targets*. 2011 Aug;15(8):1023–35.
- Nogueira-Recalde U, Lorenzo-Gómez I, Blanco FJ, Loza MI, Grassi D, Shirinsky V, et al. Fibrates as drugs with senolytic and autophagic activity for osteoarthritis therapy. *EBioMedicine*. 2019 Jul 5;45:588–605.
- Nwosu LN, Allen M, Wyatt L, Huebner JL, Chapman V, Walsh DA, et al. Pain prediction by serum biomarkers of bone turnover in people with knee osteoarthritis: an observational study of TRAcP5b and cathepsin K in OA. *Osteoarthr Cartil*. 2017;25(6):858–65.
- OARSI. OARSI White Paper. 2016.
- Obsil T, Obsilova V. Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin Cell Dev Biol*. 2011 Sep;22(7):663–72.
- O'Connor MI. Osteoarthritis of the Hip and Knee: Sex and Gender Differences. *Orthopedic Clinics of North America*. 2006 Oct;37(4):559–68.
- Odgren PR, Kim N, MacKay CA, Mason-Savas A, Choi Y, Marks SC. The role of RANKL (TRANCE/TNFSF11), a tumor necrosis factor family member, in skeletal development: effects of gene knockout and transgenic rescue. *Connect Tissue Res*. 2003;44 Suppl 1:264–71.

- Ogihara T, Isoke T, Ichimura T, Taoka M, Funaki M, Sakoda H, et al. 14-3-3 protein binds to insulin receptor substrate-1, one of the binding sites of which is in the phosphotyrosine binding domain. *J Biol Chem*. 1997 Oct 3;272(40):25267–74.
- Ohno S, Im H-J, Knudson CB, Knudson W. Hyaluronan oligosaccharides induce matrix metalloproteinase 13 via transcriptional activation of NFkappaB and p38 MAP kinase in articular chondrocytes. *J Biol Chem*. 2006 Jun 30;281(26):17952–60.
- Okabe Y, Medzhitov R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell*. 2014 May 8;157(4):832–44.
- Okada Y, Shinmei M, Tanaka O, Naka K, Kimura A, Nakanishi I, et al. Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. *Lab Invest*. 1992 Jun;66(6):680–90.
- Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current Opinion in Immunology*. 2005 Aug;17(4):359–65.
- Orlowsky EW, Kraus VB. The Role of Innate Immunity in Osteoarthritis: When Our First Line of Defense Goes On the Offensive. *The Journal of Rheumatology*. 2015 Mar;42(3):363–71.
- Orr C, Vieira-Sousa E, Boyle DL, Buch MH, Buckley CD, Cañete JD, et al. Synovial tissue research: a state-of-the-art review. *Nature Reviews Rheumatology*. 2017 Aug;13(8):463–75.
- Ospelt C, Brentano F, Rengel Y, Stanczyk J, Kolling C, Tak PP, et al. Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008 Dec;58(12):3684–92.
- Otterness IG, Swindell AC, Zimmerer RO, Poole AR, Ionescu M, Weiner E. An analysis of 14 molecular markers for monitoring osteoarthritis: segregation of the markers into clusters and distinguishing osteoarthritis at baseline. *Osteoarthr Cartil*. 2000 May;8(3):180–5.
- Owens C, Conaghan PG. Improving joint pain and function in osteoarthritis. *Practitioner*. 2016;260(1799):17–20.
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000 Dec 5;97(25):13766–71.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Mar;8(3):221–33.
- Pan J, Wang B, Li W, Zhou X, Scherr T, Yang Y, et al. Elevated cross-talk between subchondral bone and cartilage in osteoarthritic joints. *Bone*. 2012 Aug;51(2):212–7.
- Panwar P, Du X, Sharma V, Lamour G, Castro M, Li H, et al. Effects of cysteine proteases on the structural and mechanical properties of collagen fibers. *J Biol Chem*. 2013 Feb 22;288(8):5940–50.
- Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnicka-Worms H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*. 1997 Sep 5;277(5331):1501–5.

- Peoc'h K, Schröder HC, Laplanche J, Ramljak S, Müller WE. Determination of 14-3-3 protein levels in cerebrospinal fluid from Creutzfeldt-Jakob patients by a highly sensitive capture assay. *Neurosci Lett*. 2001 Apr 6;301(3):167–70.
- Pessler F, Dai L, Diaz-Torne C, Gomez-Vaquero C, Paessler ME, Zheng D-H, et al. The synovitis of “non-inflammatory” orthopaedic arthropathies: a quantitative histological and immunohistochemical analysis. *Ann Rheum Dis*. 2008 Aug;67(8):1184–7.
- Petersson IF, Sandqvist L, Svensson B, Saxne T. Cartilage markers in synovial fluid in symptomatic knee osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1997 Jan 1;56(1):64–7.
- Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm*. 2010;2010.
- Pisetsky DS, Erlandsson-Harris H, Andersson U. High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(3):209.
- Poole AR, Kobayashi M, Yasuda T, Lavery S, Mwale F, Kojima T, et al. Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2002 Nov 1;61(suppl 2):ii78–81.
- Pozgan U, Caglic D, Rozman B, Nagase H, Turk V, Turk B. Expression and activity profiling of selected cysteine cathepsins and matrix metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biol Chem*. 2010 May;391(5):571–9.
- Priam S, Bougault C, Houard X, Gosset M, Salvat C, Berenbaum F, et al. Identification of Soluble 14-3-3 ϵ as a Novel Subchondral Bone Mediator Involved in Cartilage Degradation in Osteoarthritis: Soluble 14-3-3 ϵ in Bone-Cartilage Communication. *Arthritis & Rheumatism*. 2013 Jul;65(7):1831–42.
- Puenpatom RA, Victor TW. Increased prevalence of metabolic syndrome in individuals with osteoarthritis: an analysis of NHANES III data. *Postgrad Med*. 2009 Nov;121(6):9–20.
- Qi J, Buzas K, Fan H, Cohen JI, Wang K, Mont E, et al. Painful pathways induced by TLR stimulation of dorsal root ganglion neurons. *J Immunol*. 2011 Jun 1;186(11):6417–26.
- Qi W, Martinez JD. Reduction of 14-3-3 proteins correlates with increased sensitivity to killing of human lung cancer cells by ionizing radiation. *Radiat Res*. 2003 Aug;160(2):217–23.
- Radin EL, Rose RM. Role of Subchondral Bone in the Initiation and Progression of Cartilage Damage: *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1986 Dec;NA;(213):34–40.
- Raghu H, Lepus CM, Wang Q, Wong HH, Lingampalli N, Oliviero F, et al. CCL2/CCR2, but not CCL5/CCR5, mediates monocyte recruitment, inflammation and cartilage destruction in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017 May;76(5):914–22.
- Rajkumar A, Dean J, Kohane I. Machine Learning in Medicine. *New England Journal of Medicine*. 2019 Apr 4;380(14):1347–58.
- Reichenbach S, Guermazi A, Niu J, Neogi T, Hunter DJ, Roemer FW, et al. Prevalence of bone attrition on knee radiographs and MRI in a community-based cohort. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2008 Sep 1;16(9):1005–10.

- Renshaw M, Rockwell J, Engleman C, Gewirtz A, Katz J, Sambhara S. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol*. 2002 Nov 1;169(9):4697–701.
- Revell PA, al-Saffar N, Fish S, Osei D. Extracellular matrix of the synovial intimal cell layer. *Ann Rheum Dis*. 1995 May;54(5):404–7.
- Rezabkova L, Kacirova M, Sulc M, Herman P, Vecer J, Stepanek M, et al. Structural modulation of phosphatidylinositol 3-kinase by phosphorylation and 14-3-3 protein binding. *Biophys J*. 2012 Nov 7;103(9):1960–9.
- Richmond RS, Carlson CS, Register TC, Shanker G, Loeser RF. Functional estrogen receptors in adult articular cartilage: estrogen replacement therapy increases chondrocyte synthesis of proteoglycans and insulin-like growth factor binding protein 2. *Arthritis Rheum*. 2000 Sep;43(9):2081–90.
- Rider P, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN, Cohen I. Alarmins: Feel the Stress. *The Journal of Immunology*. 2017 Feb 15;198(4):1395–402.
- Riera Romo M, Pérez-Martínez D, Castillo Ferrer C. Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*. 2016 Jun;148(2):125–39.
- Rivero G, Aldana AA, Frontini Lopez YR, Liverani L, Boccacini AR, Bustos DM, et al. 14-3-3 ϵ protein-immobilized PCL-HA electrospun scaffolds with enhanced osteogenicity. *J Mater Sci Mater Med*. 2019 Aug 27;30(9):99.
- Roach HI, Aigner T, Kouri JB. Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis*. 2004 May;9(3):265–77.
- Roemer FW, Guermazi A, Niu J, Zhang Y, Mohr A, Felson DT. Prevalence of magnetic resonance imaging-defined atrophic and hypertrophic phenotypes of knee osteoarthritis in a population-based cohort. *Arthritis Rheum*. 2012 Feb;64(2):429–37.
- Roos H, Adalberth T, Dahlberg L, Lohmander LS. Osteoarthritis of the knee after injury to the anterior cruciate ligament or meniscus: the influence of time and age. *Osteoarthr Cartil*. 1995 Dec;3(4):261–7.
- Rószter T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2015 [cited 2020 Feb 3];2015. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4452191/>
- Rudek MA, Venitz J, Figg WD. Matrix metalloproteinase inhibitors: do they have a place in anticancer therapy? *Pharmacotherapy*. 2002 Jun;22(6):705–20.
- Ruhlen R, Marberry K. The chondrocyte primary cilium. *Osteoarthr Cartil*. 2014 Aug;22(8):1071–6.
- Russell FA, McDougall JJ. Proteinase activated receptor (PAR) involvement in mediating arthritis pain and inflammation. *Inflamm Res*. 2009 Mar;58(3):119–26.
- Russo L, Lumeng CN. Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. *Immunology*. 2018;155(4):407–17.

- Ryder JJ, Garrison K, Song F, Hooper L, Skinner J, Loke Y, et al. Genetic associations in peripheral joint osteoarthritis and spinal degenerative disease: a systematic review. *Ann Rheum Dis*. 2008 May;67(5):584–91.
- Saito I, Koshino T, Nakashima K, Uesugi M, Saito T. Increased cellular infiltrate in inflammatory synovia of osteoarthritic knees. *Osteoarthr Cartil*. 2002 Feb;10(2):156–62.
- Salter DM, Hughes DE, Simpson R, Gardner DL. Integrin expression by human articular chondrocytes. *Br J Rheumatol*. 1992 Apr;31(4):231–4.
- Samavedi S, Diaz-Rodriguez P, Erndt-Marino JD, Hahn MS. A Three-Dimensional Chondrocyte-Macrophage Coculture System to Probe Inflammation in Experimental Osteoarthritis. *Tissue Eng Part A*. 2017;23(3–4):101–14.
- Sanchez C, Gabay O, Salvat C, Henrotin YE, Berenbaum F. Mechanical loading highly increases IL-6 production and decreases OPG expression by osteoblasts. *Osteoarthr Cartil*. 2009 Apr;17(4):473–81.
- Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res*. 2001;3(2):107–13.
- Sandy JD, Verscharen C. Analysis of aggrecan in human knee cartilage and synovial fluid indicates that aggrecanase (ADAMTS) activity is responsible for the catabolic turnover and loss of whole aggrecan whereas other protease activity is required for C-terminal processing in vivo. *Biochem J*. 2001 Sep 15;358(Pt 3):615–26.
- Sarmanova A, Hall M, Moses J, Doherty M, Zhang W. Synovial changes detected by ultrasound in people with knee osteoarthritis - a meta-analysis of observational studies. *Osteoarthr Cartil*. 2016;24(8):1376–83.
- Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*. 2003 Oct 15;171(8):4304–10.
- Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone*. 2012 Aug;51(2):249–57.
- Schelbergen RFP, Blom AB, van den Bosch MHJ, Slöetjes A, Abdollahi-Roodsaz S, Schreurs BW, et al. Alarmins S100A8 and S100A9 elicit a catabolic effect in human osteoarthritic chondrocytes that is dependent on Toll-like receptor 4. *Arthritis & Rheumatism*. 2012 May;64(5):1477–87.
- Schneider M, Voss B, Rauterberg J, Menke M, Pauly Th, Miehke RK, et al. Basement membrane proteins in synovial membrane: Distribution in rheumatoid arthritis and synthesis by fibroblast-like cells. *Clin Rheumatol*. 1994 Mar 1;13(1):90–7.
- Schwarz H, Schmittner M, Duschl A, Horejs-Hoeck J. Residual Endotoxin Contaminations in Recombinant Proteins Are Sufficient to Activate Human CD1c+ Dendritic Cells. *PLOS ONE*. 2014 Dec 5;9(12):e113840.
- Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2010 Nov;6(11):625–35.

- Sellam J, Courties A, Eymard F, Ferrero S, Latourte A, Ornetti P, et al. Recommendations of the French society of rheumatology for the pharmacological management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2019 Apr 1;27:S507–8.
- Seller PC, Dowson D, Wright V. The rheology of synovial fluid | SpringerLink. *Rheologica Acta*. 1971;10:2–7.
- Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili S-A, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*. 2018 Sep;233(9):6425–40.
- Sharma L, Song J, Dunlop D, Felson D, Lewis CE, Segal N, et al. Varus and Valgus Alignment and Incident and Progressive Knee Osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010 Nov;69(11):1940–5.
- Shen P, Fuchs M, Reisener M-J, Grinner C, Wu P, Jung T, et al. Toll-like receptor signaling in chondrocyte promotes the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2019 Apr 1;27:S378–9.
- Sheng J, Ruedl C, Karjalainen K. Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity*. 2015 Aug 18;43(2):382–93.
- Shibakawa A, Yudoh K, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Nakamura H. The role of subchondral bone resorption pits in osteoarthritis: MMP production by cells derived from bone marrow. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2005 Aug 1;13(8):679–87.
- Shiga Y, Wakabayashi H, Miyazawa K, Kido H, Itoyama Y. 14-3-3 protein levels and isoform patterns in the cerebrospinal fluid of Creutzfeldt-Jakob disease patients in the progressive and terminal stages. *J Clin Neurosci*. 2006 Jul;13(6):661–5.
- Shimizu H, Yokoyama S, Asahara H. Growth and differentiation of the developing limb bud from the perspective of chondrogenesis. *Dev Growth Differ*. 2007 Aug;49(6):449–54.
- Showery JE, Kusnezov NA, Dunn JC, Bader JO, Belmont PJ, Waterman BR. The Rising Incidence of Degenerative and Posttraumatic Osteoarthritis of the Knee in the United States Military. *J Arthroplasty*. 2016;31(10):2108–14.
- Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012 Mar 1;122(3):787–95.
- Siebelt M, Jahr H, Groen HC, Sandker M, Waarsing JH, Kops N, et al. Hsp90 inhibition protects against biomechanically induced osteoarthritis in rats. *Arthritis and rheumatism*. 2013;65(8):2102–12.
- Simkhes YV, Karpov SM, Baturin VA, Vyshlova A. ROLE OF S100 PROTEIN IN THE PATHOGENESIS OF PAIN SYNDROMES [Internet]. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2016 [cited 2020 Feb 3]. Available from: <https://nnp.ima-press.net/nnp/article/view/674>
- Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in Inflammation and Cancer. *Annual Review of Immunology*. 2010 Mar;28(1):367–88.
- Singh JA, Arayssi T, Duray P, Schumacher HR. Immunohistochemistry of normal human knee synovium: a quantitative study. *Ann Rheum Dis*. 2004 Jul;63(7):785–90.

- Siraganian RP, Hook WA. Complement-induced histamine release from human basophils. II. Mechanism of the histamine release reaction. *J Immunol.* 1976 Mar;116(3):639–46.
- Sluchanko NN, Gusev NB. Oligomeric structure of 14-3-3 protein: what do we know about monomers? *FEBS Lett.* 2012 Dec 14;586(24):4249–56.
- Smith MD. The Normal Synovium. *Open Rheumatol J.* 2011 Dec 30;5:100–6.
- Smith MD, Barg E, Weedon H, Papangelis V, Smeets T, Tak PP, et al. Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints. *Ann Rheum Dis.* 2003 Apr;62(4):303–7.
- Sniekers YH, Intema F, Lafeber FP, van Osch GJ, van Leeuwen JP, Weinans H, et al. A role for subchondral bone changes in the process of osteoarthritis; a micro-CT study of two canine models. *BMC Musculoskeletal Disorders.* 2008 Feb 12;9(1):20.
- Sohn DH, Sokolove J, Sharpe O, Erhart JC, Chandra PE, Lahey LJ, et al. Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine production via Toll-like receptor 4. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(1):R7.
- Sokoloff L. Microcracks in the calcified layer of articular cartilage. *Arch Pathol Lab Med.* 1993 Feb;117(2):191–5.
- Song R-H, Tortorella MD, Malfait A-M, Alston JT, Yang Z, Arner EC, et al. Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum.* 2007 Feb;56(2):575–85.
- Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health: A Multidisciplinary Approach.* 2009 Nov;1(6):461–8.
- Soto-Gamez A, Demaria M. Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence. *Drug Discovery Today.* 2017 May;22(5):786–95.
- Sowers M, Jannausch M, Stein E, Jamadar D, Hochberg M, Lachance L. C-reactive protein as a biomarker of emergent osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2002 Aug;10(8):595–601.
- Spector TD, Conaghan PG, Buckland-Wright JC, Garner P, Cline GA, Beary JF, et al. Effect of risedronate on joint structure and symptoms of knee osteoarthritis: results of the BRISK randomized, controlled trial [ISRCTN01928173]. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(3):R625-633.
- van Spil WE, Jansen NWD, Bijlsma JWJ, Reijman M, DeGroot J, Welsing PMJ, et al. Clusters within a wide spectrum of biochemical markers for osteoarthritis: data from CHECK, a large cohort of individuals with very early symptomatic osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2012 Jul;20(7):745–54.
- Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2005 Sep;13(9):769–81.
- Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, et al. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature.* 2005 Mar 31;434(7033):648–52.

- Strassle BW, Mark L, Leventhal L, Piesla MJ, Jian Li X, Kennedy JD, et al. Inhibition of osteoclasts prevents cartilage loss and pain in a rat model of degenerative joint disease. *Osteoarthr Cartil.* 2010 Oct;18(10):1319–28.
- Straub RH, Hense HW, Andus T, Schölmerich J, Riegger GA, Schunkert H. Hormone replacement therapy and interrelation between serum interleukin-6 and body mass index in postmenopausal women: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Mar;85(3):1340–4.
- Styrkarsdottir U, Helgason H, Sigurdsson A, Norddahl GL, Agustsdottir AB, Reynard LN, et al. Corrigendum: Whole-genome sequencing identifies rare genotypes in COMP and CHADL associated with high risk of hip osteoarthritis. *Nat Genet.* 2017 27;49(8):1286.
- Sugiura H, Ichikawa T, Koarai A, Yanagisawa S, Minakata Y, Matsunaga K, et al. Activation of Toll-like receptor 3 augments myofibroblast differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009 Jun;40(6):654–62.
- Sun S, Wong EWP, Li MWM, Lee WM, Cheng CY. 14-3-3 and its binding partners are regulators of protein–protein interactions during spermatogenesis. *J Endocrinol.* 2009 Sep;202(3):327–36.
- Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, Takasugi K, Kawashima M, Yamamoto H, 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.* 2006;8(3):R69.
- Suri S, Walsh DA. Osteochondral alterations in osteoarthritis. *Bone.* 2012 Aug;51(2):204–11.
- Syx D, Tran PB, Miller RE, Malfait A-M. Peripheral Mechanisms Contributing to Osteoarthritis Pain. *Curr Rheumatol Rep.* 2018 26;20(2):9.
- Takahashi K, Kubo T, Arai Y, Imanishi J, Kawata M, Hirasawa Y. Localization of heat shock protein in osteoarthritic cartilage. *Scand J Rheumatol.* 1997;26(5):368–75.
- Takakubo Y, Barreto G, Konttinen YT, Oki H, Takagi M. Role of innate immune sensors, TLRs, and NALP3 in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Long Term Eff Med Implants.* 2014;24(4):243–51.
- Takeda K. Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J Endotoxin Res.* 2005;11(1):51–5.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335–76.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 1999 Oct;11(4):443–51.
- Tamaki Y, Takakubo Y, Hirayama T, Konttinen YT, Goodman SB, Yamakawa M, et al. Expression of Toll-like Receptors and Their Signaling Pathways in Rheumatoid Synovitis. *The Journal of Rheumatology.* 2011 May 1;38(5):810–20.
- Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol.* 2007 Feb;170(2):427–35.

- Terada C, Yoshida A, Nasu Y, Mori S, Tomono Y, Tanaka M, et al. Gene Expression and Localization of High-mobility Group Box Chromosomal Protein-1 (HMGB-1) in Human Osteoarthritic Cartilage. *Acta Med Okayama*. 2011;65(6):9.
- Terauchi R, Takahashi KA, Arai Y, Ikeda T, Ohashi S, Imanishi J, et al. Hsp70 prevents nitric oxide-induced apoptosis in articular chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*. 2003;48(6):1562–8.
- Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum*. 2001 Mar;44(3):585–94.
- Tetsunaga T, Nishida K, Furumatsu T, Naruse K, Hirohata S, Yoshida A, et al. Regulation of mechanical stress-induced MMP-13 and ADAMTS-5 expression by RUNX-2 transcriptional factor in SW1353 chondrocyte-like cells. *Osteoarthr Cartil*. 2011 Feb;19(2):222–32.
- Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009 Aug;9(8):581–93.
- Thomas CM, Fuller CJ, Whittles CE, Sharif M. Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. *Osteoarthr Cartil*. 2007 Jan;15(1):27–34.
- Tian J, Avalos AM, Mao S-Y, Chen B, Senthil K, Wu H, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol*. 2007 May;8(5):487–96.
- Tomi A-L, Sellam J, Lacombe K, Fellahi S, Sebire M, Rey-Jouvin C, et al. Increased prevalence and severity of radiographic hand osteoarthritis in patients with HIV-1 infection associated with metabolic syndrome: data from the cross-sectional METAFIB-OA study. *Ann Rheum Dis*. 2016 Dec;75(12):2101–7.
- Toyo-oka K, Shionoya A, Gambello MJ, Cardoso C, Leventer R, Ward HL, et al. 14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nat Genet*. 2003 Jul;34(3):274–85.
- Tsai CL, Liu TK. Osteoarthritis in women: its relationship to estrogen and current trends. *Life Sci*. 1992;50(23):1737–44.
- Tsuchida AI, Beekhuizen M, Rutgers M, van Osch GJ, Bekkers JE, Bot AG, et al. Interleukin-6 is elevated in synovial fluid of patients with focal cartilage defects and stimulates cartilage matrix production in an in vitro regeneration model. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(6):R262.
- Turk B, Turk V, Turk D. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol Chem*. 1997 Apr;378(3–4):141–50.
- Umahara T, Uchihara T, Nakamura A, Iwamoto T. Differential expression of 14-3-3 protein isoforms in developing rat hippocampus, cortex, rostral migratory stream, olfactory bulb, and white matter. *Brain Res*. 2011 Sep 2;1410:1–11.
- Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Ohkubo I, Hukuda S. Expression of genes for estrogen receptors alpha and beta in human articular chondrocytes. *Osteoarthr Cartil*. 1999 Nov;7(6):560–6.
- Valdes AM, Meulenbelt I, Chassaing E, Arden NK, Bierma-Zeinstra S, Hart D, et al. 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. *Osteoarthr Cartil.* 2014 May;22(5):683–9.
- Van Everbroeck BRJ, Boons J, Cras P. 14-3-3 γ -isoform detection distinguishes sporadic Creutzfeldt–Jakob disease from other dementias. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005 Jan;76(1):100–2.
- Van Spil WE, Kubassova O, Boesen M, Bay-Jensen A-C, Mobasher A. Osteoarthritis phenotypes and novel therapeutic targets. *Biochemical Pharmacology.* 2019 Jul 1;165:41–8.
- Vandenbroucke RE, Libert C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat Rev Drug Discov.* 2014 Dec;13(12):904–27.
- Vaysbrot EE, Osani MC, Musetti M-C, McAlindon TE, Bannuru RR. Are bisphosphonates efficacious in knee osteoarthritis? A meta-analysis of randomized controlled trials. *Osteoarthr Cartil.* 2018;26(2):154–64.
- Verbruggen G, Wittoek R, Cruyssen BV, Elewaut D. Tumour necrosis factor blockade for the treatment of erosive osteoarthritis of the interphalangeal finger joints: a double blind, randomised trial on structure modification. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2012 Jun 1;71(6):891–8.
- Verdoodt B, Benzinger A, Popowicz GM, Holak TA, Hermeking H. Characterization of 14-3-3sigma dimerization determinants: requirement of homodimerization for inhibition of cell proliferation. *Cell Cycle.* 2006 Dec;5(24):2920–6.
- Verma SK, Leikina E, Melikov K, Gebert C, Kram V, Young MF, et al. Cell-surface phosphatidylserine regulates osteoclast precursor fusion. *J Biol Chem.* 2018 Jan 5;293(1):254–70.
- Veronese N, Trevisan C, De Rui M, Bolzetta F, Maggi S, Zambon S, et al. Association of Osteoarthritis With Increased Risk of Cardiovascular Diseases in the Elderly: Findings From the Progetto Veneto Anziano Study Cohort. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ).* 2016;68(5):1136–44.
- Vesentini S, Soncini M, Fiore GB, Redaelli A. Mechanisms of polymyxin B endotoxin removal from extracorporeal blood flow: molecular interactions. *Contrib Nephrol.* 2010;167:45–54.
- Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res.* 2002;4(3):157–64.
- Visconti S, Camoni L, Marra M, Aducci P. Role of the 14-3-3 C-terminal region in the interaction with the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell Physiol.* 2008 Dec;49(12):1887–97.
- Vlaicu SI, Tatomir A, Rus V, Mekala AP, Mircea PA, Niculescu F, et al. The role of complement activation in atherogenesis: the first 40 years. *Immunol Res.* 2016 Feb;64(1):1–13.
- Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell.* 1998 May 1;93(3):411–22.
- Waarsing JH, Bierma-Zeinstra SMA, Weinans H. Distinct subtypes of knee osteoarthritis: data from the Osteoarthritis Initiative. *Rheumatology (Oxford).* 2015 Sep;54(9):1650–8.

- Wähämaa H, Schierbeck H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, Aveberger A-C, Andersson U, 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*. 2011;13(4):R136.
- Wakelin SJ, Sabroe I, Gregory CD, Poxton IR, Forsythe JLR, Garden OJ, et al. "Dirty little secrets"--endotoxin contamination of recombinant proteins. *Immunol Lett*. 2006 Jul 15;106(1):1–7.
- Walker WT, Kawcak CE, Hill AE. Medial femoral condyle morphometrics and subchondral bone density patterns in Thoroughbred racehorses. *American Journal of Veterinary Research*. 2013 Apr 29;74(5):691–9.
- Walsh DA, Pearson CI. Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases. *Arthritis Res*. 2001;3(3):147–53.
- Wang L, Zhang H, Shao L, Chen L, Liu Z, He X, et al. S100A12 levels in synovial fluid may reflect clinical severity in patients with primary knee osteoarthritis. *Biomarkers*. 2013a May 1;18(3):216–20.
- Wang M, Sampson ER, Jin H, Li J, Ke QH, Im H-J, et al. MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2013b Jan 8;15(1):R5.
- Wang Q, Rozelle AL, Lepus CM, Scanzello CR, Song JJ, Larsen DM, et al. Identification of a central role for complement in osteoarthritis. *Nat Med*. 2011 Nov 6;17(12):1674–9.
- Wang X, Manner PA, Horner A, Shum L, Tuan RS, Nuckolls GH. Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthr Cartil*. 2004 Dec;12(12):963–73.
- Waterman MJ, Stavridi ES, Waterman JL, Halazonetis TD. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet*. 1998 Jun;19(2):175–8.
- Weischenfeldt J, Porse B. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH Protoc*. 2008 Dec 1;2008:pdb.prot5080.
- Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B. The aging of the immune system. *Transpl Int*. 2009 Nov;22(11):1041–50.
- Wenisch C, Patruta S, Daxböck F, Krause R, Hörl W. Effect of age on human neutrophil function. *J Leukoc Biol*. 2000 Jan;67(1):40–5.
- Westacott CI, Whicher JT, Barnes IC, Thompson D, Swan AJ, Dieppe PA. Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*. 1990 Sep;49(9):676–81.
- Widmyer MR, Utturkar GM, Leddy HA, Coleman JL, Spritzer CE, Moorman CT, et al. High body mass index is associated with increased diurnal strains in the articular cartilage of the knee. *Arthritis Rheum*. 2013 Oct;65(10):2615–22.
- Williams MF, London DA, Husni EM, Navaneethan S, Kashyap SR. Type 2 diabetes and osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *J Diabetes Complicat*. 2016;30(5):944–50.
- Woodell-May JE, Sommerfeld SD. Role of Inflammation and the Immune System in the Progression of Osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research [Internet]*. 2019 Sep 12 [cited 2019 Dec 11]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jor.24457>

- Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ.* 2003;81(9):646–56.
- Wright NC, Riggs GK, Lisse JR, Chen Z. Self-Reported Osteoarthritis, Ethnicity, BMI and other Associated Risk Factors in Postmenopausal Women---Results from the Women’s Health Initiative. *J Am Geriatr Soc.* 2008 Sep;56(9):1736–43.
- Wu C-L, McNeill J, Goon K, Little D, Kimmerling K, Huebner J, et al. Conditional Macrophage Depletion Increases Inflammation and Does Not Inhibit the Development of Osteoarthritis in Obese Macrophage Fas-Induced Apoptosis–Transgenic Mice. *Arthritis & Rheumatology.* 2017;69(9):1772–83.
- Wu DD, Burr DB, Boyd RD, Radin EL. Bone and cartilage changes following experimental varus or valgus tibial angulation. *J Orthop Res.* 1990 Jul;8(4):572–85.
- Wu H, Du J, Zheng Q. Expression of MMP-1 in cartilage and synovium of experimentally induced rabbit ACLT traumatic osteoarthritis: immunohistochemical study. *Rheumatol Int.* 2008 Nov;29(1):31–6.
- Xia C, Braunstein Z, Toomey AC, Zhong J, Rao X. S100 Proteins As an Important Regulator of Macrophage Inflammation. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Jan 5 [cited 2020 Jan 31];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5770888/>
- Xiao B, Smerdon SJ, Jones DH, Dodson GG, Soneji Y, Aitken A, et al. Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature.* 1995 Jul 13;376(6536):188–91.
- Xie J, Huang Z, Yu X, Zhou L, Pei F. Clinical implications of macrophage dysfunction in the development of osteoarthritis of the knee. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019;46:36–44.
- Xu H, Edwards J, Banerji S, Prevo R, Jackson DG, Athanasou NA. Distribution of lymphatic vessels in normal and arthritic human synovial tissues. *Ann Rheum Dis.* 2003 Dec;62(12):1227–9.
- Xue C, Takahashi M, Hasunuma T, Aono H, Yamamoto K, Yoshino S, et al. Characterisation of fibroblast-like cells in pannus lesions of patients with rheumatoid arthritis sharing properties of fibroblasts and chondrocytes. *Ann Rheum Dis.* 1997 Apr;56(4):262–7.
- Yaffe MB. How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett.* 2002 Feb 20;513(1):53–7.
- Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, et al. The Structural Basis for 14-3-3:Phosphopeptide Binding Specificity. *Cell.* 1997 Dec;91(7):961–71.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol.* 2003 Nov;4(11):1144–50.
- Yammani RR, Long D, Loeser RF. Interleukin-7 stimulates secretion of S100A4 by activating the JAK/STAT signaling pathway in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2009 Mar;60(3):792–800.
- Yang C-Y, Chanalaris A, Troeberg L. ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis – looking beyond the ‘usual suspects.’ *Osteoarthritis Cartilage.* 2017a Jul;25(7):1000–9.

- Yang D, Han Z, Oppenheim JJ. ALARMINs AND IMMUNITY. *Immunol Rev.* 2017b Nov;280(1):41–56.
- Yang X, Lee WH, Sobott F, Papagrigoriou E, Robinson CV, Grossmann JG, et al. Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 Nov 14;103(46):17237–42.
- Yielding KL, Tomkins GM, Bunim JJ. Synthesis of hyaluronic acid by human synovial tissue slices. *Science.* 1957 Jun 28;125(3261):1300.
- Yin S-J, Lee J-R, Kwak H, Lee B-N, Han J-W, Hahn M-J, et al. Functional study of 14-3-3 protein epsilon (YWHAE) in keratinocytes: microarray integrating bioinformatics approaches. *J Biomol Struct Dyn.* 2019 Jul 5;1–17.
- Yona S, Kim K-W, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity.* 2013 Jan 24;38(1):79–91.
- Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Tanaka S, Kawaguchi H, Nakamura K, et al. Accumulation of metabolic risk factors such as overweight, hypertension, dyslipidaemia, and impaired glucose tolerance raises the risk of occurrence and progression of knee osteoarthritis: a 3-year follow-up of the ROAD study. *Osteoarthr Cartil.* 2012 Nov;20(11):1217–26.
- Yuan XL, Meng HY, Wang YC, Peng J, Guo QY, Wang AY, et al. Bone–cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2014 Aug 1;22(8):1077–89.
- Zelzer E, Glotzer DJ, Hartmann C, Thomas D, Fukai N, Soker S, et al. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mech Dev.* 2001 Aug;106(1–2):97–106.
- Zeng GQ, Chen AB, Li W, Song JH, Gao CY. High MMP-1, MMP-2, and MMP-9 protein levels in osteoarthritis. *Genet Mol Res.* 2015 Nov 23;14(4):14811–22.
- Zhang C, Dong H, Chen F, Wang Y, Ma J, Wang G. The HMGB1-RAGE/TLR-TNF- α signaling pathway may contribute to kidney injury induced by hypoxia. *Exp Ther Med.* 2019 Jan;17(1):17–26.
- Zhang H, Lin C, Zeng C, Wang Z, Wang H, Lu J, et al. Synovial macrophage M1 polarisation exacerbates experimental osteoarthritis partially through R-spondin-2. *Ann Rheum Dis.* 2018;77(10):1524–34.
- Zhang J, Zhang HY, Zhang M, Qiu ZY, Wu YP, Callaway DA, et al. Connexin43 hemichannels mediate small molecule exchange between chondrocytes and matrix in biomechanically-stimulated temporomandibular joint cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2014 Jun 1;22(6):822–30.
- Zhang S, Xing H, Muslin AJ. Nuclear localization of protein kinase U-alpha is regulated by 14-3-3. *J Biol Chem.* 1999 Aug 27;274(35):24865–72.
- Zhang X, Blalock D, Wang J. Classifications and Definitions of Normal Joints. In: Chen Q, editor. *Osteoarthritis - Progress in Basic Research and Treatment* [Internet]. InTech; 2015 [cited 2019 Dec 22]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/osteoarthritis-progress-in-basic-research-and-treatment/classifications-and-definitions-of-normal-joints>

- Zhao L, Wang Q, Zhang C, Huang C. Genome-wide DNA methylation analysis of articular chondrocytes identifies TRAF1, CTGF, and CX3CL1 genes as hypomethylated in osteoarthritis. *Clin Rheumatol*. 2017 Oct;36(10):2335–42.
- Zhong Z-M, Chen X, Qi X, Wang X-M, Li C-Y, Qin R-J, et al. Adaptor protein LNK promotes anaplastic thyroid carcinoma cell growth via 14-3-3 ϵ/γ binding. *Cancer Cell Int*. 2020;20:11.
- Zhou J, Perelman JM, Kolosov VP, Zhou X. Neutrophil elastase induces MUC5AC secretion via protease-activated receptor 2. *Mol Cell Biochem*. 2013 May;377(1–2):75–85.
- Zhou S, Cui Z, Urban JPG. Factors influencing the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage-bone interface: a modeling study. *Arthritis Rheum*. 2004 Dec;50(12):3915–24.
- Zhu W, Zhang X, Jiang Y, Liu X, Huang L, Wei Q, et al. Alterations in peripheral T cell and B cell subsets in patients with osteoarthritis. *Clin Rheumatol*. 2020 Feb;39(2):523–32.
- Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015 Aug 22;386(9995):743–800.

Annexes

Revue :

“Danger signals and inflammaging in
osteoarthritis”

Publié dans *Clinical and Experimental Rheumatology*, 2019

Auteurs : M. Millerand, F. Berenbaum, C. Jacques

Danger signals and inflammaging in osteoarthritis

M. Millerand¹, F. Berenbaum^{1,2}, C. Jacques¹

¹Sorbonne University, INSERM (UMR S938) and Labex Transimmuno, Paris, France; ²Department of Rheumatology, AP-HP, APHP-Sorbonne University, Paris, France.

Marion Millerand

Francis Berenbaum, MD, PhD
Claire Jacques, PhD

Please address correspondence to: Dr Francis Berenbaum,

UMR S938, CDR Saint-Antoine, INSERM, Sorbonne Université, 184 Rue du Faubourg Saint-Antoine, 75012 Paris, France.

E-mail: francis.berenbaum@sat.aphp.fr

Received on July 18, 2019; accepted on September 4, 2019.

Clin Exp Rheumatol 2019; 37 (Suppl. 120): S48-S56.

© Copyright CIniciCaI and

ExpErimEntal rhEumatology 2019.

Key words: DAMPs, inflammaging, osteoarthritis, innate immunity, TLR

6. ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is the most common age-related chronic and disabling joint disease. Long considered to be a “wear and tear” disease, OA is now seen as a low-grade inflammation disease that affects all tissues of the joint, involving cartilage degradation, bone remodelling, osteophytes, and synovitis. The process, called inflammaging, is characterised by the association of low-grade inflammation, profound changes in intra-cellular mechanisms, and the decreased efficiency of the immune system with ageing. The activation of innate immunity plays a critical role in the development and progression of OA. Innate immunity, including inflammasome activation, is triggered by small endogenous molecules called alarmins or damage-associated molecular patterns (DAMPs). These molecules are released in the extracellular media after cell stress or damage, bind to pathogen-recognition receptors (PRRs), such as Toll-like receptors (TLRs) and the receptor for advanced glycation end products (RAGE), and activate the secretion of pro-inflammatory factors, leading to joint inflammation. Moreover, such sterile inflammation triggers cell senescence, characterised by a senescence-associated secretory phenotype (SASP). Understanding the substantial age-related changes of joint tissues that influence the pathogenesis of OA is critical to improving the quality of life of elderly people in the context of increased life expectancy. This review will focus on age-related sterile inflammation in OA and highlight the various innovative and promising therapies targeting the mechanisms of aging.

Inflammaging in osteoarthritis

Osteoarthritis (OA) is the most common and disabling joint disease worldwide and aging is the most important risk factor for its development (1). Typically considered to be mechanically induced, it has taken many years

to accept that low-grade inflammation may also play a role in the OA process. This discovery came from the observation that an inflammatory state, although lower than in rheumatoid arthritis (RA), is present and is detectable both locally and systemically (2). The levels of several inflammatory mediators, such as IL6, IL-1 β , and MCP1, are higher in OA than healthy sera (3, 4). In addition, the aging process is also associated with chronic, low-grade inflammation, also known as inflammaging (5). Aging is a multifactorial process, during which many alterations and damage appear at the molecular, cellular, and tissue level (6). Aging cells undergo alterations of their properties, such as genomic instability, telomere attrition, epigenetic alterations, and the loss of proteostasis, resulting in a senescent-cell phenotype. Consequently, impaired regulation of oxidative stress in some types of aging cells causes the pro-inflammatory production of various mediators, shifting their phenotype to a so-called “senescence-associated secretory phenotype” (SASP) (7-9). It is noteworthy that aging shares similar mechanisms with those found in OA, including low-grade, chronic, sterile inflammation (10, 11). In aging, inflammation is partially due to the dysregulation and reduced efficiency of the immune system.

In both OA and inflammaging, inflammation is mostly driven by damage-associated molecular patterns (DAMPs), also called alarmins, a term proposed by Oppenheim *et al.* (12). Throughout aging, the body is challenged by a myriad of antigens and stressors. The resulting oxidative stress causes, at least in part, the release of DAMPs. In OA, the main hypothesis is that cartilage matrix fragments are released into the synovial cavity and stimulate the synovium. The synovial cells (macrophages and fibroblasts) react by producing inflammatory mediators, such as cytokines, chemokines, lipid mediators, and

Funding: this work was supported by grants from INSERM, Sorbonne University, French Society of Rheumatology (Société Française de rhumatologie) and Fondation Arthritis - Courtin.

M. Millerand was supported by a doctoral fellowship from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Competing interests: none declared

DAMPs, into the synovial fluid (SF). These SF mediators then activate chondrocytes to produce metalloproteinases, leading to a vicious circle (13). As DAMPs trigger the immune system, they likely contribute to the pathological association of ageing and OA (6, 14). Indeed, the local and systemic effects of DAMPs are numerous and largely contribute to the aging process and the progression of OA. They interact with pathogen-recognition receptors (PRRs), such as Toll-like receptors (TLRs) and the receptor for advanced glycation end products (RAGE). They also trigger the intracellular NLRP3 inflammasome (15). Overall, DAMPs exhibit pro-inflammatory effects that increase during aging, as well as during OA progression. As molecular targets, they constitute interesting therapeutic leads. Further research on alarmins needs to be conducted to understand their involvement in OA and inflammaging.

7. Age related-DAMPs involved in osteoarthritis

Throughout aging, the body is challenged by a multitude of antigens and stressors. The resulting oxidative stress causes the release of DAMPs. Whether due to aging or OA, the release of DAMPs increases and sustains inflammation, creating a state of chronic low-grade inflammation.

Physiologically, these molecules have many intracellular roles but can also be released into the extracellular media, both passively by stressed, damaged, or necrotic cells or actively through exosomes by immune cells (13). They trigger PRRs to alert the innate immune system and increase local inflammation and cartilage degradation (16). Age-related accumulation of reactive oxygen species from mitochondria has been demonstrated to be a major source of DAMP release (17). A large number of intracellular molecules have been shown to be alarmins, such as high mobility box 1 (HMGB1), uric acid (UA), ATP, S100 proteins, and heat shock proteins (HSPs). In addition, extracellular matrix fragments (polysaccharides and proteoglycans) cleaved during pathological conditions, such as OA, are able

to activate PRRs (14, 16). The list of alarmins is still growing and their structural characteristics vary greatly. Several alarmins are specifically involved in aging and OA, such as HMGB1, S100A8/A9, UA, and hyaluronan fragments (15) (Fig. 1).

HMGB1 is a member of a group of non-histone nuclear proteins. This DAMP of 30 kDa is highly conserved throughout evolution and exerts essential functions inside and outside the cell (6). Oxidative stress and injury are highly involved in aging (17) and induce the active release of HMGB1 by immune cells or passive release by necrotic cells. Moreover, HMGB1 levels are elevated in aged mouse kidney and liver and associated with macrophage infiltration (18). HMGB1 levels are higher in the SF of OA patients than that of controls (19) and have an extracellular pro-inflammatory role. This alarmin is able to bind to various receptors, such as RAGE, TLR2, and TLR4 (20). The interaction between HMGB1 and RAGE induces cytokine expression (IL-17) (15). Although the release of HMGB1 increases during aging, mainly due to its release by immune cells and damaged cells, its expression decreases in aged tissues (21).

The S100 family is comprised of low molecular weight proteins. They share common features with calmodulin and have two calcium-binding motifs. S100 proteins are involved in many intracellular processes, such as calcium homeostasis, cell growth, and proliferation. Like all alarmins, S100 proteins have pathophysiological roles when released outside of cells. For example, S100A8, A9, A12, and S100B have extracellular pro-inflammatory effects (15). Their expression varies throughout aging. They bind both to TLR and RAGE (22) but the main receptor of S100 is TLR4. The binding of S100A9 to TLR4 induces nuclear factor NF- κ B activation. TLR4 appears to be crucial for the induction of most cytokines, whereas RAGE is involved mainly in IL-1 β secretion (23). UA is an intracellular chemical product that results from the degradation and excretion of purines and is excreted through urine in humans. UA is constitutively produced in normal cells and

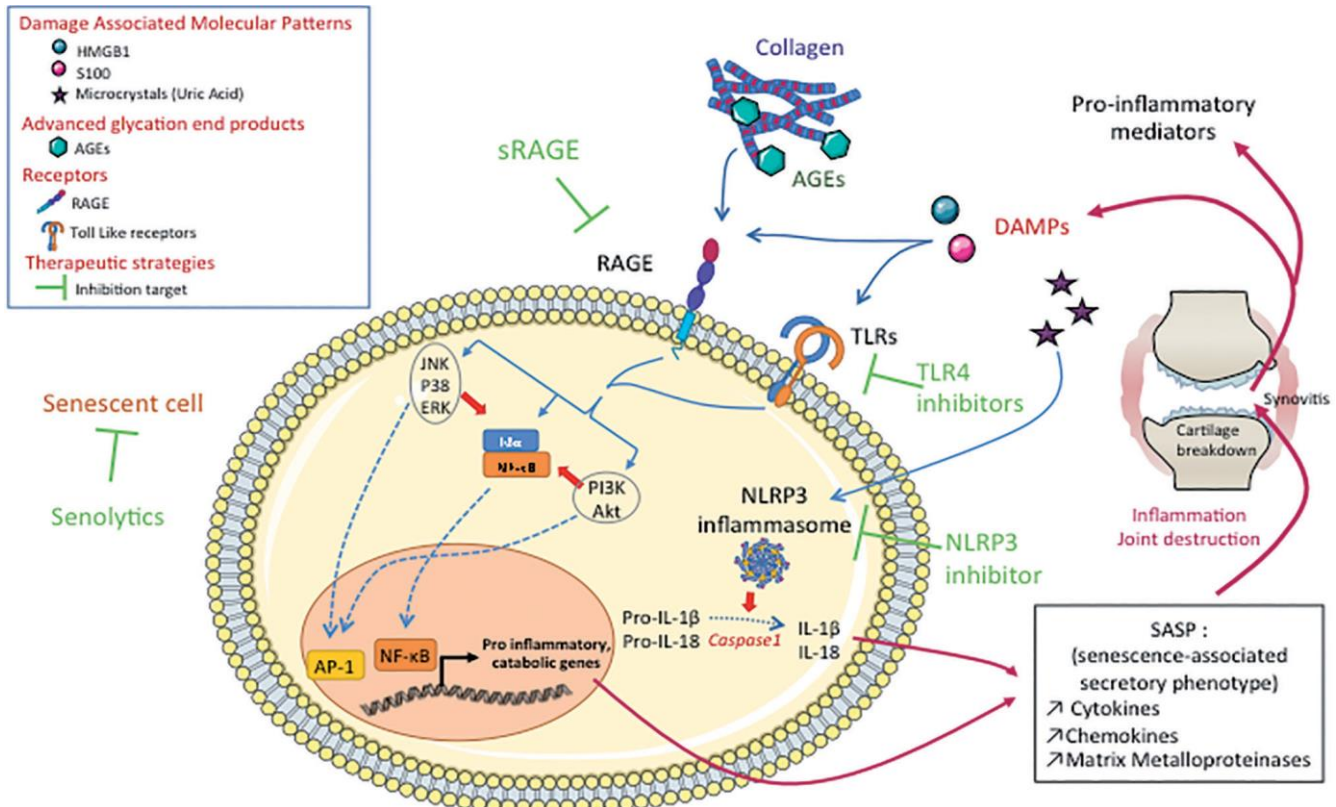
can be found both in the nucleus and cytoplasm. When its concentration exceeds the limit of solubility (6.8 mg/dL), UA forms crystals, which activate the inflammasome (24). UA levels increase in injured cells and it is released by dying cells (25). UA is a danger signal and a marker of OA severity. A clinical study suggested a possible role of elevated serum UA in the multifactorial aetiology of generalised OA (26). Increasing evidence shows that UA may be a factor that promotes the pathological process of OA through activation of the inflammasome (27). A correlation has been found between the levels of cytokines (IL-18 and IL-1 β) produced by UA-activated inflammasomes and UA, showing the importance of this DAMP in the activation of the innate immune system in OA.

Overall, these observations show that DAMPs are highly involved in the age-related progression of OA.

8. DAMPs trigger innate immunity through RAGE and TLRs

The immune system undergoes profound changes during aging in a process called immunosenescence. Immunosenescence is primarily caused by clonal expansion among T and B cells and the exhaustion of the pool of naïve T cells. This process thus decreases the body's ability to respond to new antigens (28). PRRs are critical for the activation of the immune system of the host due to their ability to recognise both pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and DAMPs. TLRs and RAGE are the most well known receptors involved in the activation of immunity. They share many ligands and can physically interact (29).

TLRs are a family of PRRs crucial for the activation of innate immunity in response to the detection of pathogens and cell/tissue damage (30). The 10 isoforms of TLRs expressed by mammals participate in both PAMP and DAMP recognition. Many cell types express TLRs, but they are mostly expressed by innate immune cells, including macrophages. Elevated TLR4 expression and pro-inflammatory signalling have been observed in the muscles of older individuals (31). Studies have shown



Sustaining of sterile inflammation process by the DAMPs and AGEs through the activation of the SASP by senescent cells and associated therapeutic targets in joint during OA

Fig. 1. Sustaining of sterile inflammation process by the DAMPs and AGEs through the activation of the SASP by senescent cells and associated therapeutic targets in joint during OA.

Osteoarthritis (OA) and aging share a common characteristic: a chronic, sterile low grade inflammation. The resulting synovitis provokes the release of damage signals by activated synovial cells, the DAMPs (HMGB1, S100, Uric acid). Moreover, the presence of AGEs on collagen fibrils increases through aging. AGEs and DAMPs accumulation in the joint induce MAPK and NF-κB inflammatory pathways in senescent cells through the activation of 2 main types of receptors, RAGE and the TLRs as well as the NLRP3 inflammasome. Then, senescent cells of the joint release pro-inflammatory and pro-catabolic factors (cytokines, chemokines, Matrix Metalloproteinases), which is called “senescence-associated secretory phenotype” (SASP). These mediators released in the synovial fluid worsen the inflammation of the synovium and the cartilage breakdown, leading to a positive-feedback loop. Taken together this phenomenon enhances and sustains a vicious circle of inflammation in the joint. Few emerging therapeutic strategies are under investigations and focus on inhibiting RAGE with soluble RAGE, TLR4 and NLRP3 with specific inhibitors and kill specifically the senescent cell called “senolyse”.

that human TLR function is impaired during the aging process. TLR signalling, and NF-κB signalling differ in aged macrophages relative to young macrophages (32). Moreover, there is evidence of the inappropriate persistence of TLR activation associated with aging (33).

RAGE is a multi-ligand receptor of the immunoglobulin superfamily of cell surface molecules expressed in mammals. This receptor is broadly expressed in all organs (lung, liver, kidney, skeletal muscle, and heart (34)). Immune cells of both the innate and adaptive immune response express this receptor (35-37). It is composed of two terminal domains, a “V”-type domain, which recognises extracellular ligands and a “C”-type domain, which mediates sig-

nalling through the MAPK and NF-κB pathways (13). RAGE expression increases with aging (38). The activation of RAGE leads to increased stimulation of chondrocytes and synoviocytes in OA (39). RAGE was first studied as the receptor of advanced glycation end products (AGEs) which are elevated in aging tissues, especially cartilage (40). The accumulation of AGEs in collagen during aging alters the mechanical features of the cartilage extracellular matrix (41). Aside from binding by AGEs, RAGE interacts with multiple PAMPs and DAMPs. RAGE deletion in mice protects against age-related diseases, showing its role in aging (42).

TLRs and RAGE trigger inflammatory intra-cellular pathways using various adaptor proteins or effectors, such as

TIRAP, MyD88, or mDia1 (43, 44). These intermediates activate intracellular pathways, including mainly the NF-κB pathway and the MAPK pathway via the ERK, JNK, and p38 kinase signalling cascade. Activation of these inflammatory pathways induces the expression of catabolic and inflammatory genes that participate in the induction of matrix metalloproteinase (MMP)-13, a collagenase with high selectivity towards collagen-II (14) (Fig. 1).

9. Contribution of the inflammasome to inflammaging in osteoarthritis

The inflammasome, first described by Martinon in 2002 (45), has been identified as an important driver of sterile inflammation and is a key contributor to the innate immune response seen in

the aging population (46-48). There is accumulating evidence that the inflammasome plays an important role during inflammaging (10, 49).

The inflammasome functions as a molecular platform for caspase-1-dependent proteolytic maturation and the secretion of IL-1 β and IL-18 (50). It is composed of a nucleotide-binding and oligomerisation domain-like receptor-containing protein (NLRP) as a sensor, an adapter protein called apoptosis-associated speck-like protein (ASC), containing an N-terminal caspase recruitment domain, and procaspase-1 (51). The best characterised member is NLRP3, which is highly expressed in macrophages, chondrocytes, synoviocytes, and osteoblasts (52). The NLRP3 inflammasome is activated by two steps; the priming step (signal 1) is provided by inflammatory stimuli, such as TLR4 agonists, and the activation step (signal 2) is triggered by PAMPs and DAMPs (53, 54). Interestingly, active caspase-1 has been associated with the release of HMGB1 (55). Regulation of the NLRP3 inflammasome, including by post-translational modifications (56, 57), is essential for maintaining adequate immune protection while preventing tissue damage from the overproduction of cytokines, which can cause chronic inflammation and excessive cell death (11, 56, 58).

In OA, the principal DAMPs that activate NLRP3 are crystals, such as those containing basic calcium phosphate (BCP), calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD), or UA (52). These microcrystals are interpreted as 'danger signals' by the innate immune system and contribute to inflammation (59). Various types of phosphate crystals are found in the joints of OA patients in association with radiographic lesions (60). Both *in vitro* and *in vivo* data demonstrate that NLRP3 is activated by hydroxyapatite crystals, suggesting that NLRP3 is responsible for the pathogenic effects of hydroxyapatite in OA, driving cartilage degeneration and synovitis through the production of IL-1 β , IL-18, and matrix-degrading enzymes (61).

UA is released from dying cells as a danger signal. In knee OA, SF UA levels correlate with disease severity and SF IL-1 β and IL-18 levels, suggest-

ing that it is a driver of OA pathology through the activation of NLRP3 (27) (Fig. 1). Indeed, UA may be used as a marker of disease severity.

Moreover, other studies have shown that OA cartilage can be degraded independently of inflammasome activity and that the IL-1 β involved in OA cartilage degradation may not be produced by the cartilage itself but rather by synovial tissue. Thus, synovial tissue may have an important impact on cartilage degradation via NLRP3 activation (62).

10. Cell senescence and the SASP in osteoarthritis

One of the mechanisms by which aging promotes the chronic inflammation that may be important in OA is cell senescence, a concept first described by Hayflick and Moorhead (63). Cellular senescence is characterised by the accumulation of senescent cells (SnCs) in degenerated tissues (64) and the increase in the expression of certain senescence markers. SnCs contribute to aging and shorten health span (24). They accumulate in OA joints near the OA lesion and their quantity positively correlates with OA severity (65). Such an accumulation of SnCs may predispose joints to OA development (66). The accumulation of SnCs in degenerative OA cartilage was first described by Price *et al.* in 2002 (67). The term "chondrosenescence" refers to all age-dependent deterioration of chondrocytes as a consequence of replicative and stress-induced factors. There is a strong correlation between inflammaging, chondrosenescence, the presence of the inflammasome, and autophagy. Recent data demonstrate that SnCs also accumulate in the synovium, as well as at the cartilage surface, during experimental OA (68).

SnCs are characterised by the association of multiple markers, including SA β -gal staining (senescent-associated- β -galactosidase) (69) and the upregulated expression of p16INK4A (70). Moreover, SnCs have an important role in aging through the secretion of matrix-degrading proteins and proinflammatory cytokines, which is called a "senescence-associated secretory phenotype" or SASP (7, 41, 71, 72) (Fig. 1).

Studies have highlighted SA β -gal staining in OA cartilage (73). Indeed, it is the most commonly used senescence marker, due to its easy detection (74).

The selective inhibitor of cyclin-dependent kinases CDK4 and CDK6, p16INK4A, is the second most widely used senescence marker after SA β -gal. The expression of p16INK4A in SnCs is elevated and participates in cell cycle arrest (75). Aging organisms accumulate SnCs expressing p16INK4A in various tissues (76). During the processes of cartilage aging, it may be partially responsible for the senescence of chondrocytes, such as that seen in OA (76). Indeed, significantly higher p16INK4a levels have been detected in OA chondrocytes than in age-matched healthy chondrocytes (77). Moreover, P16INK4 silencing results in increased proliferation and decreased SA β -gal staining of OA chondrocytes (76). Finally, p16INK4A has been detected in multiple tissues in arthritic joints, including cartilage, subchondral bone, and synovium (67-68, 78-79).

SnCs promote low-level local chronic inflammation through SASP factors, such as inflammatory cytokines and MMPs (80, 81). The SASP is a bioactive secretome produced by SnCs, which remain metabolically active, despite their not being proliferative (7). The SASP is associated with the production of proinflammatory cytokines (IL-6, IL-1 α/β), chemokines (MCP-1, IL-8, GRO α), growth factors (TGF- β , VEGF, IGFBP7), and proteases (MMP-3) (82). The specific secretory profiles of SnCs are highly cell- and context-dependent. SnCs may have distinct effects, depending on the inducing stress and/or the local tissue environment (83-86). Indeed, the SASP propagates senescence from cell to cell through paracrine mediators, thus exacerbating the pro-aging effects of SnCs. SASP regulators converge on the NF- κ B signalling pathway (87). NF- κ B activation and subsequent SASP production may also be initiated by oxidative stress and increased reactive oxygen species (88). Moreover, AGEs, as well as HMGB1, also activate the NF- κ B pathway through their interaction with RAGE (89, 90).

Numerous SASP components described in SnCs are also present in OA tissues or SF (91). The proinflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6, and IL-8 are particularly relevant to OA. These cytokines have been shown to promote OA progression, notably by inducing synovitis and by altering chondrocyte function and viability (91). IL-1 β and TNF- α drive chondrocytes toward a senescent phenotype (78), inducing the secretion of a SASP containing IL-6, IL-8, MMP-13, MMP-1, MMP-9, MMP-3, MMP-14, and ADAMTS 4, 5, and 9, as well as PGE2 and NO, which participate in the pathogenesis of OA. IL-1 β and TNF- α are the most widely used cytokines to induce an OA-like phenotype in chondrocytes *in vitro* (92, 93) and are now recognised to be inducers of senescence (94, 95). IL-6 and IL-8 levels are elevated in the SF of OA patients (96-98). Moreover, MMP-13 and MMP-1 are secreted by IL-1 β -induced senescent chondrocytes and degrade aggrecan and type II collagen (78). Many chemokines are produced in OA, but MCP-1 is considered to be a major component of the SASP. The level of MCP-1 in SF positively correlates with OA severity and pain (99, 100). There are multiple possible connections between the synovium, SnCs, and OA. Indeed, SnCs in other joint tissues can affect the synovium through their SASPs, which can attract and modulate resident and migrating immune cells in the synovium through the action of multiple chemokines and cytokines (101). Cells in the synovium are activated and proliferate (102) and may themselves become more susceptible to undergoing senescence. In the ACLT-induced OA model, p16INK4A-positive SnCs are present in the synovium (68). Moreover, subchondral bone also appears to be involved in senescence. VEGF is a common component of the SASP and can participate in the dysregulation of bone remodelling through promoting osteocyte formation. Osteocytes retrieved from bone tissue of old animals have been found to be senescent. Moreover, these SnCs have been shown to be involved in age-related bone loss (103). Thus, SnCs in bone can have a significant physiological impact and may pro-

duce the subchondral bone changes and bone remodelling that are relevant to OA progression.

In addition to the increase of these classical markers of senescence, the decrease or loss of certain other markers may also be useful for the identification of senescent cells. Among such markers, HMGB1, which is localised to the nucleus in non-senescent cells, is secreted by SnCs, making the loss of nuclear staining for HMGB1 a sign of senescence (86). Thus, alarmins and DAMPs connect the presence of SnCs with tissue damage and repair responses, such as those in joint trauma. HMGB-1 is secreted by SnCs into the extracellular space (86) and stimulates the SASP through its binding to various receptors, such as RAGE or TLR4. A correlation between the total number of HMGB-1-positive chondrocytes and the OARSI score has been reported (104). Immunohistochemistry analysis of synovial membranes has shown that HMGB1 expression shifts from strictly nuclear localisation in healthy individuals to nuclear and cytoplasmic localisation in OA patients (19). Moreover, HMGB-1 levels in both the synovium and SF of OA patients are significantly higher than in that of healthy individuals (19). In addition the clearance of SnCs was found to reestablish the nuclear staining of HMGB1 in post-traumatic OA models (68). S100A8, another alarmin involved in OA, which increases with age, has recently been shown to be capable of inducing cellular senescence-like changes in bovine oviduct epithelial cells. Thus, the role of S100A8 in the inflammaging of OA needs to be explored in joint tissues (105).

Finally, recent findings suggest that SnCs can transmit limited senescent phenotypes to nearby cells, called secondary or paracrine senescence (106, 107). SnCs may exert central effector functions in the local tissue environment through extracellular vesicles (EVs), which are potential cellular communication tools. Indeed, SnCs secrete more EVs than their non-senescent counterparts (108, 109). In a recent study, senescent chondrocytes isolated from OA patients were found to secrete

more EVs than non-senescent chondrocytes. These EVs are able to inhibit cartilage extra-cellular matrix deposition by healthy chondrocytes and can induce a senescent state in nearby cells (110). The differences in SnC phenotypes and local environmental cues may determine which drugs are required for SnC clearance. Thus, tissue-specific SASP profiles should be studied to elucidate the detailed mechanistic roles of SnCs in the various joint structures (Fig. 1).

11. Future therapeutic targets in the inflammaging of OA

There are currently no effective treatments to stop or prevent OA, although many advances have been made in understanding the pathophysiological processes of this disease. Our current understanding of inflammaging puts innate immunity at the centre of this process. PRRs, which recognise DAMPs and induce inflammation, are key elements of innate immunity. The accumulation of DAMPs with age highlights the importance of studying PRRs (in particular TLRs and RAGE) as potential therapeutic targets in OA.

Several important ligands of RAGE increase or accumulate with age, such as HMGB1, S100s, and AGEs (18, 111), thus promoting increased low-grade, sterile inflammation with age. Contrary to full-length RAGE, sRAGE is thought to be beneficial by acting as a decoy for RAGE ligands and/or by interacting with RAGE at the membrane, thus preventing RAGE signalling. A newly generated sRAGE murine model which overexpresses circulating sRAGE able to block RAGE signalling and/or serve as a decoy for RAGE ligands could help to untangle the relationship between RAGE, inflammaging, and ageing (112). Such sRAGE studies in mice have the potential to help improve our understanding of OA in humans and open new therapeutic strategies (Fig. 1). DAMPs are able to further perpetuate TLR activation. A TLR4 monoclonal antibody has recently demonstrated an adequate safety profile, and a phase II clinical trial in patients with rheumatoid arthritis has been launched (113). However, no small molecules or other TLR inhibitors have yet been tested in OA

(114). Some of these drugs, targeting MyD88-mediated inflammatory pathways, are now being tested in phase I studies for several human diseases, but none on OA (115, 116). Moreover, specific blockade of TLR4 by natural compounds, such as ginsenosides or ginger-derivatives, have been shown to exert anti-inflammatory actions (117-119) (Fig. 1).

The NLRP3 inflammasome is an attractive therapeutic target due to its involvement in the pathogenesis of OA. The identification of inhibitory agents that are specific for NLRP3 is expected to provide the most potent therapeutic strategies (120). Several approaches are currently being investigated to target various components of the inflammasome directly or through involved pathways (52, 121). MCC950, a small-molecule inhibitor, specifically inhibits NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β secretion by preventing NLRP3-induced ASC oligomerisation. Additional research is needed to clarify the use of NLRP3 as a biomarker to assist clinical decisions and it could also be a useful biomarker for the diagnosis and monitoring of OA (52) (Fig. 1).

Another emerging therapeutic strategy for age-related diseases is to specifically kill SnCs to prevent detrimental secretion of SASP-related factors. Selective removal of senescent chondrocytes from OA patients, which decreases the expression of senescence and inflammatory biomarkers and increases the expression of ECM proteins, shows promise (68). Preclinical data support the concept of selective targeting of senescent chondrocytes as a novel therapeutic strategy for OA. Direct targeting and killing of SnCs provides a potential opportunity to eliminate the source of OA disease. Several senolytics have been identified and new and/or more selective drugs are continuing to be developed. Senolysis of SnCs has been achieved by the inhibition of antiapoptotic proteins, including the BCL-2 family members BCL-2, BCL-XL, and BCL-W (122, 123). For example, the senolytic molecule ABT-263 counteracts their antiapoptotic functions, permitting SnCs to initiate apoptosis. Small molecules that inhibit antiapop-

totic pathways have been shown to eliminate SnCs that develop after joint trauma and those present in cultured human OA chondrocytes (68) (Fig. 1). Another example of a selective SnC killing strategy is the inhibition of HSP90, a ubiquitously expressed molecular chaperone (124). HSP90 inhibitors, such as geldanamycin and tanespimycin, can induce apoptosis of SnCs by multiple mechanisms (125). Directly targeting mechanisms that induce SnCs in OA, and cartilage in particular, may also lead to new therapeutic targets, although there is always the danger of promoting cancer in such strategies. SIRT6 depletion can induce senescence in human chondrocytes, suggesting that the upregulation of this protein deacetylase could suppress senescence and the SASP (125). Finally, the interactions between SnCs and stem cells have attracted recent attention, given the prominent role of regenerative medicine in age-related diseases (126).

12. Conclusion

In conclusion, OA is a complex multifaceted disease associated with aging and inflammation, making inflammaging a pivotal process in its pathogenesis. As a result, research and development focusing on multiple therapeutic targets, as well as many diverse treatment modalities based on senescence processes, is now ongoing, with the hope of curing OA.

13. References

1. JOHNSON VL, HUNTER DJ: The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2014; 28: 5-15.
2. SCANZELLO CR, LOESER RF: Inflammatory activity in symptomatic knee osteoarthritis: not all inflammation is local. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67: 2797-800.
3. SOHN DH, SOKOLOVE J, SHARPE O *et al.*: Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine production via Toll-like receptor 4. *Arthritis Res Ther* 2012; 14: R7.
4. ATTUR M, STATNIKOV A, ALIFERIS CF *et al.*: Inflammatory genomic and plasma biomarkers predict progression of symptomatic knee OA (SKOA). *Osteoarthritis Cartilage* 2012; 20: S34-S35.
5. FRANCESCHI C, BONAFÈ M, VALENSIN S *et al.*: Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann NY Acad Sci* 2000; 908: 244-54.
6. HUANG J, XIE Y, SUN X *et al.*: DAMPs, ageing, and cancer: The "DAMP Hypothesis."

Ageing Res Rev 2015; 24(Pt. A): 3-16.

7. COPPE J-P, PATIL CK, RODIER F *et al.*: Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 2008; 6: e301.
8. WANG S: Characterization Of IGFBP-3, PAI-1 and SPARC mRNA expression in senescent fibroblasts. *Mechanisms of Ageing and Development* 1996; 92: 121-32.
9. KUMAR S, MILLIS AJ, BAGLIONI C: Expression of interleukin 1-inducible genes and production of interleukin 1 by aging human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4683-87.
10. FRANCESCHI C, ZAIKIN A, GORDLEEVA S *et al.*: Inflammaging 2018: An update and a model. *Semin Immunol* 2018; 40:1-5.
11. FELDMAN N, ROTTER-MASKOWITZ A, OKUN E: DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. *Ageing Res Rev* 2015; 24: 29-39.
12. OPPENHEIM JJ, YANG D: Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 359-365.
13. NEFLA M, HOLZINGER D, BERENBAUM F, JACQUES C: The danger from within: alarmins in arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2016; 12: 669-83.
14. ROSENBERG JH, RAI V, DILISIO MF, AGRAWAL DK: Damage associated molecular patterns in the pathogenesis of osteoarthritis: potentially novel therapeutic targets. *Mol Cell Biochem* 2017; 434: 171-79.
15. CHUNG HY, KIM DH, LEE EK *et al.*: Redefining chronic inflammation in aging and age-related diseases: proposal of the senoinflammation concept. *Ageing Dis* 2019; 10: 367.
16. van den BOSCH MHJ: Inflammation in osteoarthritis: is it time to dampen the alarm(in) in this debilitating disease?: The importance of alarmins in OA. *Clin Exp Immunol* 2019; 195: 153-66.
17. TANG D, KANG R, ZEH HJ, LOTZE MT: High-Mobility Group Box 1, Oxidative Stress, and Disease. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14: 1315-35.
18. SON M, CHUNG W-J, OH S *et al.*: Age dependent accumulation patterns of advanced glycation end product receptor (RAGE) ligands and binding intensities between RAGE and its ligands differ in the liver, kidney, and skeletal muscle. *Immun Ageing* 2017; 14: 12.
19. KE X, JIN G, YANG Y *et al.*: Synovial fluid HMGB-1 levels are associated with osteoarthritis severity. *Clin Lab* 2015; 61: 809-18.
20. van BEIJNUM JR, BURMAN WA, GRIFFIOEN AW: Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis* 2008; 11: 91-99.
21. ENOKIDO Y, YOSHITAKE A, ITO H, OKAZAWA H: Age-dependent change of HMGB1 and DNA double-strand break accumulation in mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 376: 128-33.
22. SUNAHORI K, YAMAMURA M, YAMANA J *et al.*: The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by

- macrophages via activation of nuclear factor- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R69
23. RIVA M, KÄLLBERG E, BJÖRK P *et al.*: Induction of nuclear factor- κ B responses by the S100A9 protein is Toll-like receptor-4-dependent. *Immunology* 2012; 137: 172-82.
 24. MARTINON F, PÉTRILLI V, MAYOR A, TARDIVEL A, TSCHOPP J: Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; 440: 237-41.
 25. SHI Y, EVANS JE, ROCK KL: Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003; 425: 516-21.
 26. SUN Y, BRENNER H, SAUERLAND S: Serum uric acid and patterns of radiographic osteoarthritis - the Ulm Osteoarthritis Study. *Scand J Rheumatol* 2000; 29: 380-86.
 27. DENOBLE AE, HUFFMAN KM, STABLER TV *et al.*: Uric acid is a danger signal of increasing risk for osteoarthritis through inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 2088-93.
 28. FREUND A, ORJALO AV, DESPREZ P-Y, CAMPISI J: Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med* 2010; 16: 238-46.
 29. IBRAHIM ZA, ARMOUR CL, PHIPPS S, SUKKAR MB: RAGE and TLRs: Relatives, friends or neighbours? *Mol Immunol* 2013; 56: 739-44.
 30. SABROE I, PARKER LC, DOWER SK, WHYTE MKB: The role of TLR activation in inflammation. *J Pathol* 2008; 214: 126-35.
 31. GHOSH S, LERTWATTANARAK R, GARDUNO JDE *et al.*: Elevated muscle TLR4 expression and metabolic endotoxemia in human aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2015; 70: 232-46.
 32. PONNAPPAN S, PONNAPPAN U: Aging and immune function: molecular mechanisms to interventions. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14: 1551-85.
 33. SHAW AC, PANDA A, JOSHI SR, QIAN F, ALLORE HG, MONTGOMERY RR: Dysregulation of human Toll-like receptor function in aging. *Ageing Res Rev* 2011; 10: 346-53.
 34. BRETT J, SCHMIDT AM, YAN SD *et al.*: Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* 1993; 143: 1699-712.
 35. MANFREDI AA, CAPOBIANCO A, ESPOSITO A *et al.*: Maturing dendritic cells depend on RAGE for in vivo homing to lymph nodes. *J Immunol* 2008; 180: 2270-75.
 36. CHEN Y, AKIRAV EM, CHEN W *et al.*: RAGE ligation affects T cell activation and controls T cell differentiation. *J Immunol* 2008; 181: 4272-78.
 37. AKIRAV EM, PRESTON-HURLBURT P, GAR-YU J *et al.*: RAGE expression in human T cells: a link between environmental factors and adaptive immune responses. *PLoS One* 2012; 7.
 38. CASSELMANN C, REIMANN A, FRIEDRICH I, SCHUBERT A, SILBER R-E, SIMM A: Age-dependent expression of advanced glycation end product receptor genes in the human heart. *Gerontology* 2004; 50: 127-34.
 39. STEENVOORDEN MMC, HUIZINGA TWJ, VERZIJL N *et al.*: Activation of receptor for advanced glycation end products in osteoarthritis leads to increased stimulation of chondrocytes and synoviocytes. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 253-63.
 40. LOESER RF, YAMMANI RR, CARLSON CS *et al.*: Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: Potential role in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2376-85.
 41. LOESER RF, COLLINS JA, DIEKMAN BO: Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2016; 12: 412-20.
 42. PARK S, YOON SJ, TAE HJ, SHIM CY: RAGE and cardiovascular disease. *Front Biosci* 2011; 16: 486-97.
 43. SAKAGUCHI M, MURATA H, YAMAMOTO K *et al.*: TIRAP, an adaptor protein for TLR2/4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding. *PLoS One* 2011; 6: e23132.
 44. MANIGRASSO MB, PAN J, RAI V *et al.*: Small molecule inhibition of ligand-stimulated RAGE-DIAPH1 signal transduction. *Sci Rep* 2016; 6: 22450.
 45. MARTINON F, BURNS K, TSCHOPP J: The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol Cell* 2002; 10: 417-26.
 46. YOUM Y-H, GRANT RW, McCABE LR *et al.*: Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging. *cell metab* 2013; 18: 519-32.
 47. BAUERNFEIND F, NIEPMANN S, KNOLLE PA, HORNUNG V: Aging-associated TNF production primes inflammasome activation and NLRP3-related metabolic disturbances. *J Immunol* 2016; 197: 2900-8.
 48. CORDERO MD, WILLIAMS MR, RYFFEL B: AMP-activated protein kinase regulation of the NLRP3 Inflammasome during aging. *Trends Endocrinol Metab* 2018; 29: 8-17.
 49. LATZ E, DUEWELL P: NLRP3 inflammasome activation in inflammaging. *Semin Immunol* 2018; 40: 61-73.
 50. MIAO EA, LEAF IA, TREUTING PM *et al.*: Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol* 2010; 11: 1136-42.
 51. ZHONG Y, KINIO A, SALEH M: Functions of NOD-like receptors in human diseases. *Front Immunol* 2013; 4: 333.
 52. McALLISTER MJ, CHEMALY M, EAKIN AJ, GIBSON DS, McGILLIGAN VE: NLRP3 as a potentially novel biomarker for the management of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2018; 26: 612-19.
 53. KIM J-J, JO E-K: NLRP3 inflammasome and host protection against bacterial infection. *J Korean Med Sci* 2013; 28: 1415-23.
 54. THORNBERRY NA, BULL HG, CALAYCAY JR *et al.*: A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature* 1992; 356: 768-74.
 55. WILLINGHAM SB, ALLEN IC, BERGSTALH DT *et al.*: NLRP3 (NALP3, cryopyrin) facilitates *in vivo* caspase-1 activation, necro-sis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 2009; 183: 2008-15.
 56. YANG J, LIU Z, XIAO TS: Post-translational regulation of inflammasomes. *Cell Mol Immunol* 2017; 14: 65-79.
 57. ZHONG Z, SANCHEZ-LOPEZ E, KARIN M: Autophagy, NLRP3 inflammasome and auto-inflammatory/immune diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2016; 34 (Suppl. 98): S12-16.
 58. STROWIG T, HENAO-MEJIA J, ELINAV E, FLAVELL R: Inflammasomes in health and disease. *Nature* 2012; 481: 278-86.
 59. BUSSO N, SO A: Microcrystals as DAMPs and their role in joint inflammation. *Rheumatology* 2012; 51: 1154-60.
 60. NALBANT S, MARTINEZ JAM, KITUMNU-AYPONG T, CLAYBURNE G, SIECK M, SCHUMACHER HR: Synovial fluid features and their relations to osteoarthritis severity: new findings from sequential studies. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11: 50-54.
 61. JIN C, FRAYSSINET P, PELKER R *et al.*: NLRP3 inflammasome plays a critical role in the pathogenesis of hydroxyapatite-associated arthropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 14867-72.
 62. BOUGAULT C, GOSSET M, HOUARD X *et al.*: Stress-induced cartilage degradation does not depend on the NLRP3 inflammasome in human osteoarthritis and mouse models. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 3972-81.
 63. HAYFLICK L, MOORHEAD PS: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25: 585-621.
 64. BAKER DJ, PEREZ-TERZIC C, JIN F *et al.*: Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 825.
 65. McCULLOCH K, LITHERLAND GJ, RAI TS: Cellular senescence in osteoarthritis pathology. *Ageing Cell* 2017; 16: 210-18.
 66. KOZHEMYAKINA E, ZHANG M, IONESCU A *et al.*: Identification of a PrG4 -expressing articular cartilage progenitor cell population in mice. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67: 1261-73.
 67. PRICE JS, WATERS JG, DARRAH C *et al.*: The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Ageing Cell* 2002; 1: 57-65.
 68. JEON OH, KIM C, LABERGE R-M *et al.*: Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat Med* 2017; 23: 775-81.
 69. EVANGELOU K, LOUGIAKIS N, RIZOU SV *et al.*: Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens. *Ageing Cell* 2017; 16: 192-97.
 70. VINATIER C, DOMÍNGUEZ E, GUICHEUX J, CARAMÉS B: Role of the inflammation-autophagy-senescence integrative network in osteoarthritis. *Front Physiol* 2018; 9.
 71. LOTZ MK, CARAMÉS B: Autophagy and cartilage homeostasis mechanisms in joint health, aging and OA. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7: 579-87.
 72. COPPÉ J-P, DESPREZ P-Y, KRTOLICA A, CAMPISI J: The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 2010; 5: 99-118.

73. MOBASHERI A, MATTA C, ZÁKÁNY R, MUSUMECI G: Chondrosenescence: Definition, hallmarks and potential role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Maturitas* 2015; 80: 237-44.
74. DEBACQ-CHAINIAUX F, ERUSALIMSKY JD, CAMPISI J, TOUSSAINT O: Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and *in vivo*. *Nat Protoc* 2009; 4: 1798-806.
75. ALCORTA DA, XIONG Y, PHELPS D, HANNON G, BEACH D, BARRETT JC: Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13742-47.
76. KRISHNAMURTHY J, TORRICE C, RAMSEY MR *et al.*: Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 2004; 114: 1299-307.
77. ZHOU HW, LOU SQ, ZHANG K: Recovery of function in osteoarthritic chondrocytes induced by p16INK4a-specific siRNA *in vitro*. *Rheumatology* 2004; 43: 555-68.
78. PHILIPOT D, GUÉRIT D, PLATANO D *et al.*: p16INK4a and its regulator miR-24 link senescence and chondrocyte terminal differentiation-associated matrix remodeling in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2014; 16: R58.
79. MARTIN JA, BROWN T, HEINER A, BUCKWALTER JA: Post-traumatic osteoarthritis: The role of accelerated chondrocyte senescence. *Biorheology* 2004; 41: 479-91.
80. DE KEIZER PLJ: The fountain of youth by targeting senescent cells? *Trends Mol Med* 2017; 23: 6-17.
81. FRANCESCHI C, CAMPISI J: Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014; 69 (Suppl. 1): S4-9.
82. SOTO-GAMEZ A, DEMARIA M: Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence. *Drug Discov Today* 2017; 22: 786-95.
83. WILEY CD, VELARDE MC, LECOT P *et al.*: Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. *Cell Metab* 2016; 23: 303-14.
84. ORJALO AV, BHAUMIK D, GENGLER BK, SCOTT GK, CAMPISI J: Cell surface-bound IL-1 α is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 17031-36.
85. COPPÉ J-P, RODIER F, PATIL CK, FREUND A, DESPREZ P-Y, CAMPISI J: Tumor suppressor and aging biomarker p16INK4a induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J Biol Chem* 2011; 286: 36396-403.
86. DAVALOS AR, KAWAHARA M, MALHOTRA GK *et al.*: p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes. *J Cell Biol* 2013; 201: 613-29.
87. CHIEN Y, SCUOPPO C, WANG X *et al.*: Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev* 2011; 25: 2125-36.
88. CHANDRASEKARAN A, IDELCHIK MDPS, MELENDEZ JA: Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biol* 2017; 11: 91-102.
89. ORLOVA VV, CHOI EY, XIE C *et al.*: A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. *EMBO* 2007; 26: 1129-39.
90. LI J, SCHMIDT AM: Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 1997; 272: 16498-506.
91. KAPOOR M, MARTEL-PELLETIER J, LAJEU-NESSE D, PELLETIER J-P, FAHMI H: Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 7: 33.
92. FUKUI N, ZHU Y, MALONEY W, CLOHISY J, SANDELL L: Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF- α in normal and osteoarthritic chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A: 59-66.
93. CARAMÉS B, LÓPEZ-ARMADA MJ, CILERO-PASTOR B *et al.*: Differential effects of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β on cell death in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16: 715-22.
94. PLATAS J, GUILLÉN MI, DEL CAZ MDP *et al.*: Paracrine effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells in inflammatory stress-induced senescence features of osteoarthritic chondrocytes. *Aging (Albany NY)* 2016; 8: 1703-17.
95. SONG W, ZHANG Y, WANG J, MA T, HAO L, WANG K: Antagonism of cysteinyl leukotriene receptor 1 (cysLTR1) by montelukast suppresses cell senescence of chondrocytes. *Cytokine* 2018; 103: 83-89.
96. KANEKO S, SATOH T, CHIBA J, JU C, INOUE K, KAGAWA J: Interleukin-6 and interleukin-8 levels in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Cytokines Cell Mol Ther* 2000; 6: 71-79.
97. GUERNE P, BLANCO F, KAELIN A, DESGEORGES A, LOTZ M: Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 960-68.
98. TAKAHASHI A, DE ANDRÉS MC, HASHIMOTO K, ITOI E, OREFFO ROC: Epigenetic regulation of interleukin-8, an inflammatory chemokine, in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2015; 23: 1946-54.
99. MILLER RE, TRAN PB, DAS R *et al.*: CCR2 chemokine receptor signaling mediates pain in experimental osteoarthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 20602-7.
100. LI L, JIANG B-E: Serum and synovial fluid chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein 1 concentrations correlates with symptomatic severity in patients with knee osteoarthritis. *Ann Clin Biochem* 2015; 52 (Pt 2): 276-82.
101. JEON OH, DAVID N, CAMPISI J, ELISSEEFF JH: Senescent cells and osteoarthritis: a painful connection. *J Clin Invest* 2018; 128: 1229-37.
102. SMITH MD: The Normal Synovium. *Open Rheumatol J* 2011; 5: 100-6.
103. FARR JN, FRASER DG, WANG H *et al.*: Identification of Senescent Cells in the Bone Microenvironment. *J Bone Miner Res* 2016; 31: 1920-29.
104. TERADA C, YOSHIDA A, NASU Y *et al.*: Gene expression and localization of high-mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) in human osteoarthritic cartilage. *Acta Med Okayama* 2011; 65: 9.
105. NAKAMURA Y, IWATA H, KUWAYAMA T, SHIRASUNA K: S100A8, which increases with age, induces cellular senescence-like changes in bovine oviduct epithelial cells. *Am J Reprod Immunol* 2019; 25: e13163
106. FERREIRA-GONZALEZ S, LU W-Y, RAVEN A *et al.*: Paracrine cellular senescence exacerbates biliary injury and impairs regeneration. *Nat Commun* 2018; 9: 1020.
107. ACOSTA JC, BANITO A, WUESTEFELD T *et al.*: A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* 2013; 15: 978-90.
108. LEHMANN BD, PAINE MS, BROOKS AM *et al.*: Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68: 7864-71.
109. EFFENBERGER T, von der HEYDE J, BARTSCH K *et al.*: Senescence-associated release of transmembrane proteins involves proteolytic processing by ADAM17 and microvesicle shedding. *FASEB J* 2014; 28: 4847-56.
110. JEON OH, WILSON DR, CLEMENT CC *et al.*: Senescence cell-associated extracellular vesicles serve as osteoarthritis disease and therapeutic markers. *JCI Insight* 2019; 4.
111. SELL DR, LANE MA, JOHNSON WA *et al.*: Longevity and the genetic determination of collagen glycoxidation kinetics in mammalian senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 485-90.
112. PENG Y, PARK H-S, TANG LA, HORWITZ N, LIN L: Generation of sRAGEhigh transgenic mice to study inflammaging. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2019; 24: 555-53.
113. MONNET E, LAPEYRE G, POELGEEST EV *et al.*: Evidence of NI-0101 pharmacological activity, an anti-TLR4 antibody, in a randomized phase I dose escalation study in healthy volunteers receiving LPS. *Clin Pharmacol Ther* 2017; 101: 200-8.
114. HERRERO-BEAUMONT G, PÉREZ-BAOS S, SÁNCHEZ-PERNAUTE O, ROMAN-BLAS JA, LAMUEDRA A, LARGO R: Targeting chronic innate inflammatory pathways, the main road to prevention of osteoarthritis progression. *Biochem Pharmacol* 2019; 165: 24-32.
115. SINGER JW, FLEISCHMAN A, AL-FAYOUMI S, MASCARENHAS JO, YU Q, AGARWAL A: Inhibition of interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1) as a therapeutic strategy. *Oncotarget* 2018; 9: 33416-39.
116. SEGANISH WM: Inhibitors of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4): a patent review (2012-2015). *Expert Opin Ther Pat* 2016; 26: 917-32.
117. JOH E-H, LEE I-A, JUNG I-H, KIM D-H: Ginsenoside Rb1 and its metabolite compound K inhibit IRAK-1 activation--the key step of inflammation. *Biochem Pharmacol* 2011; 82: 278-86.
118. GRATAL P, MEDIERO A, LAMUEDRA A *et al.*:

- The TLR-4 inhibitor 6-shogaol as a treatment in osteoarthritis through the modulation of chondrocyte hypertrophy and matrix calcification. *ACR Meeting Abstracts*. 2018
119. LEE I-A, HYAM SR, JANG S-E, HAN MJ, KIM D-H: Ginsenoside Re ameliorates inflammation by inhibiting the binding of lipopolysaccharide to TLR4 on macrophages. *J Agric Food Chem* 2012; 60: 9595-602.
120. YANG Y, WANG H, KOUADIR M *et al.*: Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis* 2019; 10: 128.
121. BROZ P, VON MOLTKE J, JONES JW, VANCE RE, MONACK DM: Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe* 2010; 8: 471-83.
122. CHANG J, WANG Y, SHAO L *et al.*: Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* 2016; 22: 78-83.
123. YOSEF R, PILPEL N, TOKARSKY-AMIEL R *et al.*: Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun* 2016; 7: 11190.
124. FUHRMANN-STROISSNIGG H, LING YY, ZHAO J *et al.*: Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. *Nat Commun* 2017; 8: 422.
125. NAGAI K, MATSUSHITA T, MATSUZAKI T *et al.*: Depletion of SIRT6 causes cellular senescence, DNA damage, and telomere dysfunction in human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2014; 22: S137.
126. LOESER RF, GOLDRING SR, SCANZELLO CR, GOLDRING MB: Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 1697-707