



**HAL**  
open science

# Evaluation d'outils pour l'étude de l'arthrose à l'échelle protéique, cellulaire et animale

Sabine Drevet

► **To cite this version:**

Sabine Drevet. Evaluation d'outils pour l'étude de l'arthrose à l'échelle protéique, cellulaire et animale. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2020. Français. NNT : 2020GRALV019 . tel-03505885

**HAL Id: tel-03505885**

**<https://theses.hal.science/tel-03505885v1>**

Submitted on 1 Jan 2022

**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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**Sabine DREVET**

Thèse dirigée par **Bernard LARDY, MCU-PH**, Université Grenoble Alpes et co-dirigée par **Gaëtan GAVAZZI, PU-PH**, Université Grenoble Alpes

préparée au sein du Laboratoire du GREPI  
dans l'École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant de  
Grenoble

## « Evaluation d'outils pour l'étude de l'arthrose à l'échelle protéique, cellulaire et animale »

Thèse soutenue en visio-conférence le 7 Mai 2020, devant le jury composé de

**Mr Athan BAILLET**

PU-PH, Faculté de médecine, Université Grenoble Alpes (Président)

**Mr Jacques BODDAERT**

PU-PH, Faculté de médecine, Université de Paris Sorbonne

**Mr Hubert BLAIN**

PU-PH, Faculté de médecine, Université de Montpellier (Rapporteur)

**Mr Hervé KOVACIC**

Professeur, Faculté de pharmacie, Université Aix-Marseille (Rapporteur)

**Mme Corinne DUPUY**

Professeur associé, Institut Gustave Roussy

**Mr Laurent GRANGE**

Praticien Hospitalier, CHU Grenoble Alpes

**Mr Bernard LARDY**

MCU-PH, Faculté de médecine, Université Grenoble Alpes (Directeur)

**Mr Gaëtan GAVAZZI**

PU-PH, Faculté de médecine, Université Grenoble Alpes (Co-directeur)





## **Remerciements**

*Au Professeur Jacques Boddaert, d'avoir accepté de juger ce travail. Merci de ton soutien et de ces belles perspectives de collaborations que tu offres,*

*Au Professeur Hubert Blain, d'avoir accepté de juger ce travail et de votre disponibilité malgré le contexte Covid. Soyez assuré de ma profonde gratitude,*

*Au Professeur Hervé Kovacic, d'avoir accepté de juger le travail d'une clinicienne, soyez assuré de ma reconnaissance,*

*Au Professeur Corinne Dupuy, de m'avoir fait partager votre expertise lors de mes comités de suivi de thèse, soyez assurée de mon admiration,*

*Au Docteur Laurent Grange, pour ton engagement contre l'arthrose et pour ton écoute quelques fois,*

*Au Docteur Bernard Lardy, pour ton accueil au sein du laboratoire et tes idées scientifiques,*

*Au Professeur Gaëtan Gavazzi, pour la richesse de notre collaboration,*

*Au Professeur Athan Baillet, d'avoir accepté de juger ce travail, sois assuré de ma reconnaissance,*

*Au Professeur Philippe Gaudin de m'avoir accueillie au sein du GREPI.*

*A l'équipe du GREPI pour son accueil et ses conseils*

*A Nicolas Tarbouriech, Jean-Marie Bouris et Marc Jamin pour m'avoir accordé de leur temps et m'avoir fait partager leur expertise d'une manière passionnante,*

*A Sylvie Berthier pour son aide, sa rigueur, sa pertinence et son écoute,*

*A Julien Vollaire pour sa disponibilité et sa bienveillance,*

*A Florence Puch pour son temps en RT,*

*A Arnaud, de m'avoir fait confiance pour cette aventure et de m'avoir fait bénéficier de ses compétences,*

*A l'équipe de Gériatrie et tout particulièrement à Catherine Bioteau,*

*A Monsieur le Professeur Tonetti et à l'équipe d'Ortho Nord, de m'avoir accueillie au bloc si souvent et de m'avoir soutenue dans cette démarche de thèse fondamentale,*

*A Jean François et Xavier pour leurs relectures,*

*A mes parents,*

*A mes amies, amis, pour nos moments de vie,*

*A mon doux et mini-doux*

## Résumé

L'arthrose est une pathologie chronique dégénérative invalidante, fréquente, multifactorielle, grave et coûteuse. Deux avancées conceptuelles récentes soulignent une vision pluritissulaire de la maladie et un abord clinique phénotypique, permettant d'envisager l'individualisation de la stratégie thérapeutique. Un article publié dans *la Revue de Gériatrie* résume brièvement ces deux concepts. Sur le plan physiopathologique, le chondrocyte est la cellule cible primordiale et la NADPH Oxydase (Nox) 4 semble être un acteur d'intérêt. La Nox4, son activité, son interaction avec ses partenaires et sa conformation constituent des enjeux scientifiques d'intérêt et autant de cibles thérapeutiques potentielles pour l'élaboration de stratégies thérapeutiques anti-arthrosiques. Au cours de ce travail de thèse, le lien entre Nox4 et arthrose était abordé à 3 niveaux : structural, cellulaire et animal. Le volet structural laisse supposer que la boucle E de Nox4 est une séquence intrinsèquement désordonnée. Ainsi, la fonction de Nox4 pourrait être liée à sa structure, venant ainsi corroborer l'hypothèse de la « cage redox » avec une production de peroxyde d'hydrogène par dismutation spontanée. Les connaissances actuelles sur l'implication du stress oxydant et particulièrement de la Nox4 dans l'arthrose ont été étudiées au cours d'une publication dans *Experimental and Gerontology*. Ensuite, le volet cellulaire confirmait que la Nox4 est exprimée par le chondrocyte primaire humain et notre hypothèse d'une voie de signalisation catabolique IGF-1/Nox4 n'a pas été invalidée. Le volet animal a été l'occasion de faire une revue des connaissances tant sur les différents modèles murins d'arthrose que sur les critères d'évaluation clinique et paraclinique avec notamment des innovations technologiques. Cet article est en cours de révision majeure dans *Bone Research*. Notre travail expérimental a par ailleurs montré que le cartilage murin exprimait les isoformes Nox2 et Nox4, et nos résultats sont en accord avec la littérature récente. Pour finir, nous avons évalué un nouveau modèle d'arthrose murin selon des critères de jugement robustes et novateurs. Le modèle a été choisi dans la perspective de tester l'implication de Nox4 dans la voie de signalisation de l'IL-1 $\beta$  *in vivo*. Cet article sera soumis dans *Bone Research*.

## Mots clés

Arthrose ; Chondrocyte ; Stress oxydant ; NADPH Oxydase 4 ; Modèle ; Animal

## **Abstract**

Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative disease affecting millions of people around the world and one of the most co-occurring diseases among patients aged 55 years and older. Two recent conceptual approaches highlighted a pluritissular vision of the disease and a phenotypic clinical approach, making it possible to envisage individualization of the therapeutic strategy. An article published in the *Revue de Gériatrie* briefly summarizes these two concepts. The chondrocyte is the target cell and NADPH Oxidase (Nox) 4 is a player of interest in the physiopathological process of osteoarthritis. Nox4, its activity, its interaction with its partners and its conformation constitute scientific issues of interest and potential therapeutic targets for the development of anti-arthritis therapeutic strategies. In the course of this work, the link between Nox4 and osteoarthritis was approached from three complementary points of view. The structural aspect suggests that the E loop of Nox4 is an intrinsically disordered peptide. Thus, the function of Nox4 could be linked to its random structure, thus corroborating the "redox cage" hypothesis with a production of hydrogen peroxide by spontaneous dismutation. Current knowledge on the involvement of oxidative stress and particularly of Nox4 in OA has been reviewed in a publication in *Experimental and Gerontology*. Then, the cellular component confirmed that Nox4 is expressed by the human primary chondrocyte and our hypothesis of a catabolic IGF-1/Nox4 signalling pathway has not been invalidated. The animal component provided an opportunity to review knowledge of the various mouse models of osteoarthritis and the clinical and paraclinical evaluation criteria, including technological innovations. This article is currently undergoing major revision in *Bone Research*. Our experimental work has also shown that murine cartilage expresses the Nox2 and Nox4 isoforms, and our results are in agreement with recent literature. Finally, we assessed a new murine model of OA according to robust and innovative judgment criteria. The model was chosen with the prospect of testing the involvement of Nox4 in the IL-1 $\beta$  signalling pathway *in vivo*. This paper will be submitted to *Bone Research*.

## **Key words**

Osteoarthritis; Chondrocyte; Oxidative stress; NADPH Oxidase 4; Model; Animal

# Table des matières

<b>ABREVIATIONS</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>8</b>
<b>1.1 ARTHROSE CHEZ L'HUMAIN</b>	<b>8</b>
DEFINITION ET PHYSIOPATHOLOGIE GENERALE	8
EPIDEMIOLOGIE	13
FACTEURS DE RISQUE ET PHENOTYPES D'ARTHROSE	15
CLINIQUE ET DIAGNOSTIC	18
TRAITEMENT	20
ARTICLE NUMERO 1	23
<b>1.2 L'IMPLICATION DU STRESS OXYDANT DANS L'ARTHROSE</b>	<b>24</b>
STRESS OXYDANT, NADPH OXYDASE ET ARTHROSE	24
LA NADPH OXYDASE 4	26
ARTICLE NUMÉRO 2	28
<b>1.3 AXES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL</b>	<b>29</b>
<b>EXPERIMENTAL</b>	<b>30</b>
<b>2.1 VOLET STRUCTURAL – PROJET DE CRISTALLISATION DE LA BOUCLE E DE LA NADPH OXYDASE 4.</b>	<b>30</b>
INTRODUCTION	30
MATERIELS METHODES ET RESULTATS	32
DISCUSSION	44
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	46
<b>2.2 VOLET CELLULAIRE</b>	<b>47</b>
CULTURE DE CHONDROCYTES PRIMAIRES HUMAINS	47
ROLE DE L'INSULIN GROWTH FACTOR-1 DANS L'ARTHROSE	49
HYPOTHESE DE LA VOIE KLOTHO-IGF-1	62
CONCLUSION A L'ECHELLE CELLULAIRE	68
<b>2.3 VOLET ANIMAL</b>	<b>69</b>
INTRODUCTION	69
ARTICLE NUMÉRO 3	70
LA NADPH OXYDASE 4 DANS LE CHONDROCYTE MURIN	71
ARTICLE NUMÉRO 4	78
ARTICLE NUMÉRO 5	79
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>80</b>
<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>82</b>

## Abréviations

<b>ADAMTS</b>	:	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs
<b>ADN</b>	:	Acide désoxyribonucléique
<b>Akt</b>	:	Protéine kinase B, PKB
<b>ARN</b>	:	Acide ribonucléique
<b>BSA</b>	:	Bovine Serum Albumine
<b>CP</b>	:	Chondrocyte primaire
<b>Cys</b>	:	Cystéine
<b>DMEM</b>	:	Dulbecco's modified Eagle's medium
<b>DTT</b>	:	Dithiotréitol
<b>EB</b>	:	Extrait brut
<b>ERK</b>	:	Extracellular regulated kinase
<b>FAD</b>	:	Flavine adénine dinucléotide
<b>FGF</b>	:	Fibroblast Growth Factor
<b>GH</b>	:	Growth hormon
<b>GKT</b>	:	GenKyoTex
<b>GREPI</b>	:	Groupe de recherche et d'étude du processus inflammatoire
<b>His</b>	:	Histidine
<b>IGF</b>	:	Insuline growth factor
<b>IGF-BP</b>	:	Insuline growth factor- binding protein
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	:	Interleukine-1- $\beta$
<b>IMC</b>	:	Indice de masse corporelle
<b>IPTG</b>	:	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
<b>IRS</b>	:	Insulin Receptor Substrate
<b>JNK</b>	:	c-jun-N-terminal Kinase
<b>KO</b>	:	Knock out
<b>MAP Kinases</b>	:	MAP kinases (mitogen activated protein kinases)
<b>MCS</b>	:	Site de multiclonaage
<b>MEC</b>	:	Matrice extra-cellulaire

<b>MMPs</b>	⋮	Métalloprotéases matricielles
<b>N4bE</b>	⋮	Boucle E de Nox4
<b>NAC</b>	⋮	N-AcetylCystéine
<b>NADP</b>	⋮	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>NOS</b>	⋮	Oxyde nitrique synthase
<b>PG</b>	:	Protéoglycane
<b>PI3K</b>	⋮	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
<b>PID</b>	⋮	Protéine intrinsèquement désordonnée
<b>PMA</b>	⋮	Phorbol myristate acétate
<b>QSP</b>	⋮	Quantité suffisante pour
<b>ROS</b>	⋮	Dérivés réactifs de l'oxygène
<b>RT-PCR</b>	⋮	Reverse transcription, réaction en chaîne polymérase.
<b>SDS</b>	⋮	Sodium Dodecyl Sulfate
<b>SOC</b>	⋮	Super Optimal Broth
<b>SOD2</b>	⋮	Superoxyde dismutase 2

# Introduction

## 1.1 Arthrose chez l'humain

### Définition et Physiopathologie générale

**L'arthrose est une pathologie caractérisée par une rupture d'homéostasie en faveur du catabolisme, conduisant à une dégradation du cartilage articulaire.** Plusieurs articulations peuvent être atteintes avec par ordre de fréquence : le rachis notamment cervical (70%), les genoux (40%), les articulations trapézo-métacarpiennes (30%) et les articulations coxo-fémorales (10%). L'épaule, le coude, le poignet et la cheville sont plus rarement atteints. L'atteinte affecte non seulement le cartilage mais aussi l'articulation dans son ensemble (membrane synoviale, os sous-chondral...). Finalement, le processus physiopathologique est aujourd'hui considéré comme systémique. Cette vision pluritissulaire de l'arthrose est une des avancées majeures dans le concept « d'arthroses » avec des implications en terme physiopathologique, de recherche et de stratégies thérapeutiques.

Le cartilage articulaire est un tissu avasculaire et non innervé. Il est alimenté grâce à ses échanges avec l'os sous-chondral sous-jacent et la membrane synoviale attenante. Le cartilage se compose d'un seul type cellulaire le chondrocyte (20-40 µm) enchâssé dans des logettes, les chondroplastes, en milieu anaérobie (condition d'hypoxie entre 1 et 7% d'O<sub>2</sub>). Les chondrocytes ont comme rôle la synthèse/dégradation du cartilage mais ne représentent que 3% du volume total du cartilage. Le composé principal est la matrice extra cellulaire (MEC) constituée d'eau et d'un réseau de fibres de collagène et de protéoglycanes (PG). Ce réseau hydrophile donne au cartilage ses propriétés biomécaniques d'absorption des contraintes mécaniques.

La rupture d'homéostasie conduit à des modifications quantitatives et qualitatives du cartilage. L'arthrose induit une perte de la MEC, une apoptose chondrocytaire et une surexpression du collagène de type X et de type I à la place du collagène de type II.

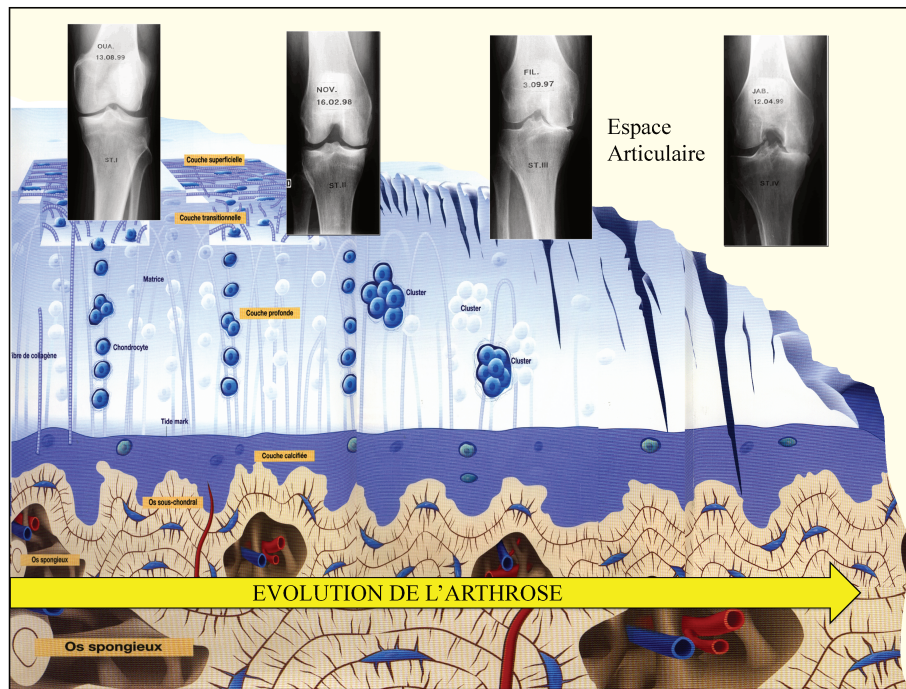


Figure 1. Les stades évolutifs de l'arthrose.

D'après L. Grange

Le processus physiopathologique évolue selon trois phases :

- 1/ Le premier stade aboutit à un œdème du cartilage lié à une tentative de réparation cartilagineuse inefficace. Les fonctions catabolique et anabolique s'accroissent avec une activation des chondrocytes par des facteurs mécaniques (via ses baro et mécano-récepteurs) ou biologiques. Il y a une augmentation de la prolifération cellulaire chondrocytaire, une augmentation de la synthèse des protéines matricielles, des protéinases, des facteurs de croissance et des cytokines (Goldring and Goldring, 2007). Néanmoins, les propriétés biomécaniques du néo-cartilage sont affectées par la mauvaise qualité des produits de synthèse. La surproduction de PG entraîne une hyperhydratation du cartilage avec un ramollissement des tissus. La rareté des fibres de collagène modifie la résistance du cartilage avec l'apparition de microfissures et le dysfonctionnement anabolique conduit à la production d'ostéophytes.
- 2/ La deuxième étape est dominée par une majoration du catabolisme. La protéolyse de la MEC (Yudoh et al., 2005) (Gowen et al., 1984) aboutit à des fissures superficielles de la surface cartilagineuse. Le cycle cellulaire chondrocytaire est perturbé entraînant une prolifération, une différenciation hypertrophique avec une sénescence chondrocytaire et une apoptose cellulaire



(Charlier et al., 2016) (Dozin et al., 2002). En réponse à cette stimulation anormale des chondrocytes, les cellules augmentent leur synthèse de métalloprotéases matricielles (MMPs). Les MMPs sont des protéases solubles (MMP-1 (collagénase 1), MMP-3 (stromelysine 1), MMP-8 (collagénase 2), MMP-2 ; MMP-9 (gélatinase A et B) et MMP-13 (collagénase 3)) responsables de la dégradation de la MEC. La MMP-13 joue un rôle essentiel dans la physiopathologie de l'arthrose et a été identifiée comme un marqueur de différenciation des chondrocytes hypertrophiques (Ma et al., 2018). Le système de contrôle de la protéolyse médié par les inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs) n'est plus suffisant pour le maintien de l'homéostasie cartilagineuse. Les MMPs dégradent les composés de la MEC mais peuvent également cliver et donc activer des précurseurs de cytokines cataboliques (IL-1, TNF- $\alpha$ ) et des protéines anaboliques comme l'IGF-BP (insuline growth factor- binding protein). IL-1 $\beta$  agit comme un facteur paracrine et autocrine induisant une nouvelle synthèse d'IL-1 $\beta$  par les chondrocytes, ce qui amplifie encore les conditions pro-inflammatoires (Rousset et al., 2015). Des débris cartilagineux sont libérés dans la cavité articulaire et activent la membrane synoviale induisant alors un phénomène inflammatoire auto-entretenu parfois responsable d'épanchement articulaire riche en médiateurs pro-inflammatoires et en enzymes protéolytiques. Le microenvironnement du chondrocyte subit des modifications majeures et le processus s'auto-entretient.

- 3/ C'est au dernier stade que la chondrolyse s'étend aux couches profondes du cartilage jusqu'à ce que la zone sous-chondrale et les chondrocytes deviennent hypertrophiques ou apoptotiques. Le collagène X, la MMP-13, le Runt-related transcription factor 2 (RUNX-2) et le Indian hedgehog (Ihh) sont les marqueurs exprimés durant cet état de différenciation terminale (Mariani et al., 2014).

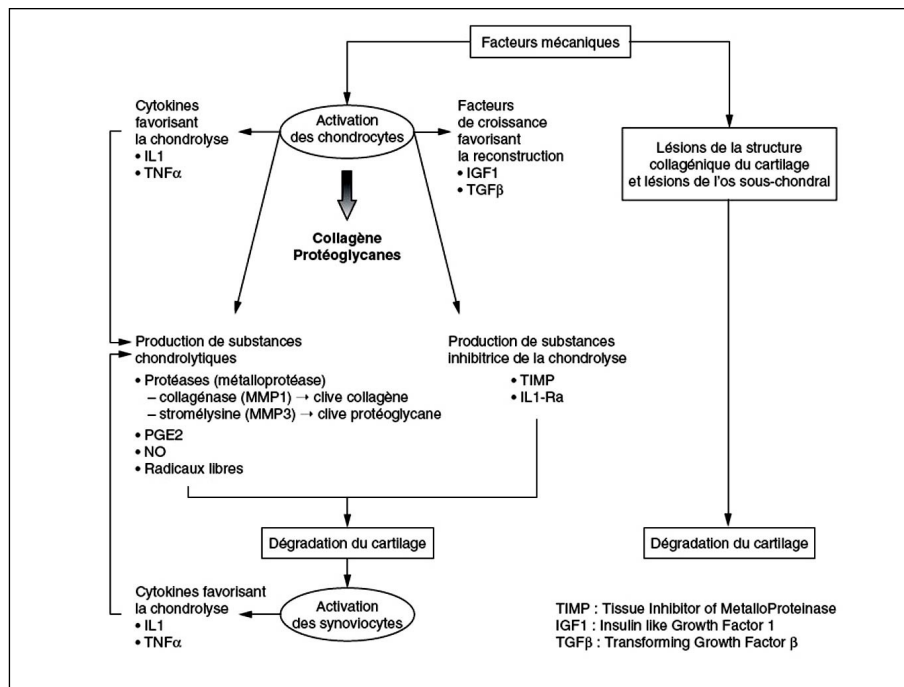


Figure 2. Physiopathologie de l'arthrose.

D'après le collège national de Rhumatologie

La pathogénie de l'arthrose est initiée par des stress mécaniques et biologiques avec une majoration des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, CRP). Les stimuli chimiques ou mécaniques activent des voies intracellulaires biochimiques via une interaction ligand-récepteur ou par l'activation d'une intégrine de surface (Iannone and Lapadula, 2003). C'est au sein du laboratoire du Groupe de Recherche et d'Etude des Processus Inflammatoires (GREPI) que Rousset et *al.* montraient qu'une stimulation cellulaire (C20/A4, lignée chondrocytaire immortalisée) par de l'IL-1 $\beta$  conduisait à une augmentation de l'activité de la Nox4 *in vitro*, avec une augmentation de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (Rousset et al., 2015). Le TNF- $\alpha$  est un régulateur positif de l'expression des MMP-2 et MMP-9 (Gilbert et al., 2004) et il permet d'augmenter l'activité de Nox et la production de ROS. L'accumulation de ce stress oxydatif est impliqué dans l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 (Ma et al., 2018). D'autre part, les trois sous-familles de la voie des MAP kinases (Mitogen Activated Protein kinases) sont impliquées dans la croissance, la prolifération et la différenciation des cellules (via ERK : extracellular regulated kinase), dans la survie cellulaire (via JNK :c-jun-N-terminal Kinase) et dans la production de cytokines (via p38 MAP kinase). Cette voie est impliquée dans la dégradation de la MEC en stimulant l'expression de la MMP-13. C'est la translocation nucléaire du NF- $\kappa$ B qui induit l'expression de MMP-3, MMP-13 et du collagène X. L'ensemble conduit à la

dégradation de la MEC et à la différenciation hypertrophique du chondrocyte, jusqu'à l'apoptose cellulaire (Mariani et al., 2014). Les MAP Kinases, le NF- $\kappa$ B et d'autres (protéine activatrice (AP-1), facteur inductible de l'hypoxie (HIF-1 $\alpha$ ), les Wnt et la  $\beta$ -caténine) sont connus comme des cibles sensibles aux conditions d'oxydo-réduction (Pantano et al., 2006), en partie déterminées par les NADPH Oxydases.

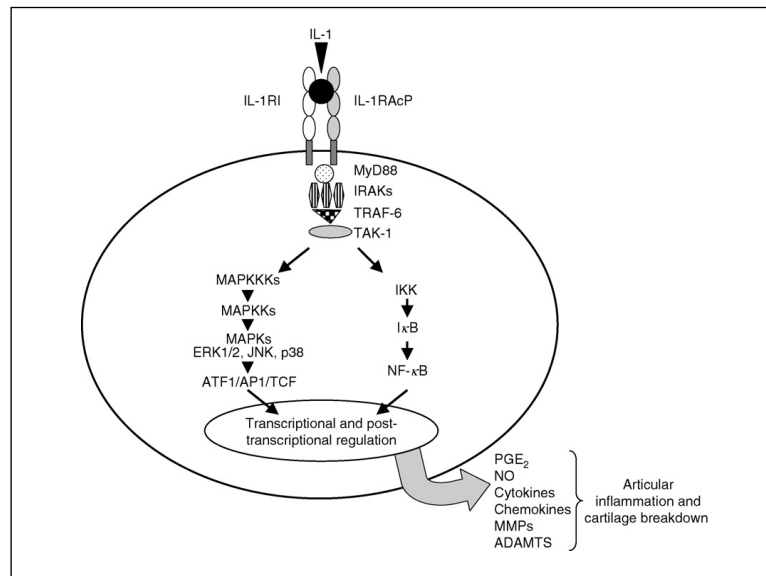


Figure 3. Physiopathologie de l'arthrose expliquée par l'activation cellulaire via l'IL-1.

D'après (Jacques et al., 2006)

## Epidémiologie

L'arthrose est une maladie chronique dégénérative qui affecte plus de 300 millions de personnes à travers le monde (GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2017) (Cross et al., 2014). Il s'agit d'une des pathologies les plus fréquentes chez les personnes de plus de 55 ans avec une prévalence qui augmente avec l'âge (van Oostrom et al., 2014). L'arthrose est plus fréquente chez la femme que chez l'homme (Guillemin et al., 2011).

Sachant qu'il existe une dissociation clinico-radiologique et que les critères diagnostiques d'arthrose diffèrent d'une étude à l'autre, il est difficile d'établir une prévalence précise (Vina and Kwoh, 2018) (O'Neill et al., 2018). En France en 2003, la prévalence de l'arthrose était estimée à 17%, affectant 9 à 10 millions de personnes selon le rapport du Groupe Technique National de Définition des Objectifs de santé publique. La prévalence de l'arthrose radiologique est supérieure à la prévalence de l'arthrose cliniquement symptomatique. D'après une des études sur la cohorte Framingham aux États-Unis, la prévalence d'une gonarthrose radiologique était en moyenne de 33% chez 1420 patients de plus de 65 ans. La fréquence de l'atteinte se majorait avec l'avancée en âge. La gonarthrose était symptomatique pour 9,5% d'entre eux, et les femmes l'étaient plus fréquemment (11,4% contre 6,8%) (Felson et al., 1987). Entre 2007 et 2009 une enquête a été menée chez des personnes âgées de 40 à 75 ans dans plusieurs régions de France afin d'estimer la prévalence de la gonarthrose ou coxarthrose symptomatiques et radiologiquement confirmées (Guillemin et al., 2011). La prévalence standardisée de la coxarthrose et de la gonarthrose symptomatique était respectivement de 1,9 et 4,7% chez les hommes et de 2,5 et 6,6% chez les femmes.

L'incidence de l'arthrose est mal connue et il reste difficile de l'évaluer. En effet, la variabilité inter-individuelle du seuil douloureux motivant une consultation médicale est une des limites aux études épidémiologiques (Eular 2016). Récemment l'incidence de la coxarthrose, de l'arthrose digitale et de la gonarthrose se majoraient jusqu'à atteindre respectivement 210, 240 et 650 cas/ 100 000 (Prieto-Alhambra et al., 2014).

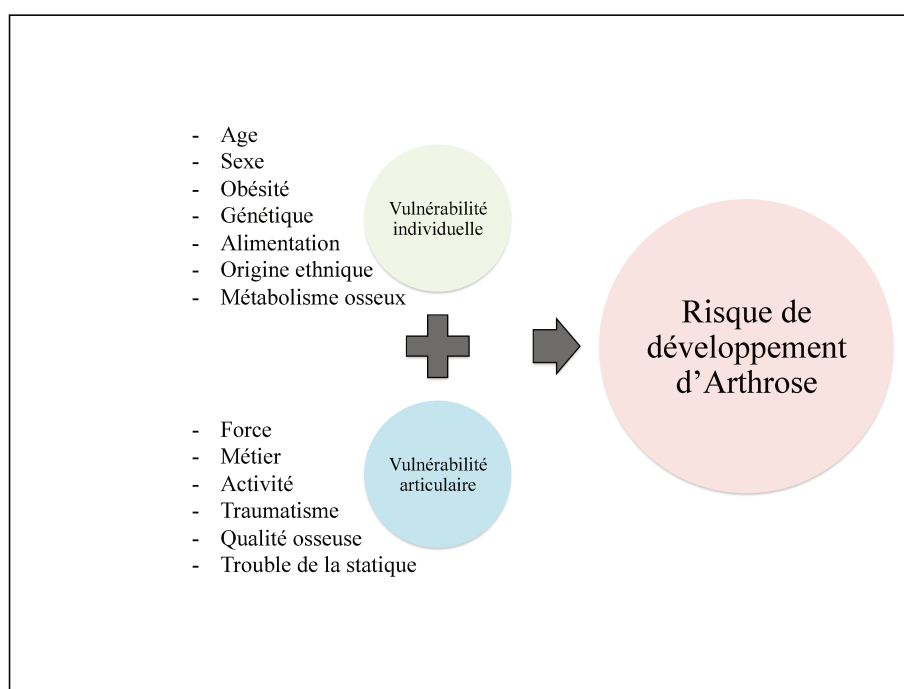
En terme pronostic, les pathologies musculo-squelettiques sont classées au second rang des comorbidités induisant de la dépendance fonctionnelle chez les

personnes de plus de 70 ans et ce, quel que soit le sexe (“GBD Compare | IHME Viz Hub,” n.d.). Il existe de manière générale une association positive entre la multimorbidité (maladies chroniques) et les limitations fonctionnelles (Jindai et al., 2016). L’impact de l’arthrose est majeur, sur la qualité de vie privée et professionnelle, sur la sphère psychologique et sur les conditions de vieillissement des patients. Il existe un excès de mortalité toutes causes chez les patients arthrosiques (HR 1,55 (IC95% 1,41-1,70)) avec une surmortalité notamment cardiovasculaire (HR 1,71 (IC95% 1,49-1,98)). Le taux de mortalité n’était associé ni à la présence d’une obésité ni à la prise d’anti-inflammatoires (Nüesch et al., 2011).

En parallèle, la société doit assumer des coûts médico-économiques directement liés à la prise en charge de l’arthrose s’élevant à 1,6 milliard d’euros en 2002 mais également des coûts indirects majeurs (Le Pen et al., 2005). La prévalence de l’arthrose ne devrait pas cesser d’augmenter (22% en projection pour 2030) en raison du vieillissement de la population, de l’épidémie d’obésité prévue et de l’absence de traitement curatif à ce jour, faisant de cette pathologie chronique un enjeu de santé publique (Neogi and Zhang, 2013).

## Facteurs de risque et phénotypes d'arthrose

Plusieurs facteurs de risque individuel d'arthrose participent au processus dégénératif. Des facteurs systémiques comprennent entre autres les facteurs épigénétiques et génétiques, l'âge, le sexe, l'origine ethnique, le diabète, l'obésité et le syndrome métabolique. Des facteurs biomécaniques (morphologie, traumatisme, activité physique, activité professionnelle...) favorisent au cours du temps le développement de l'arthrose (O'Neill et al., 2018) (Neogi and Zhang, 2013). Certains de ces facteurs de risque sont modifiables, notamment l'obésité et la traumatologie (Neogi and Zhang, 2013).



*Figure 4. Facteurs de risque de survenue d'une arthrose ou sa progression.*

*D'après (Neogi and Zhang, 2013)*

Facteurs de risque	RR de gonarthrose	IC 95%
Méniscectomie	8,55	2,86 - 25,60
Obésité - IMC 30 kg/m <sup>2</sup>	7,53	4,04 - 14,01
Fracture articulaire	6,45	1,11 - 37,43
Surpoids - IMC 27-30 kg/m <sup>2</sup>	3,60	2,12 - 6,10
Génétique	3,24	2,08 - 5,04
Genu varum/valgum	2,84	1,74 - 4,64
Sport moyen à intensif	2,76	1,44 - 5,29
Chondrocalcinose	2,75	1,32 - 5,71
Contusion de genou	2,02	1,20 - 3,39

Tableau 1. Facteurs de risque de gonarthrose. D'après Mazières B. Etude cas-témoin (n=600)

Il existe une grande variabilité inter-individuelle quant à l'intensité des symptômes ou la présence d'une limitation fonctionnelle, faisant aborder la notion d'hétérogénéité sémiologique dans la population arthrosique. C'est une approche phénotypique de l'arthrose qui a permis d'envisager une classification « des arthroses » (Figure 2) en fonction du facteur principal causal: les traumatismes, l'obésité et le vieillissement (Sellam, 2015). Les phénotypes génétiques et douloureux ont aussi été décrits (Sellam and Berenbaum, 2013).

Phénotypes d'Arthrose	Lié au Vieillissement	Post Traumatique	Métabolique
<b>Age</b>	> 65 ans	< 45 ans	45-65 ans
<b>Physiopathologie</b>	Produits de glycation avancée (AGEs), senescence des chondrocytes	Stress mécanique à haute énergie	Stress mécanique répété, adipokines, hyperglycémie, AGEs
<b>Localisations</b>	Hanche, Genou, Main, Rachis	Genou, Pouce, Cheville, Epaule, Rachis	Genou, Main, Diffuse
<b>Perspectives thérapeutiques</b>	Blocage des AGEs	Protection articulaire, Stabilisation articulaire, Intervention chirurgicale préventive	Perte de poids, contrôle glycémique et lipidique, blocage des AGEs

Figure 5. Les principaux phénotypes d'arthrose. D'après (Sellam, 2015).

La notion de phénotype de gonarthrose a été étudiée dans la cohorte OsteoArthritis Initiative (OAI) (Knoop et al., 2011). Cinq phénotypes d'arthrose étaient décrits à partir de 4 critères clinico-radiologiques facilement accessibles en pratique : la force proximale des membres inférieurs, l'indice de masse corporelle (IMC), l'arthrose radiographique et l'humeur dépressive (Knoop et al., 2011) (Lane et al., 2017). Les phénotypes comprenaient « minimal joint disease phenotype », « strong muscle phenotype », « nonobese and weak muscle phenotype », « obese and weak muscle phenotype » and « depressive phenotype ». Les caractéristiques cliniques de la douleur et des limitations fonctionnelles différaient entre les sous-groupes (Knoop et al., 2011). Les études cliniques et fondamentales permettront peut-être de mettre à jour des sous-groupes phénotypiques tout en montrant des phénomènes de chevauchement possibles entre ceux-ci. La compréhension de cette complexité est fondamentale pour déterminer les cibles thérapeutiques permettant peut-être à moyen terme la pratique d'une médecine individualisée et personnalisée, évolutive au cours du temps. La prise en charge de l'arthrose comme celle de toute pathologie chronique, doit être large en abordant le patient dans sa globalité dans un objectif fonctionnel car au-delà de la variabilité inter-individuelle, l'évolutivité de la maladie est aussi hétérogène entre les individus.

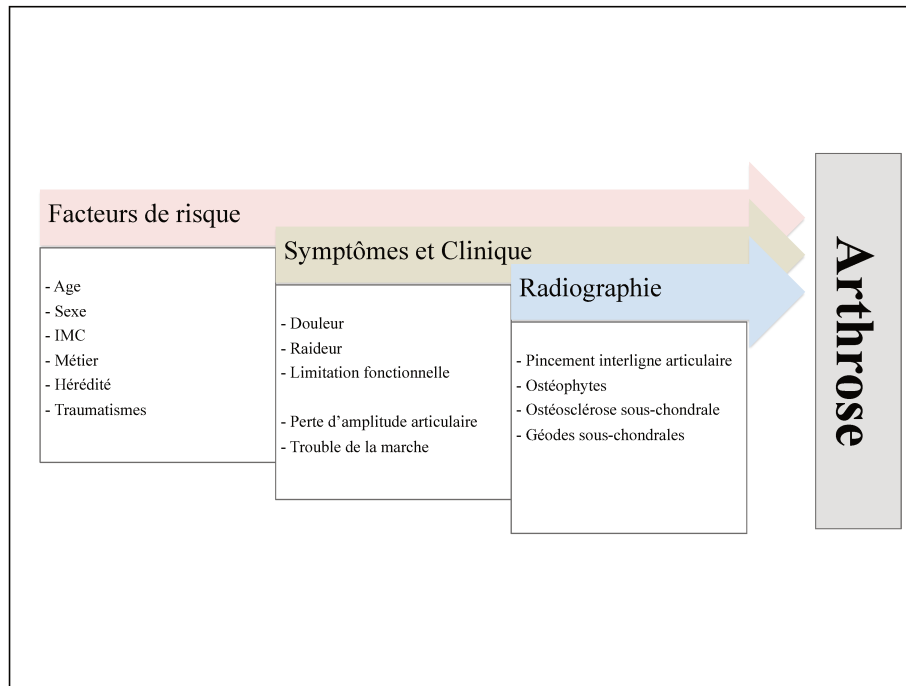


## Clinique et Diagnostic

L'enjeu pour le clinicien est de ne pas méconnaître les diagnostics différentiels et notamment les pathologies curables responsables d'arthrose secondaire (EULAR, 2016). Les recommandations pour le diagnostic de gonarthrose se basent sur un consensus d'experts avec la présence de trois symptômes : la gonalgie persistante d'horaire mécanique (douleur s'aggravant à l'activité physique et soulagée par le repos), la raideur articulaire matinale brève (15 minutes), et la limitation fonctionnelle. L'examen clinique comporte une étape articulaire statique à la recherche de facteurs de risque, d'une limitation d'amplitude articulaire et d'une déformation articulaire. Un éventuel épanchement articulaire est possible avec un degré variable d'inflammation locale. L'examen clinique doit être complété par une étape dynamique d'analyse de la marche et une étape fonctionnelle par la cotation d'indices algo-fonctionnels visant à évaluer le retentissement fonctionnel de l'atteinte. L'indice de Western Ontario and McMaster Universities Arthritis (WOMAC) est un auto-questionnaire évaluant la qualité de vie de patients atteints d'arthrose des membres inférieurs. Il donne un indice de sévérité de l'arthrose des membres inférieurs symptomatique en évaluant la gêne fonctionnelle au quotidien pour le patient. L'orientation de la prise en charge thérapeutique notamment chirurgicale est conditionnée par le degré d'impact fonctionnel (McConnell et al., 2001). D'autre part, il n'est pas rare de faire le co-diagnostic d'un syndrome dépressif, d'un trouble du sommeil et d'une altération de la qualité de vie puisque l'arthrose symptomatique est significativement associée à ces co-morbidités (Allen et al., 2008) (Veronese et al., 2017) (Kye and Park, 2017). Concernant la population âgée plus spécifiquement, une évaluation gériatrique standardisée permettrait de s'assurer de l'imputabilité de la pathologie arthrosique dans la gêne fonctionnelle du patient et de ne pas méconnaître une autre co-morbidité pouvant être co-responsable des symptômes. Cette question est un des enjeux des consultations d'évaluation gériatrique pré-opératoire de chirurgie orthopédique programmée.

Le recours à l'imagerie n'est pas nécessaire au diagnostic en cas de présentation typique puisque la radiographie confirme la gonarthrose dans 99% des cas où ce diagnostic est évoqué (Zhang et al., 2010) (Allen et al., 2008) (Sakellariou et al., 2017). L'imagerie est indiquée en cas de présentation atypique (nécessité d'éliminer des diagnostics différentiels) ou lors du bilan pré-opératoire (remplacement prothétique). La classification radiologique la plus fréquente est celle de Kellgren and Lawrence qui

est un score composite à 5 stades de 0 à 4 selon les lésions macroscopiques d'arthrose. Les signes cardinaux radiologiques d'arthrose à rechercher sont le pincement asymétrique de l'interligne articulaire, la présence d'ostéophytes, la condensation de l'os sous-chondral (ostéosclérose sous-chondrale) avec ou sans géodes sous-chondrales du même compartiment.



**Figure 6. Eléments diagnostiques de l'arthrose.**

*D'après (Zhang et al., 2010)*

## Traitement

La maladie est caractérisée par deux phases évolutives : la phase chronique et les exacerbations douloureuses aiguës. A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif ou retardant l'évolution de l'arthrose. Les solutions sont symptomatiques et les réponses aux traitements pharmacologiques encore décevantes tant sur le plan de la gestion de la douleur que de l'amélioration de la fonction/mobilité. Les recommandations internationales (American College of Rheumatology) proposent une approche globale qui combine à la fois des mesures physiques, psychologiques et/ou pharmacologiques (Kolasinski et al., 2020). La prise en charge doit être individualisée selon la localisation de l'atteinte et le profil du patient mais il est très clair que les mesures non pharmacologiques sont les modalités thérapeutiques de première intention, quel que soit le patient.

En effet, l'activité physique est recommandée en première ligne de prise en charge de la phase chronique (Rausch Osthoff et al., 2018). Même si l'exercice en aérobie et le renforcement musculaire semblent être d'intérêt, aucune recommandation n'est faite à l'heure actuelle sur le type d'exercice, sa durée ni son intensité. Il est question d'orienter le patient vers la pratique d'une activité de son choix, prenant en compte sa motivation et ses ressources financières. Les sociétés savantes s'engagent à promouvoir la pratique de l'activité physique en dédiant des sessions de congrès sur cette thématique et en incitant les professionnels de santé à se former.

Tout professionnel de santé en charge de patients arthrosiques doit donc inciter ceux-ci à la pratique d'une activité physique mais aussi planifier des interventions rééducatives sous forme de programmes d'éducation thérapeutique et d'auto-exercices. L'objectif est d'obtenir des changements de comportement en s'appuyant sur des décisions partagées entre patient et soignant. Les programmes de promotion de la confiance en soi et de l'auto-efficacité constituent une part importante de la prise en charge de l'arthrose. D'autres mesures sont également fortement recommandées comme la perte de poids, la pratique du Tai-Chi et l'usage d'une aide technique (cane) en phase aiguë douloureuse.

En cas d'échec des mesures non pharmacologiques, il convient de les combiner à une prise en charge pharmacologique. Les propositions thérapeutiques ont peu évolué. La présence ou les traitements de co-morbidités doivent être pris en compte puisqu'ils peuvent influencer/orienter les choix du prescripteur. Cette précaution est

indispensable avant la prescription d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (topiques ou oraux) ou une infiltration intra articulaire de glucocorticoïdes, particulièrement recommandés en cas de crise douloureuse aiguë (Kolasinski et al., 2020). Cette prescription doit être de la plus courte durée possible. Ensuite, la prescription d'antalgiques de type paracétamol ou opioïdes faibles est recommandée, dans certaines conditions. La duloxétine (inhibiteur de la recapture de sérotonine et de la noradrénaline) fait partie de l'arsenal thérapeutique grâce à son action mixte sur la douleur par excès de nociception et la douleur neuropathique.

En dernier recours et en cas d'échec d'une prise en charge combinée et bien conduite des traitements non pharmacologiques et pharmacologiques, une prise en charge chirurgicale peut être proposée. Le traitement peut être conservateur par ostéotomie de ré-axation pour certaines gonarthroses invalidantes (ostéotomie de valgisation tibiale en cas de varus). La visco-supplémentation avec de l'acide hyaluronique n'est plus recommandée devant le faible niveau de preuve de son efficacité (Rutjes et al., 2012). Le remplacement prothétique (arthroplastie) est également possible pour les gonarthroses ou coxarthroses en cas de handicap sévère; cependant la chirurgie présente certaines limites rendant cette solution non optimale.

Jusqu'à présent, les traitements ont eu pour objectif de soulager la douleur et de rendre au patient un meilleur statut fonctionnel (Majeed et al., 2018). La recherche a permis de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques, l'objectif étant d'individualiser la prise en charge en fonction du profil du patient. Il existe différents niveaux de preuve scientifique : études pilotes, études précliniques sur modèle animal, essais cliniques non contrôlés, essais randomisés mono-multi-centriques. Pour l'heure, aucune nouvelle recommandation n'est envisageable compte tenu du faible niveau de preuve mais plusieurs axes de recherche sont explorés :

- Lutter contre la douleur
- Lutter contre l'inflammation pour ralentir la progression de la maladie
  - o les études sur des anticorps monoclonaux anti-IL1 (Cohen et al., 2011) (Cheleschi et al., 2015) ou anti-TNF $\alpha$  (Adalimumab) (Aitken et al., 2018) (Wang, 2018) n'ont pas donné de résultats concluants en terme d'efficacité sur la réduction de la douleur et présentaient des risques de toxicité (Kolasinski et al., 2020).

- Le blocage de cytokines pro-inflammatoires par un anticorps monoclonal anti-IL6 (Tocilizumab) est en cours d'évaluation (Kolasinski et al., 2020).
- Lutter contre le catabolisme en ciblant le cartilage articulaire
  - Les inhibiteurs des MMPs et ADAMTS sont responsables d'effets secondaires sévères. La preuve de la tolérance n'est pas faite (Zhu et al., 2018).
  - Les facteurs de croissance comme le Fibroblast Growth Factor-18 (FGF-18) (Sprifermine) injecté en intra-articulaire sont évalués pour la stimulation de la production de MEC par le chondrocyte. Les résultats sont encore contradictoires sur l'impact structural (paramètres du cartilage) (Zhu et al., 2018).
- Cibler l'os sous chondral
  - Les études sur les biphosphonates n'ont conduit à aucune recommandation. Les résultats sont contradictoires et non concluants en terme de régression de la douleur ou de la gêne fonctionnelle (Zhu et al., 2018) (Kolasinski et al., 2020).
- Restauration de l'homéostasie cartilagineuse
  - Des traitements visant HIF- $\alpha$  (hypoxia inducible factor) and TGF- $\beta$  (transforming growth factor) sont explorés (Murahashi et al., 2018).
- Remplacer le cartilage détruit
  - Thérapie cellulaire par
    - « Greffe » de cellules souches adipocytaires en intra-articulaire par bio-infiltration. Les protocoles ne sont encore pas standardisés. Une étude en phase I encourageante a été publiée en 2016 (Pers et al., 2016).
    - Greffe de bio-matériaux composés de chondrocytes autologues.

D'autres cibles thérapeutiques sont plus ponctuellement évoquées. Le laboratoire du GREPI s'intéresse particulièrement à la NADPH Oxydase 4 qui est impliquée dans le processus physiopathologique de l'arthrose. Plusieurs cibles sont identifiées au sein de cette enzyme et nous les évoquons dans l'article numéro 2.

## Article numéro 1

« Retour des 36<sup>ème</sup> JASFGG, 21-23 novembre 2016 à Paris : la session arthrose ».

Cet article est un retour de congrès des Journées Annuelles de la Société Française de Gériatrie et Gérontologie de novembre 2016. Il s'agissait d'une session sur la thématique de l'arthrose proposée par le groupe AGRHUM, Association Gériatrie Rhumatologie. J'ai ensuite intégré ce groupe de travail entre décembre 2016 et juin 2018.

Je suis premier auteur de cet article publié dans la Revue de Gériatrie, revue non classée.

« **S Drevet**, M Boudissa, C Bioteau, B Lardy, G Gavazzi. Retour des 36<sup>ème</sup> JASFGG, 21-23 novembre 2016 à Paris : la session arthrose. *Rev Geriatr* 2017;42(2) :117-8 ».

## Retour des 36<sup>èmes</sup> JASFGG, 21-23 novembre 2016 à Paris : la session arthrose

### Session report of the French Society of Geriatrics and Gerontology (SFGG): Session on arthrose

Sabine DREVET<sup>1</sup>, Mehdi BOUDISSA<sup>2</sup>, Catherine BIOTEAU<sup>1</sup>, Bernard LARDY<sup>3</sup>, Gaëtan GAVAZZI<sup>1</sup>

Le congrès de la Société Française de Gériatrie et Gerontologie 2016 a été l'occasion d'une « session arthrose » proposée par des membres de l'association AGRHUM (Association Gériatrie et Rhumatologie). L'exposition d'éléments à la fois cliniques et biologiques a mis en valeur les évolutions récentes du concept d'Arthrose.

L'arthrose est une pathologie chronique très prévalente, la plus fréquente des pathologies ostéo-articulaires (17 % de la population générale) et la première cause de handicap chez le plus de 65 ans. Le traitement chirurgical de dernier recours concerne 80 000 prothèses totales de genoux (PTG) et 140 000 prothèses totales de hanche (PTH) annuelles en France. L'arthrose est une comorbidité à risque de développer une multi-morbidité. En effet les conséquences individuelles peuvent être sévères et avoir un impact sur la qualité de vie. Un patient arthrosique aurait deux fois plus de risque de présenter une autre co-morbidité associée qu'un patient non arthrosique (OR = 2,35 ; 2,16-2,55). Le syndrome douloureux, le déconditionnement physique, la perte d'indépendance, les troubles de l'humeur, les pathologies cardiovasculaires favorisées par la sédentarité sont associées à la maladie arthrosique. Chez le patient âgé, il convient de mentionner la sarcopénie ainsi que la iatrogénie, secondaire par exemple à l'emploi inapproprié d'AINS chez des insuffisants rénaux sévères. Au-delà de constituer une « co-morbidité facteur de risque », l'arthrose pourrait être une « comorbidité complication ». Même en l'absence d'obésité, le

syndrome métabolique prédisposerait au développement d'une arthrose digitale, alors que les mains ne sont pas soumises à des contraintes mécaniques. Des facteurs métaboliques et systémiques sont impliqués. Au même titre, le diabète semble être associé à un risque plus élevé d'arthrose et à une arthrose plus sévère. C'est ainsi qu'a récemment été mis en évidence l'association fréquente du syndrome métabolique, ou de certains de ces éléments, à l'arthrose.

Il semble actuellement préférable de ne plus utiliser le terme générique « d'arthrose » mais plutôt de parler « d'arthroseS » et de se familiariser avec différents phénotypes d'arthrose, actuellement déclinés en 3 sous catégories : l'arthrose post traumatique, l'arthrose métabolique et l'arthrose liée au vieillissement. Malgré la distinction de ces trois phénotypes arthrosiques, l'inflammation est une caractéristique commune. En ce sens, les travaux actuels prouvent que l'arthrose ne doit plus être opposée aux maladies ostéo-articulaires inflammatoires. La physiopathologie même de l'arthrose se base sur des voies de signalisation pro-inflammatoires (cytokines, stress oxydant...). Des médiateurs de l'inflammation sont un socle de dialogue inter-cellulaire et inter-tissulaire. Il existe une rupture d'homéostasie en faveur du catabolisme, conduisant à la synthèse de métalloprotéases matricielles capables de dégrader la matrice extra cellulaire. Cette micro-inflammation n'est pas uniquement chondrocytaire mais locorégionale voire systémique. En effet, l'arthrose, n'est pas une pathologie isolée de cartilage, mais une atteinte de l'articulation dans son ensemble impliquant os sous-chon-

*Rev Geriatr 2017 ; 42 (2) : 117-8.*

<sup>1</sup> Clinique Universitaire de Gériatrie, CHU Grenoble Alpes, boulevard de la chantourne, 38043 Grenoble Cedex 09, France.

<sup>2</sup> Clinique Universitaire de chirurgie orthopédique et traumatologie, CHU Grenoble Alpes, boulevard de la chantourne, 38043 Grenoble Cedex 09, France.

<sup>3</sup> Institut de biologie et pathologie, CHU Grenoble Alpes, boulevard de la chantourne, 38043 Grenoble Cedex 09, France.

Auteur correspondant : Docteur Sabine Drevet, Clinique Universitaire de Gériatrie, CHU Grenoble Alpes, Boulevard de la chantourne, 38043 Grenoble Cedex 09, France.

Courriel : [sdrevet@chu-grenoble.fr](mailto:sdrevet@chu-grenoble.fr)

dral, capsule articulaire, membrane synoviale, ménisques, ligaments et muscles. Il existe des interactions dynamiques entre chaque structure composant l'articulation. De fait, les cibles thérapeutiques ne devraient pas exclusivement viser le cartilage. Au-delà de ces nouveaux regards sur les mécanismes physiopathologiques, la prise en charge clinique doit

être multidisciplinaire et globale en valorisant notamment l'éducation sur la maladie, l'activité physique et la perte de poids. ■

*Liens d'intérêts* : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

## RÉFÉRENCES

---

**Louati K, Berenbaum F, Sellam J.** Association between diabetes mellitus and osteoarthritis: systematic literature review and meta-analysis. *RMD Open* 2015 ; 1 : e000077.

**Sellam J, Berenbaum F.** Is osteoarthritis a metabolic disease? *Joint Bone Spine* 2013 ; 80 : 568-73.

**Zhuo Q, Yang W, Chan J, Wang Y.** Metabolic syndrome meets osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012 ; 8 : 729-37.

*Note de la rédaction : vous pouvez retrouver d'autres comptes rendus des 36<sup>èmes</sup> Journées Annuelles de la Société de Gériatrie et Gérologie - JASFGG 2016, sur [www.geriatrie.tv](http://www.geriatrie.tv)*



## 1.2 L'implication du stress oxydant dans l'arthrose

### Stress oxydant, NADPH Oxydase et arthrose

Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et le Stress Oxydant (OS) ont un rôle majeur dans la physiopathologie de l'arthrose (Ashraf et al., 2016) (Yin et al., 2009). Les chondrocytes peuvent générer différentes espèces de ROS ( $O_2^{\circ-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $NO^{\circ}$ ,  $ONOO^{\circ}$ ,  $^{\circ}OH$ ,  $HOCl$ ) et l'utilisation d'agents antioxydants discriminants suggère que les chondrocytes produisent principalement du peroxyde d'hydrogène (Rathakrishnan et al., 1992). La chaîne respiratoire mitochondriale peut générer des ROS dans de nombreux tissus, mais son but principal est de produire de l'ATP. Le rôle de la mitochondrie dans l'arthrose et le vieillissement reste encore controversé. En effet, la dysfonction mitochondriale liée à l'âge (DAMPs) (Picca et al., 2017), l'altération de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale dans les chondrocytes arthrosiques (Maneiro et al., 2003) et la probable perte de la superoxyde dismutase 2 (SOD2) au cours de l'arthrose (Koike et al., 2015) font s'interroger sur le degré d'implication de la mitochondrie dans la production de ROS dans l'arthrose. Les sources initiales de ROS pourraient être des enzymes NADPH oxydases (Nox), des enzymes d'oxyde nitrique synthase (Nos) ou des xanthines oxydases (Chung et al., 2009). Certains auteurs considèrent la famille des Nox comme la principale source de production de ROS dans les chondrocytes (Lepetsos and Papavassiliou, 2016) (Henrotin et al., 2005). Les Nox pourraient être le premier producteur de ROS agissant comme initiateur dans le processus physiopathologique de la maladie.

Les cellules de lignée chondrocytaire expriment les isoformes Nox2 et Nox4 mais Nox2 ne semble pas impliquée dans les modifications physiopathologiques liées à l'arthrose. La lignée cellulaire humaine immortalisée C-20/A4 exprime plusieurs composants cytosoliques de la NADPH oxydase : les ARNm de p22phox, p40phox, p67phox, Rac2 mais pas de p47phox. Parmi les autres Nox, seul l'isoforme Nox4 est exprimée (Grange et al., 2006a). Malgré la transcription de Nox2, la stimulation par du phorbol myristate acétate (PMA) n'a aucun effet sur la production de ROS, ce qui suggère que le complexe Nox2 n'est pas fonctionnel (Grange et al., 2006a).

Grange et al. montraient au sein du laboratoire qu'une stimulation de C-20/A4 par de l'IL-1 $\beta$  augmentait la production de ROS et la synthèse de MMP-1 via une voie de signalisation dépendante de Nox4 (Grange et al., 2006b). Le chondrocyte humain

n'exprimait que le transcrite de Nox4 alors que l'ARNm de Nox1, 2, 3 et 5 n'était pas exprimé (Rousset et al., 2015). Le niveau d'expression de l'ARNm codant pour Nox4 et son partenaire p22phox était supérieur en situation d'arthrose, et la production de ROS également (Rousset et al., 2015).

Dans le cartilage humain, l'isoforme Nox4 a été décrit comme un acteur de l'apoptose induite (Fu et al., 2016) mais aussi comme un activateur des voies MAP-Kinases et NF-kB (Feng et al., 2017) et comme un inducteur des facteurs de transcription sensibles aux potentiels Redox (AP-1 et HIF-1). Nox4 peut également conduire à la protéolyse : stimulée par l'IL-1 $\beta$ , elle induit une majoration de l'expression des ARNm codant pour MMP-1, MMP-3 et ADAMTs4 avec une augmentation du niveau de protéine libérée par le chondrocyte (Rousset et al., 2015). La voie Nox pourrait également être induite par le TNF- $\alpha$  et contribuer à la dégradation de la MEC médiée par le MMP13 et la voie ERK (Ma et al., 2018). Plus récemment, il a été montré que le niveau d'expression de Nox4 ainsi que son activité était significativement réduite dans les 48 premières heures suivi d'une majoration significative. Ce résultat était valable *in vitro* sur chondrocyte humain et *in vivo* sur un modèle d'arthrose murin (Wegner et al., 2019).

Bien que la fonction et les mécanismes d'activation de Nox4 demeurent mal compris, Nox4 semble être un acteur essentiel dans le processus physiopathologique d'arthrose.

## La NADPH oxydase 4

La Nox4 ou la NADPH Oxydase 4 est une des enzymes de la famille des NADPH oxydases. Elle partage avec les autres Nox une structure conservée. Les extrémités N- et C-terminales sont cytosoliques. Le domaine catalytique de la déshydrogénase est situé en C-Terminal et contient des sites de liaison pour la flavine adénine dinucléotide (FAD) et la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). La région transmembranaire se compose de six hélices transmembranaires reliées par cinq boucles (A, B, C, D, E). Les troisième et cinquième hélices transmembranaires contiennent chacune deux résidus d'histidine conservés, permettant de coordonner deux hèmes impliquées dans le transport des électrons et donc dans l'état redox de la protéine.

Dans la famille des Nox, Nox4 reste la moins connue. Sa localisation sub-cellulaire demeure incertaine et la protéine a été décrite dans le noyau, le réticulum endoplasmique, la membrane plasmique et les mitochondries (Chen et al., 2008) (Van Buul et al., 2005) (Block et al., 2009) (Kuroda et al., 2005). Contrairement aux autres isoformes, Nox4 est constitutivement active et ne dépend pas des protéines activatrices cytosoliques ni des domaines régulateurs (Ambasta et al., 2004) (Martyn et al., 2006). A ce jour, p22phox est le seul composant régulateur stabilisant requis pour le couplage Nox4/p22phox et la fonction de Nox4. D'autres régulateurs sont cités : Poldip2 (protéine delta-interactive 2 dirigée par l'ADN de la polymérase) (Lyle et al., 2009), la région cytosolique du récepteur Toll de type 4 (TLR4) (Park et al., 2006), Tks5 (substrat de tyrosine kinase avec 5 domaines SH3) (Diaz et al., 2009), la protéine disulfure isomérase (PDI), une dithiol/disulfure oxido réductase chaperonne de la superfamille thioredoxine (Janiszewski et al., 2005). Le type de ROS produit par l'isoforme Nox4 est aussi différent: contrairement à Nox1 ou 3, qui produisent de l'anion superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ ), la fonction intrinsèque de Nox4 est de générer du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , capable de diffuser à travers les membranes pour atteindre sa cible (Bedard et al., 2007) (Takac et al., 2011). La boucle E de Nox4 a une conformation spécifique et confère à Nox4 une vraie spécificité comparativement aux autres Nox. Son pont disulfure entre deux cystéines (Cys-226, Cys-270) et son histidine (His-222) conservée semblent être impliqués dans l'activité endogène de superoxyde dismutation (Takac et al., 2011). La fonction et les mécanismes d'activation de Nox4

demeurent encore mal compris mais Nox4 semble être un acteur essentiel dans le processus physiopathologique d'arthrose.

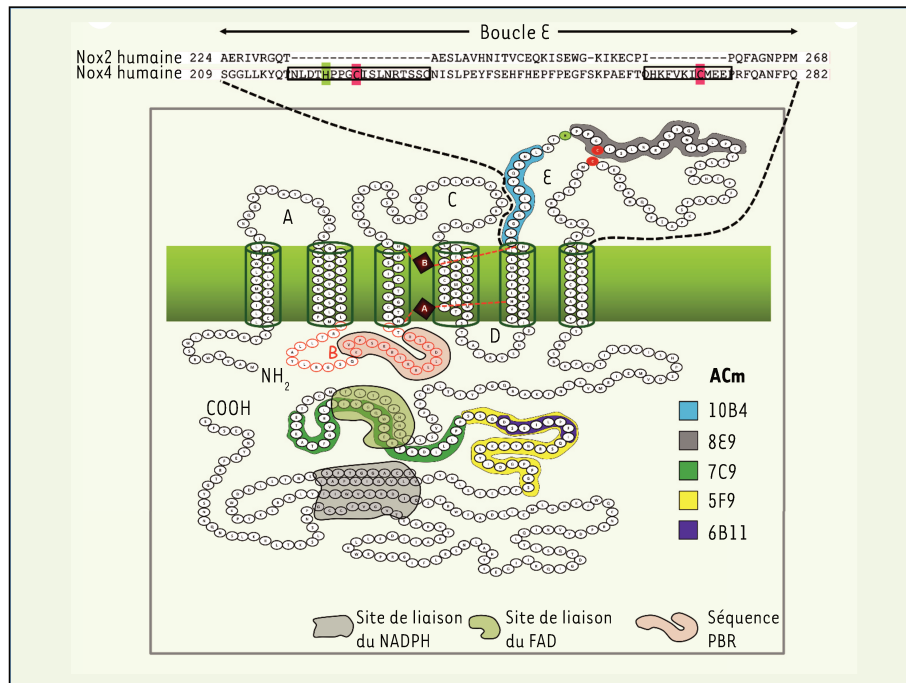


Figure 7. Organisation topologique de la séquence protéique de Nox4.

D'après (Chuong Nguyen et al., 2015)

Nox4 est une protéine de 578 acides aminés. Sa taille théorique est de 66,9 kDa (Expasy). Le signal spécifique mis en évidence par les anticorps anti-Nox4 en SDS-PAGE est attendu à 75-80 kDa et 55-65 kDa (Bedard et al., 2007).

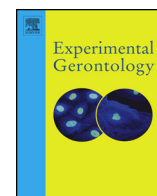
## Article numéro 2

**“Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in Osteoarthritis”.**

Cet article est une revue abordant le stress oxydant, le vieillissement cartilagineux et le rôle de la NADPH Oxydase 4 la physiopathologie de l’arthrose.

Je suis premier auteur de cet article publié dans *Experimental and Gerontology*, revue classée SIGAPS C en 2018, Impact Factor 3,08.

« **Drevet S**, Gavazzi G, Grange L, Dupuy C, Lardy B. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in Osteoarthritis. *Exp Gerontol.* 2018 Jul 13. pii: S0531-5565(18)30338-3. doi: 10.1016/j.exger.2018.07.007».



## Review

## Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis

S. Drevet<sup>a,\*</sup>, G. Gavazzi<sup>b</sup>, L. Grange<sup>c</sup>, C. Dupuy<sup>d</sup>, B. Lardy<sup>e</sup><sup>a</sup> Grenoble Alpes University Hospital, Orthogeriatric Unit, Geriatric Department, Grenoble Alpes University, GREPI UGA-EFS EA7408, Boulevard de la Chantourne, 38043 Grenoble Cedex 1, France<sup>b</sup> Grenoble Alpes University Hospital, Acute Geriatric Medicine Unit, Geriatric Department, Grenoble Alpes University, GREPI UGA-EFS EA7408, Boulevard de la Chantourne, 38043 Grenoble Cedex 1, France<sup>c</sup> Grenoble Alpes University Hospital, Rheumatology Department, Hopital Sud, GREPI UGA-EFS EA7408, 19 avenue de Kimberley, 38130 Echirrolles, France<sup>d</sup> Institut Gustave Roussy, UMR 8200 CNRS “Stabilité génétique et Oncogénèse”, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif Cedex, France<sup>e</sup> Grenoble Alpes University Hospital, Biology Department, Grenoble Alpes University, GREPI UGA-EFS EA7408, Boulevard de la Chantourne, 38043 Grenoble Cedex 1, France

## ARTICLE INFO

Section Editor: Marzetti Emanuele

## Keywords:

NADPH oxidase  
Nox 4  
Osteoarthritis  
Oxidative stress  
Ageing  
Primary chondrocyte

## ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a degenerative chronic disease affecting > 300,000 million people around the world as of 2016. Symptomatic measures exist, but there are hardly any curative treatments available. Disruption of the cartilage homeostasis in favor of catabolism leads to cartilage destruction. ROS-macromolecular-induced damage is significantly greater in OA cartilage and OA is described as low-grade chronic systemic inflammation. This review aimed to assess the critical role of cartilage ageing and oxidative stress in the OA process, focusing in particular on NADPH oxidase and especially Nox4 involvement. With age, hypertrophic senescent cells with an altered redox cell profile accumulated. Chondrocytes are more sensitive to oxidant-mediators and the serum level of pro-inflammatory mediators increases. Age-related advanced glycation end products impact on extra cellular matrix (ECM) properties leading to the apoptosis of chondrocytes. A focus on NADPH oxidase-mediated-ROS signaling highlighted the very specific Nox4 isoform, which plays a role on the final common pathway targeting chondrocyte cells. IL-1 $\beta$ -mediated Nox4 stimulation induced an increase in the levels released by the chondrocyte of MMP-1 and MMP-13 proteins, which are involved in ECM degradation. In comparison with the other Nox isoforms, Nox4 remains unusual, since it is constitutively active, does not depend on cytosolic activator proteins and seems to generate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> thanks to the specific conformation of the Nox4 E-loop. Nox4-induced ROS production appears an essential actor in the OA process and it could be relevant to focus on this target in the aim of discovering and developing new therapeutic strategies.

## 1. Introduction

Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative disease affecting > 300,000 million people around the world in 2016 (“Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries 1990–2016,” 2017).

Prevalence increases with age, and OA is one of the most co-occurring diseases among patients aged 55 years and older (van Oostrom et al., 2014), with a positive association between multimorbidity and functional limitations (Jindai et al., 2016). This multi-dimensional health problem has a major impact on patients' quality of life and conditions of ageing, and incurs significant direct and indirect costs for society (Le

**Abbreviations:** ADAMT, aggrecanase disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin Motifs; AGE, advanced glycation end products; Akt, protein kinase B; AP, activator protein; CRP, C-reactive protein; ECM, extra cellular matrix; DAMP, damaged associated molecular pattern; ERK, extracellular regulated kinase; FAD, flavin adenine dinucleotide; GKT, Genkyotex; GPX, glutathione peroxidase; HIF, hypoxia inducible factor; IFN, interferon; IGF-BP, insulin growth factor-binding protein; Ihh, Indian hedgehog; IL, interleukin; JNK, c-jun-N-terminal Kinase; MAP, mitogen activated protein; MMP, Matrix metalloprotease; MIA, monosodium iodoacetate; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; Nox, NADPH oxidase; NF-kb, nuclear factor kappa-light-transcriptor factor; Nos, nitric oxidase synthase; OA, osteoarthritis; OS, oxidative stress; PDI, protein disulfide isomerase; PKC, protein kinase C; PKR, double-stranded RNA-dependent protein kinase; PMA, phorbol myristate acetate; Poldip, polymerase delta-interacting protein; Rac, ras-related C3 botulinum toxin substrate; ROS, reactive oxygen species; RUNX-2, Runt-related transcription factor 2; SOD, superoxide dismutase; TIMP, tissue inhibitor of MMP; Tks, tyrosine kinase substrate; TNF, tumor necrosis factor; TLR, toll-like receptor; XOD, xanthine oxygen oxidoreductase

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [SDrevet@chu-grenoble.fr](mailto:SDrevet@chu-grenoble.fr) (S. Drevet), [GGavazzi@chu-grenoble.fr](mailto:GGavazzi@chu-grenoble.fr) (G. Gavazzi), [LGrange@chu-grenoble.fr](mailto:LGrange@chu-grenoble.fr) (L. Grange), [corinne.dupuy@gustaveroussy.fr](mailto:corinne.dupuy@gustaveroussy.fr) (C. Dupuy), [BLardy@chu-grenoble.fr](mailto:BLardy@chu-grenoble.fr) (B. Lardy).

<https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.07.007>

Received 28 May 2018; Received in revised form 6 July 2018; Accepted 9 July 2018

0531-5565/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Pen et al., 2005). Several risk factors seem to be involved in developing OA (Buckwalter et al., 2004) (Lotz and Loeser, 2012) (McCulloch et al., 2017). Preventive and symptomatic measures exist, but there are hardly any curative treatments available, and new therapeutic targets are much needed (Morel et al., 2015). OA is characterized by a disruption of cartilage homeostasis in favor of catabolism, leading to cartilage destruction. This multifactorial disease not only affects the cartilage structure, but all of the joint tissues, including intra- and periarticular tissue, generating systematic disease. At least three main OA phenotypes are currently identified: age-related OA, post-traumatic OA and metabolic OA (Bijlsma et al., 2011), while Sellam et al. have suggested genetic and pain OA in the classification of OA phenotypes (Sellam and Berenbaum, 2013). Whatever the underlying cause, OA is one form of low-grade chronic systemic inflammation (Mobasheri et al., 2015) (Greene and Loeser, 2015) (Goldring and Otero, 2011). Molecular mechanisms are not well established but literature published over the last decades describes links between ageing, OA and inflammation (van der Kraan et al., 2017) (Rahmati et al., 2017). Pro-inflammatory cytokines are the key drivers of inflammation, and reactive oxygen species (ROS) are involved in the process. Mitochondria and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidases (Nox) activity are the two main sources of ROS production. This ROS production is needed to ensure the maintenance of cartilage homeostasis, but under some conditions, ROS can exceed anti-oxidant defenses, causing oxidative stress (Lepetsos and Papavassiliou, 2016). After establishing the pathophysiology and the critical role of cartilage ageing, this review will focus on Nox-mediated-ROS signaling and assess how ROS are widely involved in each level of the OA process. We will highlight in particular one very specific Nox family enzyme, the Nox 4 isoform, which plays a role on the final common pathway targeting chondrocyte cells.

## 2. Pathophysiology of osteoarthritis

OA may be classified as either primary, when it occurs on abnormal cartilage with normal loading, or secondary, when the disease results from an abnormal loading on normal cartilage. A set of OA risk factors is identified and may additionally participate in the degenerative process. Systemic factors include epigenetic and genetic factors, age, sex, diabetes, obesity, and metabolic syndrome. On the other hand, OA may result from mechanical stress (Buckwalter et al., 2004) (Lotz and Loeser, 2012) (McCulloch et al., 2017) (Hellevik et al., 2018). Since the local articular description, the list of impacted target tissues is increasingly longer. The first element to be described was the intra-articular part, with cartilage breaking down, synovial membrane inflammation and hypertrophy, subchondral bone remodeling, osteophytes and sclerosis. In a second phase, whole peri-articular tissues were outlined: muscle atrophy, unbalanced fat metabolism, capsule, ligament and tendon dysfunction. It was only later that the concept of systemic pathophysiology was highlighted, while entertaining the idea that the main actor in the final common path is the chondrocyte. Modifications of inter-cellular and inter-tissular interactions allow phenotype – function alterations in the chondrocyte.

The disruption of cartilage homeostasis towards catabolism leads to fibrillations and fissures of the articular cartilage surface (Fig. 1). There are both quantitative and qualitative modifications of the structure of the cartilaginous tissue (Fig. 2). OA induces a loss of extracellular matrix, chondrocyte apoptosis and overexpression of type X and type I collagen instead of type II collagen. The timeline of the process can be divided into three phases. The first stage is characterized by cartilage swelling due to the failure of attempted repair. Both catabolic and anabolic function are increased with cell proliferation, an increase in matrix proteins, proteinases, growth factors and cytokines (Goldring and Goldring, 2007). The biomechanical properties of cartilage are affected by the poor quality of synthesis products. Proteoglycan overproduction leads to cartilage hyper-hydration with tissue softening, and

the scarcity of collagen fiber alters the cartilage's resistance, leading to micro-cracks. On the other hand, anabolic dysfunction leads to osteophyte production.

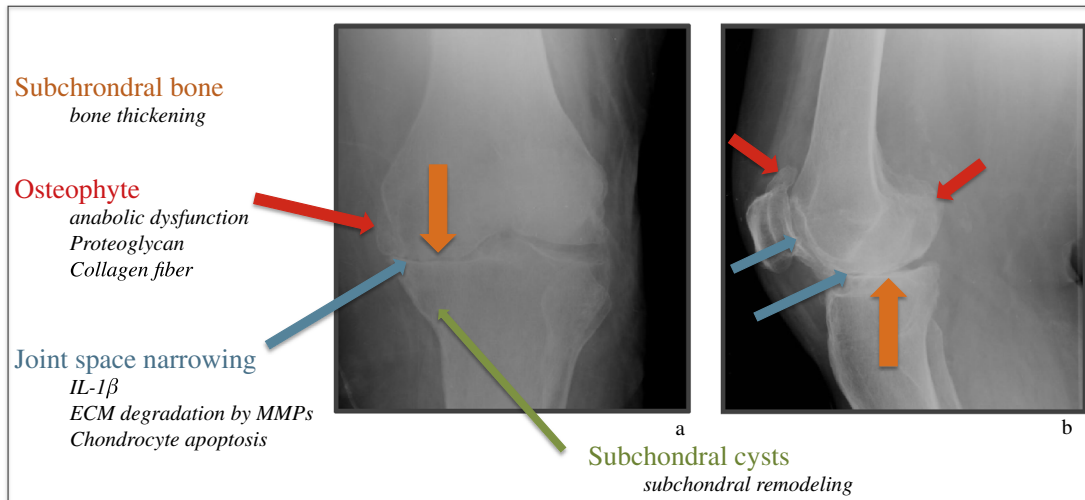
The second stage is characterized by superficial cracks arising from up-regulation of cell catabolism, and extra cellular matrix (ECM) proteolysis (Yudoh et al., 2005) (Gowen et al., 1984). In response to abnormal chondrocyte activation, cells are able to increase the synthesis of Matrix metalloproteinases (MMPs). MMPs are soluble key proteases (MMP-1 (collagenase 1), MMP-3 (stromelysin 1), MMP-8 (collagenase 2), MMP-2; -9 (gelatinase A and B) and -13 (collagenase 3)) leading to degradation of the ECM. MMP-13 has also been identified as a marker of differentiation in hypertrophic chondrocytes, and it plays a critical role in OA pathophysiology (Ma et al., 2018). The proteolysis control system mediated by tissue inhibitor of MMPs (TIMPs) is not sufficient to maintain cartilage homeostasis. The dysregulation of the MMPs/TIMPs ratio in the synovial fluid is involved in the catabolic pathway (Xu et al., 2008). MMPs not only degrade ECM compounds but also cleave and activate catabolic cytokine precursors (IL-1, TNF- $\alpha$ ) and anabolic proteins like IGF-BP (insulin growth factor-binding protein), with a crucial modification to the chondrocyte's microenvironment in a self-sustained process. IL-1 $\beta$  is usually not present in the healthy joint but in OA conditions it is one of the key pro-inflammatory cytokines. Osteoarthritic patients have an elevated level of IL-1 $\beta$  in the whole joint: synovial fluid, synovial membrane, cartilage and subchondral bone. Its local synthesis depends on chondrocytes, osteoblasts, synoviocytes and mononuclear cells after infiltration in the joint (Wojdasiewicz et al., 2014). IL-1 $\beta$  acts as a paracrine and autocrine factor inducing new IL-1 $\beta$  synthesis by chondrocytes, which further supports the pro-inflammatory conditions (Rousset et al., 2015). The cell cycle is disturbed, leading to proliferation, hypertrophic differentiation with a maturity-arrested differentiation state, chondrocyte senescence, and cell apoptosis (Charlier et al., 2016) (Dozin et al., 2002).

In the final stage, chondrolysis reaches the deep layers of cartilage until the subchondral zone and chondrocytes become hypertrophic or apoptotic. Collagen X, MMP-13, Runx-related transcription factor 2 (RUNX-2), and Indian hedgehog (Ihh) are the markers expressed during this terminal differentiation state (Mariani et al., 2014).

The up-regulation of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, CRP) and mechanical stress seem to be the first steps in OA pathogenesis (Fig. 3). Ligand/receptor interaction and integrin cell surface activation (Iannone and Lapadula, 2003) constitute the interface between chemical or mechanical stimuli and biochemical intracellular pathways. Rousset et al. demonstrated in vitro that IL-1 $\beta$  stimulation led to Nox4 activity enhancement with an increase in ROS production (Rousset et al., 2015). TNF- $\alpha$  was able to mediate MMP-2 and MMP-9 up-regulation (Gilbert et al., 2004), increase Nox activity and ROS production with accumulated oxidative stress responsible for IL-8 secretion (Ma et al., 2018). The three subfamilies of the mitogen activated protein (MAP) kinase pathway are involved in cell growth, proliferation and differentiation via extracellular regulated kinase (ERK), in cell survival via JNK (c-jun-N-terminal Kinase) and in cytokine production via p38 MAP kinase. All are implicated in matrix degradation by inducing MMP-13 up-regulation. The nuclear translocation of NF- $\kappa$ B up-regulates MMP-3, MMP-13, and collagen X leading to ECM degradation and hypertrophic state differentiation of the chondrocyte, until cell apoptosis (Mariani et al., 2014). NF- $\kappa$ B is also described as a key regulator for the hypoxic maintenance actors. MAPK, NF- $\kappa$ B and others (activator protein (AP-1), Hypoxia Inducible Factor (HIF-1 $\alpha$ ), Wnt- $\beta$  catenine) are known as redox-sensitive targets (Pantano et al., 2006). The Nox enzymes mediate a large part of redox signaling and contribute to regulating interactions between decisive players.

OA risk factors, target tissues and the large number of elements represent a complex interactive network. The chondrocyte is the targeted cell of this multi-dimensional disease and MMPs play a crucial role in degrading the ECM. OA is associated with inflammation, and





**Fig. 1.** Radiograph of the knee showing radiological evidence of osteoarthritis linked to pathophysiological factors (a: frontal, b: lateral). Joint space narrowing is localized and due to triggers of inflammation. Pro-inflammatory cytokines induce degradation of the extra cellular matrix via MMPs (matrix metalloproteinases), as well as chondrocyte hypertrophy and apoptosis. Subchondral bone thickening results from bone remodeling and failure of attempted repair. Subchondral cysts are generally near the subchondral bone lesion. Anabolic dysfunction characterized by over-production of inappropriate quality of proteoglycan and collagen fibers leads to osteophyte.

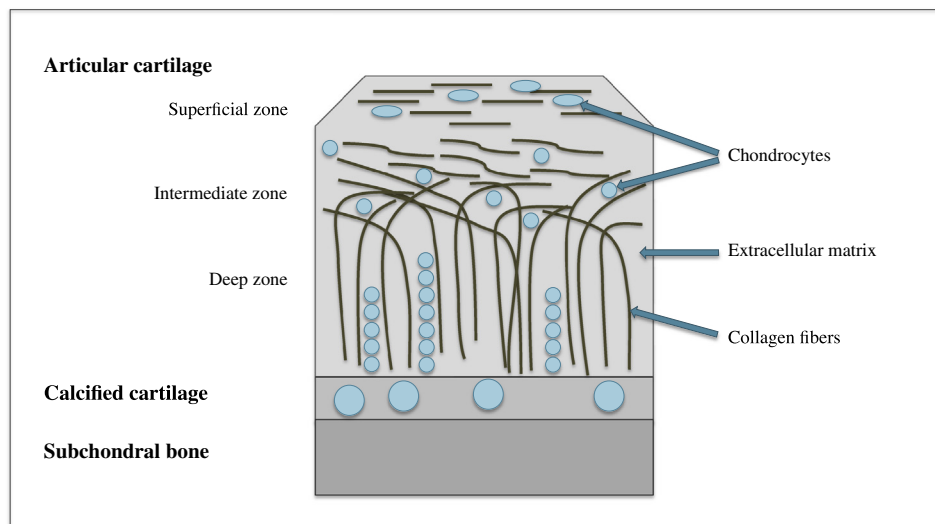
ageing may contribute to the development of OA in several interesting ways.

### 3. Cartilage and ageing

Age-related weakening affecting joint tissues may increase susceptibility to the development of OA, such as decline of muscle mass and strength (Marzetti et al., 2017), or bone demineralization (Paillard, 2014). Furthermore, environmental factors may influence ageing. The contribution of oxidative stress during the course of ageing, and the importance of the ECM lead us to focus on the two main age-related changes in articular cartilage, namely advanced glycation end products (AGE) and chondrocyte senescence (Bijlsma et al., 2011).

The ECM is the main element of the cartilage, and the remaining 1–2% is represented by a unique cell type, namely the chondrocyte (Lepetsos and Papavassiliou, 2016). The ECM is composed of proteoglycans (aggrecans) that retain water, and of 95% type II collagen fibers (Bhosale and Richardson, 2008). With age, the activity of both collagenases (MMP-1, -3, -8, -13) (Rahmati et al., 2017) and Aggrecanases Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin

Motifs (ADAMTS-4 and -5) (Mitani et al., 2006) increases, affecting the quality and quantity of the ECM components, with elongation, shortening and stiffness of fibers. Advanced glycation end products (AGE) (Takahashi et al., 1994) lead to changes in the structural and biomechanical properties of type II collagen fibers, which lose their ability to resist to tension (Buckwalter et al., 1993). In parallel, the rate of proteoglycan synthesis seems to be negatively correlated with glycation intensity (DeGroot et al., 1999). Glycation and oxidation pathways are strongly linked, and each step of glycation generates free radicals, leading to oxidative stress. Age-related AGEs also seem to induce the NF-κB pathway, leading to apoptosis of chondrocytes (Loeser et al., 2005). The chondrocyte is responsible for the maintaining the volume of cartilage thanks to permanent and dynamic remodeling during the lifetime. This quiescent cell, which has a low regenerative capacity (Li and Pei, 2012) (Toh et al., 2016) and whose cell-metabolism is controlled by anaerobic glycolysis, is physiologically exposed to senescence due to mechanical trauma and oxidative stress (Yudoh et al., 2005). With increasing age, there is an accumulation of hypertrophic senescent cells marked with expression of p16<sup>INK4a</sup>, while positive staining for senescence-associated β-galactosidase is another feature of senescent



**Fig. 2.** Structure and organization of the cartilaginous tissue. From the articular surface to the subchondral bone, the cartilage is composed by four layers: the superficial zone, the intermediate zone, the deep zone and the calcified zone. The extracellular matrix is composed of proteoglycans (aggrecans) that retain water, and of 95% type II collagen fibers. The horizontal orientation of the collagen fibers turns into vertical lines. The chondrocyte (unique cell type in the cartilage) is represented in each cartilage layer.



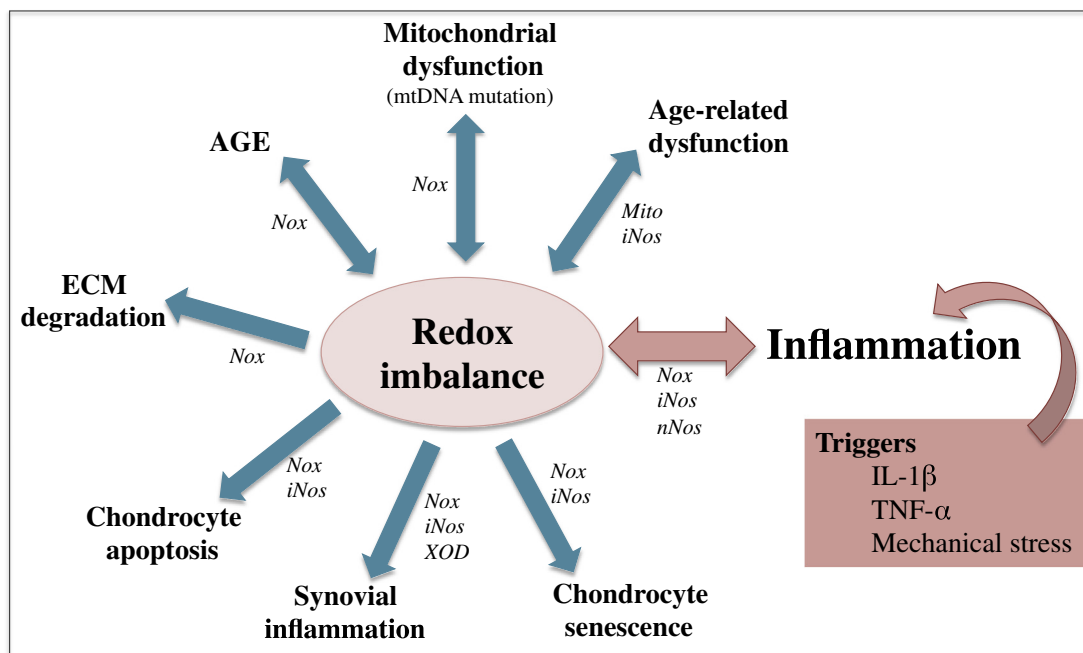


Fig. 3. Consequences of redox imbalance in the chondrocyte.

AGE: advanced glycation end-products, mtDNA: mitochondrial DNA; XOD: xanthine oxygen oxido-reductase; Mito: mitochondria; Nox: NADPH oxidase; iNos: inducible nitric oxide synthase; nNos: neuronal nitric oxide synthase; IL-1 $\beta$ : interleukine-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ .

chondrocytes (Loeser et al., 2016). They are also characterized by an altered redox cell profile that contributes to the inflammatory state (Ashraf et al., 2016). Compared to younger, age-related oxidative stress induces redox imbalance due to the up-regulation of key pro-inflammatory mediators, the overproduction of ROS (Chung et al., 2009) and the activation of several networks. To our knowledge, no quantitative assessments of Nox4 mRNA expression, protein expression or activity in the cartilage according to the age have been published. Among other factors, chondrogenic phenotype maintenance depends on *type II collagen gene* that is regulated by the redox-sensitive transcription factor Sox9 (Ashraf et al., 2016). The Sox family transcription factors are essential for chondrogenesis and chondrogenic differentiation (Kozhemyakina et al., 2015). Elsewhere, a specific “ageing epigenome” has been described, with histone modifications, DNA-methylation and breakdown of enzyme activity (Cencioni et al., 2013). Telomere erosion, DNA damage, oxidative stress (OS) and inflammation underpin the disruption of cartilage homeostasis, with a decline in cell proliferation rates and matrix biosynthesis (Toh et al., 2016). Aged chondrocytes have reduced level of ECM gene expression (Loeser et al., 2016). Age-induced phenotypic modifications lead to functional alterations, such as changes in signaling transduction and an abnormal response to growth factors (van der Kraan et al., 2017) (Rahmati et al., 2017) (Loeser et al., 2014) (Yin et al., 2009). In the cartilage of the elderly, chondrocytes are more sensitive to oxidant-mediators (Carlo and Loeser, 2003) with a significant decrease in IGF-1 response (Loeser et al., 2014) (Blumenfeld and Livne, 1999). Compared to younger people, downstream ERK phosphorylation is higher, whereas Akt phosphorylation is down-regulated, with an age-related reduction in the ability of IGF-1 to stimulate proteoglycan synthesis. The serum level of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18) and CRP (Rahmati et al., 2017) increases with age, and age-related redox imbalance sustains the phenomenon by inducing chronic systemic inflammation termed “inflammaging”. In brief, ageing affects ECM quality and the chondrocyte's ability to cope with disruption of homeostasis, which creates fertile ground for the pathogenesis of OA (Ferrández et al., 2014). Some authors have begun to establish the links between normal cartilage ageing and cartilage disruption leading to OA

(Toh et al., 2016) (Loeser et al., 2016). Age-related changes promote OA pathophysiology, but it is well established that systemic factors and metabolic diseases also contribute to the process. Currently, we have not yet identified any specific ageing-redox-biomarker, but genetic factors, ageing itself and lifestyle all seem to impact redox homeostasis (Weber et al., 2017).

#### 4. Osteoarthritis and oxidative stress

Chondrocytes can generate ROS:  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $NO^{\cdot}$ ,  $ONOO^{\cdot}$ ,  $\cdot OH$ ,  $HOCl^-$  (Bedard and Krause, 2007) (Blanco et al., 1995) (Tiku et al., 1998) (Lepetsos and Papavassiliou, 2016) (Rousset et al., 2015) (Abramson, 2008) (Yasuhara et al., 2005). Human chondrocytes stimulated with phorbol myristate acetate (PMA) can produce ROS (Henrotin et al., 1993) (Rathakrishnan et al., 1992) in a dose-dependent manner. PMA is a PKC activator that induces a phosphorylation of the cytosolic cofactors and an activation of the NADPH oxidase complex. The use of discriminant antioxidant agents suggests that chondrocytes mostly produce hydrogen peroxide (Rathakrishnan et al., 1992). Compared to non-stimulated rabbit chondrocytes, IFN-gamma or TNF-exposure induced significantly greater amounts of hydrogen peroxide production (Tiku et al., 1990).

At the systemic level, oxidative stress orchestrates biological changes happening in diseases related to OA development (Meng et al., 2008) (Lotz and Loeser, 2012) (McCulloch et al., 2017) (Hellevik et al., 2018) and it seems to be involved in the regulation of each determining factor in the development of OA. At the level of the whole joint's tissues and in physiological conditions, ROS ensure the maintenance of cartilage homeostasis by regulating intracellular signaling and cell physiology. ROS act as intracellular second messenger molecules and take part in the regulation of genes involved in cell physiology and joint homeostasis as cytokines, matrix components (Henrotin et al., 2005). Beyond this physiological role (Henrotin et al., 2003), excess ROS induces macromolecular damage that is significantly greater in OA cartilage (Lepetsos and Papavassiliou, 2016). With age or in the presence of OA, there is a modulation of mitochondrial superoxide dismutase expression in human articular chondrocytes (Ruiz-Romero et al., 2006).

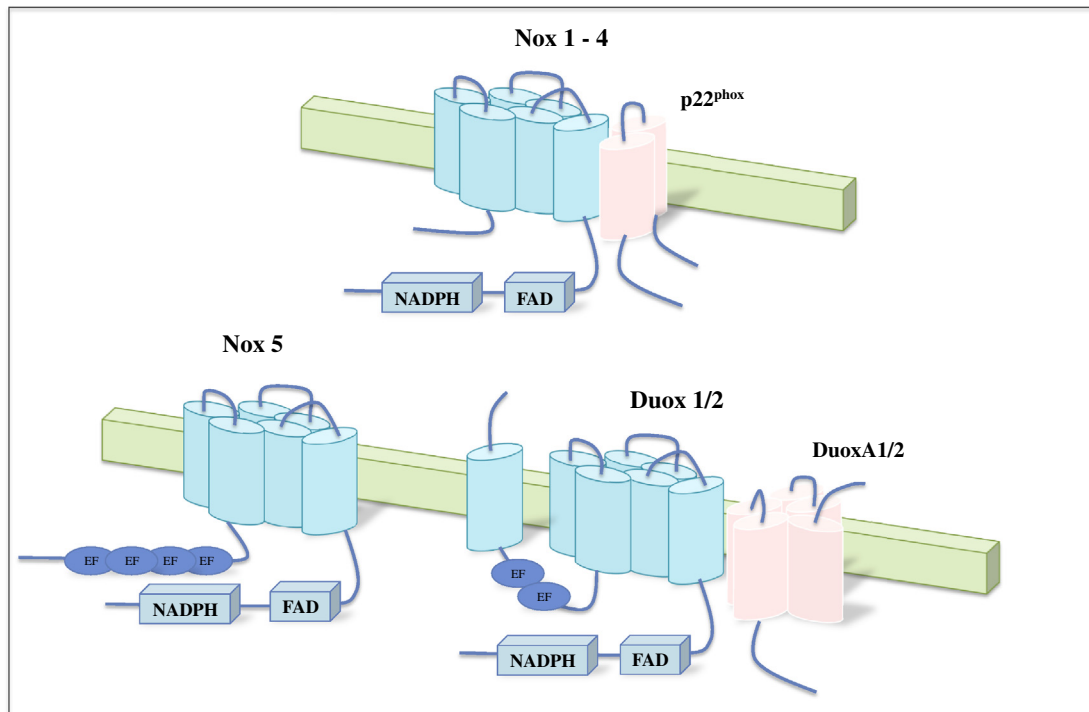


Fig. 4. Structure of the Nox/Duox homologs.

The five Nox members all share a conserved structure. Both N- and C-terminals are cytosolic. The long C-terminal catalytic dehydrogenase domain contains binding sites for FAD and NADPH. The transmembrane region consists of six transmembrane helices connected by five loops (A, B, C, D, E). Nox5 has four EF-hand domains to bind calcium. The two Duox members present slight structural differences; the N-terminal domains are extracellular, Duox are formed by seven transmembrane domains and need DuoxA1/2 to be activated.

The chondrocyte cannot tolerate the growth in OS combined with a decrease in the antioxidant system (Altindag et al., 2007). Cartilage is a non-vascularized, non-innervated and hypoxic tissue, and the slightest modification of O<sub>2</sub> metabolism can have a significant impact, since its capacity to repair is limited. Oxidative modifications of proteins, telomere genomic instability (Lepetsos and Papavassiliou, 2016), DNA damage (Cencioni et al., 2013), gene-expression and cell cycling modulation are all the result of an imbalance in intracellular redox status (Lepetsos and Papavassiliou, 2016) (Henrotin et al., 2003). Lepetsos (2014) highlights the oxidative stress-related mechanisms of OA pathogenesis, including intra cellular signaling disruption, chondrocyte senescence, apoptosis, mitochondrial dysfunction, cartilage degradation, synovial inflammation, reduction of matrix synthesis and subchondral bone dysfunction (Lepetsos and Papavassiliou, 2016). Inducing OS in normal human cartilage can mimic OA conditions, supporting the crucial role of ROS in osteoarthritis pathophysiology (Ashraf et al., 2016) (Yin et al., 2009). Under stress conditions, cells have unusual responses to stimuli, and trigger asymmetric downstream pathways, leading to IGF-resistance. Akt phosphorylation is inhibited and IGF-1 fails to induce proteoglycan and type II collagen synthesis. At the same time ERK is triggered resulting in preferential activation of the catabolism pathway (Yin et al., 2009) (Loeser et al., 2014).

The mitochondrial respiratory chain may generate ROS in many tissues, but its main purpose is to produce ATP. Age-related mitochondrial dysfunction is characterized by the alteration of the mitochondrial quality control system, leading to release of damaged-associated molecular patterns (DAMPs) (Picca et al., 2017). However, the relationship between mitochondrial function and age is still controversial in cartilage (Maneiro et al., 2003). Compared to normal human cartilage, the OA chondrocyte's mitochondrial respiratory chain activity is altered, with a higher proportion of de-energized mitochondria (Maneiro et al., 2003). Furthermore, superoxide dismutase 2 (SOD<sub>2</sub>) is a mitochondrial enzyme able to metabolize superoxides, and

has recently been implicated in the pathophysiology of osteoarthritis (Koike et al., 2015). In the study by Koike et al., loss of *Sod2* in the chondrocytes led to exacerbation of cartilage degeneration during ageing, in a surgical model of OA. Defective mitochondria generate ROS and an inflammatory response, leading to a phenomenon termed “oxy-inflamm-aging”, which participates in the pathophysiology of OA (Picca et al., 2017). An initial oxidative stress may induce the fragmentation of mitochondrial DNA (Ozawa, 1997), which causes mitochondria dysfunction and a self-sustained process. The source of initial ROS may be Nox enzymes, nitric oxide synthase (Nos) enzymes (inducible Nos (iNos), endothelial (eNos), neuronal Nos (nNos)) or xanthine oxidase (Chung et al., 2009). Some authors consider the NADPH oxidase family as the main source of ROS production in the chondrocyte (Lepetsos and Papavassiliou, 2016) (Krause, 2007) (Henrotin et al., 2005), and Nox could be the first ROS-producer acting as a spark in the preliminary redox imbalance process (Fig. 3).

## 5. Nox family and Nox4 isoform

NADPH oxidase family enzymes are heme-containing transmembrane proteins with a basic function of electron transport, from a cytosolic electron donor (in most cases NADPH) to an electron acceptor (O<sub>2</sub>) located in the extracellular or organelle lumen. The activity of the enzyme consists in reducing molecular oxygen leading to superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) and ROS production. ROS are secondary messengers mainly generated by the NADPH oxidase (Nox)/Dual oxidase (Duox) (Lambeth et al., 2007). Nox enzymes are widely distributed in different kingdoms of life (Bedard et al., 2007), are ubiquitous in humans, and have been fully integrated into many pathophysiology of diseases in mammalian organisms (Bedard and Krause, 2007) (Altenhöfer et al., 2015).

Once thought to be an exclusive feature of phagocytes, ROS induced by NADPH oxidases have now been described in several tissues and

cells (Bedard and Krause, 2007). There are seven Nox/Duox enzyme family members in humans: Nox1–5, Duox1, and Duox2 (Shiose et al., 2001), (Bánfi et al., 2004a) (Bánfi et al., 2004b), (Dupuy et al., 1999), (De Deken et al., 2000). The five Nox members all share a conserved structure (Fig. 4). Both N- and C-terminals are cytosolic. The long C-terminal catalytic dehydrogenase domain contains binding sites for FAD and NADPH. The transmembrane region consists of six transmembrane helices connected by five loops (A, B, C, D, E). The third and fifth transmembrane helices each contain two conserved histidine residues to coordinate two hemes involved in electron transport and the redox state. The two Duox members present slight structural differences; the N-terminal domains are extracellular and Duox are formed by seven transmembrane domains. Nox/Duox-isoform function and ROS generation are directly linked to the enzyme's structure conformation and to membrane partner coupling. The most extensively studied NADPH oxidase isoform is the phagocyte Nox2 (previously termed gp91phox), which depends on p22<sup>phox</sup> and whose activation requires assembly with the cytosolic regulatory subunits p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup> (Vignais, 2002) (Chuong Nguyen et al., 2015) (Morel, 2007), along with GTP-loaded Rac1 or Rac2. Cell activation by microorganisms or inflammatory mediators initiates at least three molecular triggers: phosphorylation of cytosolic regulatory subunits by kinase or PMA, lipid metabolism and guanine nucleotide exchange on Rac. Taken together, these results firstly in membrane translocation, followed by cytosolic component assembly with the Nox2-p22<sup>phox</sup> complex. As for Nox2, the Nox1 and Nox3 homologs require regulatory subunits, NoxA1 and NoxO1 (Lambeth, 2004). Duox1 and 2 respectively require Duoxa1 and Duoxa2 as scaffold proteins for their maturation and functionality (Grasberger and Refetoff, 2006). Nox5 and the Duox enzymes contain EF-hand structures, making their activities directly calcium dependent (Lambeth et al., 2007).

In the Nox family, Nox4 remains unusual and has been described in 2001 (Shiose et al., 2001). Nox4 is 578 amino acids long and Nox4 antibodies recognize bands of 75–80 kDa and of 65 kDa (Bedard et al., 2007). Nox4 is constitutively active and the level of transcription of the coding gene for this protein is a key in the process. Nox4 mRNA expression seemed to be induced after endoplasmic reticulum stress, shear stress, hypoxia, ischemia, transforming growth factor (TGF- $\beta$ 1) and TNF- $\alpha$  stimulation (Bedard et al., 2007). Nox 4 human gene is located on chromosome 11q14.2-q21 with 34 introns. Alternative splicing leads to five Nox4 splice variants (Nox4A, Nox4B, Nox4C, Nox4D and Nox4E) (Goyal et al., 2005). The Nox4A variant is active and the Nox4B and Nox4C variants seem to be inactive with dominant negative characteristics for ROS generation. Nox4D and Nox4E lack the transmembrane domain.

First described in kidney epithelial cells (Geiszt et al., 2000), Nox4 was also described in different type of cells such as endothelial cells, vascular smooth muscle cells, fibroblasts, cardiomyocytes, skeletal muscle cells, osteoclasts, adipocytes, neurons, microglia (Bedard and Krause, 2007) and chondrocytes (Rousset et al., 2015). The Nox4 subcellular localization remains unclear and the protein has been described in the nucleus, endoplasmic reticulum, focal adhesions, plasma membrane and mitochondria (Chen et al., 2008) (Van Buul et al., 2005) (Block et al., 2009) (Kuroda et al., 2005).

In contrast to all other isoforms, Nox4 is constitutively active and does not depend on cytosolic activator proteins or regulatory domains (Ambasta et al., 2004) (Martyn et al., 2006). To date, p22<sup>phox</sup> is the only stabilizing regulatory component required for Nox4/p22<sup>phox</sup> coupling and Nox4 function. Without any significant changes in the Nox4 expression level, the loss of p22<sup>phox</sup> expression abrogates Nox4 activity (Bedard and Krause, 2007). On the other hand, an increase in p22<sup>phox</sup> expression could enhance Nox4 activity (Martyn et al., 2006). Beyond p22<sup>phox</sup>, other potential partners have recently been described with an ability to enhance ROS-derived-Nox4 production (Lyle et al., 2009) (Takac et al., 2011) (Park et al., 2006). The mechanism through which Poldip2 (polymerase DNA-directed delta-interacting protein 2) could

increase Nox4 activity is complex and involves not only direct binding to p22<sup>phox</sup> but also interactions between Nox4 and cytoskeletal regions (Lyle et al., 2009). The poldip2/p22<sup>phox</sup> partnership has an impact on Nox4 expression and activity (Takac et al., 2011). A study of human aortic endothelial cells demonstrated that a cytosolic region of the Toll-like receptor 4 (TLR4) could interact with the Nox4 C-terminal region, mediating lipopolysaccharide-induced ROS production (Park et al., 2006) (Park et al., 2004). Transfection of Nox4 into melanoma cells increases total ROS levels in a Tks5 (tyrosine kinase substrate with 5 SH3 domains)-dependent manner (Diaz et al., 2009). Tks5 may be a new partner in the Nox4/p22<sup>phox</sup> complex. Protein disulfide isomerase (PDI), a dithiol/disulfide oxidoreductase chaperone of the thioredoxin superfamily regulates NADPH oxidase activity and particularly Nox4 (Janiszewski et al., 2005). The type of ROS produced by the Nox4 isoform presents another interesting difference: contrary to Nox1-3, which produce O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, the intrinsic function of Nox4 is to generate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which diffuses through the membrane to reach its target (Bedard and Krause, 2007) (Takac et al., 2011) (Martyn et al., 2006) (Serrander et al., 2007) (Nisimoto et al., 2014). The specific conformation of the Nox4 E-loop and the conserved histidines and cysteines (Cys-226, Cys-270, His-222) seem to be involved in endogenous superoxide dismutase activity (Takac et al., 2011).

## 6. Nox isoforms in the chondrocyte and involvement in osteoarthritis

The chondrocyte is a non-phagocytic cell and the ROS production used for cell signaling is mainly due to NADPH oxidases (Lepetsos and Papavassiliou, 2016). ATDC5 cell lines (derived from mouse teratocarcinoma cells) and primary chondrocytes derived from mouse embryos express Nox 1, 2 and 4 mRNA (Kim et al., 2010). The depletion of Nox 1 has no effect on ROS generation, whereas ROS generated by Nox2 or Nox4 are necessary for survival and differentiation in chondrogenesis. A recent study investigating the role of Nox2 on ECM in chondrocytes in mouse ATDC5 cells reported that after IL-1 $\beta$ -stimulation, mRNA expression of type II collagen and aggrecan was lowered, but Nox2-siRNA did not change expression of the same components, suggesting that Nox2 is not a key regulator in this pathway (Funato et al., 2017). Furthermore, the use of an inhibitor of Nox2 (4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride AEBSF), preventing complex assembly, did not influence hyaluronidase expression but showed that Nox2 seemed to mediate an increase in enzyme activity by acidification of the medium.

In both C-20/A4 and human primary chondrocytes, gp91<sup>phox</sup> (Nox2) mRNA is present (Moulton et al., 1998). The human immortalized cell line C-20/A4 also expresses several cytosolic components of NADPH Oxidase: p22<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, Rac2, mRNA but not p47<sup>phox</sup>. Among the other Nox, only Nox4 is well expressed (Grange et al., 2006). The use of different stimulatory agents has made it possible to identify which Nox protein is directly implicated in ROS production. Despite the presence of Nox2 transcript, PMA-stimulation did not have any effect on ROS production, suggesting that the Nox2 complex is not functional (Grange et al., 2006). Nox2 mRNA was present, but the absence of its partner p47<sup>phox</sup> could explain why Nox2 is not inducible and therefore not involved in ROS production. The same result was observed in porcine chondrocytes where PMA did not also increase the release of ROS, suggesting that Nox2 was not implicated (Hiran et al., 1997). Several studies have focused on the involvement of the Nox4 isoform in chondrocytes. Grange et al. (2006) showed that under IL-1 $\beta$  stimulation, C-20/A4 increased ROS production and MMP-1 synthesis through a Nox4-pathway (Grange et al., 2006).

In human articular chondrocytes, the Nox4 expression level initially increases and then decreases during the cell differentiation (Kim et al., 2010). Rousset et al. (2015) showed for the first time that both Nox4 and p22<sup>phox</sup> mRNA were highly expressed while the level of other Nox isoforms is substantially undetectable (Rousset et al., 2015) (Fig. 5).

	IL-1 $\beta$	Oleic palmitate	Dex
<b>Nox4 expression</b>	<b>Up-regulated</b>	<b>Up-regulated</b>	<b>Up-regulated</b>
<b>Interactive partner pathway</b>	p22 <sup>phox</sup> up-regulated		p38 MAP Kinase <i>ERK</i> *
<b>ROS enhanced</b>			
<b>Transcription factor</b>	<i>NF-kb</i> *, <i>AP-1</i> *, <i>HIF-1</i> *		
<b>Effector (protein)</b>	MMP-13, MMP-1	Caspase-3	MMP-13
<b>Consequence</b>	Matrix catabolism	Apoptosis	Apoptosis Matrix catabolism
<b>Article</b>	Rousset F, 2015	Fu D, 2016	Huang Y, 2018

**Fig. 5.** Knowledge of Nox4 hyper-activity in the human articular chondrocyte mRNA levels of MMP-1 and MMP-13 and the quantity of MMPs released in the cell culture supernatant were up-regulated after 24 h of stimulation with IL-1 $\beta$ . MMP mediation depended on Nox4 activity. Osteoarthritic chondrocytes treated with Oleic/palmitate enhanced expression of Nox4 and caspase 3, which are implicated in cell apoptosis. In the presence of dexamethasone (DEX), Nox4 expression of healthy chondrocytes increased. Dex triggered MMP-13 expression and apoptosis through the Nox4/ROS/p38 MAPK pathway. \* potential actors, but publication to date has established the existence of a common pathway between these factors and Nox4 in the human articular chondrocyte. (Adapted from Rousset F, 2015; Fu D, 2016; Huang Y, 2018).

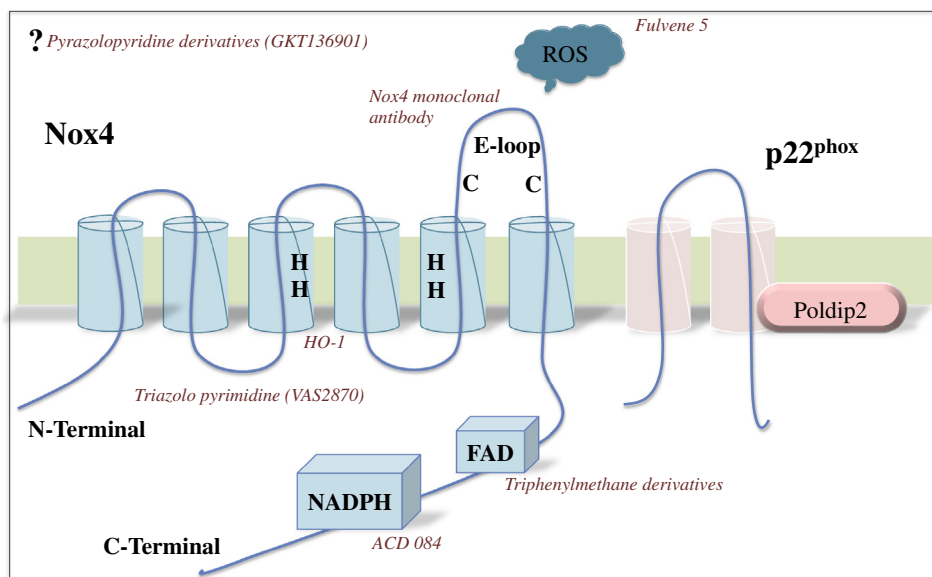
Compared to non-osteoarthritic conditions, the level of Nox4 mRNA expression was enhanced in osteoarthritic patients, and basal ROS production was higher (Rousset et al., 2015). Under IL-1 $\beta$  stimulation, the expression of both Nox4 and p22<sup>phox</sup> proteins was enhanced leading to an increase of Nox4-derived ROS generation. This is of particular interest, since in human articular cartilage, Nox4-induced-ROS are involved in critical redox sensitive pathways. The Nox4 isoform has been described as an actor of induced-apoptosis (Fu et al., 2016), as a genotoxic agent in nucleus pulposus cells through the MAPK and NF-kB pathways (Feng et al., 2017), and as an inductor of redox-sensitive transcription factors (AP-1, HIF-1). Furthermore, the deleterious impact can also lead to ECM proteolysis through catabolic MMP expression (Gowen et al., 1984). IL-1 $\beta$ -mediated Nox4 stimulation induces significant upregulation of MMP-1, MMP-13, and ADAMTs4 mRNA expression and an increase in the level of MMP-1 and MMP-13 protein released by the chondrocyte (Rousset et al., 2015). An additional Nox-dependent pathway triggered by TNF- $\alpha$  stimulation was recently described and shown to also contribute to MMP13-mediated degradation via the ERK pathway (Ma et al., 2018). Nox1 and NADPH oxidase cytosolic subunits including p47<sup>phox</sup> and Rac1 were found to be increased in mildly-damaged and damaged human articular cartilage. However, Nox4 expression was not evaluated in this study. As we might expect, this underlines that cartilage damage is related to an increase in Nox activity. The physiological reason for the coexistence of Nox4 and Nox1 in chondrocytes is an open question described by some authors. Besides MMP-13 upregulation, a Nox4/p38 MAPK pathway seems to underlie dexamethasone-induced apoptosis (Huang et al., 2018) (Fig. 5). Oleic palmitate also acts as a Nox4 inductor by upregulating the Nox4 protein level and by inducing apoptosis of the chondrocyte through caspase 3 (Fu et al., 2016).

These findings support the role of Nox family activity in cartilage differentiation, in the maintenance of homeostasis and in the pathophysiology of osteoarthritis. The role of Nox4 in the C20/A4 chondrocyte immortalized cell lines and in human articular chondrocytes has been highlighted. Although Nox4 function and mechanisms of activation remain poorly understood, Nox4 appears to be an essential actor in the OA process and it may be relevant to focus on this protein. The enzyme, its activity, its interaction with its partners and its conformation, constitute potential therapeutic targets for OA treatment strategies.

## 7. Therapeutic prospects

A complex network between many potential pathogenic factors leaves plenty of scope for basic research. Anti-TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  antagonists, and MMP-inhibitors have been described but do not offer much hope for the future (Morel et al., 2015). Our review focused on oxidative stress, and especially on the involvement of the Nox4 isoform in OA (Fig. 6). A wide range of both natural and synthetic antioxidants has been proposed for the treatment of OA. This strategy is based on increasing cellular antioxidant status. However, there is insufficient evidence to support the use of non-specific antioxidant agents in order to relieve symptomatic OA or to prevent structural changes in OA cartilage (Lepetos and Papavassiliou, 2016). Apocynin is a NADPH-oxidase inhibitor that has been assessed in vivo. Oral administration of apocynin was shown to partially reverse the inflammation-mediated inhibition of cartilage proteoglycan synthesis in a mouse model of zymosan-induced acute arthritis (Hougee et al., 2006). More targeted agents, such as the Polyphenol (S17834) could act as a potential ROS-scavenger and may also activate the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) (Altenhöfer et al., 2015). A small molecule such as Fulvene 5 could decrease Nox4-mediated ROS production (Altenhöfer et al., 2015). The triazolo pyrimidine VAS2870 is another small molecule that may inhibit the intra-molecular interactions of different domains of the enzyme and decrease Nox4 activity (Altenhöfer et al., 2012). Other strategies have been considered to inhibit Nox4 activity. A monoclonal antibody strategy with mAb5F9 targeting the amino acid sequence of the cytosolic tail of Nox4 decreases the generation of ROS (Zhang et al., 2011). A second monoclonal antibody (mAb8E9) targets the amino acid sequence of the extra cellular E-loop and decreases the generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Takac et al., 2011). The cytoplasmic domains have also been studied: the dehydrogenase domain could be targeted by ACD 084 and the flavoprotein by the triphenylmethane derivatives (Altenhöfer et al., 2015). The transmembrane heme-element seems to be inhibited by the Heme-Oxygenase-1 (HO-1): Nox4 activity appeared to be down-regulated (Rousset et al., 2013) and HO-1 over-expression reduced acute inflammatory arthritis in mice (Benallaoua et al., 2007). To our knowledge, no study could experiment the use of Nox4 inhibitor (pharmacological, siRNA) in mice model of OA. Some competitive peptide assays have been described but without any success when targeting the C-terminal tail, the B-loop or the N-





**Fig. 6.** Potential targets within the Nox4 enzyme

Fulvene 5 is a small molecule acting as a ROS-scavenger. The triazolo pyrimidine VAS2870 may inhibit intra-molecular interactions of different domains of the enzyme. The monoclonal antibody mAb8E9 targets the amino acid sequence of the extra-cellular-E-loop. ACD 084 targets the dehydrogenase domain, while triphenylmethane derivatives target the flavoprotein. The Heme-Oxygenase-1 (HO-1) inhibits the transmembrane heme-element. The mechanism of the GKT136901 compound is still unknown.

terminal p22<sup>phox</sup>-tail (Altenhöfer et al., 2015). Considering the peptidic strategy, no effect of peptidic inhibitors was found on Nox4 activity (Cifuentes-Pagano et al., 2015). More specific and selective strategies have already been validated in diabetic nephropathy with the Nox1/4 inhibitor GKT136901 (Sedeek et al., 2013). The mechanism of action of this pharmacological inhibitor remains unknown.

Other hypotheses also merit consideration. Desai et al. demonstrated the existence of post-translational regulation of Nox4 expression (Desai et al., 2014). They further showed that hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) promotes the ubiquitin-proteasomal system mediating the degradation of Nox4 in fibroblast cells. Activating Hic-5 may be a therapeutic strategy of interest in pathological conditions of Nox4 up-regulation. The up-regulation of a competitive inactive variant considered as a dominant negative (Nox4B) (Morel et al., 2015) may impact on Nox4 activity. Targeting the Nox4-potential-partners such as Poldip-2, TLR-4, protein disulphide-isomerase, Tyrosine kinase substrate 4/5 and NAD(P)H quinone oxidoreductase could be another means to regulate Nox4 activity.

It is important to remember that overall assessment of the patient is essential and non-pharmacological strategies have an important place in the treatment of OA. To date, the link between physical activity and Nox-dependent pathways has been explored mainly in cardiovascular diseases (Lee et al., 2015) (Adams et al., 2005). There are certainly a lot of science issues that remain unanswered and warrant investigation, and we believe it would be appropriate to focus on the Nox4 enzyme.

## 8. Perspectives and conclusions

Osteoarthritis is a public health challenge that leads to considerable disability and increased health-care costs. According to guidelines from Osteoarthritis Research Society International (OARSI), physical activity remains one of the first approved treatments for osteoarthritis and is appropriate for all individuals (McAlindon et al., 2014). Beyond the surgical options (joint replacement), the lack of efficiency of standard treatments (analgesics, anti-inflammatory drugs, intra-articular injections) in delaying onset or progression of the disease, has led to the emergence of new therapeutic strategies, with a view to slowing down and modulate the degenerative process. Research is currently focusing on both regulation of chronic inflammation, and cartilage regeneration (Goldring and Berenbaum, 2015). Both OA phenotype mechanisms and ageing are underpinned by oxidative stress and micro-inflammation, which may act together to promote the disruption of homeostasis and a shift towards catabolism. The role of Nox4 in OA has been highlighted.

Considering the Nox4 enzyme is promising at the cellular level. Validation of the Nox4 hypothesis in the animal model is needed before considering the threshold for clinical assessment.

## Acknowledgements

We thank Fiona Ecartot (EA3920, University Hospital Besancon, France) for editorial assistance.

## Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## Declarations of interest

None.

## References

- Abramson, S.B., 2008. Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthr. Cartil.* 16 (Suppl. 2), S15–S20. [https://doi.org/10.1016/S1063-4584\(08\)60008-4](https://doi.org/10.1016/S1063-4584(08)60008-4).
- Adams, V., Linke, A., Kränkel, N., Erbs, S., Gielen, S., Möbius-Winkler, S., Gummert, J.F., Mohr, F.W., Schuler, G., Hambrecht, R., 2005. Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. *Circulation* 111 (02), 555–562.
- Altenhöfer, S., Kleikers, P.W.M., Radermacher, K.A., Scheurer, P., Rob Hermans, J.J., Schiffrers, P., Ho, H., Winkler, K., Schmidt, H.H.H.W., 2012. The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 2327–2343. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1010-9>.
- Altenhöfer, S., Radermacher, K.A., Kleikers, P.W.M., Winkler, K., Schmidt, H.H.H.W., 2015. Evolution of NADPH oxidase inhibitors: selectivity and mechanisms for target engagement. *Antioxid. Redox Signal.* 23, 406–427. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5814>.
- Altindag, O., Erel, O., Aksoy, N., Seleik, S., Celik, H., Karaoglanoglu, M., 2007. Increased oxidative stress and its relation with collagen metabolism in knee osteoarthritis. *Rheumatol. Int.* 27, 339–344. <https://doi.org/10.1007/s00296-006-0247-8>.
- Ambasta, R.K., Kumar, P., Griendling, K.K., Schmidt, H.H.H.W., Busse, R., Brandes, R.P., 2004. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22<sup>phox</sup> is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 279, 45935–45941. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406486200>.
- Ashraf, S., Cha, B.-H., Kim, J.-S., Ahn, J., Han, I., Park, H., Lee, S.-H., 2016. Regulation of senescence associated signaling mechanisms in chondrocytes for cartilage tissue regeneration. *Osteoarthr. Cartil.* 24, 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.07.008>.
- Bánfi, B., Malgrange, B., Knisz, J., Steger, K., Dubois-Dauphin, M., Krause, K.-H., 2004a. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J. Biol. Chem.* 279, 46065–46072. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403046200>.
- Bánfi, B., Tirone, F., Durussel, I., Knisz, J., Moskwa, P., Molnár, G.Z., Krause, K.-H., Cox, J.A., 2004b. Mechanism of Ca<sup>2+</sup> activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J. Biol.*

- Chem. 279, 18583–18591. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310268200>.
- Bedard, K., Krause, K.-H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>.
- Bedard, K., Lardy, B., Krause, K.-H., 2007. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. *Biochimie* 89, 1107–1112. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.01.012>.
- Benallaoua, M., François, M., Bateau, F., Thelie, N., Shyy, J.Y.-J., Fitting, C., Tsagris, L., Boczkowski, J., Savouret, J.-F., Corvol, M.-T., Poiraudou, S., Rannou, F., 2007. Pharmacologic induction of heme oxygenase 1 reduces acute inflammatory arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 56, 2585–2594. <https://doi.org/10.1002/art.22749>.
- Bhosale, A.M., Richardson, J.B., 2008. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br. Med. Bull.* 87, 77–95. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldn025>.
- Bijlsma, J.W., Berenbaum, F., Lafeber, F.P., 2011. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet* 377, 2115–2126. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60243-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60243-2).
- Blanco, F.J., Ochs, R.L., Schwarz, H., Lotz, M., 1995. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am. J. Pathol.* 146, 75–85.
- Block, K., Gorin, Y., Abboud, H.E., 2009. Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 14385–14390. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906805106>.
- Blumenfeld, I., Livne, E., 1999. The role of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , insulin-like growth factor (IGF)-1, and interleukin (IL)-1 in osteoarthritis and aging of joints. *Exp. Gerontol.* 34, 821–829.
- Buckwalter, J.A., Woo, S.L., Goldberg, V.M., Hadley, E.C., Booth, F., Oegema, T.R., Eyre, D.R., 1993. Soft-tissue aging and musculoskeletal function. *J. Bone Joint Surg. Am.* 75, 1533–1548.
- Buckwalter, J.A., Saltzman, C., Brown, T., 2004. The impact of osteoarthritis: implications for research. *Clin. Orthop.* S6–15.
- Carlo, M.D., Loeser, R.F., 2003. Increased oxidative stress with aging reduces chondrocyte survival: correlation with intracellular glutathione levels. *Arthritis Rheum.* 48, 3419–3430. <https://doi.org/10.1002/art.11338>.
- Cencioni, C., Spallotta, F., Martelli, F., Valente, S., Mai, A., Zeiher, A.M., Gaetano, C., 2013. Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 17643–17663. <https://doi.org/10.3390/ijms140917643>.
- Charlier, E., Relic, B., Deroyer, C., Malaise, O., Neuville, S., Collée, J., Malaise, M.G., De Seny, D., 2016. Insights on molecular mechanisms of chondrocytes death in osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms1722146>.
- Chen, K., Kirber, M.T., Xiao, H., Yang, Y., Keaney, J.F., 2008. Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J. Cell Biol.* 181, 1129–1139. <https://doi.org/10.1083/jcb.200709049>.
- Chung, H.Y., Cesari, M., Anton, S., Marzetti, E., Giovannini, S., Seo, A.Y., Carter, C., Yu, B.P., Leeuwenburgh, C., 2009. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* 8, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2008.07.002>.
- Chuong Nguyen, M.V., Lardy, B., Palet, M.-H., Rousset, F., Berthier, S., Baillet, A., Grange, L., Gaudin, P., Morel, F., 2015. NADPH oxidases, Nox: new isoenzymes family. *Med. Sci.* 31, 43–52. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153101012>.
- Cifuentes-Pagano, M.E., Mejiles, D.N., Pagano, P.J., 2015. Nox inhibitors & therapies: rational design of peptidic and small molecule inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* 21, 6023–6035.
- De Deken, X., Wang, D., Many, M.C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., Dumont, J.E., Miot, F., 2000. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J. Biol. Chem.* 275, 23227–23233. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000916200>.
- DeGroot, J., Verzijl, N., Bank, R.A., Lafeber, F.P., Bijlsma, J.W., TeKoppele, J.M., 1999. Age-related decrease in proteoglycan synthesis of human articular chondrocytes: the role of nonenzymatic glycation. *Arthritis Rheum.* 42, 1003–1009. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199905\)42:5<1003::AID-ANR20>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199905)42:5<1003::AID-ANR20>3.0.CO;2-K).
- Desai, L.P., Zhou, Y., Estrada, A.V., Ding, Q., Cheng, G., Collawn, J.F., Thannickal, V.J., 2014. Negative regulation of NADPH oxidase 4 by hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) protein. *J. Biol. Chem.* 289, 18270–18278. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.562249>.
- Diaz, B., Shani, G., Pass, I., Anderson, D., Quintavalle, M., Courtneidge, S.A., 2009. Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation. *Sci. Signal.* 2, ra53. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000368>.
- Dozin, B., Malpeli, M., Camardella, L., Cancedda, R., Pietrangelo, A., 2002. Response of young, aged and osteoarthritic human articular chondrocytes to inflammatory cytokines: molecular and cellular aspects. *J. Int. Soc. Matrix Biol.* 21, 449–459.
- Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noël-Hudson, M.S., Dème, D., Virion, A., 1999. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cDNAs. *J. Biol. Chem.* 274, 37265–37269.
- Feng, C., Zhang, Y., Yang, M., Lan, M., Liu, H., Huang, B., Zhou, Y., 2017. Oxygen-sensing Nox4 generates genotoxic ROS to induce premature senescence of nucleus pulposus cells through MAPK and NF- $\kappa$ B pathways. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2017, 7426458. <https://doi.org/10.1155/2017/7426458>.
- Ferrández, M.L., Terencio, M.C., Ruhf, R., Vergés, J., Montell, E., Torrent, A., Alcaraz, M.J., 2014. Influence of age on osteoarthritis progression after anterior cruciate ligament transection in rats. *Exp. Gerontol.* 55, 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.03.010>.
- Fu, D., Lu, J., Yang, S., 2016. Oleic/palmitate induces apoptosis in human articular chondrocytes via upregulation of NOX4 expression and ROS production. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 46, 353–359.
- Funato, S., Yasuhara, R., Yoshimura, K., Miyamoto, Y., Kaneko, K., Suzawa, T., Chikazu, D., Mishima, K., Baba, K., Kamijo, R., 2017. Extracellular matrix loss in chondrocytes after exposure to interleukin-1 $\beta$  in NADPH oxidase-dependent manner. *Cell Tissue Res.* 368, 135–144. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2551-2>.
- Geiszt, M., Kopp, J.B., Várnai, P., Leto, T.L., 2000. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8010–8014. <https://doi.org/10.1073/pnas.130135897>.
- Gilbert, S.J., Duance, V.C., Mason, D.J., 2004. Does protein kinase R mediate TNF- $\alpha$  and ceramide-induced increases in expression and activation of matrix metalloproteinases in articular cartilage by a novel mechanism? *Arthritis Res. Ther.* 6, R46–R55. <https://doi.org/10.1186/ar1024>.
- Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016, 2017. *Lancet Lond. Engl.* 390, 1211–1259. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32154-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32154-2).
- Goldring, M.B., Berenbaum, F., 2015. Emerging targets in osteoarthritis therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* 22, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.03.004>.
- Goldring, M.B., Goldring, S.R., 2007. Osteoarthritis. *J. Cell. Physiol.* 213, 626–634. <https://doi.org/10.1002/jcp.21258>.
- Goldring, M.B., Otero, M., 2011. Inflammation in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 23, 471–478. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e328349c2b1>.
- Gowen, M., Wood, D.D., Ihrie, E.J., Meats, J.E., Russell, R.G., 1984. Stimulation by human interleukin 1 of cartilage breakdown and production of collagenase and proteoglycanase by human chondrocytes but not by human osteoblasts in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 797, 186–193.
- Goyal, P., Weissmann, N., Rose, F., Grimminger, F., Schäfers, H.J., Seeger, W., Hänze, J., 2005. Identification of novel Nox4 splice variants with impact on ROS levels in A549 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.089>.
- Grange, L., Nguyen, M.V.C., Lardy, B., Derouazi, M., Campion, Y., Trocme, C., Palet, M.-H., Gaudin, P., Morel, F., 2006. NAD(P)H oxidase activity of Nox4 in chondrocytes is both inducible and involved in collagenase expression. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1485–1496. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1485>.
- Grasberger, H., Refetoff, S., 2006. Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *J. Biol. Chem.* 281, 18269–18272. <https://doi.org/10.1074/jbc.C600095200>.
- Greene, M.A., Loeser, R.F., 2015. Aging-related inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 23, 1966–1971. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.01.008>.
- Hellevik, A.I., Johnsen, M.B., Langhammer, A., Baste, V., Furnes, O., Storheim, K., Zwart, J.A., Flugsrud, G.B., Nordsletten, L., 2018. Metabolic syndrome as a risk factor for total hip or knee replacement due to primary osteoarthritis: a prospective cohort study (the HUNT study and the Norwegian Arthroplasty Register). *Clin. Epidemiol.* 10, 83–96. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S145823>.
- Henrotin, Y., Deby-Dupont, G., Deby, C., De Bruyn, M., Lamy, M., Franchimont, P., 1993. Production of active oxygen species by isolated human chondrocytes. *Br. J. Rheumatol.* 32, 562–567.
- Henrotin, Y.E., Bruckner, P., Pujol, J.-P.L., 2003. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* 11, 747–755.
- Henrotin, Y., Kurz, B., Aigner, T., 2005. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthr. Cartil.* 13, 643–654. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.04.002>.
- Hiran, T.S., Moulton, P.J., Hancock, J.T., 1997. Detection of superoxide and NADPH oxidase in porcine articular chondrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 736–743.
- Hougee, S., Hartog, A., Sanders, A., Graus, Y.M.F., Hoijer, M.A., Garssen, J., van den Berg, W.B., van Beuningen, H.M., Smit, H.F., 2006. Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 531, 264–269. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.11.061>.
- Huang, Y., Cai, G.-Q., Peng, J.-P., Shen, C., 2018. Glucocorticoids induce apoptosis and matrix metalloproteinase-13 expression in chondrocytes through the NOX4/ROS/p38 MAPK pathway. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.03.001>.
- Iannone, F., Lapadula, G., 2003. The pathophysiology of osteoarthritis. *Ageing Clin. Exp. Res.* 15, 364–372.
- Janiszewski, M., Lopes, L.R., Carmo, A.O., Pedro, M.A., Brandes, R.P., Santos, C.X.C., Laurindo, F.R.M., 2005. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 280, 40813–40819. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509255200>.
- Jindai, K., Nielson, C.M., Vorderstrasse, B.A., Quiñones, A.R., 2016. Multimorbidity and functional limitations among adults 65 or older, NHANES 2005–2012. *Prev. Chronic Dis.* 13. <https://doi.org/10.5888/pcd13.160174>.
- Kim, K.S., Choi, H.W., Yoon, H.E., Kim, I.Y., 2010. Reactive oxygen species generated by NADPH oxidase 2 and 4 are required for chondrogenic differentiation. *J. Biol. Chem.* 285, 40294–40302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.126821>.
- Koike, M., Nojiri, H., Ozawa, Y., Watanabe, K., Muramatsu, Y., Kaneko, H., Morikawa, D., Kobayashi, K., Saita, Y., Sasho, T., Shirasawa, T., Yokote, K., Kaneko, K., Shimizu, T., 2015. Mechanical overloading causes mitochondrial superoxide and SOD2 imbalance in chondrocytes resulting in cartilage degeneration. *Sci. Rep.* 5, 11722. <https://doi.org/10.1038/srep11722>.
- Kozhemyakina, E., Lassar, A.B., Zelzer, E., 2015. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Dev. Camb. Engl.* 142, 817–831. <https://doi.org/10.1242/dev.105536>.
- Krause, K.-H., 2007. Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. *Exp. Gerontol.* 42, 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.10.011>.
- Kuroda, J., Nakagawa, K., Yamasaki, T., Nakamura, K., Takeya, R., Kuribayashi, F., Imajoh-Ohmi, S., Igarashi, K., Shibata, Y., Sueishi, K., Sumimoto, H., 2005. The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells. *Genes Cells* 10, 1139–1151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443>

- 2005.00907.x.
- Lambeth, J.D., 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 181–189. <https://doi.org/10.1038/nri1312>.
- Lambeth, J.D., Kawahara, T., Diebold, B., 2007. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 319–331. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.028>.
- Le Pen, C., Reygobellet, C., Gérentes, I., 2005. Financial cost of osteoarthritis in France. The “COART” France study. *Joint Bone Spine* 72, 567–570. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2005.01.011>.
- Lee, Y., Kwak, H.-B., Hord, J., Kim, J.-H., Lawler, J.M., 2015. Exercise training attenuates age-dependent elevation of angiotensin II type 1 receptor and Nox2 signaling in the rat heart. *Exp. Gerontol.* 70, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.07.016>.
- Lepetos, P., Papavassiliou, A.G., 2016. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim. Biophys. Acta* 1862, 576–591. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2016.01.003>.
- Li, J., Pei, M., 2012. Cell senescence: a challenge in cartilage engineering and regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev.* 18, 270–287. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2011.0583>.
- Loeser, R.F., Yammani, R.R., Carlson, C.S., Chen, H., Cole, A., Im, H.-J., Bursch, L.S., Yan, S.D., 2005. Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: potential role in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 52, 2376–2385. <https://doi.org/10.1002/art.21199>.
- Loeser, R.F., Gandhi, U., Long, D.L., Yin, W., Chubinskaya, S., 2014. Aging and oxidative stress reduce the response of human articular chondrocytes to insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1. *Arthritis Rheumatol.* 66, 2201–2209. <https://doi.org/10.1002/art.38641>.
- Loeser, R.F., Collins, J.A., Diekman, B.O., 2016. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 412–420. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.65>.
- Lotz, M., Loeser, R.F., 2012. Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone* 51, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.03.023>.
- Lyle, A.N., Deshpande, N.N., Taniyama, Y., Seidel-Rogol, B., Pounkova, L., Du, P., Papaharalambus, C., Lassègue, B., Griendling, K.K., 2009. Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 105, 249–259. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.193722>.
- Ma, C.-H., Wu, C.-H., Jou, I.-M., Tu, Y.-K., Hung, C.-H., Hsieh, P.-L., Tsai, K.-L., 2018. PKR activation causes inflammation and MMP-13 secretion in human degenerated articular chondrocytes. *Redox Biol.* 14, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.08.011>.
- Maneiro, E., Martín, M.A., de Andres, M.C., López-Armeda, M.J., Fernández-Suero, J.L., del Hoyo, P., Galdó, F., Arenas, J., Blanco, F.J., 2003. Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 48, 700–708. <https://doi.org/10.1002/art.10837>.
- Mariani, E., Pulsatelli, L., Facchini, A., 2014. Signaling pathways in cartilage repair. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 8667–8698. <https://doi.org/10.3390/ijms15086667>.
- Martyn, K.D., Frederick, L.M., von Loehneysen, K., Dinan, M.C., Knaus, U.G., 2006. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell. Signal.* 18, 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.03.023>.
- Marzetti, E., Hwang, A.-C., Tosato, M., Peng, L.-N., Calvani, R., Picca, A., Chen, L.-K., Landi, F., 2017. Age-related changes of skeletal muscle mass and strength among Italian and Taiwanese older people: results from the Milan EXPO 2015 survey and the I-Lan Longitudinal Aging Study. *Exp. Gerontol.* 102, 76–80. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.12.008>.
- McAlindon, T.E., Bannuru, R.R., Sullivan, M.C., Arden, N.K., Berenbaum, F., Bierma-Zeinstra, S.M., Hawker, G.A., Henrotin, Y., Hunter, D.J., Kawaguchi, H., Kwok, K., Lohmander, S., Rannou, F., Roos, E.M., Underwood, M., 2014. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 22, 363–388. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.01.003>.
- McCulloch, K., Litherland, G.J., Rai, T.S., 2017. Cellular senescence in osteoarthritis pathology. *Aging Cell* 16, 210–218. <https://doi.org/10.1111/acel.12562>.
- Meng, D., Lv, D.-D., Fang, J., 2008. Insulin-like growth factor-I induces reactive oxygen species production and cell migration through Nox4 and Rac1 in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* 80, 299–308. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn173>.
- Mitani, Hidetoshi, Takahashi, I., Onodera, K., Bae, J.-W., Sato, T., Takahashi, N., Sasano, Y., Igarashi, K., Mitani, Hideo, 2006. Comparison of age-dependent expression of aggrecan and ADAMTSs in mandibular condylar cartilage, tibial growth plate, and articular cartilage in rats. *Histochem. Cell Biol.* 126, 371–380. <https://doi.org/10.1007/s00418-006-0171-8>.
- Mobasheri, A., Matta, C., Zákány, R., Musumeci, G., 2015. Chondrorescence: definition, hallmarks and potential role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Maturitas* 80, 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.12.003>.
- Morel, F., 2007. Molecular aspects of chronic granulomatous disease. “The NADPH oxidase complex”. *Bull. Acad. Natl. Med.* 191, 377–390 (discussion 390–392).
- Morel, F., Rousset, F., Vu Chuong Nguyen, M., Trocme, C., Grange, L., Lardy, B., 2015. NADPH oxidase Nox4, a putative therapeutic target in osteoarthritis. *Bull. Acad. Natl. Med.* 199, 673–686 (discussion 686–687).
- Moulton, P.J., Goldring, M.B., Hancock, J.T., 1998. NADPH oxidase of chondrocytes contains an isoform of the gp91phox subunit. *Biochem. J.* 329 (Pt 3), 449–451.
- Nisimoto, Y., Diebold, B.A., Cosentino-Gomes, D., Constantino-Gomes, D., Lambeth, J.D., 2014. Nox4: a hydrogen peroxide-generating oxygen sensor. *Biochemistry (Mosc)* 53, 5111–5120. <https://doi.org/10.1021/bi500331y>.
- Ozawa, T., 1997. Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiol. Rev.* 77, 425–464. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.2.425>.
- Paillard, T., 2014. Exercise and bone mineral density in old subjects: theoretical and practical implications. *Geriatr. Psychol. Neuropsychiatr. Vieil.* 12, 267–273. <https://doi.org/10.1684/pnv.2014.0491>.
- Pantano, C., Reynaert, N.L., van der Vliet, A., Janssen-Heininger, Y.M.W., 2006. Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1791–1806. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1791>.
- Park, H.S., Jung, H.Y., Park, E.Y., Kim, J., Lee, W.J., Bae, Y.S., 2004. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* (173), 3589–3593.
- Park, H.S., Chun, J.N., Jung, H.Y., Choi, C., Bae, Y.S., 2006. Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 72, 447–455. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.09.012>.
- Picca, A., Lezza, A.M.S., Leeuwenburgh, C., Pesce, V., Calvani, R., Landi, F., Bernabei, R., Marzetti, E., 2017. Fueling inflamm-aging through mitochondrial dysfunction: mechanisms and molecular targets. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18050933>.
- Rahmati, M., Nalesso, G., Mobasheri, A., Mozafari, M., 2017. Aging and osteoarthritis: central role of the extracellular matrix. *Ageing Res. Rev.* 40, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.07.004>.
- Rathakrishnan, C., Tiku, K., Raghavan, A., Tiku, M.L., 1992. Release of oxygen radicals by articular chondrocytes: a study of luminol-dependent chemiluminescence and hydrogen peroxide secretion. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 7, 1139–1148. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650071005>.
- Rousset, F., Nguyen, M.V.C., Grange, L., Morel, F., Lardy, B., 2013. Heme oxygenase-1 regulates matrix metalloproteinase MMP-1 secretion and chondrocyte cell death via Nox4 NADPH oxidase activity in chondrocytes. *PLoS One* 8, e66478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066478>.
- Rousset, F., Hazane-Puch, F., Pinoso, C., Nguyen, M.V.C., Grange, L., Soldini, A., Rubens-Duval, B., Dupuy, C., Morel, F., Lardy, B., 2015. IL-1beta mediates MMP secretion and IL-1beta neosynthesis via upregulation of p22(phox) and NOX4 activity in human articular chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* 23, 1972–1980. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.02.167>.
- Ruiz-Romero, C., López-Armeda, M.J., Blanco, F.J., 2006. Mitochondrial proteomic characterization of human normal articular chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* 14, 507–518. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.12.004>.
- Sedeek, M., Gutsol, A., Montezano, A.C., Burger, D., Nguyen Dinh Cat, A., Kennedy, C.R.J., Burns, K.D., Cooper, M.E., Jandeleit-Dahm, K., Page, P., Szyndralewicz, C., Heitz, F., Hebert, R.L., Touyz, R.M., 2013. Renoprotective effects of a novel Nox1/4 inhibitor in a mouse model of Type 2 diabetes. *Clin. Sci. (Lond.)* 124, 191–202. <https://doi.org/10.1042/CS20120330>. (1979).
- Sellam, J., Berenbaum, F., 2013. Is osteoarthritis a metabolic disease? *Joint Bone Spine* 80, 568–573. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2013.09.007>.
- Serrander, L., Cartier, L., Bedard, K., Banfi, B., Lardy, B., Plastre, O., Sienkiewicz, A., Fórró, L., Schlegel, W., Krause, K.-H., 2007. NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem. J.* 406, 105–114. <https://doi.org/10.1042/BJ20061903>.
- Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naito, S., Hattori, M., Sakaki, Y., Sumimoto, H., 2001. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J. Biol. Chem.* 276, 1417–1423. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007597200>.
- Takac, I., Schröder, K., Zhang, L., Lardy, B., Anilkumar, N., Lambeth, J.D., Shah, A.M., Morel, F., Brandes, R.P., 2011. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. *J. Biol. Chem.* 286, 13304–13313. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.192138>.
- Takahashi, M., Kushida, K., Ohishi, T., Kawana, K., Hoshino, H., Uchiyama, A., Inoue, T., 1994. Quantitative analysis of crosslinks pyridinoline and pentosidine in articular cartilage of patients with bone and joint disorders. *Arthritis Rheum.* 37, 724–728.
- Tiku, M.L., Liesch, J.B., Robertson, F.M., 1990. Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. Enhancement by cytokines. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* (145), 690–696.
- Tiku, M.L., Yan, Y.P., Chen, K.Y., 1998. Hydroxyl radical formation in chondrocytes and cartilage as detected by electron paramagnetic resonance spectroscopy using spin trapping reagents. *Free Radic. Res.* 29, 177–187.
- Toh, W.S., Britberg, M., Farr, J., Foldager, C.B., Gomoll, A.H., Hui, J.H.P., Richardson, J.B., Roberts, S., Spector, M., 2016. Cellular senescence in aging and osteoarthritis. *Acta Orthop.* 87, 6–14. <https://doi.org/10.1080/17453674.2016.1235087>.
- Van Buul, J.D., Fernandez-Borja, M., Anthony, E.C., Hordijk, P.L., 2005. Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 308–317. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.308>.
- van der Kraan, P., Matta, C., Mobasheri, A., 2017. Age-related alterations in signaling pathways in articular chondrocytes: implications for the pathogenesis and progression of osteoarthritis - a mini-review. *Gerontology* 63, 29–35. <https://doi.org/10.1159/000448711>.
- van Oostrom, S.H., Picavet, H.S.J., de Bruin, S.R., Stirbu, I., Korevaar, J.C., Schellevis, F.G., Baan, C.A., 2014. Multimorbidity of chronic diseases and health care utilization in general practice. *BMC Fam. Pract.* 15 (61). <https://doi.org/10.1186/1471-2296-15-61>.
- Vignais, P.V., 2002. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1428–1459.
- Weber, D., Stuetz, W., Toussaint, O., Debacq-Chainiaux, F., Dollé, M.E.T., Jansen, E., Gonos, E.S., Franceschi, C., Sikora, E., Hervonen, A., Breusing, N., Sindlinger, T., Moreno-Villanueva, M., Bürkle, A., Grune, T., 2017. Associations between specific redox biomarkers and age in a large European cohort: the MARK-AGE project. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2017, 1401452. <https://doi.org/10.1155/2017/1401452>.
- Wojdasiewicz, P., Poniatowski, L.A., Szukiewicz, D., 2014. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediat. Inflamm.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/561459>.

- Xu, H., Chen, Y., Chen, L., Li, J., Zhang, W., Wu, B., 2008. Effect of various intervention factors on MMP-3 and TIMP-1 level in synovial fluid in knee joints with osteoarthritis. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 33, 47–52.
- Yasuhara, R., Miyamoto, Y., Akaike, T., Akuta, T., Nakamura, M., Takami, M., Morimura, N., Yasu, K., Kamijo, R., 2005. Interleukin-1beta induces death in chondrocyte-like ATDC5 cells through mitochondrial dysfunction and energy depletion in a reactive nitrogen and oxygen species-dependent manner. *Biochem. J.* 389, 315–323. <https://doi.org/10.1042/BJ20041996>.
- Yin, W., Park, J.-I., Loeser, R.F., 2009. Oxidative stress inhibits insulin-like growth factor-I induction of chondrocyte proteoglycan synthesis through differential regulation of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt and MEK-ERK MAPK signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 284, 31972–31981. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.056838>.
- Yudoh, K., Nakamura, H., Masuko-Hongo, K., Kato, T., Nishioka, K., 2005. Arthritis Res. Ther. 7, R904. [No Title]. <https://doi.org/10.1186/ar1765>.
- Zhang, L., Nguyen, M.V.C., Lardy, B., Jesaitis, A.J., Grichine, A., Rousset, F., Talbot, M., Paclat, M.-H., Qian, G., Morel, F., 2011. New insight into the Nox4 subcellular localization in HEK293 cells: first monoclonal antibodies against Nox4. *Biochimie* 93, 457–468. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.11.001>.



### 1.3 Axes et Objectifs de travail

L'arthrose est une pathologie chronique dégénérative invalidante, fréquente, multifactorielle, grave et coûteuse. Deux avancées conceptuelles récentes soulignent une vision pluritissulaire de la maladie et un abord clinique phénotypique, permettant d'envisager l'individualisation de la stratégie thérapeutique (Sellam, 2015). Le chondrocyte est la cellule cible et Nox4 est un acteur d'intérêt dans le processus physiopathologique d'arthrose. Une publication récente montre l'intérêt particulier porté sur cette NADPH Oxydase (Wegner et al., 2019).

La thématique de l'arthrose est abordée de manière historique au sein du laboratoire. Parmi les 11 articles répondant à la recherche *pubmed* « Nox4 osteoarthritis », 5 ont été publiés par le GREPI. Le laboratoire a une expérience spécifique autour du stress oxydant et des NADPH oxydases. La Nox4, son activité, son interaction avec ses partenaires et sa conformation constituent des enjeux scientifiques d'intérêt et autant de cibles thérapeutiques potentielles pour l'élaboration de stratégies thérapeutiques anti-arthrosique.

Au cours de ce travail de thèse, le lien entre Nox4 et l'arthrose a été abordé sous trois points de vue complémentaires.

Le volet structural a permis d'approcher les techniques de biologie moléculaire pour une cristallisation de la boucle E de Nox4 avec une perspective thérapeutique. Notre objectif était d'obtenir le peptide d'intérêt sous forme pure.

Le volet cellulaire a permis d'aborder la culture de chondrocytes primaires humains et de s'interroger sur l'effet d'une stimulation cellulaire à haute dose d'IGF-1, sur la voie de signalisation de la Nox4 humaine.

Le volet animal a permis d'évaluer de nouvelles technologies au service de l'expérimentation animale et d'évaluer un nouveau modèle d'arthrose selon des critères de jugement robustes et novateurs. Notre objectif était de savoir si l'injection intra articulaire d'un lentivirus l'IL-1 $\beta$  pouvait induire un nouveau modèle d'arthrose murin, proche de la physiopathologie de la maladie.

## Expérimental

### 2.1 Volet Structural – Projet de cristallisation de la boucle E de la NADPH Oxydase 4.

*Ce volet structural représente 8 mois d'expérimentations. Le travail est exploratoire et n'a pas constitué le corps principal de la thèse. Les hypothèses restent à confirmer et les données ne sont pas publiables.*

#### Introduction

Les travaux de recherche ciblant la protéine Nox4 et tout particulièrement la boucle E de Nox4 (N4bE) semblent constituer une piste pour l'élaboration d'un nouveau principe actif. Il reste à expérimenter des étapes de validation de cette cible *in vitro* et *in vivo*. N4bE présente deux des caractéristiques d'une cible thérapeutique stratégique. La boucle E est impliquée dans la fonction de Nox4 au travers de son activité de dismutation spontanée permettant la production de peroxyde d'hydrogène. D'autre part, un anticorps spécifique est capable de se fixer sur la boucle E et de moduler l'activité de cette boucle suite à une interaction *in vitro* (Zhang et al., 2011) (Takac et al., 2011). Aussi, la détermination de la structure tridimensionnelle de N4bE permettrait une meilleure compréhension de la fonction biologique de cette cible thérapeutique. Une analyse structurale à haute résolution par rayons X du produit de cristallisation de N4bE est envisagée. La difficulté d'obtenir un peptide dont la conformation tridimensionnelle correspond à la conformation fonctionnelle *in vivo* serait en partie levée par l'usage d'un anticorps spécifique dont le laboratoire dispose. L'anticorps monoclonal 8E9 est une immunoglobuline de type M produite dans la souris (Balb/c) dont l'épitope est dirigé vers N4bE. L'utilisation de protéines recombinantes tronquées de Nox4 permettrait de définir l'épitope de 8E9 en conditions dénaturantes : H<sup>222</sup> - E<sup>241</sup>. Le 8E9 reconnaissait également la protéine dans des HEK 293 T-tet r-tetracycline inducible Nox4 en cytométrie en flux et en immunofluorescence : ces résultats montrent que le 8E9 reconnaît également N4bE dans sa conformation native *in vitro* (Zhang et al., 2011). De fait, déterminer la structure du complexe natif « ligand (N4bE) – anticorps (8E9) » fournirait les informations structurales et les interactions nécessaires au processus de recherche

pharmacologique. La cristallisation nécessite une solution de protéines solubles pures, en grande quantité et très concentrée. L'objectif de co-cristallisation du complexe « N4bE - 8E9 » est donc un projet à long terme. L'objectif du travail exposé était d'obtenir une solution pure de peptide N4bE et une solution pure d'anticorps 8E9. Les données ne sont pas publiées.

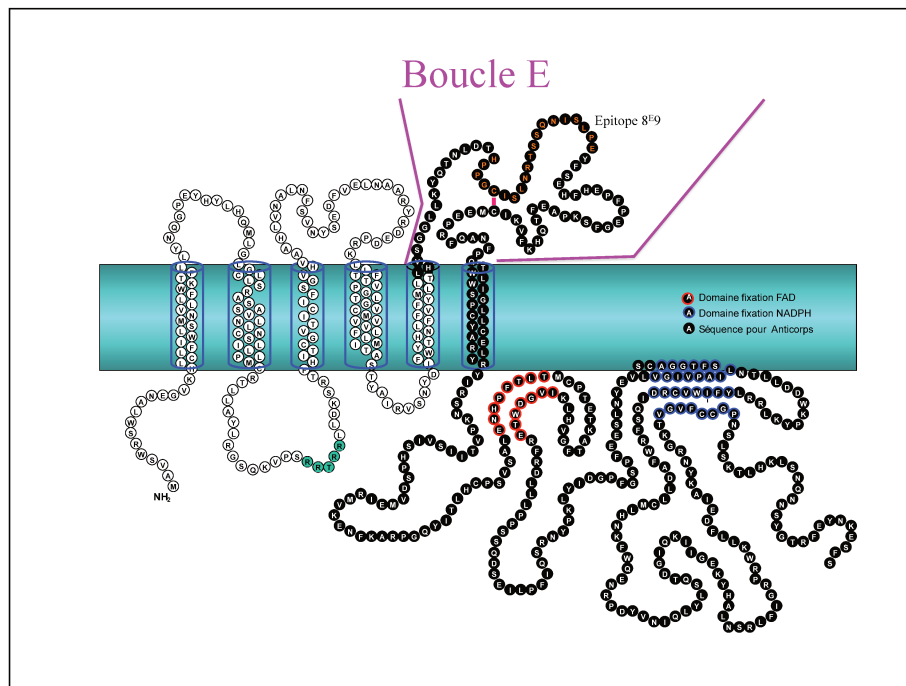


Figure 1. Schéma de la séquence protéique de Nox4 et de la topologie de la boucle E.

## Matériels Méthodes et Résultats

### 1. Production d'un vecteur

Nous utilisons le système pET (vecteur pET30) permettant l'expression d'une protéine recombinante en bactérie. La construction d'ADN commandée est nommée pET30b N4bE : la séquence code pour le peptide d'intérêt (N4bE) et pour des séquences permettant l'identification et la purification de ce peptide.

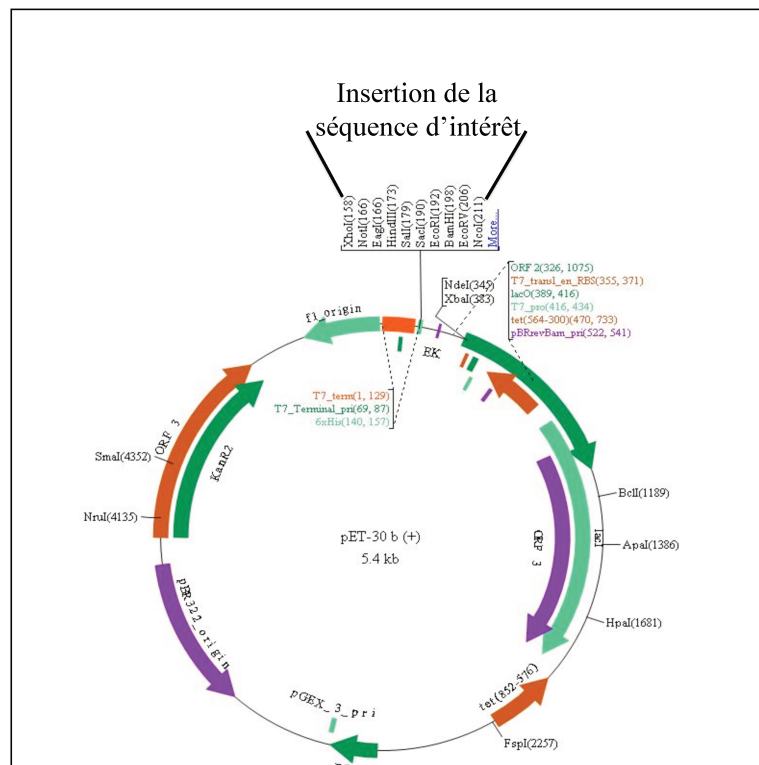
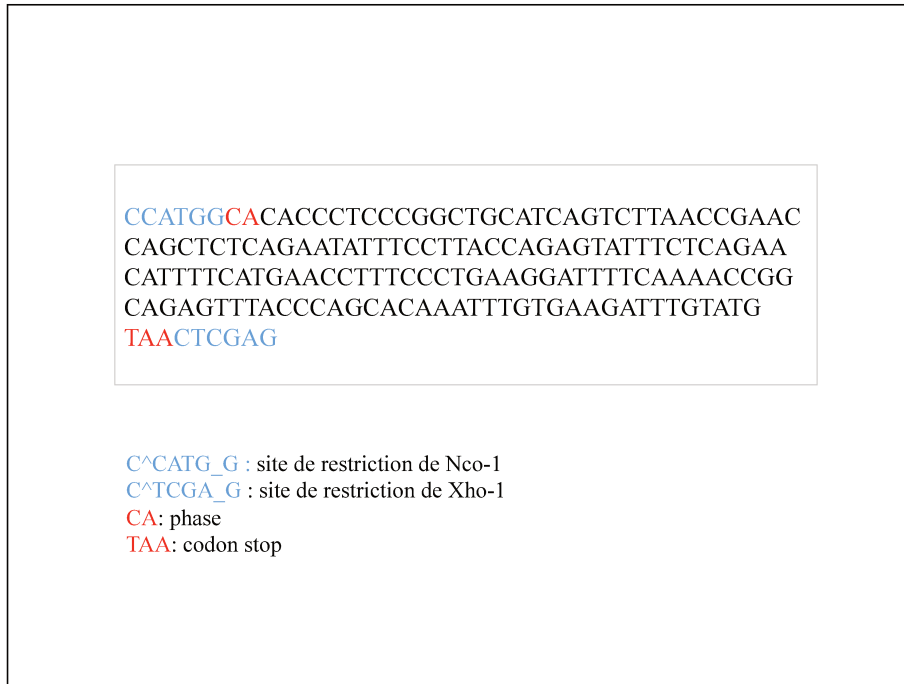
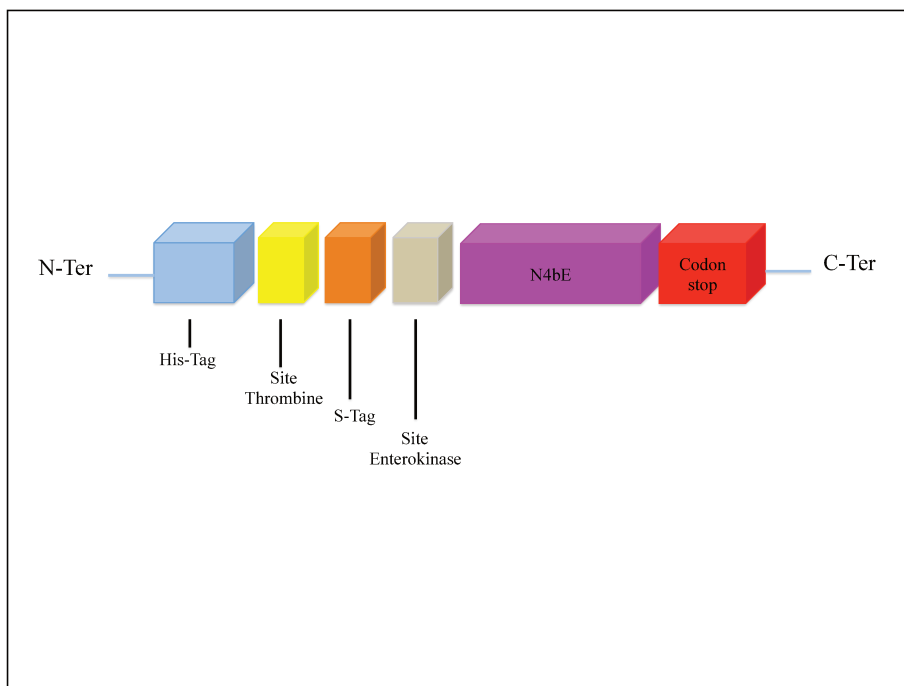


Figure 2. Carte du vecteur pET30b



**Figure 3.** *Séquence nucléotidique codant pour le peptide d'intérêt entre les deux sites de restrictions du site de multiclonaage*

Cette séquence est clonée dans le site de multiclonaage (MCS) du vecteur pET30b de 5,4 kb, avec les sites de restriction Nco1 – Xho1. Une séquence codant pour un gène de résistance à la Kanamycine permet la sélection des bactéries transfectées par le vecteur (antibiotique de sélection en bactérie).



**Figure 4.** *Peptide issu de la séquence nucléotidique commandée*

*Légende : Peptide traduit comprenant la séquence du peptide d'intérêt (N4bE) et 43 acides aminés supplémentaires en amont.*

D'après l'outil *ExPaSy-ProtParam*, la séquence d'ADN suivante correspond à un peptide de 288 nucléotides (96 acides aminés) avec un poids moléculaire de Mw= 10 838,07 kDa et avec la formule atomique suivante C<sub>473</sub> H<sub>706</sub> N<sub>138</sub> O<sub>143</sub> S<sub>7</sub>.

atg	cac	cat	cat	cat	cat	cat	tct	tct	ggt	ctg	gtg	
<b>M</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	S	S	G	<b>L</b>	<b>V</b>	
cca	cgc	ggt	tct	ggt	atg	aaa	gaa	acc	gct	gct	gct	
<b>P</b>	<b>R</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	G	M	<b>K</b>	E	T	A	A	A	
aaa	ttc	gaa	cgc	cag	cac	atg	gac	agc	cca	gat	ctg	
K	F	E	R	Q	H	M	D	S	P	D	L	
ggt	acc	gac	gac	gac	gac	aag	gcc	atg	gca	cac	cct	
G	T	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>K</b>	A	<u>M</u>	A	H	P	
ccc	ggc	tgc	atc	agt	ctt	aac	cga	acc	agc	tct	cag	
P	G	C	I	S	L	N	R	T	S	S	Q	
aat	att	tcc	tta	cca	gag	tat	ttc	tca	gaa	cat	ttt	
N	I	S	L	P	E	Y	F	S	E	H	F	
cat	gaa	cct	ttc	cct	gaa	gga	ttt	tca	aaa	ccg	gca	
H	E	P	F	P	E	G	F	S	K	P	A	
gag	ttt	acc	cag	cac	aaa	ttt	gtg	aag	att	tgt	atg	<b>taa</b>
E	F	T	Q	H	K	F	V	K	I	C	M	-

**H**: Site Polyhistidine

**L**: Site thrombine

**K**: S-tag

**D**: Site enterokinase

Soulignage : boucle E

## 2. Production d'un peptide par une bactérienne compétente

Nous utilisons l'*Escherichia Coli* BL21 (DE3), espèce bactérienne compétente pour la production de protéine à partir d'un plasmide.

La transformation bactérienne suivait le protocole suivant :

- Décongélation d'un tube de BL21 et prélèvement de 80µl de solution bactérienne dans un eppendorf.
- Ajout de 1µl du plasmide conditionné à 0,1µg/µl et mélanger délicatement sans vortex.
- Incubation du mélange dans la glace pendant 30 minutes.
- Choc thermique en plongeant l'eppendorf à 42°C pendant 45 secondes.
- Incubation immédiate dans de la glace pendant 5 minutes.
- Ajouter 500µl de SOC stocké à température ambiante
- Incuber le mélange à 37°C pendant 30 minutes

- Centrifuger à 13000g pendant 3 minutes et jeter le surnageant.
- Prélever le culot bactérien et l'ensemencer en boîte de gélose à la (Cf 50µg/ml) pour réaliser un isolement.
- Incubation toute la nuit à 37°C.

**La culture bactérienne** suivait le protocole suivant :

**Mini-culture bactérienne**

- Suspension d'une colonie bactérienne isolée dans une solution de culture bactérienne avec l'antibiotique de sélection, la kanamycine (Cf = 50µg/ml).
- Incuber à 37°C sous agitation constante pendant 4 heures.

A partir de ces mini-cultures bactériennes, réalisation d'une **Maxi-culture bactérienne** en Erlenmeyers stérilisés. Le volume de culture bactérienne initiale était de 600ml.

- La sélection bactérienne est faite par de la Kanamycine (Cf = 50µg/ml).
- Incubation à 37°C sous agitation constante à 220rpm jusqu'à obtenir une densité optique (DO) de 0,4 à 0,8 à la longueur d'onde de 600nm. Après 1h30, la DO était de 0,9.

**L'induction de la transcription du gène d'intérêt** et l'initiation de l'expression du peptide d'intérêt N4bE dans les bactéries sont réalisées par une incubation en présence de d'Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) à la concentration finale de Cf = 1mM, à 18°C, toute la nuit, sous agitation constante. Le lendemain, les volumes entiers de solution bactérienne sont centrifugés et les culots bactériens secs stockés à -80°C.

**3. Extraction protéique**

Nous associons une lyse chimique à une lyse mécanique.

Le tampon de lyse était réalisé le jour même et mélangé avec le culot bactérien avant la sonication avec un Vf = 10ml :

- |  |      |
|--|------|
| ▪ Tampon 10X   | 1X   |
| <i>(Tris-Hcl 25mM ; Nacl 137mM ; KCl 5mM ; Na.HPO. 0,7mM ; pH 7,4)</i> |      |
| ▪ EDTA   | 1mM  |
| ▪ β-mercapto-éthanol   | 2mM  |
| ▪ Imidazole  | 10mM |

- Triton X-100 1%
- Inhibiteur de protéase (*cOmplete™ protease inhibitor cocktail*) 1/50<sup>ème</sup>

La sonication était réalisée par 6 cycles de 1 minutes (30 secondes d'inter-cycle) avec une sonde de 3mm, SH70G. On obtenait un lysat bactérien que nous avons centrifugé : 17500 g, 20 minutes, à 20°C.

Le schéma expérimental global de production et de purification du peptide N4bE est représenté ci-dessous. Le volume de culture bactérienne initiale était de 600ml.

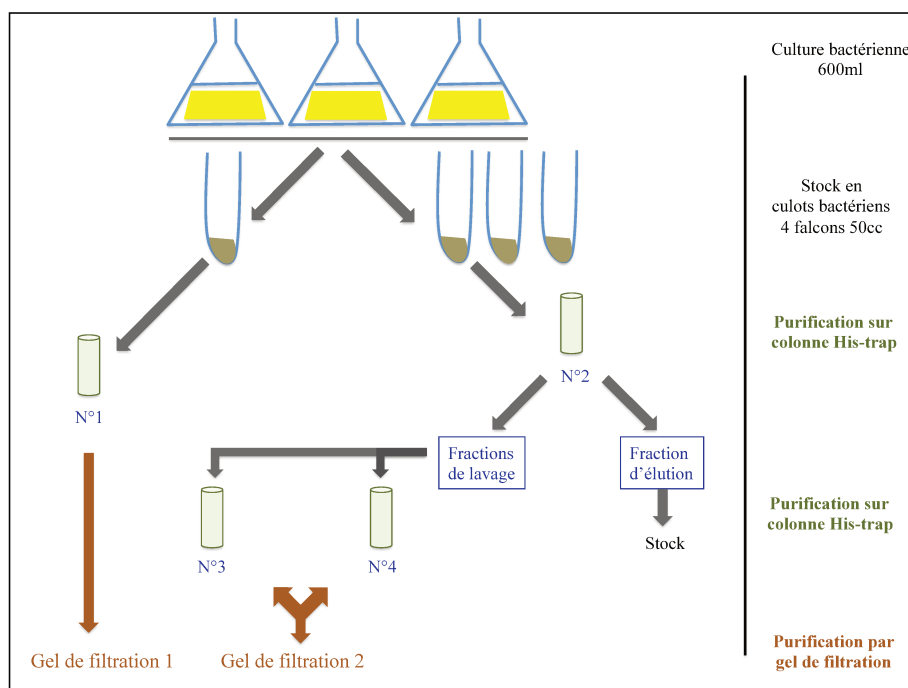


Figure 5. Schéma global du plan expérimental de production et de purification du peptide N4bE.

#### 4. Purification de peptide par chromatographie d'affinité

L'objectif est d'obtenir une solution pure de N4bE recombinant, produit par la bactérie, en éliminant les autres protéines issues de cette bactérie hôte. La technique est une chromatographie d'affinité sur colonne His-trap (1ml). Cette colonne d'affinité est à base d'ions métalliques de type nickel auxquels les résidus poly-histidines du peptide recombinant se lient avec une affinité de l'ordre du micromolaire.



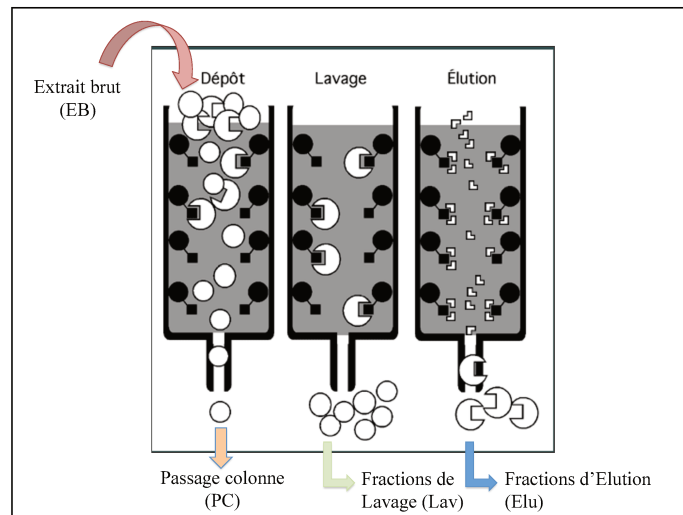


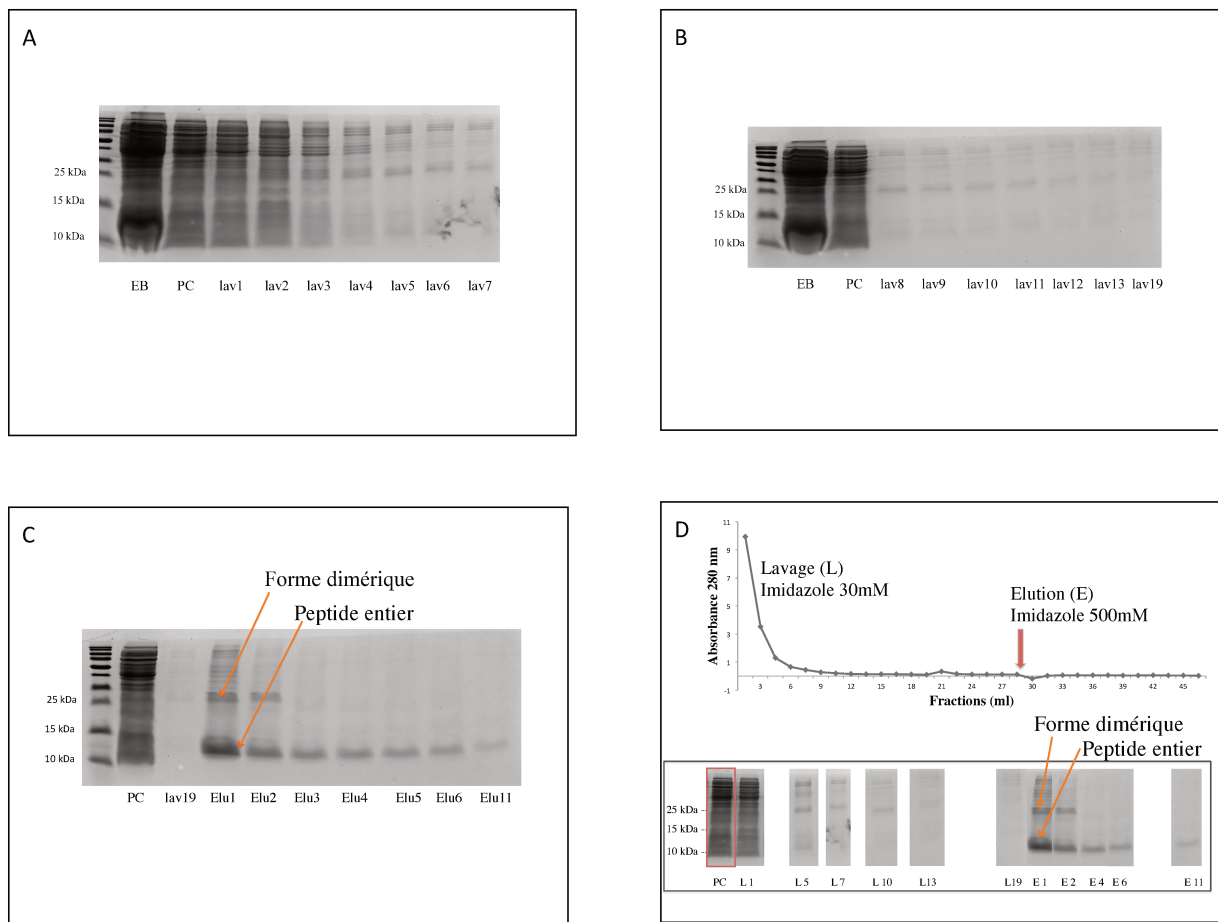
Figure 6. Schéma d'une chromatographie d'affinité sur colonne

Nous avons suivi le protocole suivant

- Réserver 200-300µl du lysat bactérien en contrôle d'extrait brut (EB).
- Equilibration de la colonne avec le tampon d'équilibration.
- Dépôt : Passage en colonne du lysat bactérien (3 fois en circuit fermé).
- Lavage de la colonne avec le tampon de lavage.
- Elution avec le tampon d'éluion permettant le recueil des peptides d'intérêt.

Les tampons pour les étapes de la purification étaient préparés le jour même

	Tampon d'Equilibration	Tampon de Lavage	Tampon d'Elution
<b>Volume final</b>	50ml	40ml	30ml
<b>Tampon Tris-Hcl 10X</b>	5ml	4ml	3ml
<b>DTT 1M</b>	50µl (1mM)	40µl (1mM)	30µl (1mM)
<b>Inhibiteur de protéases</b>	200µl	200µl	600µl
<b>Imidazole 1M</b>	0,5ml (10mM)	2ml (30mM)	15ml (500mM)
<b>Eau stérile</b>	44,25ml	33,76ml	11,37ml



**Figure 7. Purification du peptide Nox4bE par chromatographie d'affinité. Gel au Bleu de Coomassie en condition réduite.**

Légende : Panels A et B : fractions de lavage (19 fractions de 1,5ml). Panel C : fractions d'éluion (11 fractions de 1,5ml). Migration sur Gel à 15% d'acrylamide. Dépôt de 20 µl par puits. Coloration au bleu de Coomassie (Panels A, B et C). L'absorbance à 280nm était réalisée par spectrométrie pour chaque fraction (Panel D).

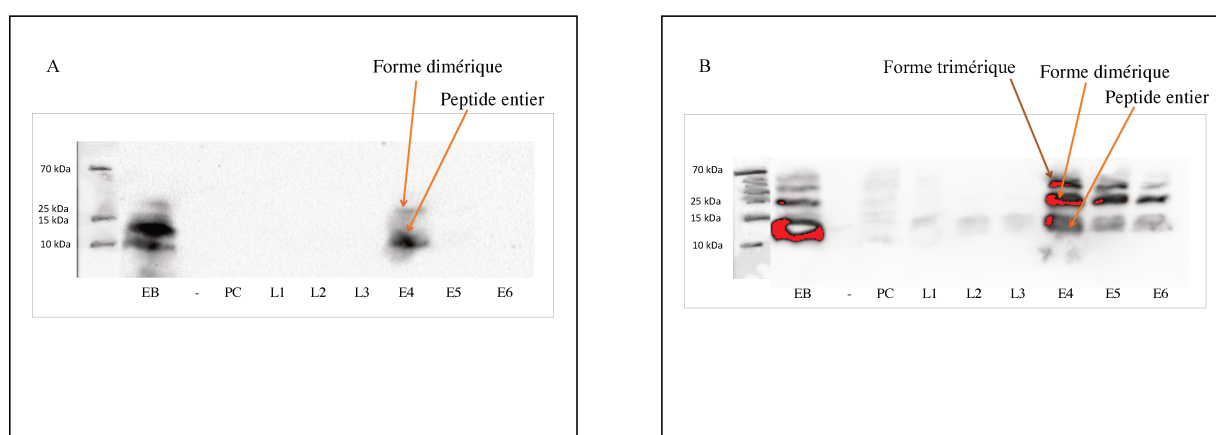
### Conclusion à l'issue des chromatographies d'affinité

Les fractions d'éluion mettent en évidence une bande de 11kDa pouvant correspondre à N4bE (avec les sites de coupure, la séquence de polyhistidine et le S-tag). Il existe une seconde bande de poids moléculaire supérieur dont l'éluion est plus courte avec un poids moléculaire estimé à 24 kDa. Il pourrait s'agir d'une forme dimérique du peptide d'intérêt ou d'une autre protéine. Il existe également quelques bandes de poids moléculaire supérieur. Nous faisons l'hypothèse que travailler en condition réduite pourrait influencer les résultats et permettre la mise en évidence ou pas de monomère ou dimères.

## 5. Concentration des peptides

Un volume de 24 ml de fractions d'élution est centrifugé dans des centricons (Amicon Ultra 0,5ml, centrifugal filter MWCO 3kDa, Sigma Aldrich) par cycles de 7500g pendant 12 minutes, jusqu'à obtenir un volume final de 1100µl.

## 6. Analyse protéique par Immuno-Blot (Western-Blot)



**Figure 8. Immuno-Blot après chromatographie d'affinité.**

*Légende : Migration sur gel en condition non réduite : Immuno-Blot anti-Nox4 (Panel A) et anti-histidine (Panel B).*

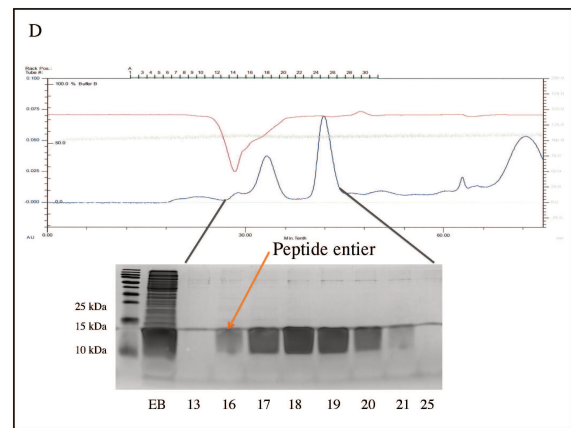
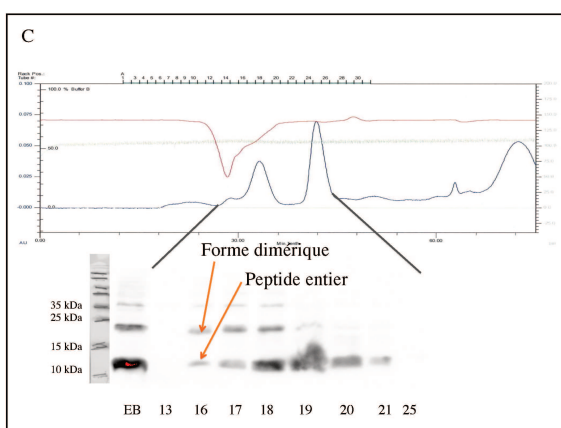
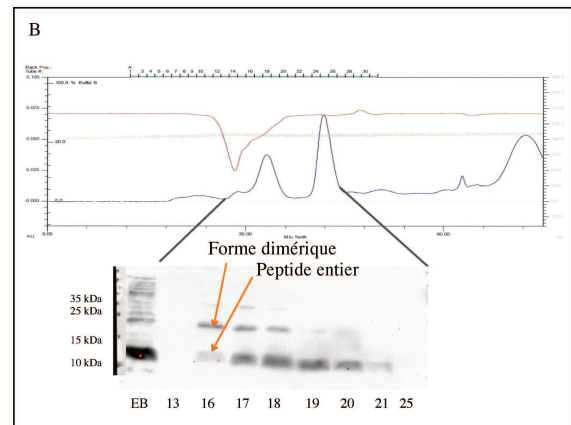
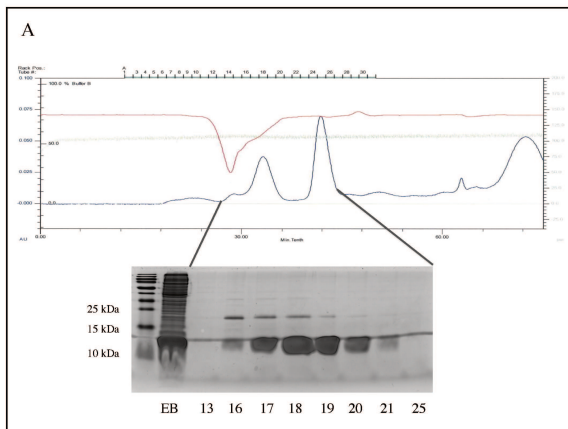
Les fractions d'élution permettent de visualiser une bande à 10-11kDa reconnue par l'anticorps anti Nox4 et l'anticorps anti Histidine correspondant à N4bE (avec les sites de coupure, la séquence de polyhistidine et le S-tag). L'immuno-blot confirme la présence d'une seconde bande de environs 24kDa. Nous maintenons l'hypothèse d'une forme dimérique de N4bE. Une troisième bande de 35kDa est révélée par l'anticorps anti-histidine mais pas par l'anticorps anti Nox4. Les conditions non réduites n'ont pas modifié le résultat.

## 7. Deuxième purification du peptide par chromatographie de filtration sur gel

L'objectif du Gel de filtration est d'obtenir le peptide d'intérêt pur en solution de faible volume. La technique consiste en un tamisage moléculaire selon la taille et la masse des molécules, tout en prenant en compte leur géométrie. Le gel choisi dépend du domaine de fractionnement qui doit comprendre la masse moléculaire du peptide d'intérêt. Les molécules de masse plus grande que la limite d'exclusion du domaine

de fractionnement auront une élution rapide. Les molécules de masse inférieure à la limite d'exclusion inférieure du domaine de fractionnement auront une élution tardive. Les molécules dont la masse est comprise dans le domaine de fractionnement seront séparées selon leur masse et leur conformation.

Nous utilisons une colonne Superdex® 10/300 GL GE Healthcare (code No 17-5174-01, Id No 02-22039) avec un domaine de fractionnement entre 3000kDa – 70 000kDa (Superdex 75, 3kDa- 70kDa). L'équilibration avec le tampon d'équilibration (Tris 20mM NaCl 150mM, pH 7,5) était réalisée la veille au soir. Les réglages du programme de chromatographie sur gel étaient : Débit : 0,4ml/min ; Volume de l'échantillon : 1ml ; Isometric flow (signant la composition fixe du tampon) : 100% buffer 1 (Tris 20mM NaCl 150mM) ; Collection à partir du 5<sup>ème</sup> ml jusqu'au 20<sup>ème</sup> ml en : fractions de 0,5ml.



**Figure 9. Purification du peptide Nox4bE par chromatographie de filtration sur gel.**

Légende : Migration sur gel des fractions correspondant aux pics d'absorbance à 280nm. Coloration de gel au Bleu de Coomassie en condition non réduite (Panel A). Immuno-Blot anti-Nox4 en condition non réduite (Panel B) et anti-histidine en condition non réduite (Panel C). Coloration de gel au Bleu de Coomassie en condition réduite (Panel D).

**Conclusion de la purification par chromatographie de filtration sur gel en condition non réduite.**

Les fractions d'élution (de 16 à 21) mettent en évidence une bande de 11kDa reconnue par l'anticorps anti Nox4 et l'anticorps anti Histidine correspondant à N4bE (avec les sites de restrictions et la séquence de polyhistidine). Les fractions d'élution 16, 17 et 18 mettent en évidence une seconde bande d'environ 24kDa également reconnue par les deux anticorps. Une troisième bande de 35 kDa semble apparaître également : elle est reconnue par les deux anticorps et peut faire évoquer la formation d'un complexe peptidique entre la forme entière de N4bE et la forme dimérique. Après l'application de conditions de réduction, ne reste plus qu'une seule bande visible pouvant correspondre au monomère N4bE.

**8. Contrôle qualité du peptide à l'EMBL (European Molecular Biology Laboratory) – ESRF (European Synchrotron Radiation facility)**

L'objectif est de pouvoir réaliser la cristallogénèse en amont d'une éventuelle cristallisation. La première étape est de déterminer la masse moléculaire de la protéine purifiée. La technique utilisée est la diffusion statique de la lumière (Malls : Multi-Angle Laser Light Scattering). Il s'agit d'un gel de filtration avec une lecture de densité optique, de conductivité, d'indice de réfraction et d'indice de dispersion de la lumière. La mesure de l'intensité de la lumière dispersée permet d'obtenir le poids moléculaire moyen ( $M_w$ ) d'une protéine sans tenir compte de sa géométrie et d'informer sur l'état de multimérisation de la protéine. Le signal est proportionnel au cube de la masse donc plus la protéine est petite, plus la solution protéique à analyser doit être concentrée.

Nous avons fait réaliser un Malls sur notre échantillon stocké en PBS 1X à -80°C. Après centrifugation, l'échantillon a précipité et le Malls n'a pas mis en évidence de trace de protéine. Il nous reste du matériel afin de réaliser d'autres Malls.

## 9. Purification de l'anticorps 8E9

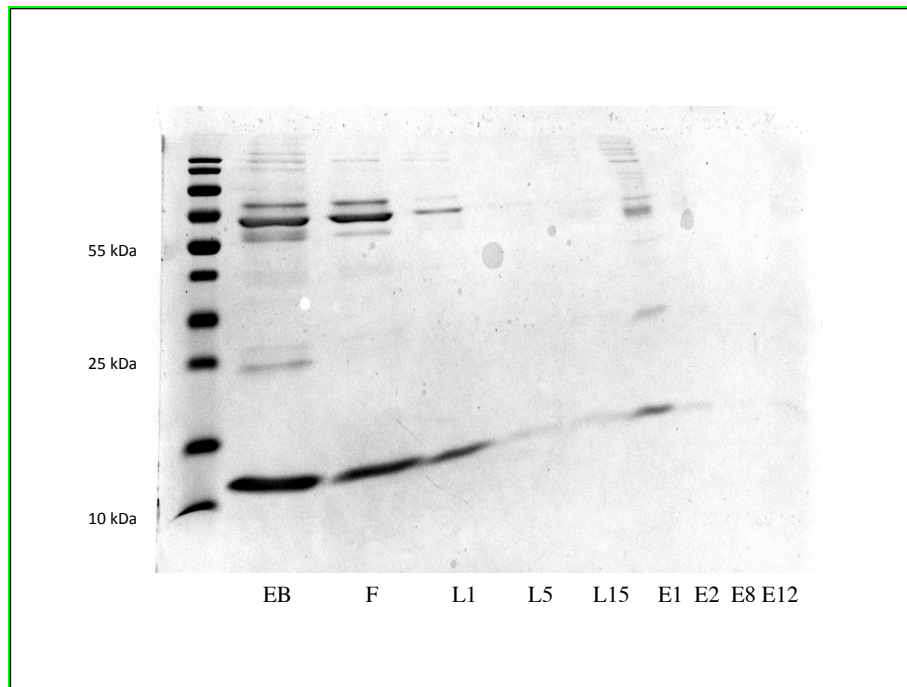
L'objectif est d'obtenir une solution pure d'anticorps, contenant uniquement notre anticorps d'intérêt produit en ascite de souris, en éliminant les autres protéines issues de l'ascite de la souris. Il faudra ensuite isoler le fragment Fab qui reconnaît l'épitope de la boucle E de Nox4.

La technique utilisée est la chromatographie d'affinité sur colonne Histrap IgM 1ml. Le poids moléculaire de l'anticorps natif est de 180 kDa (IgM). En conditions dénaturantes, le fragment Fab et le fragment Fc ont respectivement un poids moléculaire de 25 kDa et 55 kDa.

Nous avons suivi le protocole suivant

- L'ascite de souris est décongelée (1ml) et diluée avec 2ml de *Sodium Phosphate 20mM, 0,8M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Ph 7,5*.
- Prélèvement de 200-300µl réservé en contrôle « d'extrait brut ».
- Utilisation d'une colonne Hi Trap™ IgM purification HP, 1ml.
- Equilibration de la colonne avec 5 volumes de colonne (VC) de tampon d'équilibration, *Tris 100mM, pH 8*.
- Passage en colonne de l'ascite.
- Lavage de la colonne avec 15 VC de tampon de lavage, *Sodium Phosphate 20mM, 0,8M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Ph 7,5*.
- Elution avec 12 VC de tampon d'élution, *20mM Sodium Phosphate, pH 7,5* permettant le recueil 12 fractions d'élution.
- Les fractions sont stockées à +4°C.

Les tampons pour les étapes de la purification sont préparés le jour même.



**Figure 10. Purification de l'anticorps anti Nox4 – 8E9 par chromatographie d'affinité.**

*Légende : L'extrait brut est le filtrat de purification d'ascite de souris (2017) déjà passé sur colonne protéine G (0,5ml complétée à 3ml Vf avec Sodium Phosphate 20mM, 0,8M (NH<sub>4</sub>),SO<sub>4</sub>,pH 7,5. Purification sur colonnes protéine M à la seringue (His-Trap IgM HP, 1ml). Lavage 15 VC Sodium Phosphate 20mM, 0,8M (NH<sub>4</sub>),SO<sub>4</sub>,pH 7,5. Elution 12 VC avec 20mM Sodium Phosphate, pH 7,5. Dépôt sur gel acrylamide 15% de 20µl dénaturé (bêta mercapto-éthanol), Migration sur Gel. Coloration au bleu de Coomassie.*

*EB= extrait brut = liquide d'ascite. F = filtrat. L= lavage. E= Elution.*

L'élué contenait l'IgM 8E9 en faible quantité. Le dépôt était trop concentré car le filtrat contenait encore le fragment Fc à 55kDa. Des contaminants persistaient. Le travail est poursuivi au sein du laboratoire.

## Discussion

Ce travail s'inscrit dans un projet de développement thérapeutique pharmacologique anti-arthrosique avec une perspective de co-cristallisation du peptide N4bE avec le fragment Fc de l'anticorps 8E9. Nous avons réussi à produire le peptide N4bE en bactérie et le mettre en évidence en immuno-blot. Les variations des conditions d'oxydo-réduction semblent influencer la mise en évidence du peptide sous forme monomérique ou dimérique voire trimérique.

Il faudrait compléter le travail en utilisant une espèce bactérienne compétente pour la synthèse de pont disulfure, afin d'envisager la structure tertiaire du peptide. La qualité des purifications devra être optimisée et nous proposons de lister ci-dessous (tableau 1) certaines modifications à apporter au protocole afin de tenter d'obtenir un peptide pur pour la suite du projet.

D'autre part, l'analyse du peptide via ExPASy prédit des caractéristiques de protéine intrinsèquement désordonnée (PID), donnant au peptide une structure aléatoire avec une faible composition en acides aminés hydrophobes. Il est donc nécessaire d'envisager d'emblée une co-cristallisation boucle E – 8E9 afin de permettre la cristallogénèse par une stabilisation du complexe.



ETAPE	MODIFICATION
Construction du plasmide	
Transformation bactérienne	Utiliser aussi des souches bactériennes compétentes pour la synthèse de ponts disulfures.
Culture bactérienne	Volumes supérieurs.
Induction d'expression protéique	Surveillance de la DO dès la phase de mini-culture.
Sonication bactérienne	Ne pas utiliser d'agent réducteur. Utiliser des inhibiteurs de protéases tout au long des expérimentations.
Chromatographie d'affinité	Optimiser les volumes de lavage et d'élution
Immuno-Blot	Avec et sans agent réducteur. Ne pas chauffer les échantillons devant la fragilité de Nox4
Concentration de fractions	Choix des centricons (plus grande capacité), maintien de faibles températures.
Chromatographie par filtration	Tampon sans Phosphate

*Tableau 1 : Modifications à apporter au protocole.*

## Conclusions et perspectives

La cristallisation de N4bE est un objectif à long terme permettant d'explorer une cible thérapeutique potentielle dans la maladie arthrosique. Nous avons pu produire le peptide sans son pont disulfure et débiter la mise au point de l'étape de purification. Le peptide semble être une protéine intrinsèquement désordonnée (PID) ce qui impose d'envisager d'emblée une co-cristallisation du complexe natif « ligand (N4bE) – anticorps (8E9) ». Cet état désordonné serait en faveur d'un manque de structure tridimensionnelle stable lui donnant ainsi une forte plasticité. Cette variabilité de structure pourrait moduler la vitesse de génération des ROS et expliquer la singularité de Nox4 parmi les Nox de produire du peroxyde d'hydrogène par dismutation spontanée. Ainsi, la fonction de Nox4 serait liée à sa structure aléatoire, venant ainsi corroborer l'hypothèse de la « cage redox ». Le travail doit être poursuivi.

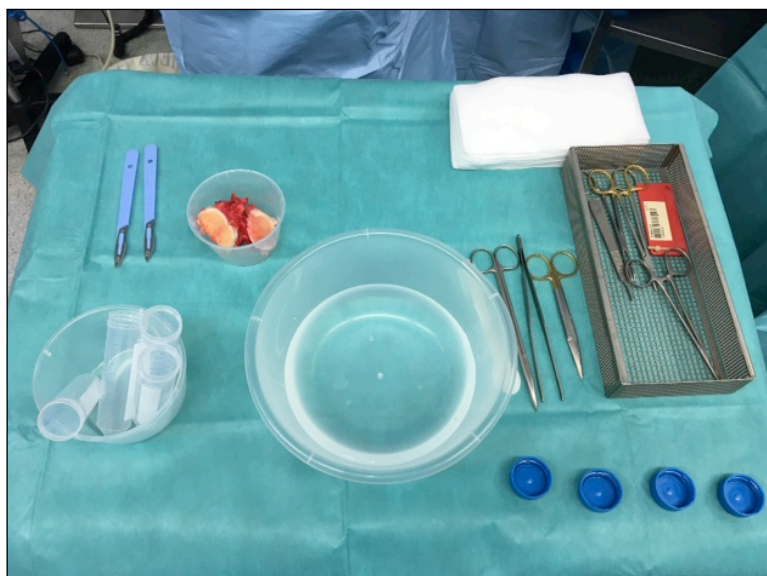
## 2.2 Volet cellulaire

*Ce volet cellulaire représente 1 an d'expérimentations en début de thèse. Les résultats sont partiels et sommaires. Des difficultés en termes de faisabilité nous ont conduit à devoir réorienter le travail. Les hypothèses restent donc à confirmer.*

Ce travail est axé sur les acteurs physiopathologiques potentiels de l'arthrose et permettrait d'identifier des cibles thérapeutiques *in vitro*. La question d'une voie physiopathologique médiée par l'Insulin Growth Factor-1 (IGF-1) et Nox4 est centrale. Si elle était confirmée, une voie inhibitrice d'IGF-1 serait explorée avec la protéine Klotho.

### Culture de chondrocytes primaires humains

Nous avons obtenu du cartilage articulaire de genoux humains au décours de chirurgies orthopédiques de remplacement prothétique sur gonarthrose. Nous prélevons du cartilage articulaire macroscopiquement sain en conditions stériles directement au bloc opératoire. Nous avons réalisé les prélèvements en utilisant une râpe ou un scalpel. Le matériel cartilagineux était lavé au PBS 1X plusieurs fois avant la mise en culture. Les manipulations au laboratoire se faisaient sous hotte PSM.



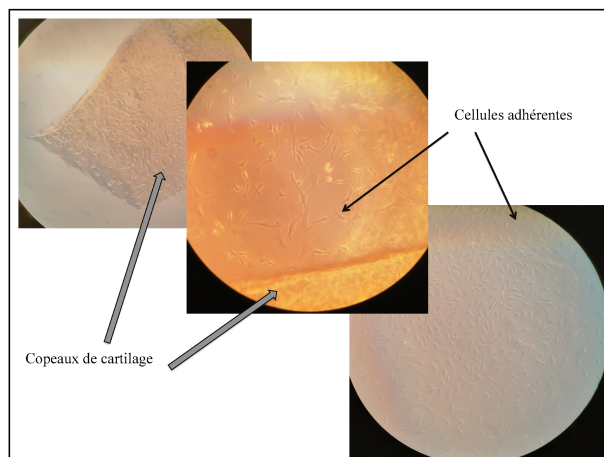
*Figure 1. Installation au bloc opératoire pour les prélèvements*

Nous avons testé différentes conditions d'isolement et de cultures cellulaires :

- Mise en culture de tissu cartilagineux râpé ou de copeaux de cartilage
- Avec ou sans matrigel
- En normoxie ou hypoxie (3% d'Oxygène)
- Avec ou sans facteur de croissance F12 nutrient mix 500ml + EGF hs 20mg/ml + FGF hs 20 ng/ml.

L'objectif premier était d'isoler les chondrocytes primaires de la matrice extracellulaire (MEC). Plusieurs techniques de digestions enzymatiques séquentielles de cette MEC ont été évaluées : par de la hyaluronidase (de 0,1mg/ml jusque 1mg/ml en PBS, 1h, 37°C) puis par de la collagénase type IA (1mg/ml, 2h jusque 24h). Nous n'avons obtenu aucune d'adhésion cellulaire et donc aucune culture cellulaire viable ni exploitable.

Finalement, nous avons obtenu des cultures cellulaires par mise en culture longue (2-3 mois) en incubateur (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) des copeaux de cartilage directement dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal, de la L-glutamine (2mM) en présence de pénicilline (100U/ml), streptomycine (0,1mg/ml), Fungizone (1µg/ml).



*Figure 2. Culture de chondrocytes primaires humains à partir de copeaux de cartilage.*

Nous réalisons systématiquement un contrôle qualité de nos cellules avant les expérimentations. Le collagène de type II étant un marqueur de différenciation chondrocytaire, nous faisons réaliser par le CHU Grenoble Alpes des RT-qPCR afin de vérifier le phénotype des cellules en culture.

## Rôle de l'Insulin Growth Factor-1 dans l'arthrose

### Introduction

L'IGF-1 est une hormone peptidique dont la structure chimique est proche de celle de la pro-insuline. Le gène codant pour l'IGF-1 est sur le chromosome n°12 humain. La protéine de 70 acides aminés est sécrétée par le foie dans la circulation sanguine, sous la régulation de l'hormone de croissance (GH) elle-même sécrétée de manière pulsatile par l'hypophyse. Une fois libérée dans la circulation, la fixation de l'IGF-1 sur son récepteur cellulaire (IGF-1R) peut être influencée par des protéines de séquestration, les IGF-BP (binding protéines) qui sont au nombre de 6 et modifient sa biodisponibilité. En effet il existe deux formes d'IGF-1 : la fraction libre qui peut se fixer sur son récepteur (fraction active) et la fraction liée aux IGF-BP.

L'IGF-1R est un récepteur de type tyrosine kinase de type II. Une étape d'autophosphorylation des résidus Tyrosine 1131, 1135 et 1136 enclenche la voie de signalisation avec une phosphorylation de la Tyrosine 950 dans le domaine juxta-membranaire suivi d'une activation des IRS (Insulin Receptor Substrate) isomères de type 1 dans le chondrocyte. Les IRS1 activés induisent la voie des MAP kinases conduisant à la production de MMP-13 (dégradation de la MEC) et la voie de signalisation de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) conduisant au recrutement de la PDK1 et de l'Akt avec synthèse de protéoglycanes (Greene and Loeser, 2015) (Siddle, 2011).

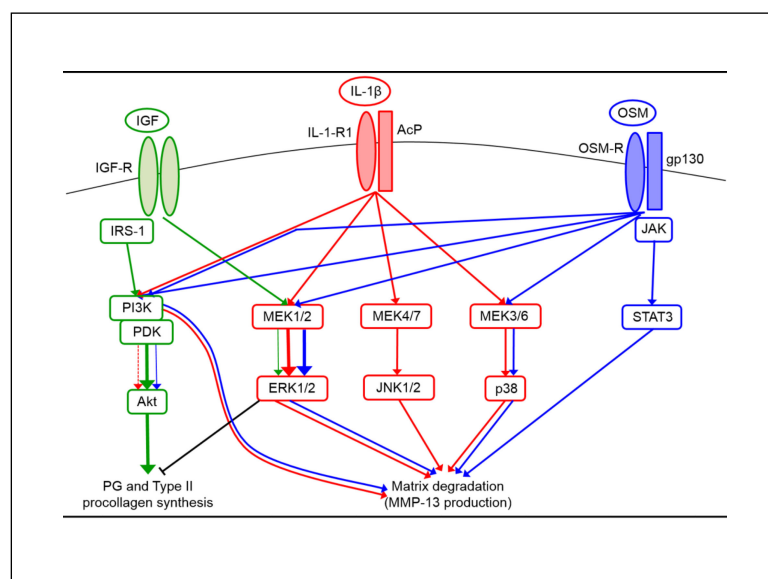


Figure 1. Voies de signalisation de l'IGF-1. D'après (Greene and Loeser, 2015).

L'IGF-1 est fonctionnellement un facteur de croissance impliqué dans la prolifération des chondrocytes différenciés et dans l'homéostasie du cartilage. Par ailleurs, il stimule l'absorption digestive de calcium, la croissance du cartilage de croissance des os longs, augmente la filtration glomérulaire rénale et limite la perte osseuse liée au vieillissement usuel. Ce facteur habituellement décrit comme anabolique a également des effets anti-apoptotiques.

Il ne semble pas y avoir de corrélation entre le taux sérique d'IGF-1 et la sévérité des lésions arthrosiques radiologiques (Hochberg et al., 1994). Cependant, le taux d'IGF-1 dans le liquide synovial de patient arthrosique ( $82 \pm 11$  ng/ml) est significativement supérieur à celui de patients sains ( $19 \pm 7$  ng/ml) (Tavera et al., 1996). Sur le versant expérimental, une stimulation cellulaire par de l'IGF-1 jusque 100 ng/ml pouvait réduire la synthèse du transcrite et de la protéine MMP-13, et réprimer son activité dans des chondrocytes primaires (CP) de rachis cervical de rat (Zhang et al., 2009). L'état pré-hypertrophique des chondrocytes pouvait être maintenu avec un ralentissement de la rupture d'homéostasie cartilagineuse. Par ailleurs, la stimulation *in vitro* de CP humains par de l'IGF-1 (100 ng/ml) réduisait l'expression de la MMP-13 (Im et al., 2003). Cette fonction anabolique pourrait être modulée en conditions de stress et les cellules auraient des réponses inhabituelles aux stimuli. En effet, un taux élevé de ROS déclencherait des voies de signalisation asymétriques d'aval, entraînant une résistance à l'IGF-1 (Yin et al., 2009). La phosphorylation de l'Akt était inhibée et l'IGF-1 n'induisait plus la synthèse de PG ni du collagène de type II mais induisait la voie catabolique des MAP kinases (Yin et al., 2009) (Loeser et al., 2014).

Notre hypothèse était que l'IGF-1 pourrait avoir un rôle paradoxal en condition d'arthrose avec une voie de signalisation catabolique. Notre objectif était d'évaluer l'effet d'une stimulation de CP humains par de l'IGF-1 à haute dose ( $> 100$  ng/ml) sur la prolifération cellulaire et sur le niveau d'expression des transcrits des acteurs impliqués dans la voie Nox4-MMPs, déjà explorés au sein du laboratoire (Grange et al., 2006a) (Rousset et al., 2015).

## Matériels et Méthodes

Nous avons utilisé des cultures de CP humains, comme décrit ci-dessus.

### Présence de Nox4 dans le chondrocyte primaire humain.

Nous avons réalisé un immuno-blot anti Nox4 et anti-actine selon le protocole suivant.

- Préparation des échantillons protéiques

L'échantillon est dilué au 1/10<sup>ème</sup> dans le Sample Buffer 10X et incubé avec un agent dénaturant  $\beta$ -mercapto-éthanol 2,5% (v/v) Over /Night 4°C.

- Electrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)
  - o La préparation des gels suivait le protocole suivant

	Gel de séparation (15% pour 1 gel épais)	Gel de concentration (4% pour 1 gel épais)
H2O	0,8ml	3,1ml
Tampon de séparation <i>Tris 0,75M, SDS 7mM, pH 8</i>	4ml	-
Tampon de concentration <i>Tris 0,5M, SDS 13mM, pH 6,8</i>	-	1,25ml
Acrylamide 40%	3ml	0,5ml
APS 10% (p/v)	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	50 $\mu$ l

- o Couler le gel de concentration en surface du gel de séparation.
  - o Une fois polymérisé, disposer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
  - o Application du tampon de migration *Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1% (p/v), pH 8,3*
  - o Dépôt des échantillons dans les puits du gel.
  - o Migration à +4°C, à 60V pendant la durée du passage du gel de concentration puis à 120V.
- Electro-transfert des protéines sur nitrocellulose (Biorad)
    - o Préparation du tampon de transfert 1X pour un Vf=50ml :
      - Tampon de Blot 10X 5ml  
*Tris 250 mM, glycine 1,92 M, pH 8,3*
      - Ethanol absolute 10ml
      - Eau distillée 35ml

- Réaliser un millefeuille avec : anode, 3 feuilles de papier wattman n°3 imbibées de tampon de transfert, membrane de nitrocellulose, gel, 3 feuilles de papier wattman n°3 imbibées de tampon de transfert, cathode.
- Programmer un transfert pendant 25 minutes à 25V.
- Immunodétection par anticorps couplés à la peroxydase
  - Saturation de la membrane de nitrocellulose par une solution de saturation (TBS Tween 0,05% (pour Vf=1L : 500 µl Tween 20, 100ml TBS 10X, qsp eau distillée, BSA 1%) pendant 1 heure à température ambiante sous agitation.
  - Rinçage de la membrane avec une solution de TBS Tween 0,5% pendant 1 heure à température ambiante sous agitation.
  - Incubation de la membrane avec une solution d'anticorps primaire 1 heure à température ambiante vs toute la nuit à +4°C (pour Nox4) sous agitation.
  - Rinçage de la membrane avec une solution de TBS Tween 0,5% pendant 10 minutes, 3 bains, sous agitation.
  - Incubation de la membrane avec une solution d'anticorps secondaire couplé à la peroxydase 1 heure à température ambiante, sous agitation.
  - Rinçage de la membrane avec une solution de TBS Tween 0,5% (pour Vf=1L : 5ml Tween 20, 100ml TBS 10X, qsp eau distillée) pendant 10 minutes, 3 bains, sous agitation.
  - Révélation par chimioluminescence (production de lumière proportionnelle à la quantité d'anticorps fixée): incubation de la membrane 1 minute avec le réactif de détection (Substrat chimiluminescent SuperSignal, Thermo Fischer™).

### **Prolifération cellulaire**

Les CP humains étaient disposés en 6 puits (triplicatas) et nous appliquions les conditions expérimentales suivantes: retrait du milieu de culture, renouvellement du milieu de culture complet (1ml par puit) et ajout d'IGF-1 à concentration croissante (de 0 à 300ng/ml) avec ou sans N-AcetylCystéine (NAC, acide aminé non essentiel anti oxydant) à 100µM, avec ou sans GKT-831 à 100µM (Setanaxib, inhibiteur de Nox1 et Nox4) (Sedeek et al., 2013). Mise en incubateur pendant 6 jours sans changement de milieu. Nous réalisons un comptage cellulaire avec la technique des cellules de Mallassez (Hématimètre de Malassez) puis en utilisant LUNA-FL™ (automatic cell



counters; Dual fluorescence cell counter, L20001) Logos, qui nous donnait également la viabilité cellulaire.

Voici les conditions expérimentales en 6 puits

Contrôle	Contrôle	Contrôle
+ IGF-1 50ng/ml	+ IGF-1 50ng/ml + <i>NAC</i>	+ IGF-1 50ng/ml + <i>GKT</i>
+ IGF-1 100ng/ml	+ IGF-1 100ng/ml + <i>NAC</i>	+ IGF-1 100ng/ml + <i>GKT</i>
+ IGF-1 200ng/ml	+ IGF-1 200ng/ml + <i>NAC</i>	+ IGF-1 200ng/ml + <i>GKT</i>
+ IGF-1 300ng/ml	+ IGF-1 300ng/ml + <i>NAC</i>	+ IGF-1 300ng/ml + <i>GKT</i>

Figure 2. Schéma expérimental avec une gamme de concentration croissante d'IGF-1 avec ou sans *NAC* ou *GKT*, pour une évaluation de la prolifération cellulaire.

### Gamme d'IGF-1 à concentration croissance

Les copeaux étaient mis en culture sans passage, puis nous réalisons un premier passage à 3 mois dans des flasques de 25cm<sup>2</sup> portées à confluence. Notre plan expérimental comportait 8 conditions :

Contrôle	<i>GKT</i>
+ IGF-1 50ng/ml	+ IGF-1 50ng/ml + <i>GKT</i>
+ IGF-1 100ng/ml	+ IGF-1 200ng/ml + <i>GKT</i>
+ IGF-1 200ng/ml	
+ IGF-1 500ng/ml	

Figure 3. Schéma expérimental avec une gamme de concentrations croissantes d'IGF-1

Le milieu de culture était remplacé par 2ml de DMEM avec antibiotiques, sans sérum de veau foetal. Nous avons réalisé une gamme de stimulations par IGF-1 à 50ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml et 500ng/ml. Une instillation de *GKT*-831 (Setanaxib, inhibiteur de Nox1 et Nox4) était réalisée à une dilution de 100µM (Sedeeq et al., 2013). L'IGF-1

et le GKT étaient laissés en culture pendant 8h puis nous réalisons un lavage, décollement chimique des cellules par action de la trypsine, centrifugation et conservation des cellules en culot sec au – 80°C. L'expérimentation n'a été analysable qu'une seule fois.

### Cinétique de stimulations par de l'IGF-1 à concentration constante

Les conditions de culture étaient les mêmes. *L'expérimentation a été réalisée 5 fois. Aucune expérimentation n'a pu être analysée. Voici les conditions expérimentales.*

Contrôle	Contrôle
IGF-1 200ng/ml 15 min	IGF-1 200ng/ml + NAC 15 min
IGF-1 200ng/ml 30 min	IGF-1 200ng/ml + NAC 30 min
IGF-1 200ng/ml 1h	IGF-1 200ng/ml + NAC 1h
IGF-1 200ng/ml 4h	IGF-1 200ng/ml + NAC 4h
IGF-1 200ng/ml 8h	IGF-1 200ng/ml + NAC 8h
IGF-1 200ng/ml 24h	IGF-1 200ng/ml + NAC 24h

*Figure 4. Schéma expérimental avec une cinétique de stimulation par IGF-1 à concentration constantes avec ou sans NAC ou GKT.*

### RT-qPCR

Elles étaient réalisées par le CHU Grenoble Alpes. La présence d'ARNm du collagène de type II était analysée dans chaque puit avant l'expérimentation. Pour évaluer le niveau d'expression des transcrits d'intérêt, nous avons réalisé des RT-qPCR. L'extraction d'ARNm était réalisée avec le kit NucleoSpin® (Macherey-Nagel, Hoerd, France). L'ADN complémentaire (ADNc) était obtenu par rétro-transcription à partir de 1µg d'ARN en utilisant le Super Script III First-Strand Synthesis (Life Technologies, Carlsbad, CA). Les échantillons ont ensuite été analysés par qPCR avec le Kit QuantiTect SYBR Green (Qiagen). L'expression des transcrits de Col2, p22Phox (CYBA), Nox4, MMP-1, MMP-13 et du gène de ménage (RPL-32) était déterminée en utilisant des couples d'amorces *homo sapiens* (Life Tech).

	Sens	Antisens
<b>Col2A1</b>	TGGACGCCATGAAGGTTTCT	TGGGAGCCAGATTGTTTCATCTC
<b>NADPH oxydase 4</b>	CATTTACCCTCACAATGTTCCA	GCAGAGGCTGACCTCATAGTT
<b>p22 phox</b>	CCCAGTGGTACTTTGGTGCC	GCGGTCATGTACTTCTGTCCC
<b>MMP-1</b>	GCTTACGAATTTGCCGACAGAG	TTCCTCAGAAAGAGCAGCATCG
<b>MMP-13</b>	CCAGACTTCACGATGGCATTG	GGCATCTCCTCCATAATTTGGC
<b>RPL-32</b>	TTAAGCGTAACTGGCGGAAAC	GAGCGATCTCGGCACAGTAA

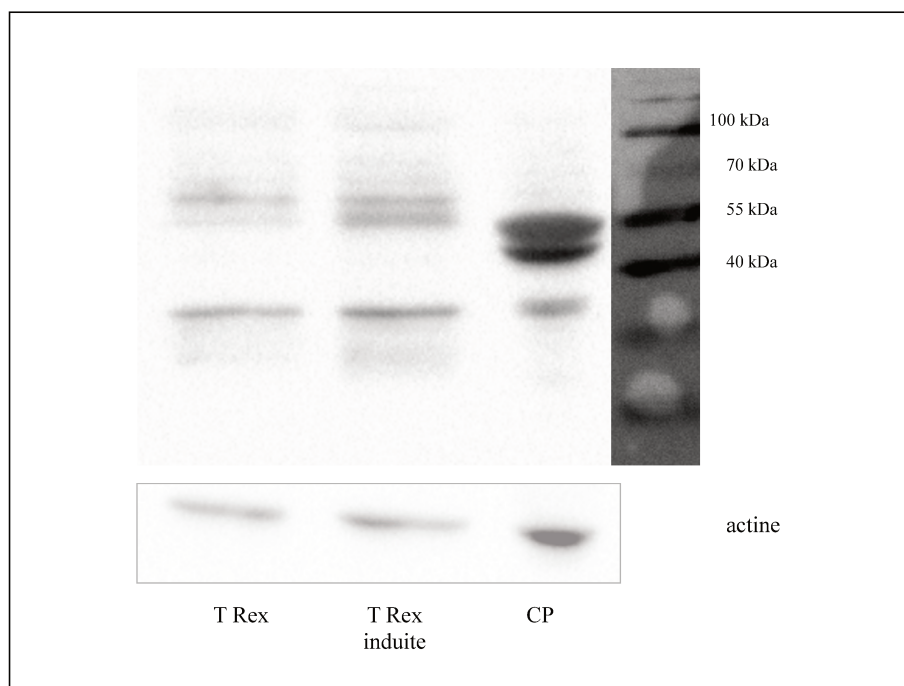
*Tableau 1 : Couples d'amorces utilisées*

Une quantification relative de la RT-PCR (la quantification relative de l'expression des gènes d'intérêt) était réalisée en corrigeant le Ct du gène d'intérêt par le Ct du gène de ménage RPL-32 :  $DCt = Ct \text{ gène intérêt} - Ct \text{ gène de ménage}$ . Le  $DDCt$  est calculé d'après la formule :  $DCt \text{ du tissu expertisé} - DCt \text{ moyen du tissu calibrateur}$ . L'ARN messager (ARNm) a été quantifié en utilisant la formule :  $Fold \text{ Change} = 2^{-DDCt}$ .

## Résultats

### Présence de Nox4 dans le chondrocyte primaire humain.

Nous avons mis en évidence la présence de la Nox 4 dans le CP humain.



**Figure 5. Immuno-Blot Nox4 et actine sur chondrocytes primaires humains.**

*Légende : Immuno-blot anti Nox4 sur CP humains : Gel à 12% d'acrylamide. Premier anticorps anti Nox4, Rb mAb B492 UOTR 1, Abcam, Paris, France (1/2000)) et deuxième anticorps mAb anti Rb peroxydase linked (1/5000). Immuno-blot anti actine sur CP humains : premier anticorps anti actine mouse, mAb 8226 anti beta actin, Abcam, Paris, France (BSA 5%, 1/1000)) et deuxième anticorps mAb anti mouse peroxydase linked (1/5000).*

### Prolifération cellulaire

*L'expérimentation a été réalisée 5 fois. Une seule a permis d'avoir des cellules viables entre 90 et 100%. Compte tenu du faible taux de prolifération des chondrocytes primaires, le délai entre l'ensemencement et la récolte était peut-être trop long.*

La stimulation des CP humains par une concentration d'IGF-1 entre 50 et 100ng/ml ne semblait pas impacter la prolifération cellulaire comparativement à la condition sans stimulation. Une prolifération était observée à 200ng/ml avec une

augmentation de la concentration cellulaire de 25% mais la prolifération était inhibée dans la condition à 300ng/ml d'IGF-1.

Comparativement à la condition sans NAC, l'usage de la NAC semblait favoriser la prolifération cellulaire pour une concentration d'IGF-1 de 50ng/ml. Entre 100 et 200ng/ml, nous n'observons pas de prolifération par rapport à la concentration cellulaire avant stimulation, alors que la concentration cellulaire augmentait dans la condition à 300ng/ml d'IGF-1.

L'usage du GKT semblait empêcher toute prolifération cellulaire et ce, quelle que soit la concentration d'IGF-1.

En conclusion, l'IGF-1 à haute dose semblait empêcher la prolifération des CP humains observés une semaine après la stimulation. La NAC semblait rétablir une prolifération cellulaire dans la condition à haute dose d'IGF-1. Le GKT inhibait la prolifération cellulaire quelle que soit la concentration d'IGF-1.

Enfin, l'IGF-1 à haute dose pourrait être toxique pour la prolifération chondrocytaire et l'usage d'un anti oxydant pourrait rétablir des conditions favorables à une prolifération cellulaire.

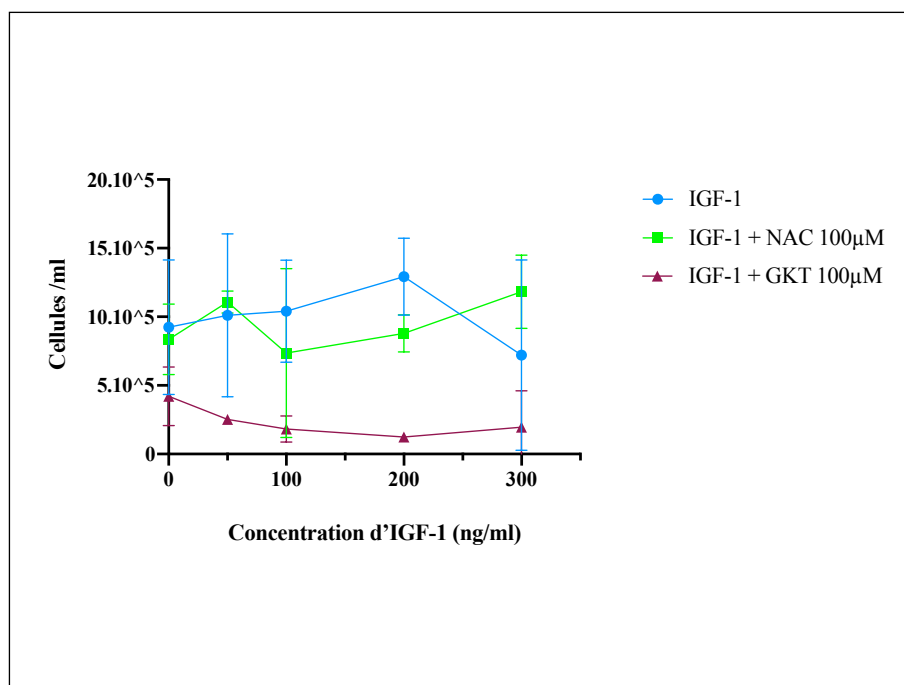


Figure 6. Cinétique de stimulations par IGF-1 à concentration constante, avec ou sans NAC ou GKT.

## Gamme d'IGF-1 à concentration croissance

L'expérimentation a été réalisée 5 fois. Une seule a été analysable car dans la plupart des situations l'extraction d'ARNm ne permettait pas d'obtenir suffisamment de matériel. Il arrivait également que les transcrits de *Col2A1* ne soient pas exprimés dans les contrôles ou dans d'autres puits expérimentaux, signant une dédifférenciation cellulaire, rendant l'analyse caduque.

La stimulation des CP humains par une gamme de concentration croissante d'IGF-1 montrait une réduction par 5 du niveau d'expression du transcrite de *Nox4* jusqu'à la concentration de 100ng/ml. On observait un pic d'expression à 200ng/ml et une élévation significative mais moindre à 500ng/ml. Le GKT permettait d'inhiber la majoration d'expression de l'ARNm de *Nox4* à 200ng/ml. Le partenaire p22phox avait un niveau d'expression augmenté de 50% entre 50 et 200ng/ml puis une forte majoration à 500ng/ml d'IGF-1. Le GKT semblait inhiber la majoration d'expression de l'ARNm mais il n'était pas évalué dans la condition à 500ng/ml d'IGF-1.

Les niveaux d'expression des transcrits de la MMP-1 étaient augmentés d'au moins 50% avec une stimulation d'IGF-1 à 50 et 100ng/ml. A 200 ng/ml la quantité d'expression était multipliée par presque 30 avec une inhibition partielle de cette majoration en présence de GKT. Concernant la MMP-13, le pic d'expression s'observait également pour une stimulation à 200ng/ml d'IGF-1. Le GKT inhibait cette sur-expression, mais de manière moins significative que pour l'ARNm de MMP-1.

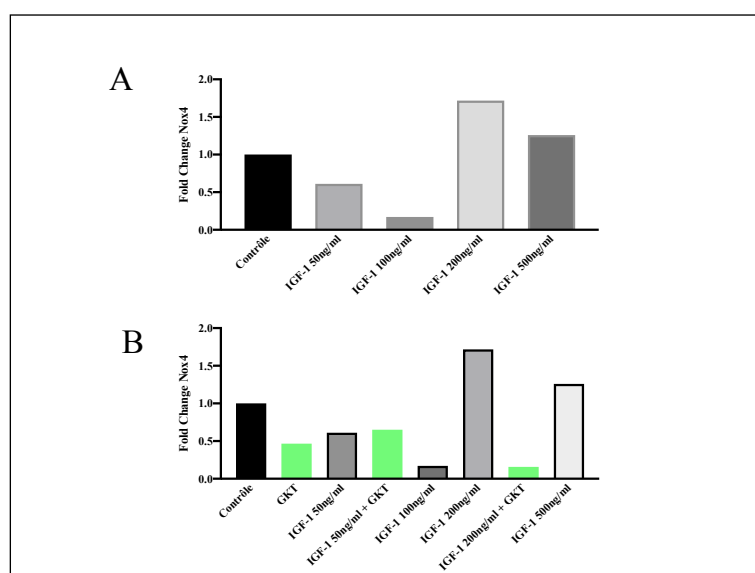
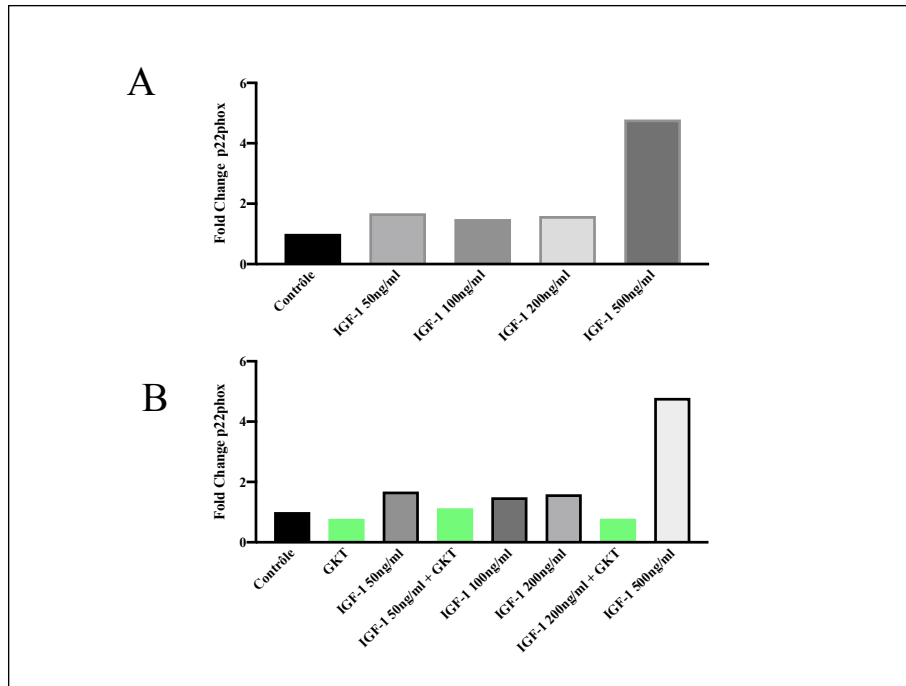


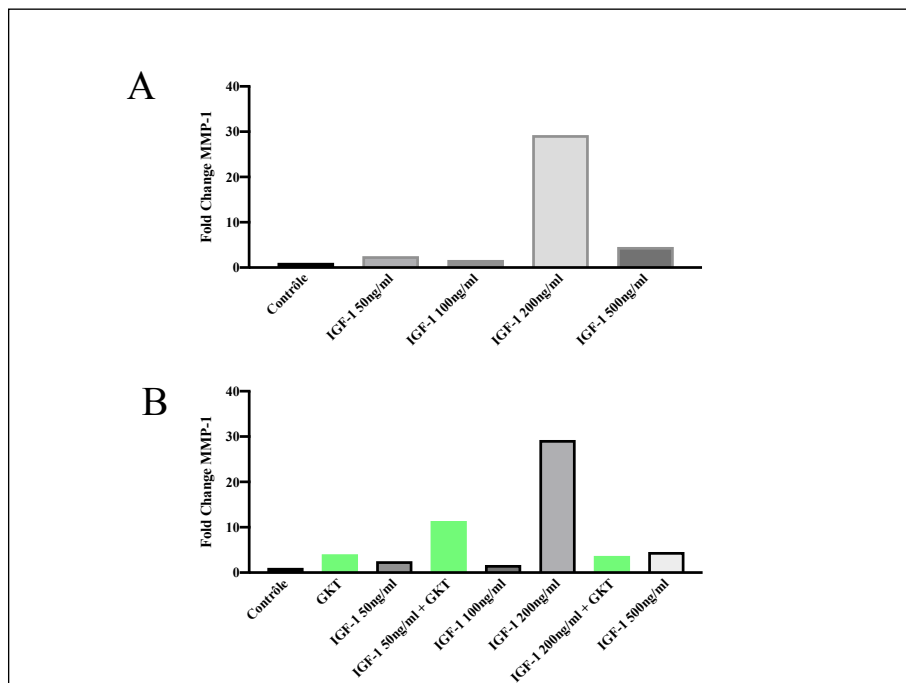
Figure 7. Niveau d'expression des transcrits de *Nox4*

Légende : Panel A : Stimulation de CP humains par une gamme croissante d'IGF-1. Panel B : Stimulation de CP humains par une gamme croissante d'IGF-1 associée à une instillation concomitante de GKT.



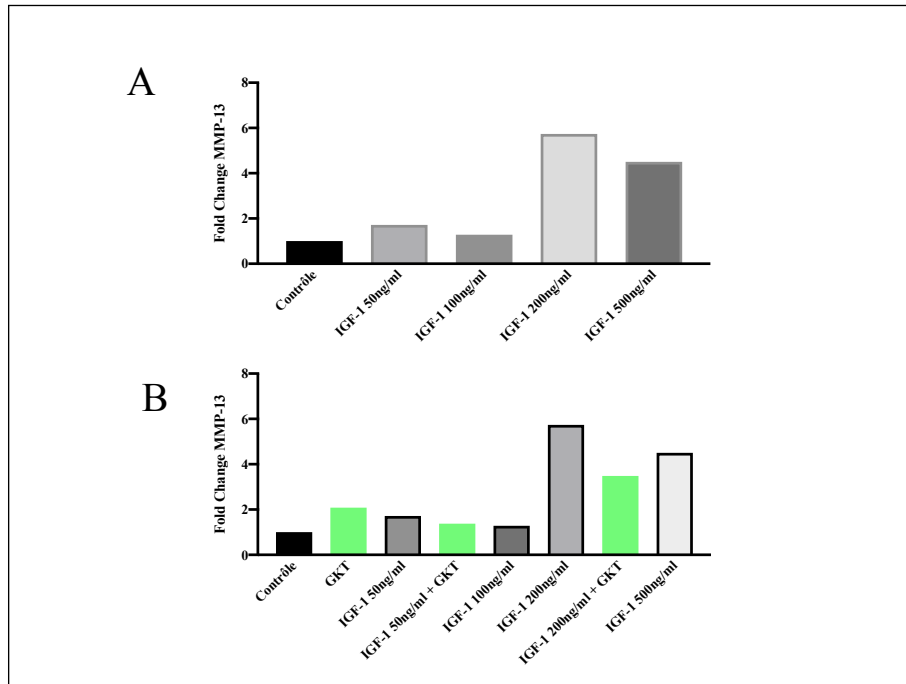
**Figure 8. Niveau d'expression des transcrits de p22phox**

Légende : Panel A : Stimulation de CP humains par une gamme croissante d'IGF-1. Panel B : Stimulation de CP humains par une gamme croissante d'IGF-1 associée à une instillation concomitante de GKT.



**Figure 9. Niveau d'expression des transcrits de MMP-1**

Légende : Panel A : Stimulation de CP humains par une gamme croissante d'IGF-1. Panel B : Stimulation de CP humains par une gamme croissante d'IGF-1 associée à une instillation concomitante de GKT.



**Figure 10. Niveau d'expression des transcrits de MMP-13**

*Légende : Panel A : Stimulation de CP humains par une gamme croissante d'IGF-1. Panel B : Stimulation de CP humains par une gamme croissante d'IGF-1 associée à une instillation concomitante de GKT.*



## *Discussion et Conclusion*

Notre travail a permis d'obtenir des résultats partiels en lien avec des difficultés de culture de chondrocytes primaires humains et de maintien de leur phénotype chondrocytaire.

Les résultats doivent être confirmés mais il semble que l'IGF-1 à haute dose puisse être toxique pour la prolifération chondrocytaire et l'usage d'anti oxydant pourrait rétablir des conditions favorables à une prolifération cellulaire. Par ailleurs, la Nox4 semble être impliquée et nécessaire dans la prolifération des CP humains. De fait, les conditions d'oxydo-réduction sont déterminantes pour la prolifération des CP humains.

La gamme de concentration croissante d'IGF-1 semblait montrer un effet dose sur la voie de signalisation cellulaire étudiée. A 200 ng/ml, l'IGF-1 augmentait le niveau d'expression des transcrits de Nox4, MMP-1 et MMP-13 pouvant laisser supposer à une voie catabolique. L'arthrose entraîne un changement de phénotype chondrocytaire : la cellule mature et différenciée passe à un état hypertrophique terminal avant son apoptose. L'évolution phénotypique s'accompagne de modulation dans l'expression des MMPs et les MMP-1 et MMP-13 sont les deux principales collagénases exprimées. L'expression des MMP-2 et MMP-9 est plus faible et inconstante (Tetlow et al., 2001). Dans les CP humains, 100 ng/ml d'IGF-1 constituent une valeur seuil. L'activité inhibitrice maximale de l'IGF-1 a été observée jusqu'à cette concentration. La stimulation à plus de 100 ng/ml d'IGF-1 n'entraînait pas d'effet inhibiteur sur l'expression de la MMP-13 (Im et al., 2003). La réponse chondrocytaire semble dépendre de la dose du stimulus par l'IGF-1. D'autre part, la signalisation des voies IGF-1 est aussi en interaction avec celles d'autres régulateurs comme l'IL-1 $\beta$ , agissant comme des partenaires dans la régulation cartilagineuse en condition physiologique ou physiopathologique.

Pour conclure, nous avons exploré une piste catabolique médiée par l'IGF-1 dans le CP humain. A 200ng/ml, l'IGF-1 pourrait induire la voie Nox4-MMP1 et MMP-13. Notre hypothèse reste à confirmer et le travail sera poursuivi au sein du laboratoire ce d'autant qu'une seconde hypothèse mettant en lien IGF-1 et la protéine Klotho a été abordée en début de thèse.

## Hypothèse de la voie Klotho-IGF-1



**Clotho**

Camille Claudel (1864 -1943)

### *Introduction*

La protéine Klotho découverte à la fin des années 1990 par l'équipe de Makoto Kuro-o, est décrite comme une protéine anti-vieillesse (Kuro-o et al., 1997) (Kuro-o, 2010). Les souris *Klotho* KO présentaient un vieillissement accéléré et leur espérance de vie était réduite à 2 mois comparativement aux 24 mois habituellement décrits pour les modèles murins. Leur phénotype était modifié et elles présentaient des pathologies fréquemment rencontrées avec l'avancée en âge : athérosclérose, ostéopénie, arthrose, calcifications ectopiques, insuffisance rénale et emphysème pulmonaire. A l'inverse, la surexpression du gène *Klotho* chez la souris permettait de prolonger l'espérance de vie par rapport aux contrôles, de 31% chez les mâles et de 16% chez les femelles (Kurosu et al., 2005). Le gène *kl* humain (13q12) a 86 % d'homologie avec le gène murin. Certains polymorphismes humains de *Klotho* sont associés à une faible espérance de vie et au développement d'une ostéoporose, de maladies coronariennes et d'infarctus du myocarde (Yan et al., 2017) (Liu et al., 2015) (Razzaque, 2012). Dans une population grecque, différents polymorphismes (G395A et C2998T) de *klotho* semblaient être impliqués dans le développement d'une gonarthrose (Tsezou et al., 2008) ou d'une arthrose de la main (Zhang et al., 2007).

Le gène *kl* code pour trois formes protéiques : une forme issue d'un épissage alternatif et sécrétée dans la circulation sanguine, une forme transmembranaire et une dernière forme, soluble, issue du clivage de la partie extracellulaire de la protéine transmembranaire (Lanske and Razzaque, 2007) (Razzaque and Lanske, 2007).

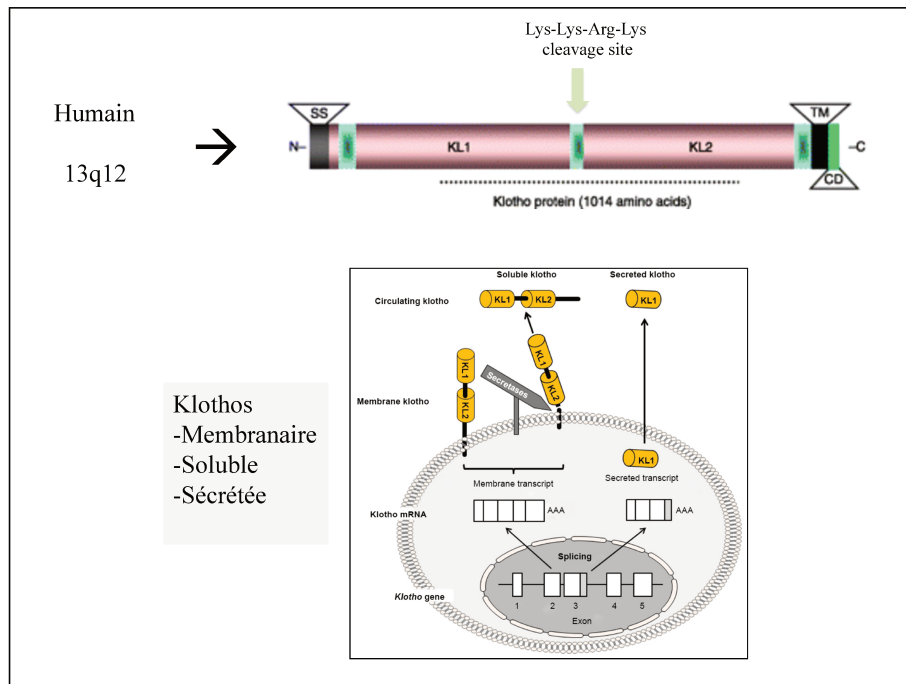
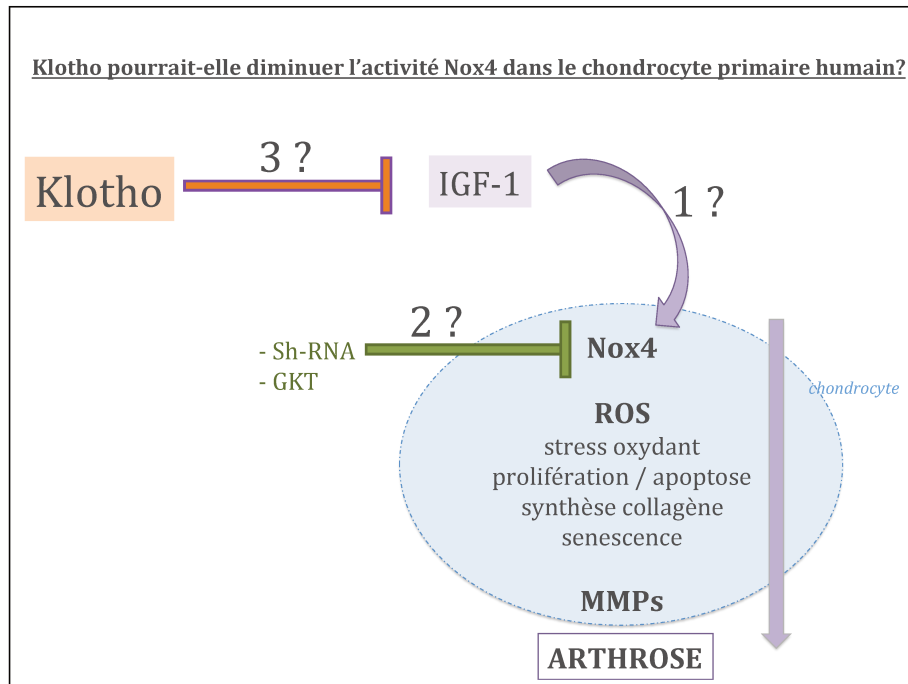


Figure 1. Les 3 formes protéiques de Klotho. D'après (Razzaque and Lanske, 2007).

La forme transmembranaire est décrite comme le co-récepteur obligatoire de FGF-23. Les formes circulantes de Klotho peuvent être considérées comme facteurs endocrines. Elles agissent à distance de leur site de synthèse. Le mode d'action est encore indéterminé mais elle participe à la régulation de nombreuses voies de signalisation dont la voie insuline/IGF-1 et la voie des couples Redox, balances oxydants-antioxydants (Yamamoto et al., 2005). Klotho permet d'une part de réguler positivement les enzymes anti-oxydantes, mais également de réguler négativement les enzymes oxydantes, productrices de ROS. Klotho permettait d'activer le facteur de transcription FOXO, impliqué dans le contrôle de l'expression de la manganèse superoxyde dismutase (MnSOD). Son action enzymatique anti oxydante permet de protéger l'organisme du stress oxydant, cause majeure du vieillissement (Kuro-o, 2008). Dans les cellules musculaires lisses aortiques de rat, Klotho pouvait supprimer l'expression de Nox2 et donc atténuer le stress oxydatif (Wang et al., 2012). *In vivo*, la surexpression de *kl* permettait de diminuer la progression d'une hypertension

artérielle et de néphropathie par réduction de l'expression de Nox2 et de son activité (Wang et al., 2012). De plus, la surexpression de Klotho a pour effet de diminuer l'induction d'apoptose. En effet, cette surexpression permet de réduire les modifications impliquées dans le processus de mort cellulaire comme l'activité bêta galactosidase, la fragmentation de l'ADN, la peroxydation lipidique, l'expression de la protéine Bax ainsi que la production de superoxyde (Haruna, 2007 ; Wang, 2012) (Wang et al., 2012).

L'objectif de notre travail était de déterminer si Klotho peut réguler l'activité de Nox4 via une voie IGF-1 dans les chondrocytes et savoir si l'effet de Klotho sur le chondrocyte est dépendant de Nox4. Nous avons tout d'abord évalué des outils de travail en culture cellulaire.



**Figure 2. L'hypothèse Klotho dans la régulation de Nox4 via une voie IGF-1.**

*Légende : 1/ existe-t-il une voie de signalisation IGF-1/Nox4 catabolique dans le chondrocyte primaire humain. 2/ Si oui, l'inhibition de la Nox4 permet-elle de réduire la production de ROS et de prévenir les effets cataboliques de l'arthrose. 3/ Si oui, Klotho pourrait-elle inhiber la voie IGF-1/Nox4 et permettre d'avoir un effet anti catabolique et anti-arthrosique.*

## *Matériels et Méthodes*

Nous avons réalisé une transfection bactérienne (E.Coli DH5) à partir d'un plasmide *Klotho* synthétisé par la société Proteogenix Sas (Schitigheim, France). Le vecteur était pEF6/V5-His. La séquence du plasmide code pour la forme sécrétée de *Klotho* (le domaine KL1) qui a été insérée entre les sites de restriction Bam-H1 et Eco-R1. Un gène de résistance à l'ampicilline a permis la sélection des bactéries transfectées par le vecteur. Nous avons réalisé des étapes de mini-et maxi-préparation de notre plasmide afin d'obtenir une quantité importante de plasmide, compatible avec une transfection cellulaire.

Dans un second temps, nous avons transfecté des cellules HEK-293 (cellules embryonnaires de rein humain) puis sélectionné les cellules ayant reçu le plasmide par de la Blasticidine.

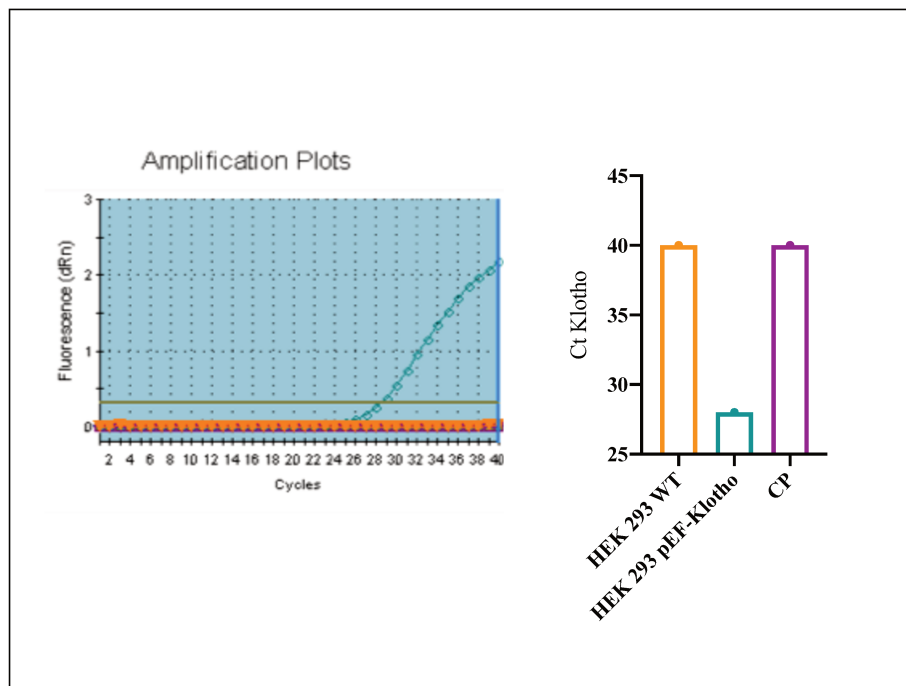
Nous avons adressé les échantillons au CHU Grenoble Alpes pour les RT-PCR. Le succès de la transfection était évalué par RT-qPCR et les contrôles étaient des HEK-293 non transfectées. Nous avons également évalué des CP humains.

Nous avons ensuite évalué la présence de la forme sécrétée de *Klotho* par des immunoblot des cellules et du surnageant de culture (protocole d'immuno-blot détaillé précédemment). Nous avons utilisé des anticorps dont l'épitope était compris dans la séquence KL1 :

- Rb anti-KL (SAB2104815-100L), Sigma Aldrich.
- Rb pAB anti-Kl (Ab 203576), Abcam.

## Résultats

Les résultats de RT-qPCR confirmaient le succès de la transfection cellulaire. Les cellules HEK-293 transfectées contenaient de l'ARNm codant pour KL1 (Ct<40) et les cellules contrôle n'en contenaient pas (No Ct, estimé à 40).



**Figure 3. Données de RT-PCR en Ct sur des cellules transfectées et non transfectées.**

Légende : courbe verte : Ct des HEK-293 pEF Klotho ; courbe orange : Ct des HEK-293 WT ; courbe violette : Ct des chondrocytes primaires.

Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence KL1 en protéine ni dans les immunoblots de culots cellulaires ni dans les surnageants de culture, après 6 tentatives et l'usage de deux anticorps différents. Nous avons fait l'hypothèse que Klotho pouvait être sensible à la décongélation ou que la production cellulaire était très faible (limite de détection) avec une thermo-sensibilité potentielle avec protéolyse. Les expérimentations devront être poursuivies.

### *Discussion et Conclusion*

La protéine Klotho est considérée comme une hormone anti vieillissement, faisant référence à la Moire Clotho qui tisse le fil de la vie dans la mythologie grecque. Concernant l'arthrose et compte tenu du lien physiopathologique précédemment décrit entre klotho, les Nox et les voies menant aux MMPs responsables de la dégradation de la MEC, il est possible que les axes insuline /IGF-1 et anti-oxydants constituent deux pistes d'exploration des interactions Klotho/Nox4. La modulation d'activité de Nox 4 pourrait par conséquent être un outil thérapeutique prometteur dans l'arthrose. Klotho pourrait être un modulateur de cette voie de régulation physiopathologique.

## Conclusion à l'échelle cellulaire

*Notre hypothèse catabolique d'une voie de régulation de la Nox4 via l'IGF-1 n'est pas infirmée par nos expérimentations et le travail doit être poursuivi avant de pouvoir statuer. Par ailleurs, nous avons commencé à utiliser des outils pour l'exploration de l'hypothèse « Klotho » mais nous n'avons pas encore réalisé d'expérimentations.*

La protéine anti vieillissement Klotho semble avoir un effet ubiquitaire et multiple sur les voies de signalisation cellulaire. Son mode d'action est encore peu décrit mais il semble qu'elle inhibe les voies insuline/IGF-1 et favorise l'expression d'enzymes anti-oxydantes. Klotho pourrait agir à un carrefour de signalisation cellulaire tout particulièrement pertinent dans la physiopathologie de l'arthrose. Ainsi, l'étude de l'interaction Nox4/ Klotho dans le chondrocyte primaire humain est d'intérêt.

Depuis ce travail de début de thèse, quelques publications viennent confirmer le lien entre la protéine Klotho et l'arthrose. Le profil protéique de souris non arthrosique était comparé à celui d'un modèle murin d'arthrose (C57/6J, modèle chirurgical par section du ligament croisé antérieur). Klotho était moins exprimée alors que l'acteur principal de la voie canonique (Wnt) était surexprimé en condition d'arthrose. Le niveau d'expression des MMPs-2 et -9, sous la régulation de la voie de signalisation de Wnt, était majoré (Gu et al., 2019b). Cette équipe australienne vient en effet confirmer l'intérêt de Klotho comme cible thérapeutique dans l'arthrose (Gu et al., 2019a) (Gu et al., 2019b). Une autre publication vient aussi confirmer le rôle de Klotho dans le CP humain cette fois-ci: il existe une corrélation négative entre le niveau d'expression de l' $\alpha$ -Klotho sécrétée et les MMP-13 (Chuchana et al., 2018). La forme sécrétée de Klotho est alors décrite comme un nouvel acteur de l'homéostasie cartilagineuse au cours de l'arthrose.



## 2.3 Volet animal

*Le volet animal constitue le corps de la thèse.*

### Introduction

L'arthrose est un problème de santé multidimensionnel. Le fort impact sur la qualité de vie, l'acquisition de limitations fonctionnelles, l'absence de traitements curatifs et le coût considérable pour la société viennent justifier la nécessité d'une recherche clinique et translationnelle. Les objectifs de l'expérimentation animale sont entre autres d'envisager la possibilité d'améliorer notre compréhension de la pathogenèse et de la physiopathologie de l'arthrose, de réaliser des diagnostics plus précoces, mettre au point des traitements précoces afin de prévenir l'évolution de la maladie et fournir de meilleurs soins aux patients.

Les modèles d'arthrose comprennent des espèces de chevaux, de chèvres, de moutons et de chiens - dont la taille et l'anatomie devraient mieux refléter les conditions des articulations humaines - tandis que les petits modèles animaux (cobaye, lapin, souris et rat) représentent 77% des modèles sélectionnés. La souris est devenue l'animal de prédilection et différents modèles murins d'arthrose existent. Le choix du modèle utilisé va dépendre des questions abordées : évaluation de la pathophysiologie de l'arthrose ou de son évolution, des thérapies de l'arthrose ou du comportement douloureux...

Le laboratoire dispose déjà d'une expérience sur le modèle animal dans l'arthrose et nous abordons cette thématique au travers de l'utilisation d'innovations technologiques. Nous avons dans un premier temps fait un état des lieux des connaissances sur la thématique et ensuite réalisé une étude expérimentale afin d'évaluer un nouveau modèle d'induction d'arthrose chez la souris.

### Article numéro 3

#### **“Mouse model of osteoarthritis: models, outcomes and new imaging tools”.**

Cet article est une revue proposant une synthèse des différents modèles murins d'arthrose et des méthodes d'évaluation clinique des souris. Sur le même support, cet article propose une mise à jour sur les nouvelles techniques d'imagerie tout en insistant sur les bonnes pratiques d'expérimentation animale et constitue un document de synthèse pouvant être d'intérêt tant pour les biologistes-chercheurs que pour les médecins-chercheurs.

Je suis premier auteur de cet article soumis et en révision majeure dans Bone Research, revue classée SIGAPS A en 2017, Impact Factor 12,354 en 2017.

« **Drevet S**, Favier B, Brun E, Gavazzi G, Lardy B. Mouse model of osteoarthritis: models, outcomes and new imaging tools”.

## La NADPH Oxydase 4 dans le chondrocyte murin

### Introduction

La souris reste l'animal de choix pour la recherche sur l'arthrose. Cependant, la physiopathologie de l'arthrose est complexe et il est impossible de disposer d'un modèle pertinent reproduisant toutes les voies de signalisation impliquées dans la maladie. Grange et *al.* montraient au sein du laboratoire du GREPI qu'une stimulation de cellules C-20/A4 par de l'IL-1 $\beta$  augmentait la production de ROS et la synthèse de MMP-1 via une voie de signalisation dépendante de Nox4 (Grange et al., 2006b). Le chondrocyte humain n'exprimait que le transcrite de Nox4 alors que l'ARNm de Nox1, 2, 3 et 5 était indétectable (Rousset et al., 2015). Le niveau d'expression de l'ARNm codant pour Nox4 et son partenaire p22phox était supérieur en situation d'arthrose et la production de ROS l'était également (Rousset et al., 2015). L'objectif à terme est de vérifier l'hypothèse d'une voie de signalisation médiée par Nox4, *in vivo*, chez la souris.

D'après la littérature, plusieurs isoformes de Nox sont présents lors de la chondrogenèse de la souris (Kim et al., 2010). Des chondrocytes primaires embryonnaires (11,5 jours) exprimaient les transcrits de Nox1, 2 et 4 et les protéines Nox1, 2 et 4 étaient visualisées en immuno-blot après une culture cellulaire de 9 jours. A la différence de Nox1, les Nox2 et Nox4 semblaient jouer un rôle dans la différenciation chondrocytaire (expression du collagène II) (Kim et al., 2010). Une étude sur un modèle d'arthrose murin post-traumatique (C57BL/6N femelles WT et Nox4 KO, rupture du ligament croisé antérieur par compression tibiale) mettait en évidence une phase initiale de diminution du niveau d'expression de Nox4 et de son activité, suivie d'une majoration significative (avec un pic à 48h) puis une légère régression jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour post-traumatique (Wegner et al., 2019). Une dernière étude évaluait le niveau d'expression en immuno-histochimie des Nox dans les chondrocytes primaires murins (C57BL/6N femelles WT). Nox1, 2 et 4 avait un niveau d'expression faible dans les souris contrôles. Après induction d'arthrose par rupture du ligament croisé, Nox4 était plus exprimée que Nox1 ou 2 (Liao et al., 2020).

Nous disposons d'une lignée de souris C57/Bl6 sauvage (WT). A la lecture de la littérature en début de thèse, il nous a paru nécessaire de réaliser une cartographie d'ARNm codant pour les isoformes de la famille des NADPH Oxydases dans le cartilage murin de notre lignée de souris, afin de vérifier quels isoformes de Nox

étaient présents dans le cartilage de souris adulte et de connaître leur répartition en condition non arthrosique. De fait, nous pourrions évaluer la pertinence de notre lignée pour notre hypothèse scientifique et ainsi adapter nos conditions d'expérimentation animale. Notre question semblait partagée avec d'autres équipes puisque depuis, des réponses ont été apportées par des études très récentes (Wegner et al., 2019) (Liao et al., 2020).

## Matériel et Méthode

Nous avons utilisé trois souris de la souche C57BL6, WT H33A cKO-flag. Elles ont été sacrifiées par dislocation cervicale.

Les caractéristiques des souris sont représentées ci-dessous :

Lignée	Sexe	Age
WT	Mâle	13 semaines
WT	Femelle	13 semaines
WT	Femelle	13 semaines

*Tableau 1 : Caractéristiques des souris*

Nous avons prélevé du cartilage sternal à expertiser, du tissu rénal servant de témoin pour l'expression de Nox4 et du tissu aortique abdominal servant de témoin pour l'expression de Nox1 et Nox2 (Bedard and Krause, 2007). Les tissus étaient prélevés immédiatement après l'euthanasie et les tissus étaient stockés dans du Trizol (Invitrogen, Thermofisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) à - 80°C.

Nous avons adressé les échantillons au CHU Grenoble Alpes pour les RT-PCR. L'extraction d'ARNm était réalisée avec le kit NucleoSpin® (Macherey-Nagel, Hoerd, France). L'ADN complémentaire (ADNc) était obtenu par rétro-transcription à partir de 1µg d'ARN en utilisant le Super Script III First-Strand Synthesis (Life Technologies, Carlsbad, CA). Les échantillons étaient analysés en qPCR avec le Kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR (Qiagen). L'expression des transcrits de Nox1, 2 et 4 et du gène de ménage (HPRT-1) était déterminée en utilisant des couples d'amorces *mus musculus* spécifiques.

	Sens	Antisens
NADPH oxydase 1	TCTCCAGCCTATCTCATCCTGA	GCTGCATACATCATGTCATGTT
NADPH oxydase 2	AGTGCGTGTGTGCTCGACAA	GCGGTGTGCAGTGCTATCAT
NADPH oxydase 2 (bis)	CCTCTACCAAAACCATTTCGGAG	CTGTCCACGTACAATTCGTTCA
NADPH oxydase 4	TTTCTCAGGTGTGCATGTAGC	GCGTACGTAGAAGCTGTAACCA
NADPH oxydase 4 (bis)	TGCCTGCTCATTGGCTGT	CCGGCACATAGGTAAAAGGATG
HPRT-1	TCAGTCAACGGGGGACATAAA	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG

*Tableau 2 : Couples d'amorces utilisées*

Une quantification relative de la RT-PCR (la quantification relative de l'expression des gènes d'intérêt) était réalisée en corrigeant le Ct du gène d'intérêt par le Ct du gène de ménage HPRT-1 :  $DCt = Ct \text{ gène intérêt} - Ct \text{ gène de ménage}$ . Le  $DDCt$  est calculé d'après la formule :  $DCt \text{ du tissu expertisé} - DCt \text{ moyen du tissu calibrateur}$ . L'ARN messager (ARNm) a été quantifié en utilisant la formule :  $Fold \text{ Change} = 2^{-DDCt}$ .

## Résultats

L'ARNm codant pour Nox1 était indétectable quel que soit le tissu. Sachant que le tissu vasculaire exprime habituellement Nox1 en quantité modérée, nous avons conclu que le couple d'amorce Nox1 n'a pas permis de mettre en évidence l'ARNm. Nous ne pouvons donc conclure sur la présence ou l'absence de Nox1 dans le tissu cartilagineux.

La figure 1 résume l'expression des transcrits de Nox2 et Nox4 en DCt. Nous avons réalisé une moyenne des DCt obtenus avec les deux couples d'amorces Nox2 ou Nox4. Plus le Ct ou le DCt est élevé et plus la quantité d'ARN est faible. L'ARNm codant pour Nox4 est très exprimé dans le rein, puis en quantité moindre dans le cartilage et en quantité moindre encore dans le tissu vasculaire aortique (Figure 1). La quantité d'ARNm de Nox2 semble être la plus importante dans le cartilage puis dans le rein et l'aorte avec des variations assez faibles d'un tissu à l'autre.

Concernant la proportion de Nox2 et Nox4 dans les 3 tissus évalués : le tissu aortique exprime deux fois plus d'ARNm de Nox2 que de Nox4. Le tissu rénal exprime en revanche une quantité importante d'ARNm Nox4 et 5 fois moins d'ARNm de Nox2. Le niveau d'expression des ARNm Nox2 et Nox4 est comparable dans le tissu cartilagineux.

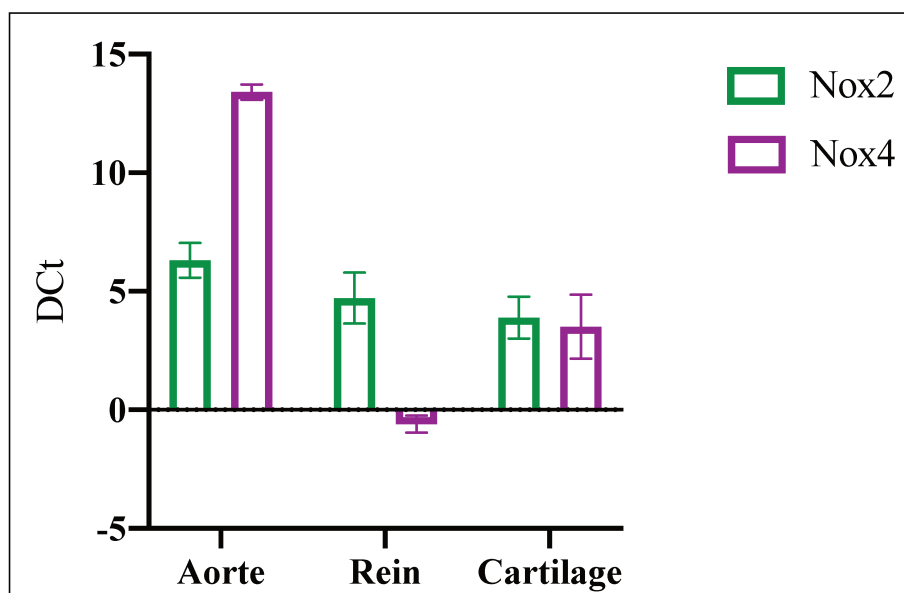


Figure 1. Expression des transcrits de Nox2 et Nox4 dans plusieurs tissus de souris WT

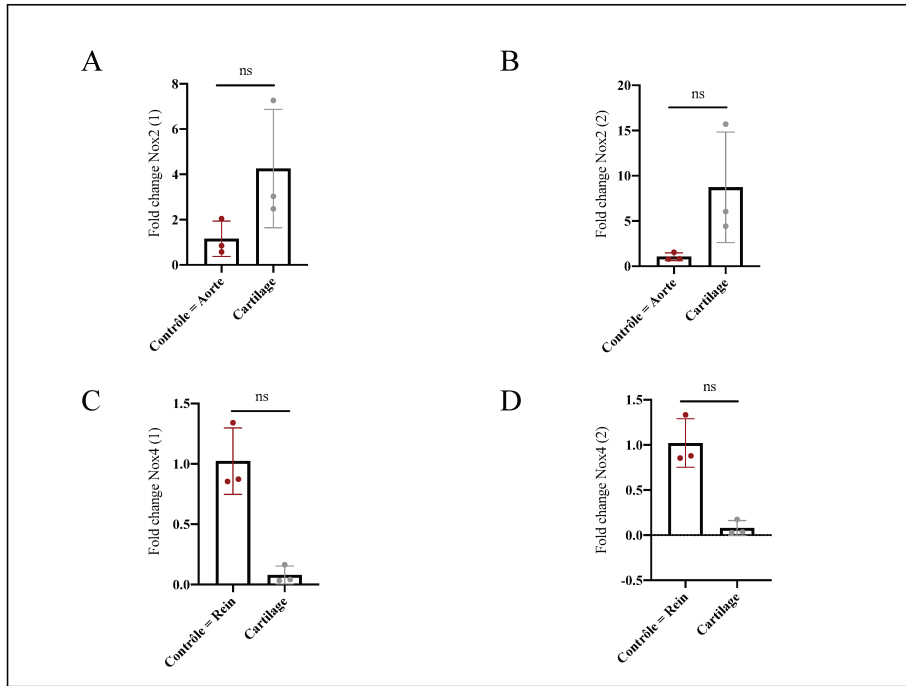


Figure 2. Expression des transcrits de Nox2 et Nox4 dans le cartilage de 3 souris WT



## Discussion et Conclusion

Nous avons montré que le tissu cartilagineux de souris exprimait de l'ARNm de Nox2 et Nox4 et nos résultats étaient comparables aux données issues de la littérature récente (Liao et al., 2020) (Wegner et al., 2019). Notre travail présente des limites. Nous avons utilisé du cartilage sternal et non un cartilage articulaire. Cependant, les deux sont des cartilages hyalins comparables dans leur composition et structure. Une confirmation des résultats au niveau articulaire semblerait cependant nécessaire. Nos souris étaient de sexe différent pouvant modifier le niveau d'expression des transcrits. D'autre part, nous devrions utiliser un nouveau couple d'amorce Nox1 et choisir comme organe témoin de Nox1, le tissu colique (Bedard and Krause, 2007). Ensuite, une analyse protéique et fonctionnelle s'imposerait afin d'affiner nos connaissances et de préciser quel isoforme est impliqué dans la production de ROS au cours de l'arthrose. Selon les résultats et pour répondre à nos hypothèses scientifiques d'implication de la protéine Nox4 dans la physiopathologie de l'arthrose, il conviendra soit de travailler sur une lignée de souris double KO (Nox2 et Nox4) soit d'envisager l'utilisation d'inhibiteur de Nox sur des simples KO de Nox2 ou Nox4.

## Article numéro 4

### « A new model of induced-mice-osteoarthritis: single knee injection of IL-1 $\beta$ lentivirus»

Cet article est un article de résultat.

Je suis premier auteur de cet article qui va être à soumettre.

**S.Drevet; B.Favier; A.Miribel; T.Marchal; J.Vollaire; V.Josserand; G.Gavazzi; B.Lardy.**

## Article numéro 5

**« Phase contrast imaging for osteoarthritis evaluation:  
a pilot study on a mice model ».**

Cet article est un article de résultat.

Je suis un des auteurs associés à l'article en cours de soumission dans Bone Research, revue classée SIGAPS A en 2017, Impact Factor 12,354 en 2017.

J'ai participé à l'expérimentation animale, à l'interprétation de l'histologie et réalisé un travail de relecture et de correction du manuscrit.

« Broche L, Favier B, Roug-Labriet H, **Drevet S**, Lardy B, Lemasson B, Brun E. Phase contrast imaging for osteoarthritis evaluation: a pilot study on a mice model ».

## Conclusions et Perspectives

L'arthrose est une maladie chronique dégénérative multifactorielle très fréquente et invalidante. La vision pluritissulaire de la maladie et l'approche phénotypique sont deux avancées conceptuelles majeures. Sur le plan physiopathologique, le chondrocyte est la cellule cible primordiale. L'activité de la Nox4, son interaction avec ses partenaires et sa conformation constituent des enjeux scientifiques d'intérêt et autant de cibles thérapeutiques potentielles pour l'élaboration de stratégies thérapeutiques anti-arthrosiques. Au cours de ce travail de thèse, le lien entre Nox4 et arthrose a été abordé selon 3 niveaux : structural, cellulaire et animal.

La Nox4 est une Nox singulière parmi les autres isoformes et sa boucle E semble être un des éléments particulièrement en cause. Sa séquence est probablement intrinsèquement désordonnée et sa structure aléatoire lui donnerait la propriété particulière de produire du peroxyde d'hydrogène par un phénomène de cage « redox ». Le travail doit être poursuivi afin d'obtenir des solutions pures de boucle E et de 8E9 et secondairement confier la poursuite du travail à l'équipe de cristallographie. Les perspectives envisagées à l'échelle protéique sont d'une part de mieux comprendre ce système complexe d'interaction de Nox4, d'envisager des mécanismes d'action potentiels à moduler et de les évaluer. Le projet est de connaître la structure de la boucle E ou plutôt ses structures éventuellement différentes en condition réduite ou oxydée. Ainsi la validation d'une cible thérapeutique potentielle représentée par la boucle E de Nox4 pourrait se concrétiser à l'échelle protéique et permettre la conception de molécules spécifiques avec la collaboration de chimistes.

La Nox4 est exprimée dans le chondrocyte primaire humain et semble être majoritairement responsable de la production de ROS dans cette cellule. La poursuite du travail pourrait s'envisager sur des chondrocytes primaires humains commerciaux afin de s'affranchir des difficultés d'initiation d'une culture cellulaire primaire. L'effet catabolique d'une stimulation cellulaire avec de hautes doses d'IGF-1 doit être confirmé dans la voie de signalisation de Nox4-MMPs. L'évaluation de l'effet pourrait s'envisager à différents niveaux : sur la prolifération cellulaire, le niveau d'expression des transcrits MMPs et de leurs protéines ainsi que de leur activité métabolique. La perspective à l'échelle cellulaire est d'évaluer le potentiel effet inhibiteur de la protéine anti vieillissement Klotho sur cette voie de signalisation IGF-1/Nox4/MMPs.

D'autres étapes de validation d'hypothèses *in vivo* sont nécessaires pour valider le rôle de Nox4 dans l'arthrose. Le développement de modèles murins plus proches de la physiopathologie permettrait l'étude des phases précoces de la maladie tout en utilisant des techniques d'induction d'arthrose facilement reproductibles. Notre modèle doit encore être évalué par une cotation histo-pathologique complémentaire et une imagerie des genoux de souris. Les perspectives envisagées à l'échelle animale seront d'évaluer l'implication de la voie de signalisation IL1-Nox4 chez la souris, en utilisant des animaux déficients pour le gène de Nox2 ou de Nox4, ou des animaux déficients pour les deux gènes (double KO) ou encore des souris déficientes pour le gène de Nox2 en y associant l'usage d'un inhibiteur de Nox4.

## Références

- Aitken, D., Laslett, L.L., Pan, F., Haugen, I.K., Otahal, P., Bellamy, N., Bird, P., Jones, G., 2018. A randomised double-blind placebo-controlled crossover trial of HUMira (adalimumab) for erosive hand Osteoarthritis - the HUMOR trial. *Osteoarthr. Cartil.* 26, 880–887. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.02.899>
- Allen, K.D., Renner, J.B., Devellis, B., Helmick, C.G., Jordan, J.M., 2008. Osteoarthritis and sleep: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J. Rheumatol.* 35, 1102–1107.
- Ashraf, S., Cha, B.-H., Kim, J.-S., Ahn, J., Han, I., Park, H., Lee, S.-H., 2016. Regulation of senescence associated signaling mechanisms in chondrocytes for cartilage tissue regeneration. *Osteoarthr. Cartil.* 24, 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.07.008>
- Bedard, K., Krause, K.-H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>
- Bedard, K., Lardy, B., Krause, K.-H., 2007. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. *Biochimie* 89, 1107–1112. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.01.012>
- Charlier, E., Relic, B., Deroyer, C., Malaise, O., Neuville, S., Collée, J., Malaise, M.G., De Seny, D., 2016. Insights on Molecular Mechanisms of Chondrocytes Death in Osteoarthritis. *Int J Mol Sci* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17122146>
- Cheleschi, S., Cantarini, L., Pascarelli, N.A., Collodel, G., Lucherini, O.M., Galeazzi, M., Fioravanti, A., 2015. Possible chondroprotective effect of canakinumab: an in vitro study on human osteoarthritic chondrocytes. *Cytokine* 71, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.10.023>
- Chuchana, P., Mausset-Bonnefont, A.-L., Mathieu, M., Espinoza, F., Teigell, M., Toupet, K., Ripoll, C., Djouad, F., Noel, D., Jorgensen, C., Brondello, J.-M., 2018. Secreted  $\alpha$ -Klotho maintains cartilage tissue homeostasis by repressing NOS2 and ZIP8-MMP13 catabolic axis. *Aging (Albany NY)* 10, 1442–1453. <https://doi.org/10.18632/aging.101481>
- Chuong Nguyen, M.V., Lardy, B., Paclet, M.-H., Rousset, F., Berthier, S., Baillet, A., Grange, L., Gaudin, P., Morel, F., 2015. [NADPH oxidases, Nox: new isoenzymes family]. *Med Sci (Paris)* 31, 43–52. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153101012>
- Cohen, S.B., Proudman, S., Kivitz, A.J., Burch, F.X., Donohue, J.P., Burstein, D., Sun, Y.-N., Banfield, C., Vincent, M.S., Ni, L., Zack, D.J., 2011. A randomized, double-blind study of AMG 108 (a fully human monoclonal antibody to IL-1R1) in patients with osteoarthritis of the knee. *Arthritis Res. Ther.* 13, R125. <https://doi.org/10.1186/ar3430>
- Cross, M., Smith, E., Hoy, D., Nolte, S., Ackerman, I., Fransen, M., Bridgett, L., Williams, S., Guillemin, F., Hill, C.L., Laslett, L.L., Jones, G., Cicuttini, F., Osborne, R., Vos, T., Buchbinder, R., Woolf, A., March, L., 2014. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 1323–1330. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204763>
- Diaz, B., Shani, G., Pass, I., Anderson, D., Quintavalle, M., Courtneidge, S.A., 2009. Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation. *Sci Signal* 2, ra53. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000368>
- Dozin, B., Malpeli, M., Camardella, L., Cancedda, R., Pietrangelo, A., 2002. Response of young, aged and osteoarthritic human articular chondrocytes to inflammatory cytokines: molecular and cellular aspects. *Matrix Biol.* 21, 449–459.

- Felson, D.T., Naimark, A., Anderson, J., Kazis, L., Castelli, W., Meenan, R.F., 1987. The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum.* 30, 914–918. <https://doi.org/10.1002/art.1780300811>
- GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2017. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 390, 1211–1259. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32154-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32154-2)
- GBD Compare | IHME Viz Hub [WWW Document], n.d. URL <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare> (accessed 7.8.19).
- Gilbert, S.J., Duance, V.C., Mason, D.J., 2004. Does protein kinase R mediate TNF-alpha- and ceramide-induced increases in expression and activation of matrix metalloproteinases in articular cartilage by a novel mechanism? *Arthritis Res. Ther.* 6, R46–R55. <https://doi.org/10.1186/ar1024>
- Goldring, M.B., Goldring, S.R., 2007. Osteoarthritis. *J. Cell. Physiol.* 213, 626–634. <https://doi.org/10.1002/jcp.21258>
- Gowen, M., Wood, D.D., Ihrie, E.J., Meats, J.E., Russell, R.G., 1984. Stimulation by human interleukin 1 of cartilage breakdown and production of collagenase and proteoglycanase by human chondrocytes but not by human osteoblasts in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 797, 186–193.
- Grange, L., Nguyen, M.V.C., Lardy, B., Derouazi, M., Campion, Y., Trocme, C., Paclet, M.-H., Gaudin, P., Morel, F., 2006a. NAD(P)H oxidase activity of Nox4 in chondrocytes is both inducible and involved in collagenase expression. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1485–1496. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1485>
- Grange, L., Nguyen, M.V.C., Lardy, B., Derouazi, M., Campion, Y., Trocme, C., Paclet, M.-H., Gaudin, P., Morel, F., 2006b. NAD(P)H oxidase activity of Nox4 in chondrocytes is both inducible and involved in collagenase expression. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1485–1496. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1485>
- Greene, M.A., Loeser, R.F., 2015. Function of the chondrocyte PI-3 kinase-Akt signaling pathway is stimulus dependent. *Osteoarthr. Cartil.* 23, 949–956. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.01.014>
- Gu, Y., Ren, K., Jiang, C., Wang, L., Yao, Q., 2019a. Regulation of cartilage damage caused by lack of Klotho with thioredoxin/peroxiredoxin (Trx/Prx) system and succedent NLRP3 activation in osteoarthritis mice. *Am J Transl Res* 11, 7338–7350.
- Gu, Y., Ren, K., Wang, L., Yao, Q., 2019b. Loss of Klotho contributes to cartilage damage by derepression of canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in osteoarthritis mice. *Aging (Albany NY)* 11, 12793–12809. <https://doi.org/10.18632/aging.102603>
- Guillemin, F., Rat, A.C., Mazieres, B., Pouchot, J., Fautrel, B., Euller-Ziegler, L., Fardellone, P., Morvan, J., Roux, C.H., Verrouil, E., Saraux, A., Coste, J., 3000 Osteoarthritis group, 2011. Prevalence of symptomatic hip and knee osteoarthritis: a two-phase population-based survey. *Osteoarthr. Cartil.* 19, 1314–1322. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2011.08.004>
- Hochberg, M.C., Lethbridge-Cejku, M., Scott, W.W., Reichle, R., Plato, C.C., Tobin, J.D., 1994. Serum levels of insulin-like growth factor in subjects with osteoarthritis of the knee. Data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Arthritis Rheum.* 37, 1177–1180. <https://doi.org/10.1002/art.1780370811>
- Iannone, F., Lapadula, G., 2003. The pathophysiology of osteoarthritis. *Aging Clin Exp Res* 15, 364–372.
- Im, H.-J., Pacione, C., Chubinskaya, S., Van Wijnen, A.J., Sun, Y., Loeser, R.F., 2003. Inhibitory effects of insulin-like growth factor-1 and osteogenic protein-1 on

- fibronectin fragment- and interleukin-1 $\beta$ -stimulated matrix metalloproteinase-13 expression in human chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 25386–25394. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302048200>
- Jacques, C., Gosset, M., Berenbaum, F., Gabay, C., 2006. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. *Vitam. Horm.* 74, 371–403. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(06\)74016-X](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(06)74016-X)
- Janiszewski, M., Lopes, L.R., Carmo, A.O., Pedro, M.A., Brandes, R.P., Santos, C.X.C., Laurindo, F.R.M., 2005. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 280, 40813–40819. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509255200>
- Jindai, K., Nielson, C.M., Vorderstrasse, B.A., Quiñones, A.R., 2016. Multimorbidity and Functional Limitations Among Adults 65 or Older, NHANES 2005–2012. *Prev Chronic Dis* 13. <https://doi.org/10.5888/pcd13.160174>
- Kim, K.S., Choi, H.W., Yoon, H.E., Kim, I.Y., 2010. Reactive oxygen species generated by NADPH oxidase 2 and 4 are required for chondrogenic differentiation. *J. Biol. Chem.* 285, 40294–40302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.126821>
- Knoop, J., van der Leeden, M., Thorstensson, C.A., Roorda, L.D., Lems, W.F., Knol, D.L., Steultjens, M.P.M., Dekker, J., 2011. Identification of phenotypes with different clinical outcomes in knee osteoarthritis: data from the Osteoarthritis Initiative. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 63, 1535–1542. <https://doi.org/10.1002/acr.20571>
- Koike, M., Nojiri, H., Ozawa, Y., Watanabe, K., Muramatsu, Y., Kaneko, H., Morikawa, D., Kobayashi, K., Saita, Y., Sasho, T., Shirasawa, T., Yokote, K., Kaneko, K., Shimizu, T., 2015. Mechanical overloading causes mitochondrial superoxide and SOD2 imbalance in chondrocytes resulting in cartilage degeneration. *Sci Rep* 5, 11722. <https://doi.org/10.1038/srep11722>
- Kolasinski, S.L., Neogi, T., Hochberg, M.C., Oatis, C., Guyatt, G., Block, J., Callahan, L., Copenhaver, C., Dodge, C., Felson, D., Gellar, K., Harvey, W.F., Hawker, G., Herzig, E., Kwoh, C.K., Nelson, A.E., Samuels, J., Scanzello, C., White, D., Wise, B., Altman, R.D., DiRenzo, D., Fontanarosa, J., Giradi, G., Ishimori, M., Misra, D., Shah, A.A., Shmagel, A.K., Thoma, L.M., Turgunbaev, M., Turner, A.S., Reston, J., 2020. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 72, 149–162. <https://doi.org/10.1002/acr.24131>
- Kuro-o, M., 2010. Klotho. *Pflugers Arch.* 459, 333–343. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0722-7>
- Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., Ohyama, Y., Kurabayashi, M., Kaname, T., Kume, E., Iwasaki, H., Iida, A., Shiraki-Iida, T., Nishikawa, S., Nagai, R., Nabeshima, Y.I., 1997. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390, 45–51. <https://doi.org/10.1038/36285>
- Kurosu, H., Yamamoto, M., Clark, J.D., Pastor, J.V., Nandi, A., Gurnani, P., McGuinness, O.P., Chikuda, H., Yamaguchi, M., Kawaguchi, H., Shimomura, I., Takayama, Y., Herz, J., Kahn, C.R., Rosenblatt, K.P., Kuro-o, M., 2005. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* 309, 1829–1833. <https://doi.org/10.1126/science.1112766>
- Kye, S.-Y., Park, K., 2017. Suicidal ideation and suicidal attempts among adults with chronic diseases: A cross-sectional study. *Compr Psychiatry* 73, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2016.12.001>
- Lane, N.E., Shidara, K., Wise, B.L., 2017. Osteoarthritis year in review 2016: clinical. *Osteoarthr. Cartil.* 25, 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2016.09.025>



- Lanske, B., Razzaque, M.S., 2007. Premature aging in klotho mutant mice: cause or consequence? *Ageing Res. Rev.* 6, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.02.002>
- Le Pen, C., Reygrobelle, C., Gérentes, I., 2005. Financial cost of osteoarthritis in France. The “COART” France study. *Joint Bone Spine* 72, 567–570. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2005.01.011>
- Lepetsos, P., Papavassiliou, A.G., 2016. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim. Biophys. Acta* 1862, 576–591. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.01.003>
- Liao, C.-R., Wang, S.-N., Zhu, S.-Y., Wang, Y.-Q., Li, Z.-Z., Liu, Z.-Y., Jiang, W.-S., Chen, J.-T., Wu, Q., 2020. Advanced oxidation protein products increase TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  expression in chondrocytes via NADPH oxidase 4 and accelerate cartilage degeneration in osteoarthritis progression. *Redox Biol* 28, 101306. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101306>
- Liu, C., Cui, W., Wang, L., Yan, L., Ruan, X., Liu, Y., Jia, X., Zhang, X., 2015. Klotho gene polymorphisms are related to colorectal cancer susceptibility. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 7446–7449.
- Loeser, R.F., Gandhi, U., Long, D.L., Yin, W., Chubinskaya, S., 2014. Aging and oxidative stress reduce the response of human articular chondrocytes to insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66, 2201–2209. <https://doi.org/10.1002/art.38641>
- Lyle, A.N., Deshpande, N.N., Taniyama, Y., Seidel-Rogol, B., Pounkova, L., Du, P., Papaharalambus, C., Lassègue, B., Griendling, K.K., 2009. Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 105, 249–259. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.193722>
- Ma, C.-H., Wu, C.-H., Jou, I.-M., Tu, Y.-K., Hung, C.-H., Hsieh, P.-L., Tsai, K.-L., 2018. PKR activation causes inflammation and MMP-13 secretion in human degenerated articular chondrocytes. *Redox Biol* 14, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.08.011>
- Majeed, M.H., Sherazi, S.A.A., Bacon, D., Bajwa, Z.H., 2018. Pharmacological Treatment of Pain in Osteoarthritis: A Descriptive Review. *Curr Rheumatol Rep* 20, 88. <https://doi.org/10.1007/s11926-018-0794-5>
- Mariani, E., Pulsatelli, L., Facchini, A., 2014. Signaling pathways in cartilage repair. *Int J Mol Sci* 15, 8667–8698. <https://doi.org/10.3390/ijms15058667>
- McConnell, S., Kolopack, P., Davis, A.M., 2001. The Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC): a review of its utility and measurement properties. *Arthritis Rheum.* 45, 453–461. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200110\)45:5<453::aid-art365>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200110)45:5<453::aid-art365>3.0.co;2-w)
- Murahashi, Y., Yano, F., Kobayashi, H., Makii, Y., Iba, K., Yamashita, T., Tanaka, S., Saito, T., 2018. Intra-articular administration of I $\kappa$ B $\alpha$  kinase inhibitor suppresses mouse knee osteoarthritis via downregulation of the NF- $\kappa$ B/HIF-2 $\alpha$  axis. *Sci Rep* 8, 16475. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34830-9>
- Neogi, T., Zhang, Y., 2013. Epidemiology of osteoarthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 39, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2012.10.004>
- Nüesch, E., Dieppe, P., Reichenbach, S., Williams, S., Iff, S., Jüni, P., 2011. All cause and disease specific mortality in patients with knee or hip osteoarthritis: population based cohort study. *BMJ* 342, d1165. <https://doi.org/10.1136/bmj.d1165>
- O’Neill, T.W., McCabe, P.S., McBeth, J., 2018. Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 32, 312–326. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2018.10.007>

- Pantano, C., Reynaert, N.L., van der Vliet, A., Janssen-Heininger, Y.M.W., 2006. Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1791–1806. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1791>
- Park, H.S., Chun, J.N., Jung, H.Y., Choi, C., Bae, Y.S., 2006. Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 72, 447–455. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.09.012>
- Pers, Y.-M., Rackwitz, L., Ferreira, R., Pullig, O., Delfour, C., Barry, F., Sensebe, L., Casteilla, L., Fleury, S., Bourin, P., Noël, D., Canovas, F., Cyteval, C., Lisignoli, G., Schrauth, J., Haddad, D., Domergue, S., Noeth, U., Jorgensen, C., ADIPOA Consortium, 2016. Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem Cells Transl Med* 5, 847–856. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0245>
- Prieto-Alhambra, D., Judge, A., Javaid, M.K., Cooper, C., Diez-Perez, A., Arden, N.K., 2014. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 1659–1664. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203355>
- Rausch Osthoff, A.-K., Niedermann, K., Braun, J., Adams, J., Brodin, N., Dagfinrud, H., Duruoz, T., Esbensen, B.A., Günther, K.-P., Hurkmans, E., Juhl, C.B., Kennedy, N., Kiltz, U., Knittle, K., Nurmohamed, M., Pais, S., Severijns, G., Swinnen, T.W., Pitsillidou, I.A., Warburton, L., Yankov, Z., Vliet Vlieland, T.P.M., 2018. 2018 EULAR recommendations for physical activity in people with inflammatory arthritis and osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 77, 1251–1260. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213585>
- Razzaque, M.S., 2012. The role of Klotho in energy metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 8, 579–587. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.75>
- Razzaque, M.S., Lanske, B., 2007. The emerging role of the fibroblast growth factor-23-klotho axis in renal regulation of phosphate homeostasis. *J. Endocrinol.* 194, 1–10. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0095>
- Rousset, F., Hazane-Puch, F., Pinosa, C., Nguyen, M.V.C., Grange, L., Soldini, A., Rubens-Duval, B., Dupuy, C., Morel, F., Lardy, B., 2015. IL-1beta mediates MMP secretion and IL-1beta neosynthesis via upregulation of p22(phox) and NOX4 activity in human articular chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* 23, 1972–1980. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.02.167>
- Rutjes, A.W.S., Jüni, P., da Costa, B.R., Trelle, S., Nüesch, E., Reichenbach, S., 2012. Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* 157, 180–191. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-157-3-201208070-00473>
- Sakellariou, G., Conaghan, P.G., Zhang, W., Bijlsma, J.W.J., Boyesen, P., D’Agostino, M.A., Doherty, M., Fodor, D., Kloppenburg, M., Miese, F., Naredo, E., Porcheret, M., Iagnocco, A., 2017. EULAR recommendations for the use of imaging in the clinical management of peripheral joint osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 1484–1494. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210815>
- Sedeek, M., Gutsol, A., Montezano, A.C., Burger, D., Nguyen Dinh Cat, A., Kennedy, C.R.J., Burns, K.D., Cooper, M.E., Jandeleit-Dahm, K., Page, P., Szyndralewicz, C., Heitz, F., Hebert, R.L., Touyz, R.M., 2013. Renoprotective effects of a novel Nox1/4 inhibitor in a mouse model of Type 2 diabetes. *Clin. Sci.* 124, 191–202. <https://doi.org/10.1042/CS20120330>
- Sellam, J., 2015. Arthrose : des grandes avancées physiopathologiques aux perspectives thérapeutiques. *Douleur analg* 28, 20–25. <https://doi.org/10.1007/s11724-015-0409-4>

- Sellam, J., Berenbaum, F., 2013. Is osteoarthritis a metabolic disease? *Joint Bone Spine* 80, 568–573. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2013.09.007>
- Siddle, K., 2011. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J. Mol. Endocrinol.* 47, R1-10. <https://doi.org/10.1530/JME-11-0022>
- Takac, I., Schröder, K., Zhang, L., Lardy, B., Anilkumar, N., Lambeth, J.D., Shah, A.M., Morel, F., Brandes, R.P., 2011. The E-loop Is Involved in Hydrogen Peroxide Formation by the NADPH Oxidase Nox4. *J Biol Chem* 286, 13304–13313. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.192138>
- Tavera, C., Abribat, T., Reboul, P., Doré, S., Brazeau, P., Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J., 1996. IGF and IGF-binding protein system in the synovial fluid of osteoarthritic and rheumatoid arthritic patients. *Osteoarthr. Cartil.* 4, 263–274. [https://doi.org/10.1016/s1063-4584\(05\)80104-9](https://doi.org/10.1016/s1063-4584(05)80104-9)
- Tetlow, L.C., Adlam, D.J., Woolley, D.E., 2001. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum.* 44, 585–594. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200103\)44:3<585::AID-ANR107>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200103)44:3<585::AID-ANR107>3.0.CO;2-C)
- Tsezou, A., Furuichi, T., Satra, M., Makrythanasis, P., Ikegawa, S., Malizos, K.N., 2008. Association of KLOTHO gene polymorphisms with knee osteoarthritis in Greek population. *J. Orthop. Res.* 26, 1466–1470. <https://doi.org/10.1002/jor.20634>
- van Oostrom, S.H., Picavet, H.S.J., de Bruin, S.R., Stirbu, I., Korevaar, J.C., Schellevis, F.G., Baan, C.A., 2014. Multimorbidity of chronic diseases and health care utilization in general practice. *BMC Fam Pract* 15, 61. <https://doi.org/10.1186/1471-2296-15-61>
- Veronese, N., Stubbs, B., Solmi, M., Smith, T.O., Noale, M., Cooper, C., Maggi, S., 2017. Association between lower limb osteoarthritis and incidence of depressive symptoms: data from the osteoarthritis initiative. *Age Ageing* 46, 470–476. <https://doi.org/10.1093/ageing/afw216>
- Vina, E.R., Kwok, C.K., 2018. Epidemiology of osteoarthritis: literature update. *Curr Opin Rheumatol* 30, 160–167. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000479>
- Wang, J., 2018. Efficacy and safety of adalimumab by intra-articular injection for moderate to severe knee osteoarthritis: An open-label randomized controlled trial. *J. Int. Med. Res.* 46, 326–334. <https://doi.org/10.1177/0300060517723182>
- Wang, Y., Kuro-o, M., Sun, Z., 2012. Klotho gene delivery suppresses Nox2 expression and attenuates oxidative stress in rat aortic smooth muscle cells via the cAMP-PKA pathway. *Aging Cell* 11, 410–417. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00796.x>
- Wegner, A.M., Campos, N.R., Robbins, M.A., Haddad, A.F., Cunningham, H.C., Yik, J.H.N., Christiansen, B.A., Haudenschild, D.R., 2019. Acute Changes in NADPH Oxidase 4 in Early Post-Traumatic Osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* 37, 2429–2436. <https://doi.org/10.1002/jor.24417>
- Yamamoto, M., Clark, J.D., Pastor, J.V., Gurnani, P., Nandi, A., Kurosu, H., Miyoshi, M., Ogawa, Y., Castrillon, D.H., Rosenblatt, K.P., Kuro-o, M., 2005. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *J. Biol. Chem.* 280, 38029–38034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509039200>
- Yan, Y., Wang, Y., Xiong, Y., Lin, X., Zhou, P., Chen, Z., 2017. Reduced Klotho expression contributes to poor survival rates in human patients with ovarian cancer, and overexpression of Klotho inhibits the progression of ovarian cancer partly via the inhibition of systemic inflammation in nude mice. *Mol Med Rep* 15, 1777–1785. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6172>
- Yin, W., Park, J.-I., Loeser, R.F., 2009. Oxidative Stress Inhibits Insulin-like Growth Factor-I Induction of Chondrocyte Proteoglycan Synthesis through Differential Regulation of

- Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt and MEK-ERK MAPK Signaling Pathways. *J Biol Chem* 284, 31972–31981. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.056838>
- Yudoh, K., Nakamura, H., Masuko-Hongo, K., Kato, T., Nishioka, K., 2005. [No Title]. *Arthritis Research & Therapy* 7, R904. <https://doi.org/10.1186/ar1765>
- Zhang, F., Zhai, G., Kato, B.S., Hart, D.J., Hunter, D., Spector, T.D., Ahmadi, K.R., 2007. Association between KLOTHO gene and hand osteoarthritis in a female Caucasian population. *Osteoarthr. Cartil.* 15, 624–629. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.12.002>
- Zhang, L., Nguyen, M.V.C., Lardy, B., Jesaitis, A.J., Grichine, A., Rousset, F., Talbot, M., Paclet, M.-H., Qian, G., Morel, F., 2011. New insight into the Nox4 subcellular localization in HEK293 cells: first monoclonal antibodies against Nox4. *Biochimie* 93, 457–468. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.11.001>
- Zhang, M., Zhou, Q., Liang, Q.-Q., Li, C.-G., Holz, J.D., Tang, D., Sheu, T.-J., Li, T.-F., Shi, Q., Wang, Y.-J., 2009. IGF-1 regulation of type II collagen and MMP-13 expression in rat endplate chondrocytes via distinct signaling pathways. *Osteoarthr. Cartil.* 17, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.05.007>
- Zhang, W., Doherty, M., Peat, G., Bierma-Zeinstra, M.A., Arden, N.K., Bresnihan, B., Herrero-Beaumont, G., Kirschner, S., Leeb, B.F., Lohmander, L.S., Mazières, B., Pavelka, K., Punzi, L., So, A.K., Tuncer, T., Watt, I., Bijlsma, J.W., 2010. EULAR evidence-based recommendations for the diagnosis of knee osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 483–489. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.113100>
- Zhu, Z., Li, J., Ruan, G., Wang, G., Huang, C., Ding, C., 2018. Investigational drugs for the treatment of osteoarthritis, an update on recent developments. *Expert Opin Investig Drugs* 27, 881–900. <https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1539075>