



HAL
open science

Du métabolisme énergétique des chondrocytes arthrosiques jusqu'au développement d'un outil de vectorisation

Anaïs Defois-Le Menn

► **To cite this version:**

Anaïs Defois-Le Menn. Du métabolisme énergétique des chondrocytes arthrosiques jusqu'au développement d'un outil de vectorisation. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2022. Français. NNT : 2022NANU1018 . tel-03881983

HAL Id: tel-03881983

<https://theses.hal.science/tel-03881983v1>

Submitted on 2 Dec 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.

THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Technologies Biomédicales, Vectorisation, Nanomédecine, Thérapie Cellulaire et Génique, Médecine Régénératrice et Biomatériaux

Par

Anaïs DEFOIS-LE MENN

Du métabolisme énergétique des chondrocytes arthrosiques jusqu'au développement d'un outil de vectorisation

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 23 novembre 2022,
Unité de recherche : U1229 – Regenerative Medecine and Skeleton (RMeS)

Rapporteurs avant soutenance :

Catherine Baugé – MCU, Université de Caen, UR 7451 BioConnect
Jérémie Sellam – PU-PH, Sorbonne Université, AP-HP, Paris, Inserm UMRS_938

Composition du Jury :

Président :	Jérémie Sellam	PU-PH, Sorbonne Université, AP-HP, Paris, Inserm UMRS_938
Examineurs :	Magali Cucchiarini Hervé Kempf	Professor, Center of Experimental Orthopaedics, Saarland University CRCN, UMR 7365 CNRS, Université de Lorraine, Laboratoire IMoPA
Directrice de thèse :	Claire Vinatier	MCU, Nantes Université, UMR U1229-RMeS
Co-dir. de thèse :	Yves Maugars	PU-PH, CHU de Nantes, UMR U1229-RMeS

Invités

Oumeya Adjali	DR2, TaRGeT INSERM UMR 1089
Mathieu Mével	Ingénieur, TaRGeT INSERM UMR 1089
Jérôme Guicheux	DR1, UMR 1229-RMeS

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury, Catherine Baugé et Jérémie Sellam pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse, ainsi que Hervé Kempf pour avoir accepté d'être examinateur. Je tiens également à remercier Magali Cucchiarini qui, en plus d'avoir accepté d'être examinatrice de cette thèse, a accepté de participer à mon comité de suivi individuel. Merci Magali, car chacun de nos échanges m'a toujours beaucoup apporté.

Proche de la fin de ce périple, je comprends aujourd'hui pourquoi on associe souvent à la thèse l'image du voyage.

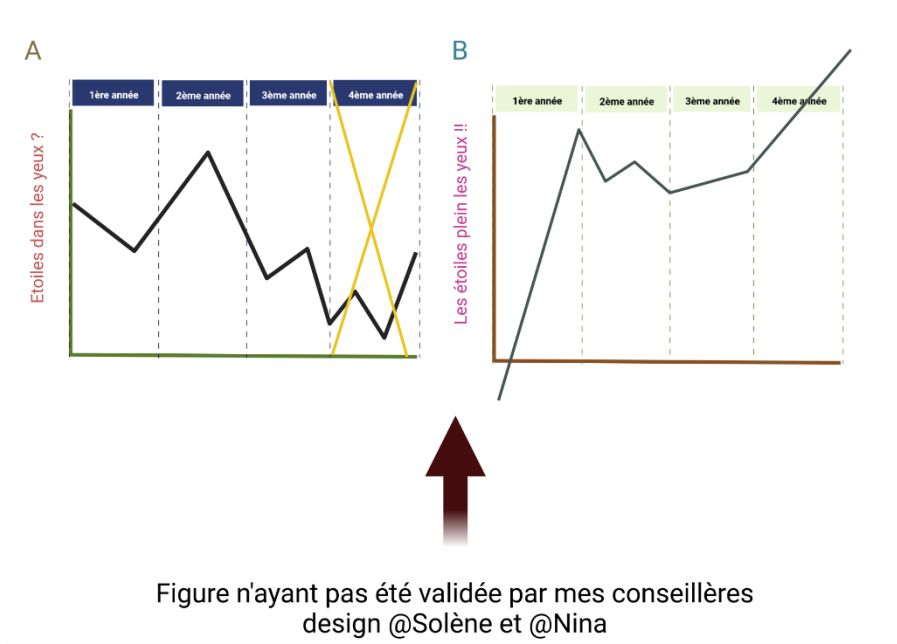
Un voyage se définit par de belles aventures, de belles rencontres et des découvertes inattendues autant de choses qui m'ont comblée au cours de cette thèse. Et au même titre qu'à la fin d'un voyage, la nostalgie nous prend souvent aux tripes, et l'envie qui nous guette est de vivre à nouveau un voyage, un nouveau voyage, qu'on n'imagine ne pas pouvoir être plus beau mais qu'on espère au moins l'être tout autant que le précédent.

Revenons alors sur ce voyage qui s'achève... Tout a commencé un jour d'été, ou après avoir brillamment confondu arthrose et ostéoporose, Claire et Jérôme (vraiment désespérés, de toute évidence !), accompagnés de loin par Mia (oups, elle était en retard !) m'ont offert la chance de venir faire une thèse avec eux, et je vous en remercie. Dans une autre mesure, merci Claire de m'avoir suivi tout au long de ce voyage, d'avoir pris le temps d'essayer de suivre les idées désorganisées que je tentais parfois de te partager et d'avoir ressenti, au moins aussi intensément que moi, chaque étape de ce voyage.

Merci à vous aussi, cher Pr Yves Maugars, d'avoir été mon directeur de thèse autant que nécessaire et de m'avoir ainsi donné la chance de vivre cette belle aventure.

Enfin, « la chance », déjà c'est un mot que je ne maîtrise pas beaucoup, mais surtout, ce n'est PAS DU TOUT ce que j'aurais dit il y a 4 ans de ça. Mes premiers collègues de bureau, Pierre, Benoit, et Giugiu en témoigneront sans aucun doute. Mais comme on le dit poliment, « il n'y a que les imbéciles qui ne changent pas d'avis ». Et alors que le schéma classiquement décrit

de l'enthousiasme du doctorant est plutôt proche de la figure A, le mien, a plutôt été proche de la figure B. Une BELLE aventure a ainsi vu le jour.



J'aime à dire (parce que j'ai trouvé mon public !) que l'arthrose ne me met pas d'étoiles dans les yeux, mais je dois quand même l'admettre, ce projet, cette aventure, a finalement réussi à me mettre des étoiles plein les yeux. Nina, tu n'y es pas pour rien, et tu sais, mieux que personne, que c'est une prouesse ;D ! Cette aventure n'aurait pas été la même sans ton aide, ta vision éclairée et tes conseils avisés au quotidien. Je te remercie pour tous ces bons moments passés, même pendant les manips les plus fastidieuses qui puissent être ! C'est toujours compliqué de sortir des kilos de reconnaissance avec quelques mots, mais j'espère que tu réussiras quand même à percevoir tout ça.

En ce sens je me dois aussi de remercier tous les autres membres du petit groupe ASKIP, Mélina, Cécile, ainsi que les différents stagiaires qui ont contribué chacun à leur manière à un petit bout de ce travail. Constantin, Julien, Mathilde, Alexandre et Lucie, je vous remercie d'avoir participé aux petites étoiles que j'ai aujourd'hui dans les yeux, car quoi de plus satisfaisant, que de pouvoir partager un peu de ce qu'on sait, un peu de ce qui nous enthousiasme au quotidien, à des personnes investies et intéressées ?

Après le groupe ASKIP, merci au(x) néo-groupe(s) Again-StratOA ! Sophie A. merci pour la petite excursion sur le plateau INOA ! Merci Fred pour ta disponibilité et les différentes

réflexions scientifiques partagées. Julien, ou devrais-je dire, Père Fouras, je compte sur toi pour m'offrir des places pour ton premier spectacle ! Et pour finir en beauté, merci Marie !!! Ne change pas, reste-toi, et je n'en dirais pas plus, car tu es de ces rencontres qui inspirent naturellement, sans fioritures, merci et merci.

Et, si nous passons la Loire, je tiens aussi à remercier Mathieu, Anthony et Nicolas, sans qui mon travail, et mon intégration (bien que furtive) à la 1089 n'aurait pas été possible.

Cette aventure n'aurait pas non plus été la même sans toi Sophie, tu as accompagné mes premiers pas en salle de bactério à mon arrivée au labo, merci pour toute l'aide et l'expertise que tu m'as transmis. Quand on parle de premiers pas au labo, merci à toi aussi Boris de m'avoir formée à la culture, merci pour ta gentillesse à toute épreuve et merci pour tout le support que tu apportes au quotidien au labo !

Joëlle ! Il vaut mieux tard que jamais, tu vois, à force de m'amadouer avec tes carrés de chocolat, finalement j'aurais travaillé avec toi, merci pour toutes ces mitochondries dans mes yeux. Et surtout, toi aussi tu as accompagné mes premiers pas au labo, participant activement à mon ouverture au monde si effrayant pour l'ourse observatrice que je peux être au premier abord.

Merci aussi à toute l'équipe d'histo, un monde assez lointain pour moi, Caroline, Julie, Maeva et Yoan (#petit salut de reine) d'avoir accompagné mes quelques balbutiements dans les pièces du fond du couloir !

Merci Sophie, merci Fabienne pour les commandes passées en urgence et toutes les autres. Et merci Tata Carole, ton rire inimitable me manquera, garde ton énergie !

Merci aussi aux « grands » de ce labo, Sarah, Laurent, Anne, Valérie, Vianney, Catherine, Pierre, Angélique, Alexandra, Alexis, Baptiste (je suis dans le tur-fu, c'est cadeau ;D), j'ai appris de chacun de vous, et je sors grandie de cette aventure.

Cette aventure, en plus de façonner mon esprit et de remplir mes yeux d'étoiles, a rempli mon cœur de joie et de bons moments partagés avec le meilleur des bureaux (incontestablement et en toute objectivité) et le deuxième des meilleurs bureaux, nos concurrents directs au LMP ! Merci à tous ceux qui y sont encore ou qui y sont passés pour tous les bons moments, et même les moins bons, quand il a fallu déguster des créations culinaires pas incroyables (on ne parle,

bien sûr, pas des miennes !!!), merci pour les Pokémon chassés, les raids gagnés, les débats philosophiques, les commérages en tout genre, les galères de manip partagées (certains sortent les protéines de référence stables en Western, d'autres non, c'est la vie !), les milliers de crêpes dégustées à la machine à crêpes, les pizzas du +39, les cafés, les chocolats... Chacun de vous se reconnaîtra et je repars avec mille merveilleux souvenirs avec vous, merci ! Concernant le meilleur des bureaux, je me dois tout de même de rajouter une mention toute particulière pour mon petit spaghetti Giugiu. Tu sais déjà tout, mais merci d'avoir partagé un bout de cette aventure de près, et l'autre de loin mais toujours avec la même bienveillance, le même toi dont je ne me lasse pas et qu'on ne décrit pas avec des mots. Et j'y arrive, je ne peux plus y échapper, j'ai pourtant retardé l'échéance au maximum... mais je vais être obligée de laisser des traces ECRITES de tout le bien que je pense de toi, chère voisine de gauche (je ne citerai pas ton nom, n'abusons pas, comme ça je pourrais nier en bloc ultérieurement !!). Je pense que pour se lever tous les matins avec l'envie d'aller au labo qui m'a porté tout au long de ma thèse, il ne faut pas simplement aimer ce que l'on fait, mais aussi aimer là où on est, et bien que beaucoup d'âmes de ce labo aient participé à cela, personne n'y a autant contribué que toi, dans chaque instant, des mieux aux pires, MERCI. En vérité, je pourrais en écrire des tonnes, mais personne ne me croirait, alors, juste, ne change pas, continue d'être entière, de râler quand bon te semble, et d'aimer sans demi-mesure !

Merci aussi à ceux qui ont accompagné mes rêves fous de « devenir chercheur » depuis le plus jeune âge, merci maman, merci mamie nounou, merci Marion. Et surtout, merci Papa, je suis fière d'être ta fille, merci de m'avoir permis de grandir et d'avoir le cœur et la force que j'ai aujourd'hui. Et merci à toi aussi Cécile de m'avoir apporté cadre et sérénité. Emerick, mon artichaut, poursuis tes rêves, ne te laisse jamais arrêter par la vie, ça en vaut la peine, crois-moi !

Je finirais par remercier par-dessus tout celui qui a eu dans cette aventure le rôle le plus ingrat, celui qui a partagé les côtés sombres de ce voyage, les imprévus, les changements de cap, et qui m'a supporté malgré tout à chaque instant. Tu es ma source intarissable de force et de sérénité quotidiennes. Merci mon amour !

Table des matières

I.	Introduction.....	19
A.	L'arthrose	19
1.	Epidémiologie.....	19
2.	Facteurs de risques.....	20
a.	Âge	21
b.	Génétique	23
c.	Sexe.....	23
d.	Traumatisme.....	25
e.	Troubles métaboliques	26
3.	Physiopathologie	27
a.	Le cartilage articulaire	28
b.	L'os sous-chondral	33
c.	La membrane synoviale	34
B.	Les cibles thérapeutiques dans l'arthrose.....	37
1.	Le vieillissement	38
a.	La sénescence	38
b.	L'autophagie	40
c.	Les facteurs anti-vieillessement	43
(1)	α -Klotho, une molécule anti-âge d'intérêt pour l'arthrose ?	43
(2)	Propriétés anti-âge d' α -Klotho	43
(3)	α -Klotho et l'arthrose.....	44
(4)	D'autres exemples de molécules anti-vieillessement	44
2.	L'inflammation	45
3.	Le métabolisme	50

a.	Le métabolisme énergétique.....	50
(1)	Les transporteurs de glucose.....	54
(2)	HK2.....	56
(3)	PKM2.....	57
(4)	LDHA.....	58
(5)	La mitochondrie et l'ATP.....	58
b.	Les autres voies métaboliques altérées au cours de l'arthrose.....	60
C.	Outils thérapeutiques en développement.....	62
1.	Traitement acellulaire : systèmes de délivrance.....	62
2.	Thérapie cellulaire.....	63
3.	Thérapie génique.....	65
a.	Avant-propos.....	65
b.	Revue de la littérature en préparation.....	67
c.	La thérapie génique combinée à l'utilisation de matériaux biocompatibles.....	105
II.	Objectifs de la thèse.....	107
III.	Résultats.....	109
A.	Dérégulations du métabolisme énergétique de chondrocytes issus d'articulations arthrosiques après un traitement pro-inflammatoire.....	109
1.	Rationnel de l'étude.....	109
2.	Article expérimental soumis dans Science Advances : "Osteoarthritic chondrocytes undergo a glycolysis-related metabolic switch upon exposure to IL-1 β or TNF- α ".....	110
3.	Perspectives de l'étude.....	149
B.	Evaluation de différents AAVr en injection intra-articulaire chez la souris.....	153
1.	Rationnel de l'étude.....	153
2.	Matériel et Méthodes.....	155
a.	Culture cellulaire.....	155

(1)	Isolation des chondrocytes primaires.....	155
(2)	Transduction	155
(3)	Analyse FACS (<i>Fluorescence activated cell sorting</i>).....	156
b.	Expérimentation in vivo : Injections intra-articulaires	156
(1)	Aspect éthique et schéma expérimental	156
(2)	Chirurgie et suivi	157
(3)	Analyses moléculaires.....	157
(4)	Analyses histologiques.....	158
3.	Résultats expérimentaux.....	159
a.	Efficacité de transduction de 6 sérotypes d'AAVr in vitro sur des chondrocytes primaires.....	159
b.	Influence du sérotype sur l'efficacité de transduction in vivo	161
c.	Evaluation de la bio-distribution des sérotypes étudiés	163
d.	Influence du transgène sur l'efficacité de transduction in vivo	166
4.	Conclusion	169
5.	Perspectives.....	171
IV.	Conclusion générale	174
V.	Bibliographie	176

Liste des publications et communications

Article de revue :

“Gene therapy for osteoarthritis”

Anaïs Defois, Nina Bon, Mathieu Mével, Oumeya Adjali, Yves Maugars, Jérôme Guicheux*, Claire Vinatier*

**Co-last authors*

En préparation

Article expérimental :

“Osteoarthritic chondrocytes undergo a glycolysis-related metabolic switch upon exposure to IL-1 β or TNF- α ”

Anaïs Defois, Nina Bon, Alexandre Charpentier, Mélina Georget, Frédéric Blanchard, Antoine Hamel, Denis Waast, Jean Armengaud, Ophélie Renoult, Claire Pecqueur, Yves Maugars, Marie-Astrid Boutet, Jérôme Guicheux, Claire Vinatier

Soumis dans « Science Advances »

Communications affichées :

“Role of the anti-aging α -klotho protein in chondrocytes”

Anaïs Defois, Nina Bon, Sophie Sourice, Mathieu Mével, Mélina Georget, Benoit Bodic, Oumeya Adjali, Yves Maugars, Jérôme Guicheux, Claire Vinatier

OARSI 2021 (en distanciel)

“Comparisons of cytokines responses of osteoarthritic and non-osteoarthritic human chondrocytes”

Anaïs Defois, Nina Bon, Mélina Georget, Cécile Boyer, Yves Maugars, Jérôme Guicheux, Claire Vinatier

OARSI 2022

Communications orales :

“Gene therapy for osteoarthritis: role of the anti-aging α -klotho in osteoarthritis”

Anaïs Defois, Nina Bon, Sophie Sourice, Elodie Le Tilly, Laurent Beck, Nicolas Jaulin, Yves Maugars, Mathieu Mével, Eduard Ayuso, Jérôme Guicheux, Oumeya Adjali, Claire Vinatier

Journée de l'école doctorale Biologie Santé (ED-BS) 2020 (en distanciel)

“Canonical pro-inflammatory response of osteoarthritic human chondrocytes differs from that of non-osteoarthritic human chondrocytes”

Anaïs Defois, Nina Bon, Mélina Georget, Cécile Boyer, Marie-Astrid Boutet, Frédéric Blanchard, Antoine Hamel, Denis Waast, Jean Armengaud, Yves Maugars, Jérôme Guicheux, Claire Vinatier

Journées françaises de biologie des tissus minéralisés (JFBTM) 2022

“Canonical pro-inflammatory response of osteoarthritic human chondrocytes differs from that of non-osteoarthritic human chondrocytes”

Anaïs Defois, Nina Bon, Alexandre Charpentier, Mélina Georget, Cécile Boyer, Marie-Astrid Boutet, Frédéric Blanchard, Antoine Hamel, Denis Waast, Jean Armengaud, Yves Maugars, Jérôme Guicheux, Claire Vinatier

Bioregate 2022

Co-encadrement et enseignement

- **Constantin Charpentier** (2018-2019)
BTS 1^{ère} année, Lycée Talensac : 6 semaines
- **Julien Cébile** (2019-2020)
BTS 2^{ème} année, Lycée Talensac : 8 semaines
- **Autone Leplat** (2020-2021)
Licence 3, Université de Nîmes : 6 semaines
- **Lucie Danet** (2020-2021 & 2021-2022)
Master 1 & Master 2 « Biologie, biotechnologie et recherche thérapeutique », Université de Nantes : 8 semaines & 6 mois
- **Mathilde Slamani** (2021-2022)
Licence 3, Université de Nantes : 8 semaines réparties sur l'année
- **Alexandre Charpentier** (2021-2022)
Master 2 « Génie génétique et biologie des systèmes », Université de Nantes : 6 mois

Enseignement : Plateau technique de Biologie Moléculaire (2021-2022)
Licence 3, Université de Nantes : 27h

Liste des tableaux

Tableaux annexés à la revue en préparation (en anglais) :

TABLE 1 : SUMMARY OF CLINICAL TRIALS RELATED TO GENE THERAPY FOR OA.	88
TABLE 2 : SUMMARY GENE THERAPIES AUTHORIZED ON THE MARKET.....	89
TABLE 3 : FEATURES OF VIRAL VECTORS.....	91
TABLE 4 : PRE-CLINICAL STUDIES EVALUATING HD-AD EFFICIENCY IN OA ANIMAL MODELS.....	92
TABLE 5 : AAV SEROTYPES, THEIR PREFERENTIAL TROPISM AND THEIR DESCRIBED RECEPTOR TO BE PROCESS.	94

Tableaux annexés au manuscrit (hors revue) :

TABLEAU 1 : AMELIORATION DE L'EFFICACITE DES VECTEURS VIRAUX GRACE A LEUR ASSOCIATION AVEC DES BIOMATERIAUX. ADAPTE D'APRES WANG ET AL. 2021 [342].	106
TABLEAU 2 : RECAPITULATIF DES DIFFERENTS AAV EVALUES AU COURS DE CETTE ETUDE.....	156
TABLEAU 3 : LISTE DES AMORCES UTILISEES.....	158
TABLEAU 4 : PROTOCOLE DE PREPARATION DES COUPES EN PARAFFINE DE 5µM DE TISSUS MOUS AVANT OBSERVATION.....	159
TABLEAU 5 : PROTOCOLE DE PREPARATION DES COUPES CONGELEES DE 8µM DE TISSUS DURS (GENOUX) AVANT OBSERVATION.	159
TABLEAU 6 : LES DIFFERENTES MODIFICATIONS CHIMIQUES APORTEES A LA SURFACE DE LA CAPSIDE QUI ONT ETE EVALUEES AU COURS DE MON PROJET	172

Liste des figures

FIGURE 1 : PRISE EN CHARGE DE L'ARTHROSE ACTUELLEMENT	20
FIGURE 2 : LES FACTEURS DE RISQUE DE L'ARTHROSE.	21
FIGURE 3 : PREVALENCE DE L'ARTHROSE (2017) METTANT EN EVIDENCE L'AGE ET LE SEXE COMME FACTEURS DE RISQUE.	22
FIGURE 4 : MISE EN EVIDENCE DE L'INCIDENCE DE L'ARTHROSE EN 2019 SELON LE SEXE ET L'ARTICULATION TOUCHEE.	24
FIGURE 5 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'IMPACT DE CHARGES ANORMALEMENT ELEVEES SUR LE CARTILAGE ARTICULAIRE.	26
FIGURE 6 : ALTERATIONS ARTICULAIRES POUVANT SURVENIR AU COURS DE L'ARTHROSE.	28
FIGURE 7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ORGANISATION CELLULAIRE AU SEIN DU CARTILAGE ARTICULAIRE NORMAL.	29
FIGURE 8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DU CARTILAGE	30
FIGURE 9 : COUPE HISTOLOGIQUES D'UNITES OSTEO-CHONDRALES COLOREES A LA SAFRANIN-O PRESENTANT UN CARTILAGE INTACT (A GAUCHE) ET UN CARTILAGE FORTEMENT DEGRADE (A DROITE).	32
FIGURE 10 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DEREGULATIONS IMPACTANT L'UNITE OSTEO-CHONDRALE DANS LES STAGES PRECOCES (GAUCHE) ET TARDIFS DE L'ARTHROSE (DROITE).	34
FIGURE 11 : UNITE ANATOMO-FONCTIONNELLE DE L'IFP ET DE LA MEMBRANE SYNOVIALE.	36
FIGURE 12 : CARACTERISTIQUES DES CELLULES SENESCENTES ET INFLUENCE DU SASP SUR LES CELLULES DE L'ARTICULATION (CHONDROCYTES, SYNOVIOCYTES, CELLULES IMMUNITAIRES...)	38
FIGURE 13 : LE CYCLE DE L'AUTOPHAGIE.	41
FIGURE 14 : VOIES DE SIGNALISATION ASSOCIEES L'INFLAMMATION	46
FIGURE 15 : LA VOIE CANONIQUE DE WNT	50
FIGURE 16 : REACTIONS MOLECULAIRES ASSOCIEES A LA GLYCOLYSE.	52
FIGURE 17 : LE CYCLE DE KREBS.	53
FIGURE 18 : LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE MITOCHONDRIALE.	53
FIGURE 19 : MISE EN EVIDENCE DES DIFFERENTS SYSTEMES ANTI-OXYDANTS DISPONIBLES AU SEIN DES CHONDROCYTES.	60
FIGURE 20 : OVERVIEW OF OSTEOARTHRITIS MAIN CHARACTERISTICS.	72
FIGURE 21 : LIMITATIONS AND IMPROVEMENTS TO ENHANCE VIRAL VECTOR TRANSDUCTION.	81
FIGURE 22 : SCHEMATIC REPRESENTATION OF THE CURRENTLY MOST PROMISING VIRAL VECTORS FOR OA GT.	85
FIGURE 23 : ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE (COMPOSANTES 1 ET 2) DES DONNEES DE TRANSCRIPTOMIQUE OBTENUES DANS LES OACS (HAC) ET DANS LES NCS (HVC).	150
FIGURE 24 : SCHEMA EXPERIMENTAL DES EXPERIMENTATIONS D'INJECTIONS INTRA-ARTICULAIRES D'AAVS.	157
FIGURE 25 : EFFICACITE DE TRANSDUCTION <i>IN VITRO</i> DES AAV 1, 2, 5, 8, 9 ET DE L'AAV DJ DANS DES IMACS (A) ET DES OACS (B). DEUX TEMPS D'INFECTION (48H ET 72H), ET TROIS QUANTITES (MOI 1 ^{E3} , 1 ^{E4} ET 1 ^{E5})	

ONT ETE EVALUES PAR DES ANALYSES FACS METTANT EN EVIDENCE LE NOMBRE DE CELLULES
EXPRIMANT LA GFP DANS CHACUN DES CONDITIONS. IMACS, N=3 ; OACS, N=1 A 4 TELS QU'INDIQUES
SUR LA FIGURE. 160

FIGURE 26 : EFFICACITE DE TRANSDUCTION *IN VIVO* DES AAV 1, 2, 5, 8, 9 ET DJ. (A) NOMBRE DE GENOME
VIRAUX PAR GENOMES DIPLOÏDES (VG/DG) DETECTES DANS LE GENOU AINSI QUE DANS LE MUSCLE. (B)
ANALYSE HISTOLOGIQUE DE L'EXPRESSION DE LA GFP. IMAGE D'UNE ARTICULATION REPRESENTATIVE
DES 5 SOURIS INJECTEES AVEC LE MEME VECTEUR. BARRE D'ECHELLE = 1 MM (C) VUE HISTOLOGIQUE
D'ENSEMBLE METTANT EN EVIDENCE LA FORTE TRANSDUCTION DES CELLULES MUSCULAIRES A
PROXIMITE DE L'ARTICULATION APRES L'INJECTION DE 8^{E10} GENOMES VIRAUX (VG). BARRE D'ECHELLE =
2,5 MM 162

FIGURE 27 : BIODISTRIBUTION DES AAV 1, 2, 5, 8, 9 ET DJ. (A) NOMBRE DE COPIES DE GENOMES VIRAUX
DETECTES DANS LE FOIE DES SOURIS INJECTEES AVEC 1^{E10} VG OU 8^{E10} VG PAR ARTICULATION. (B)
ANALYSE HISTOLOGIQUE DE L'EXPRESSION DE LA GFP DANS LE FOIE. (C) NOMBRE DE GENOMES VIRAUX
DANS LES POUMONS ET LA RATE. INJECTIONS DE 1^{E10} VG, N=3 POUR LES ANALYSES MOLECULAIRES, N=5
POUR LES ANALYSES HISTOLOGIQUES ; INJECTIONS DE 8^{E10} VG, N=5. BARRE D'ECHELLE = 1 MM. 165

FIGURE 28 : INFLUENCE DU PROMOTEUR DU TRANSGENE SUR L'EFFICACITE DE TRANSDUCTION DES AAV 8 ET 9
ET SUR L'EXPRESSION DU TRANSGENE. (A) NOMBRE DE COPIES DU TRANSGENE PAR GENOME DIPLOÏDE
(VG/DG) DETECTES DANS LE GENOU ET DANS LE MUSCLE DE LA CUISSE DES SOURIS INJECTEES AVEC LES
DIFFERENTS TYPES D'AAV. (B) ANALYSES HISTOLOGIQUES D'EXPRESSION DE LA GFP. IMAGES
REPRESENTATIVES DES GENOUX OBTENUS DANS CHACUNE DES CONDITIONS EVALUEES. BARRE
D'ECHELLE = 1 MM. (C) ANALYSES MOLECULAIRES METTANT EN EVIDENCE L'INFLUENCE DU TRANSGENE
SUR LA TRANSDUCTION NON DESIREE D'AAV 8 ET 9 DANS LE FOIE. N=5 DANS CHAQUE CONDITION ET
CHAQUE ANALYSE. 168

FIGURE 29 : EPIPHYSE FEMORALE DE C57BL/6 (P5/P6) TRANSPARISE. L'EPIPHYSE A ETE MIS EN PRESENCE
D'AAV DJ-CAG-GFP PENDANT 48H DANS DU MILIEU COMPLET, PUIS FIXEE TOUTE UNE NUIT DANS DU PFA
4%. TRANSPARISATION : RAPICLEAR. MARQUAGE DES NOYAUX : TO-PRO (642/661). 173

Liste des abréviations

[18F]FDG-PET : Fluorodesoxyglucose positron emission tomography

1,25(OH)₂D₃ : 1,25-dihydroxyvitamine D₃

2-DG : 2-déoxyglucose

AAVr : AAV recombinant

acétyl-coA : Acétyl-coenzyme-a

ADAMTS : A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs

ADN : Acide désoxyribonucleique

ADP : Adenosine di-phosphate

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

AMBRA1 : Activating molecule in becn1-regulated autophagy protein 1

AMP : Adénosine monophosphate

AMPK : Adénosine monophosphate kinase

APC : Adenomatous polyposis coli

ARN : Acides ribonucléiques

Atg : Autophagy-related genes

ATP : Adénosine triphosphate

Bcl-2 : B-cell lymphoma-2

BMP : Bone morphogenetic protein

BSA : Bovine serum albumine

cADPR : Cyclique ADP-ribose

CAG : CMV immediate enhancer/ β -actin

CAT : Catalase

CCL2/MCP1 : Chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein 1

CK1 : Casein kinase

CMV : Cytomégalovirus

COL2A1 : Chaîne α 1 du collagène de type II

COMP : Cartilage oligomeric matrix protein

COX-2 : Cyclooxygénase-2

CXCL1/GRO α : C-x-c motif chemokine ligand 1
dg : Génomes diploïdes
DKK-1 : Dickkopf
DMEM : Dulbecco's modified eagle medium
DMM : Déstabilisation du ménisque médial
DMOAD : Disease-modifying osteoarthritis drug
EDTA : Acide éthylène-diamine-tétracétique
EF-1 : Elongation factor 1
eNOS : NO synthase endothéliale
ERK : Extracellular signal-regulated protein kinases
EV : Vésicules extra-cellulaires
F6P : Fructose-6-phosphate
FACS : Fluorescence activated cell sorting
FADH2 : Flavine adénine dinucléotide
FGF : Fibroblast-growth factor
FLS : Fibroblastes-like synoviocytes
FOXO : Forkhead box o
G6P : Glucose-6-phosphate
GAGs : Glycosaminoglycanes
Gdf-11 : Growth differentiation factor-11
GFAT : Glutamine fructose-6-phosphate aminotransférase
GFP : Green fluorescent protein
Glut : Glucose transporter
GPX : Glutathione peroxidase
GSH : Glutathione
GSK-3 : Glycogen synthase kinase 3
GSX : Glutathione peroxidase
H3K9 : Lysine 9 de l'histone 3
HBP : Hexosamine biosynthetic pathway
HBSS : Hanks' balanced salt solution
HK2 : Hexokinase II

HO-1 : Hemo oxygenase 1
IDO : Indoleamine 2,3-dioxygénase
IFP : Fat pad infra-patellaire
IGF : Insulin growth factor
IGFBP : Insulin like growth factor binding protein
IL : Interleukine
iMAC : Immature murine articular chondrocytes
IMC : Indice de masse corporelle
iNOS : Oxyde nitrique synthase inductible
JAK : Janus kinases
JNK : C-jun-aminoterminal kinase
LC3 : Microtubule-associated proteins 1a/1b light chain 3b
LDH : Lactate déshydrogénase
LIPUS : Low-intensity pulsed ultrasound
LRP : Low-density lipoprotein receptor-related protein
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MCT-4 : Monocarboxylate transporter 4
MEC : Matrice extracellulaire
MMPs : Matrix métalloprotéinases
MOI : Multiplicity of infection
MSC : Cellules souches mésenchymateuses
mTORC1 : Mammalian (ou mechanistic) target of rapamycin complex 1
NAD(H) : Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP(H) : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-kB : Nuclear factor-kB
NK : Natural killer
NO : Oxyde nitrique
NOS : NO synthase
NOX : NADPH oxydase
OAC : Osteoarthritic chondrocytes
OARSI : Osteoarthritis research society international

O-GlcNAc : O-linked β -n-acetylglucosamine
OXPHOS : Phosphorylation oxydative
P2X7R : Récepteur purinergique p2x7
PARP : Poly(adp-ribose) transférase
PBS : Phosphate-buffered saline
PDGF : Platelet-derived growth factor
PE : Phosphatidylethanolamine
PFA : Paraformaldéhyde
PGC-1 α : Proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PGE2 : Prostaglandine e2
PGK1 : Phosphoglycérate kinase
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PK : Pyruvate kinase
PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor
PR : Polyarthrite rhumatoïde
PRP : Plasma riche en plaquettes
PRX : Peroxiredoxine
qPCR : Quantitative polymerase chain reaction
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
Runx2 : Runt-related transcription factor 2
SASP : Senescence associated secretory phenotype
scAAV : Self-complementary AAV
scRNA-seq : Single-cell RNA-seq
SGLT : Sodium-dependent glucose transporters
Sirt : Sirtuines
Slc : Solute carrier family
SOCS : Suppressor of cytokine signaling
Sox9 : Sry-box transcription factor 9
STAT : Signal transducers and activators of transcription
TGF : Transforming growth factor
TNF- α : Tumor necrosis factor

UDP-GlcNAc : Uridine diphosphate n-acétylglucosamine

Ulk-1 : Unc-51 like autophagy activating kinase 1

uPAR : Urokinase plasminogène

UVRAG : UV radiation resistance-associated gene

vg : Génomes viraux

VPP : Voie des pentoses phosphates

VPS : Vacuolar protein sorting

WISP-1 : Wnt1-inducible-signaling pathway protein 1

I. Introduction

A. L'arthrose

1. Epidémiologie

L'arthrose est une maladie articulaire qui touche toutes les articulations mobiles. C'est la maladie articulaire la plus répandue, dont 528 millions de personnes souffrent dans le monde [1]. La symptomatologie repose principalement sur une diminution de la mobilité articulaire, des déformations des articulations et l'apparition de douleurs. Ces symptômes imposent une réduction importante de la qualité de vie, constituant la première cause d'invalidité des personnes de plus de 40 ans, et mènent ainsi à d'importants coûts pour la société. Plus précisément, les coûts directs peuvent représenter de 1 à 2,5% du Produit Intérieur Brut des pays économiquement développés [2]. Les coûts indirects quant à eux sont plus complexes à mesurer, mais ne sont pas à négliger pour autant, et impliquent principalement un manque de productivité au travail, des absences plus nombreuses, et des départs à la retraite souvent anticipés.

La prise en charge actuelle est graduelle et dépend de l'évolution symptomatique de la maladie (**Figure 1**). Dans un premier temps, une approche non médicamenteuse peut être proposée, reposant ainsi principalement sur la perte de poids et la mise en place d'une activité physique adaptée, accompagnés d'une sensibilisation générale du patient à une bonne hygiène de vie [3]. Une récente étude a d'ailleurs mis en évidence le bénéfice d'une diminution de l'indice de masse corporelle (IMC) dans l'arthrose du genou [4]. D'autres mesures non-invasives comme le recours aux LIPUS (*Low-Intensity Pulsed Ultrasound*) peuvent aussi être envisagées [5]. Dans les cas où ces mesures ne seraient pas (ou plus) suffisantes à la diminution des symptômes, une prise en charge médicamenteuse intervient. La prise de paracétamol en première intention puis d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) est alors fréquente pour pallier à la douleur [6]. Cependant, la prise d'AINS implique plusieurs effets secondaires pouvant aller des problèmes gastriques aux problèmes cardiaques. De plus, leur utilisation à long terme tend généralement à diminuer leur efficacité, voire à augmenter à terme la douleur ressentie par les patients. Des injections intra-articulaires de corticostéroïdes peuvent alors être envisagées, permettant à court terme une amélioration significative de la

douleur qui n'est cependant pas durable, et qui sembleraient même être délétères à 5 ans [7]. Ajouté à cela, la répétition systématique d'injections intra-articulaires n'est pas envisageable à cause des risques d'infections et de l'inflammation locale associée. Une intervention chirurgicale est alors inévitable dans les cas d'arthrose les plus sévères. Dans les cas les plus simples, les traitements chirurgicaux peuvent être peu invasifs et réalisés sous arthroscopie comme lors d'un lavage articulaire ou d'une ostéotomie. En revanche, elles peuvent aussi aller jusqu'au remplacement partiel ou total de l'articulation atteinte par une prothèse. Cette ultime solution, génère une augmentation importante des coûts directs de l'arthrose, mais reste pour autant très pratiquée à la vue de l'amélioration importante de la qualité de vie qu'elle engendre chez la majorité des patients.

Pour autant, il n'existe aujourd'hui aucun médicament permettant de rétablir l'intégrité de l'articulation ou même de simplement enrayer les mécanismes menant au développement de l'arthrose (*Disease-modifying osteoarthritis drug* : DMOAD). Compte tenu du nombre important de patients atteints d'arthrose et du coût engendré pour la société, le développement de DMOADs représente alors un enjeu majeur de santé publique.



Figure 1 : Prise en charge de l'arthrose actuellement

2. Facteurs de risques

L'arthrose est une maladie soumise à différents facteurs de risque. La diversité de ces facteurs souligne la complexité de cette pathologie (**Figure 2**). En effet, ces différents facteurs de risque participent, chacun à leur manière, au développement de dérégulations anatomiques (dégradation du cartilage et des tissus mous adjacents, inflammation de la membrane synoviale, ostéophytes et sclérose de l'os sous chondral...), moléculaires (dérégulation de l'expression de matrix métalloprotéinases, dégradation des composants matriciels tels que le collagène de type II, l'agrécan et la COMP – *Cartilage oligomeric matrix protein* –) et/ou physiologiques (fibrose de la membrane synoviale, rigidité et déformation du cartilage...). Ces dérégulations mènent finalement toutes à l'apparition de symptômes communs comme la

douleur ou la rigidité articulaire. La multiplicité des facteurs pouvant participer à l'apparition de l'arthrose en fait une maladie complexe à détecter mais aussi à comprendre.

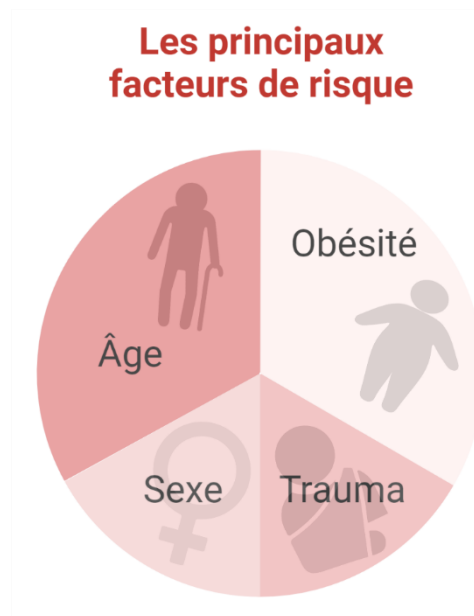


Figure 2 : Les facteurs de risque de l'arthrose.

a. Âge

L'âge est parmi les facteurs de risque les plus largement cités et décrits. En effet, une grande partie de la population âgée mondiale est touchée par l'arthrose puisque 9,6% des hommes et 18% des femmes de plus de 60 ans sont atteints d'arthrose (**Figure 3**) [8]. Ce facteur de risque représente un enjeu majeur dans nos populations vieillissantes. Ainsi, la prévalence de l'arthrose qui a déjà augmenté de 114% depuis 1990 [9], [10], ne cesse d'augmenter avec le vieillissement de la population.

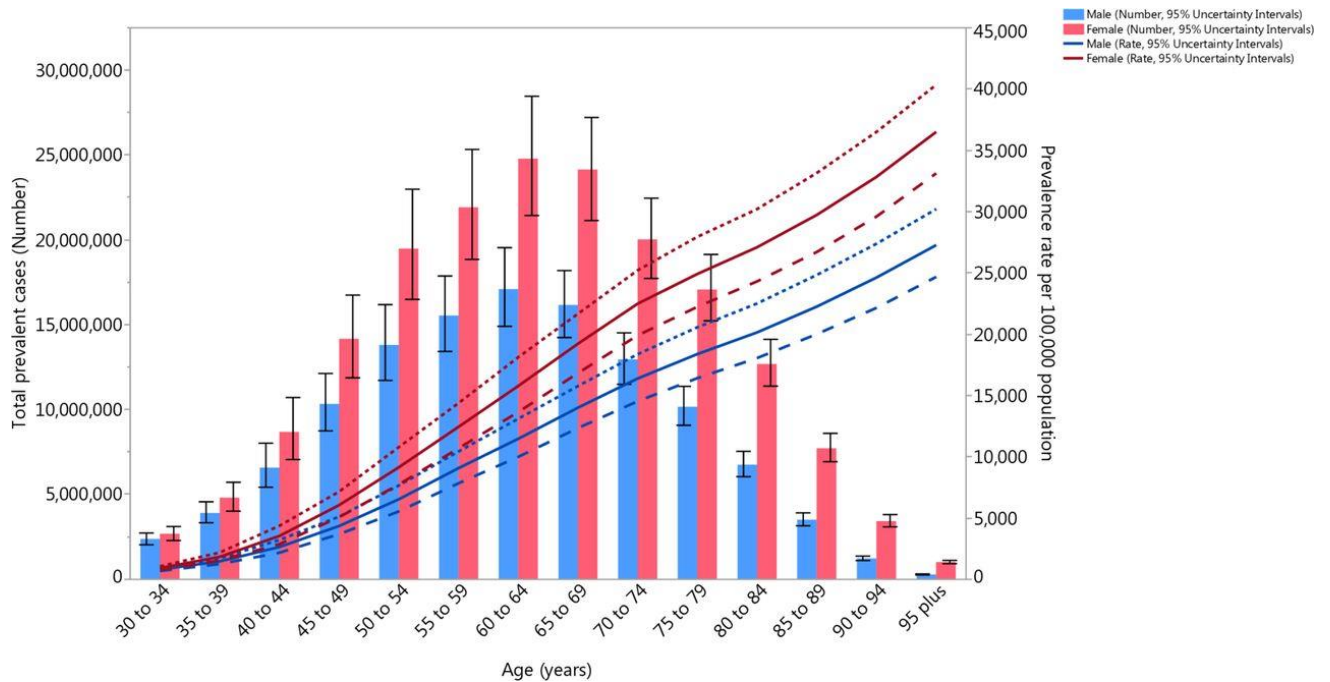


Figure 3 : Prévalence de l'arthrose (2017) mettant en évidence l'âge et le sexe comme facteurs de risque. Tirée de Safiri et al. 2017 [8].

Au-delà d'une prévalence accrue chez les personnes âgées, les mécanismes mis en jeu au cours de l'arthrose ainsi qu'au cours du vieillissement sont très similaires. Les caractéristiques cellulaires du vieillissement sont les suivantes : l'instabilité génomique, le raccourcissement des télomères, les altérations épigénétiques, la perte de l'homéostasie protéique, la dérégulation du système de détection et de régulation des nutriments, les dysfonctions mitochondriales, la sénescence, l'appauvrissement de la capacité régénératrice des cellules souches ainsi que la dérégulation de la communication intercellulaire [11]. Parmi ces caractéristiques, les altérations épigénétiques, la perte de l'homéostasie protéique, les dysfonctions mitochondriales, ainsi que la sénescence, sont les principales caractéristiques aussi retrouvées au cours d'un développement arthrosique.

Il est intéressant de noter que malgré la forte prévalence de l'arthrose dans la population âgée, toutes les personnes âgées ne souffriront pas d'arthrose [12]. Cette observation conforte l'aspect complexe et multifactoriel de la mise en place de cette maladie.

D'un point de vue thérapeutique, le mimétisme de certains mécanismes impliqués dans le vieillissement et dans le développement de l'arthrose fait des facteurs anti-âges des cibles d'intérêt. Cette stratégie thérapeutique sera développée ultérieurement dans ce manuscrit.

b. Génétique

L'arthrose n'est pas une maladie génétique. Pour autant, certains loci peuvent être significativement associés à un développement d'arthrose. Une récente étude très complète a d'ailleurs permis de mettre en évidence une centaine de loci associés à l'arthrose [13]. Cette étude est d'autant plus intéressante qu'elle a distinguée 11 phénotypes d'arthrose différents, permettant ainsi d'identifier des loci spécifiquement associés à la localisation anatomique, au sexe ou encore au stade d'arthrose. Les loci d'intérêt ont alors pu être associés à des mécanismes biologiques présentant donc un rôle clé dans la pathophysiologie de l'arthrose comme l'adipogenèse, le développement squelettique, ou encore la réponse immunitaire et l'inflammation.

c. Sexe

D'une manière générale, les femmes sont plus sujettes au développement de l'arthrose. Cependant, les différences sont plus ou moins marquées d'une articulation à une autre (**Figure 4**). En effet, alors que la différence est très marquée pour la gonarthrose, et l'arthrose des mains, elle l'est beaucoup moins pour la coxarthrose par exemple [14]. De façon intéressante, à événements traumatiques égaux, les femmes sont aussi plus susceptibles de développer une arthrose post-traumatique [15]. Il est intéressant de noter que chez la souris, la sévérité de l'arthrose induite chirurgicalement est plus importante chez les mâles que chez les femelles [16]. De façon plus marquante encore, le rôle de certaines voies de signalisation, comme l'IL-6 chez la souris, peut différer d'un sexe à l'autre [17]. Récemment, il a été montré que la signalisation de l'IL-6 contribue à la dégradation du cartilage et à la douleur chez les souris mâles mais pas chez les souris femelles [18]. En revanche, une étude récente a mis en évidence que tant les mâles que les femelles présentaient de la douleur en réponse à une induction chirurgicale d'arthrose [19].

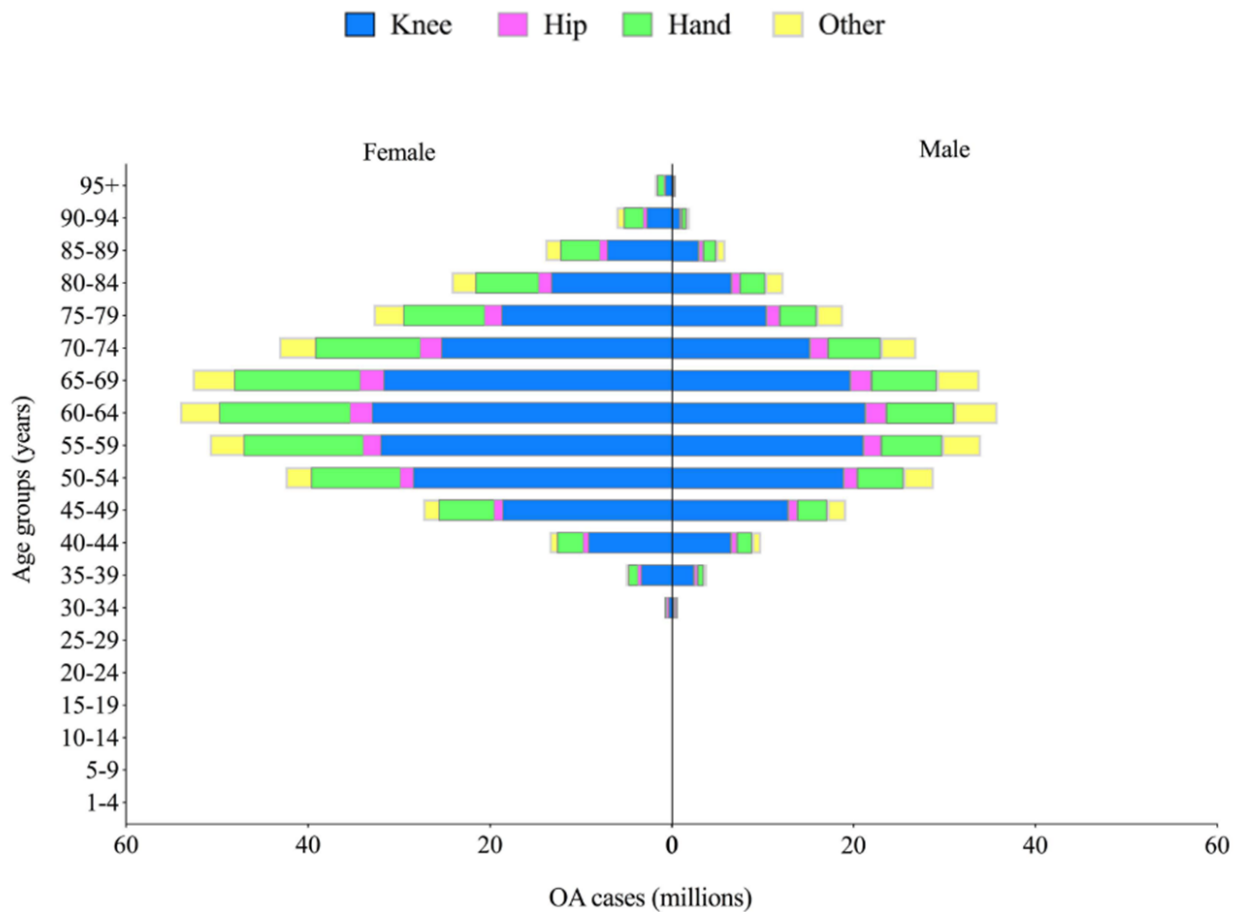


Figure 4 : Mise en évidence de l'incidence de l'arthrose en 2019 selon le sexe et l'articulation touchée. Tirée de Long et al. 2022 [10].

Cette prévalence dépendante du sexe n'est pas complètement expliquée par les connaissances actuelles. Alors que les œstrogènes [20], et des événements tels qu'une ménopause précoce ont été associés à une prévalence accrue chez les femmes, l'implication hormonale reste controversée [21]. D'autres éléments de réponses comme l'activation préférentielle de certaines voies de signalisation chez les femmes ménopausées comme la voie PI3K/Akt (Phosphoinositide 3-kinase/Akt) [22] pourraient participer à l'explication de cette prévalence accrue chez les femmes. De plus, l'étude génétique précédemment citée [13], a permis de mettre en évidence trois loci associés à l'arthrose de façon prédominante chez la femme. Parmi les 3 loci identifiés, un est en lien avec un gène impliqué dans le développement d'une ménopause précoce (rs116112221), alors que les deux autres (rs10453201 et rs10282983) ont notamment été associés à des régions géniques impliquées dans la densité minérale osseuse.

d. Traumatisme

Comme évoqué précédemment, l'arthrose peut se développer au cours du vieillissement, ou bien à la suite d'un traumatisme articulaire. On distingue alors l'arthrose spontanée de l'arthrose post-traumatique. Bien que les conséquences de la pathologie se traduisent dans chacun des cas par une douleur importante associée à une perte de mobilité articulaire, l'initiation de ces deux types d'arthroses diffère.

Les modèles animaux d'arthrose post-traumatique consistent majoritairement en un acte chirurgical ayant pour but la déstabilisation de l'articulation *via* une altération méniscale ou bien ligamentaire [23]. A la suite de cette induction chirurgicale une phase inflammatoire aiguë est observée, comme c'est aussi le cas chez l'homme à la suite d'un traumatisme articulaire [24]. En parallèle, la déstabilisation générale de l'articulation qui fait suite au traumatisme mène à un déséquilibre des forces auxquelles l'articulation est soumise. Ainsi, il a été montré que l'application de forces non physiologiques sur l'articulation de souris à la suite d'une rupture des ligaments s'accompagnait d'une perte de protéoglycanes [25]. De plus, la structure organisée de la MEC (matrice extra-cellulaire) permet, non seulement, de maintenir les propriétés biomécaniques nécessaires pour supporter les charges normales subies par l'articulation, mais aussi, de séquestrer et réguler le relargage de molécules bioactives. Ainsi, lorsque le cartilage est soumis à des forces anormales, plusieurs molécules comme FGF2 (*Fibroblast-growth factor-2*) ou TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor- β 1*) peuvent être libérées et participent aussi à l'activation de voies de signalisation modifiant la composition de la MEC [26]–[28]. L'aspect biomécanique mis en jeu au cours d'un traumatisme articulaire participe alors activement à la dégradation du cartilage (**Figure 5**). Cependant, l'inflammation associée aux phases précoces joue aussi un rôle clé. En effet, chez les patients ayant subi une reconstruction après une rupture ligamentaire, alors que l'équilibre de l'articulation est restaurée, des cas d'arthrose post-traumatique sont malgré tout observés [29].

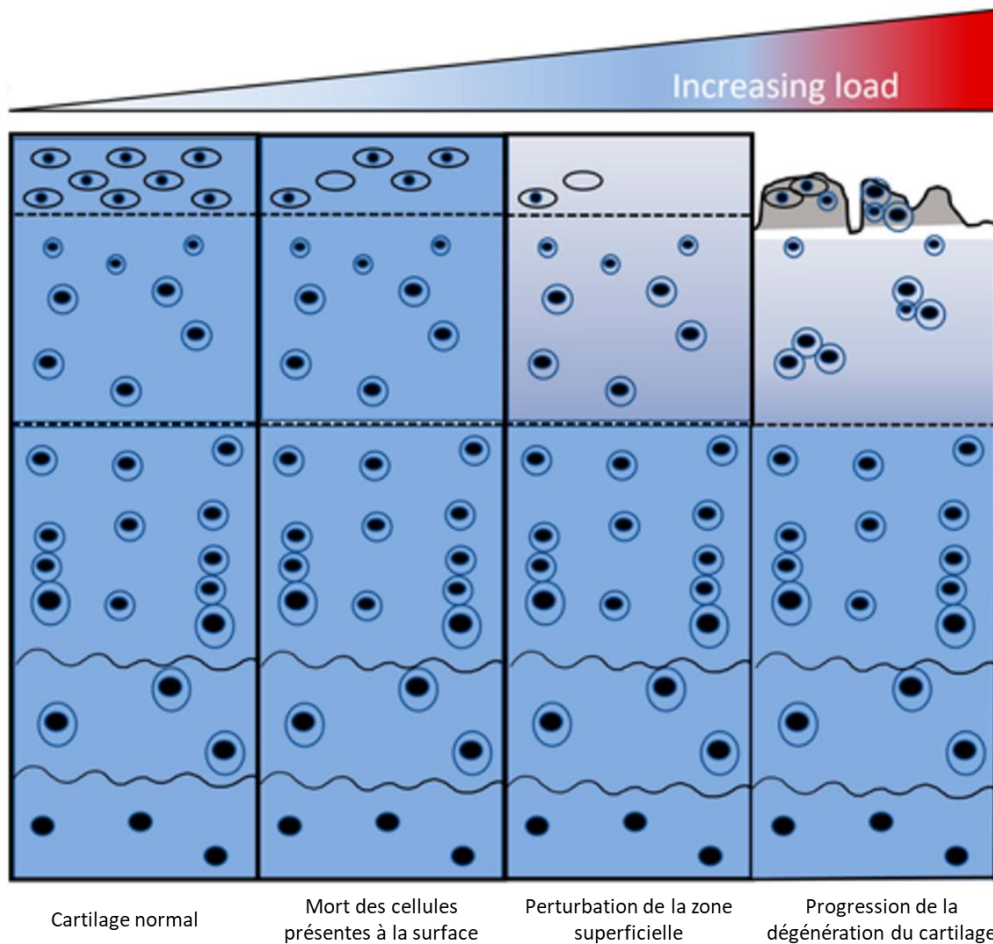


Figure 5 : Représentation schématique de l'impact de charges anormalement élevées sur le cartilage articulaire. Adaptée de Gilbert et al. 2021 [25].

e. *Troubles métaboliques*

La mise en place de mesures socio-diététiques en première ligne de traitement de l'arthrose s'explique notamment par le risque accru existant chez les patients souffrant de dérégulations métaboliques. En effet, l'augmentation de l'IMC (IMC>25) [30], et de façon encore plus marquée, l'obésité (IMC>30), augmente jusqu'à 3 fois le risque de développer de l'arthrose par rapport à une personne à l'IMC moyen [31]. L'augmentation de l'IMC induit des contraintes biomécaniques plus importantes participant à la dégradation du cartilage et ainsi, au développement de l'arthrose au niveau des articulations portantes.

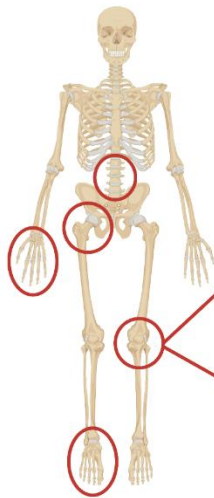
Pour autant, tout ne peut pas être expliqué par les aspects mécaniques, car des articulations non portantes comme celles des doigts sont aussi le siège d'un développement accru d'arthrose chez les patients obèses ou plus largement atteints d'un syndrome métabolique. Le syndrome métabolique se traduit par la présence d'au moins 2 des affections suivantes diagnostiquées : obésité, hypercholestérolémie, présence élevée de triglycérides,

hypertension ou intolérance au glucose [32]. Le syndrome métabolique est largement associé à une inflammation de bas grade qui contribue au développement de l'arthrose [33], [34]. En effet, le surplus de nutriments disponibles qui dérégule les processus métaboliques, et le surplus de tissu adipeux qui favorise la production d'adipokines, participent au maintien d'une inflammation de bas grade [35]. C'est alors la présence accrue de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-6 notamment) qui semble être déterminante dans le développement de l'arthrose chez ces patients [36].

3. Physiopathologie

En plus d'être une pathologie multifactorielle, la complexité de la compréhension de l'arthrose s'accroît avec le fait que ce soit une maladie de l'articulation entière. Ainsi tous les tissus de l'articulation peuvent être atteints au cours de l'arthrose. En effet, alors que l'intérêt principal de la communauté s'est longtemps exclusivement porté sur le cartilage et les dérégulations menant à sa dégradation, on prend aujourd'hui conscience du rôle de l'articulation dans son intégralité (**Figure 6**). De plus, plusieurs endotypes, définis par des sous-types d'arthrose associés à différents mécanismes moléculaires, peuvent être distingués impliquant par exemple préférentiellement soit une altération des mécanismes de réparation, soit la présence d'inflammation, ou la dérégulation des mécanismes métaboliques [37]–[39]. Ceci implique une compréhension non seulement de l'aspect moléculaire mais aussi de l'aspect phénotypique associés à une atteinte plus marquée du cartilage, de la membrane synoviale ou bien de l'os sous-chondral. Bien que ces 3 tissus soient ceux qui sont communément reconnus comme pouvant mener au développement de l'arthrose, tous les autres tissus articulaires (tendons, ligaments, muscles etc.) participent également à la dérégulation de l'homéostasie articulaire.

Articulations les plus touchées



Une atteinte de l'articulation en tant qu'organe

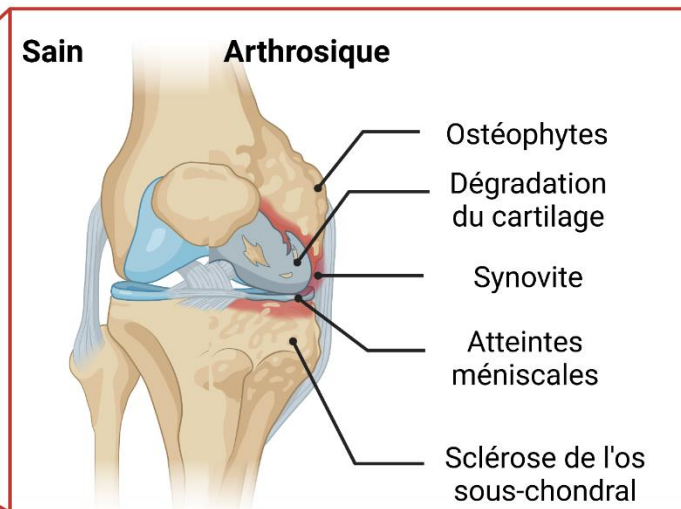


Figure 6 : Altérations articulaires pouvant survenir au cours de l'arthrose.

a. Le cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est le tissu conjonctif présent à la surface des os impliqués dans une articulation. C'est un tissu qui n'est ni innervé, ni vascularisé et qui puise alors les différents éléments utiles à sa survie (nutriments et O₂) par diffusion depuis les tissus adjacents et, dans le cas d'une articulation synoviale, le liquide synovial. Enfin, seulement 1 à 10 % de son volume total est constitué de cellules. Les cellules du cartilage, les chondrocytes, à l'image du reste du tissu sont précisément organisées en différentes couches (**Figure 7**). On observe alors, une couche superficielle où les chondrocytes sont densément présents, de morphologie ovale et orientés parallèlement à la surface articulaire. On retrouve dans cette couche superficielle des cellules chondro-progénitrices qui expriment notamment *Prg4* codant pour la lubriline, un protéoglycane [40]. Puis, une couche intermédiaire où les chondrocytes présentent une morphologie un peu plus sphérique sans organisation précise. Et enfin, une couche profonde délimitée par la *tide mark* où les chondrocytes sphériques sont empilés en colonne, sous laquelle, avant l'os sous-chondral, se trouve une zone où le cartilage est calcifié, se traduisant par la présence importante de collagène de type X et par une hypertrophie des chondrocytes.

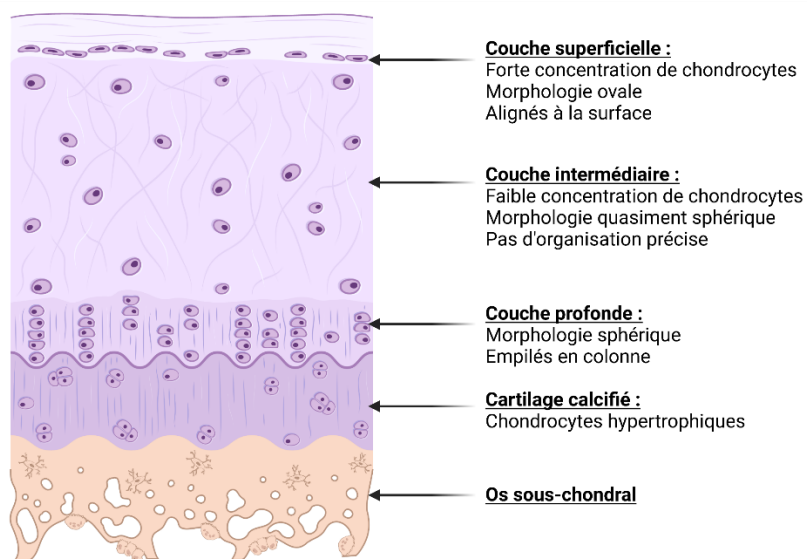


Figure 7 : Représentation schématique de l'organisation cellulaire au sein du cartilage artériel normal.

Le reste du volume du cartilage (> 90%) constitue la MEC [41]. La MEC se compose principalement d'eau (~80%), le reste étant composé de macromolécules [42]. Les macromolécules, jouent un rôle extrêmement important dans le maintien de la structure et de la fonction du cartilage artériel. Ces macromolécules peuvent se sous-diviser en trois grandes familles, les protéines collagéniques et non-collagéniques (fibronectine, laminine etc.), les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes (**Figure 8**). Le collagène de type II représente 90 à 95% des différents types de collagène qui composent la MEC [43], et est garant de la structure, et du volume du cartilage. Les collagènes de type IX et XI représentant respectivement ~3% et ~1% du collagène matriciel, participent eux, via des interactions avec le collagène de type II au maintien de la MEC et à la résistance aux forces imposées à l'articulation [25]. Enfin le collagène de type VI participe aux interactions entre la MEC et les chondrocytes [44].

Les agrécanes, protéoglycanes majoritairement retrouvés, covalamment liées aux glycosaminoglycanes (GAGs) participent largement au maintien des propriétés biomécaniques du cartilage lui permettant de répondre aux compressions lors de la mise en charge des articulations, ainsi qu'aux forces de friction [43]. Parmi les GAGs, on retrouve les héparanes sulfate, la chondroïtine sulfate ou encore l'acide hyaluronique. L'acide hyaluronique est capable d'interagir avec le CD44 des chondrocytes [45], participant ainsi au maintien de la MEC péri-cellulaire [46]. De nombreux autres protéoglycanes sont aussi retrouvés dans le cartilage comme la décorine ou encore le glypican. Enfin, les COMP participent aussi au

maintien de la structure de la MEC, d'une part, en favorisant la synthèse d'éléments essentiels comme le collagène de type II et les protéoglycanes et d'autre part, en inhibant la production de collagène I et X [47]. Le tout forme un ensemble extrêmement bien organisé, chaque composant étant indispensable à l'autre, à l'instar des cellules, qui, bien que relativement peu représentées sont indispensables à la production de la MEC.

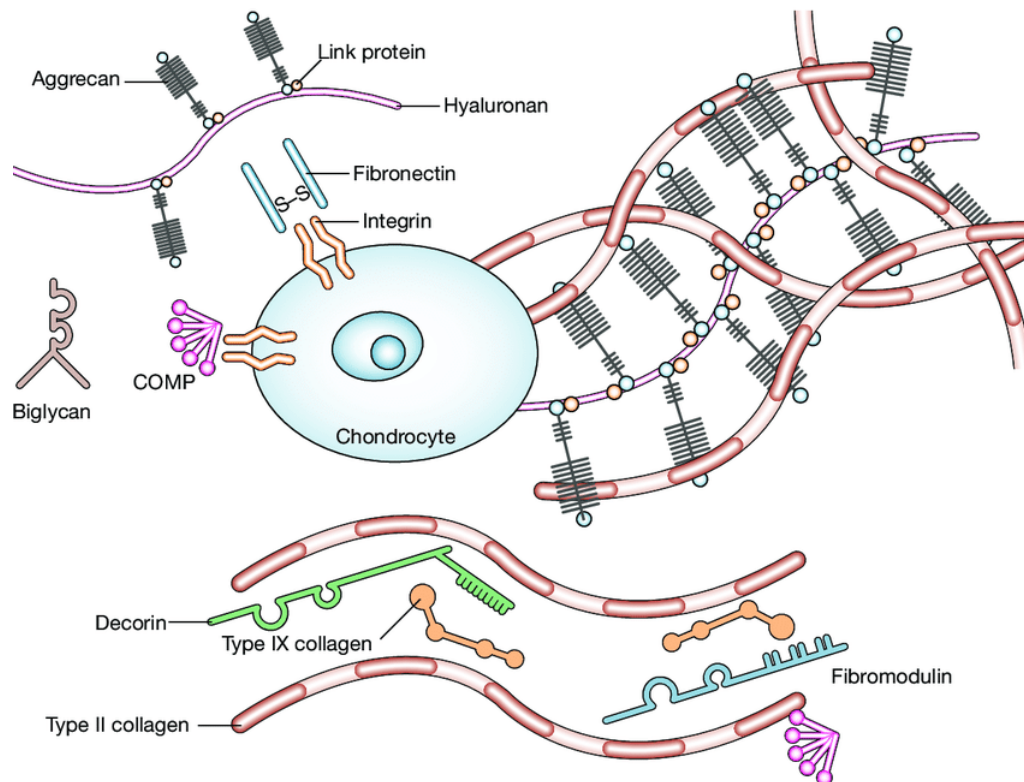


Figure 8 : Représentation schématique de la matrice extracellulaire du cartilage, d'après Chen et al. 2006 [48].

Au cours de l'arthrose, ce fin équilibre s'érode : les chondrocytes subissent des changements phénotypiques anormaux menant ainsi à la destruction de la MEC, qui, elle-même, favorise des comportements cellulaires anormaux (**Figure 9**). Plus précisément, les chondrocytes vont mettre en place des processus cataboliques, hypertrophiques, et proliférer de manière anormale menant inévitablement à la complète déstructuration du cartilage [49], [50].

Les processus cataboliques se traduisent principalement par la dégradation de 2 des composants majeurs de la MEC, le collagène de type II et les agrécans (**Figure 8**). Les enzymes responsables de cette dégradation sont les matrix métalloprotéinases (MMPs) et les ADAMTS (*A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs*), des enzymes zinc-dépendantes produites par les chondrocytes. La famille des ADAMTS se compose de 19

membres, parmi eux on retrouve notamment des agrécanases (ADAMTS 1, 4, 5 et 9), ou encore des ADAMTS capables de protéolyser les COMP (ADAMTS-7 et ADAMTS-12) [51], [52]. Les ADAMTS jouent ainsi un rôle important dans la dégradation de la MEC qui intervient au cours de l'arthrose [52], [53]. La dégradation des agrécanes, est un événement important et précurseur car il a été observé dans les phases précoces de l'arthrose [54], [55], ainsi les ADAMTS interviennent généralement avant les MMPs. Il existe 23 MMPs humaines [56]. Bien que plusieurs MMPs soient, comme les ADAMTS, capables de cliver les agrécanes au cours de l'arthrose, l'activité agrécanase des MMPs ne semble pas être prédominante [57]. Parmi les MMPs fortement impliquées dans l'arthrose, les MMP-1 et MMP-13 sont des collagénases [58], [59]. La dégradation du collagène est un processus irréversible après lequel la MEC ne peut donc plus se réparer [60], alors que la dégradation des agrécanes est un processus qui se produit aussi dans un cartilage normal, lors du renouvellement de la MEC [61], [62]. Dans ce contexte, les MMP-1 et 13 jouent un rôle majeur dans la dégradation du cartilage. Les expressions d'autres MMPs peuvent également être augmentées au cours de l'arthrose, comme les MMP-2, MMP-3 ou MMP-9, qui elles sont capables de cliver les composants non-collagéniques du cartilage [63]. Au-delà de l'action directe de dégradation de la MEC, les MMPs peuvent aussi réguler de nombreux systèmes en permettant la libération de facteurs de croissance ou de protéines de surface, ou encore en modulant des médiateurs de l'inflammation [64]. Les MMPs sont donc des enzymes clés du développement de l'arthrose lorsqu'elles sont anormalement sécrétées par les cellules de l'articulation. En effet, les chondrocytes ne sont pas les seuls producteurs de MMPs, et d'autres types cellulaires de l'articulation, comme les synoviocytes, peuvent aussi participer à la production de MMPs [59].

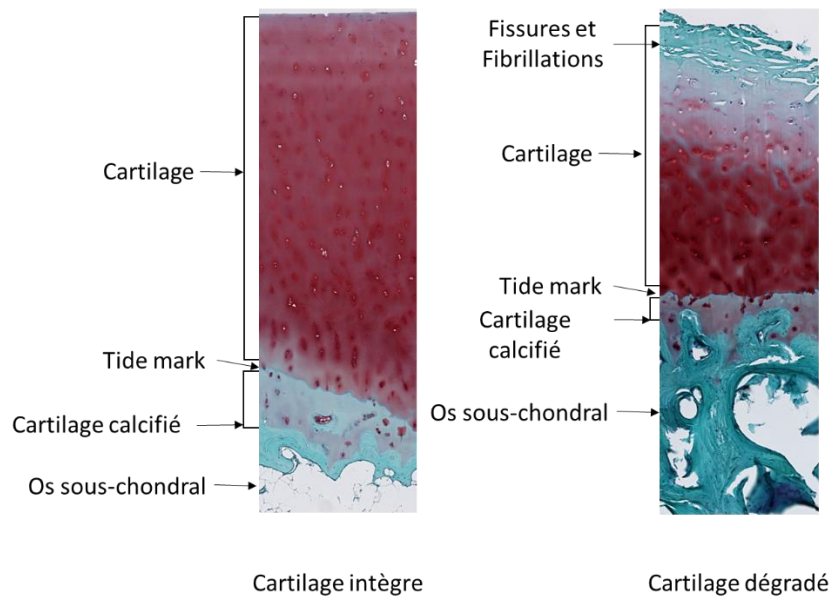


Figure 9 : Coupes histologiques d'unités ostéo-chondrales colorées à la Safranin-O présentant un cartilage intact (à gauche) et un cartilage fortement dégradé (à droite).

Certains chondrocytes, pourtant proches de la surface, vont quant à eux reprendre un processus de différenciation vers un phénotype hypertrophique [65]. Le phénotype chondrocytaire hypertrophique induit une modification globale du programme d'expression génique qui implique notamment Sox9, et Runx2 [66]. En effet ce phénotype hypertrophique est normalement, dans un cartilage articulaire sain, celui des chondrocytes de la couche profonde et calcifiée du cartilage articulaire où ils participent à la dégradation de la MEC du cartilage via la sécrétion de MMP13 et à la minéralisation de leur environnement via une augmentation de l'expression de la phosphatase alcaline [65]. La présence de chondrocytes hypertrophiques, anormalement répartis dans le cartilage mène alors à sa calcification *via* notamment la synthèse de collagène de type X [67], lui faisant perdre ses fonctions et ses propriétés biomécaniques. De plus, les chondrocytes hypertrophiques peuvent se transdifférencier en ostéoblastes, contribuant ainsi à la formation d'ostéophytes au cours de l'arthrose [68].

Bien que ce phénotype hypertrophique soit le phénotype chondrocytaire le plus documenté dans le contexte de l'arthrose, de nombreux autres phénotypes pathologiques ont aussi été observés et finement décrits grâce à une récente analyse de scRNA-seq [69]. Ainsi les phénotypes chondrocytaires retrouvés sont les suivants : prolifératif, pré-hypertrophique,

hypertrophique, fibroblast-like, effecteur, régulateur et homéostatique. Alors que les 4 premiers phénotypes chondrocytaires étaient déjà bien décrits dans la littérature, les chondrocytes effecteurs, régulateurs et homéostatiques sont de nouvelles sous-populations, aux marqueurs respectivement impliqués dans des processus métaboliques, la régulation de voie de signalisation, la régulation du cycle cellulaire, et du métabolisme des ARNs. D'après cette étude, les chondrocytes effecteurs sont retrouvés dans les premières phases de l'arthrose, alors que les phénotypes régulateurs et homéostatiques semblent répartis relativement uniformément au cours des différentes phases. Cette étude fait émerger de nouvelles perspectives thérapeutiques à mettre en place de façon personnalisée en fonction des différents stades de l'atteinte du cartilage des patients.

b. L'os sous-chondral

L'os sous chondral est la structure anatomique située directement en dessous du cartilage articulaire. Ainsi, les dérégulations qui ont lieu au sein du cartilage au cours de l'arthrose impactent directement son interaction avec l'os sous-chondral, et inversement (**Figure 10**). C'est d'ailleurs la raison pour laquelle ces deux tissus sont souvent associés en une unité ostéo-chondrale. Bien que différentes définitions des limites de l'os sous-chondral existent dans la littérature [70], nous considérerons ici qu'il se divise en deux parties : la première, au contact de la zone de cartilage calcifié, est une fine plaque d'os cortical principalement composée de collagène de type I, alors que la seconde, l'os sous-chondral trabéculaire est une structure poreuse remplie de moelle osseuse, de vaisseaux et de tissu nerveux [71]. L'os sous-chondral normal a pour fonction l'atténuation, de manière plus efficace que le cartilage articulaire, des charges qui traversent l'articulation [72]. Ainsi, l'os sous-chondral s'adapte de façon très dynamique aux forces mécaniques qu'il subit notamment grâce au processus de remodelage osseux. Le remodelage osseux est défini par un équilibre entre la formation et la résorption osseuse médiées par les ostéoblastes et les ostéoclastes [73].

Au cours des phases précoces de l'arthrose, l'os sous-chondral est le siège d'un remodelage anormalement élevé [74], alors que dans les phases plus tardives, une sclérose importante de l'os sous chondral est observée [75]. Ainsi dans les phases précoces, la perte osseuse associée au nombre élevé d'ostéoclastes présents au niveau de l'os sous-chondral perturbent la transmission des forces auxquelles sont contraintes les articulations et favorisent alors la destruction du cartilage [76]. Au-delà de l'aspect mécanique, la plaque d'os cortical sous-

chondral est le premier lien direct permettant une rapide communication avec le cartilage à travers des canaux ou encore des vaisseaux sanguins qui pénètrent la zone calcifiée du cartilage (**Figure 10**) [70]. A terme, ces nouveaux vaisseaux vont rompre la limite formée par la *tide mark*, et pénétrer la zone profonde du cartilage [77]. Indispensable au cartilage profond pour disposer de ses nutriments en condition normale, la fine porosité entre la zone de cartilage calcifié et la plaque corticale d'os sous-chondral participe, en conditions pathologiques, à la transmission de molécules néfastes de l'os sous chondral vers le cartilage, et inversement. Ainsi, la sécrétion d'ADAMTS ou de MMPs par les chondrocytes et réciproquement de cytokines ou de facteurs de croissance comme IGF-1 par l'os sous chondral participent à l'altération de l'unité ostéo-chondrale au cours de l'arthrose [73].

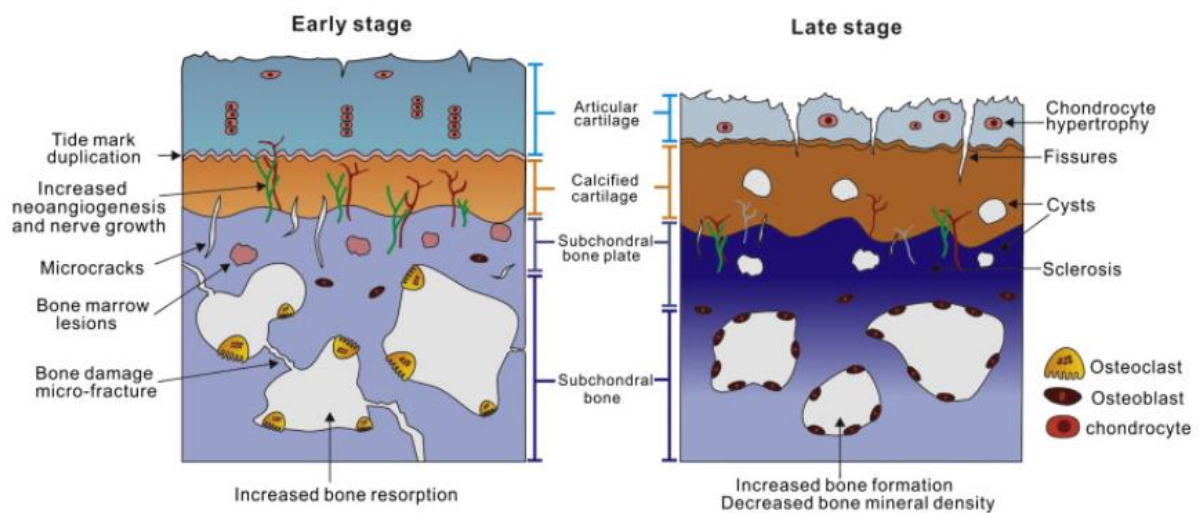


Figure 10 : Représentation schématique des dérégulations impactant l'unité ostéo-chondrale dans les stades précoces (gauche) et tardifs de l'arthrose (droite). D'après Yuan et al. 2014 [73]

Finalement, l'os sous-chondral se densifie anormalement, perd ses fonctions de support aux forces biomécaniques subies par l'articulation et participe activement à la calcification du cartilage [75]. Les ostéophytes sont l'ultime expression de cette activité osseuse complètement dérégulée. Pour autant, plusieurs études montrent que le rôle de ces ostéophytes serait finalement plutôt protecteur et contribuerait ainsi à stabiliser l'articulation [78]–[80].

c. La membrane synoviale

La membrane synoviale est le tissu qui participe à la mobilité articulaire par la production du liquide synovial, en communiquant à la fois avec les structures internes de l'articulation et les tissus musculo-squelettiques. La capsule synoviale quant à elle maintient la cavité articulaire.

D'un point de vue histologique, la membrane synoviale peut être séparée en 2 zones : la *lining*, bordant la face interne de la membrane, formant une barrière compacte et séparant ainsi la cavité renfermant le liquide synovial du reste de l'articulation, ainsi que la *sub-lining* (**Figure 11**). La *lining* se compose de deux à trois couches de fibroblastes liés entre eux par la cadhérine-11 qui participe à la formation de *tight-jonctions* et ainsi au maintien de la structure et de l'organisation de cette couche bordante [81]. On y retrouve aussi des macrophages non-monocytaires. Les fibroblastes de la *lining* produisent majoritairement la lubricine, et l'acide hyaluronique qui participent à la protection et au maintien de l'intégrité du cartilage articulaire [82] ainsi que de la production des constituants matriciels de la *sub-lining* [83]. Les macrophages de la *lining*, quant à eux, exercent un rôle protecteur grâce à leur activité de phagocytose, permettant ainsi un renouvellement permanent des constituants du liquide synovial [84]. La *sub-lining*, beaucoup plus vascularisée que la *lining*, est composée de fibroblastes et de macrophages entourés par une MEC. De la même manière que les interactions cellules-cellules jouent un rôle fondamental dans le maintien de la *lining*, les interactions cellules-MEC sont clés pour le maintien de l'intégrité anatomique et fonctionnelle de la *sub-lining* [83].

Au cours de l'arthrose, différentes caractéristiques plus ou moins marquées se développent au sein de la membrane synoviale. Ainsi on distingue l'hyperplasie, la fibrose, la présence anormale de débris et l'inflammation comme principales caractéristiques d'une membrane synoviale arthrosique [85].

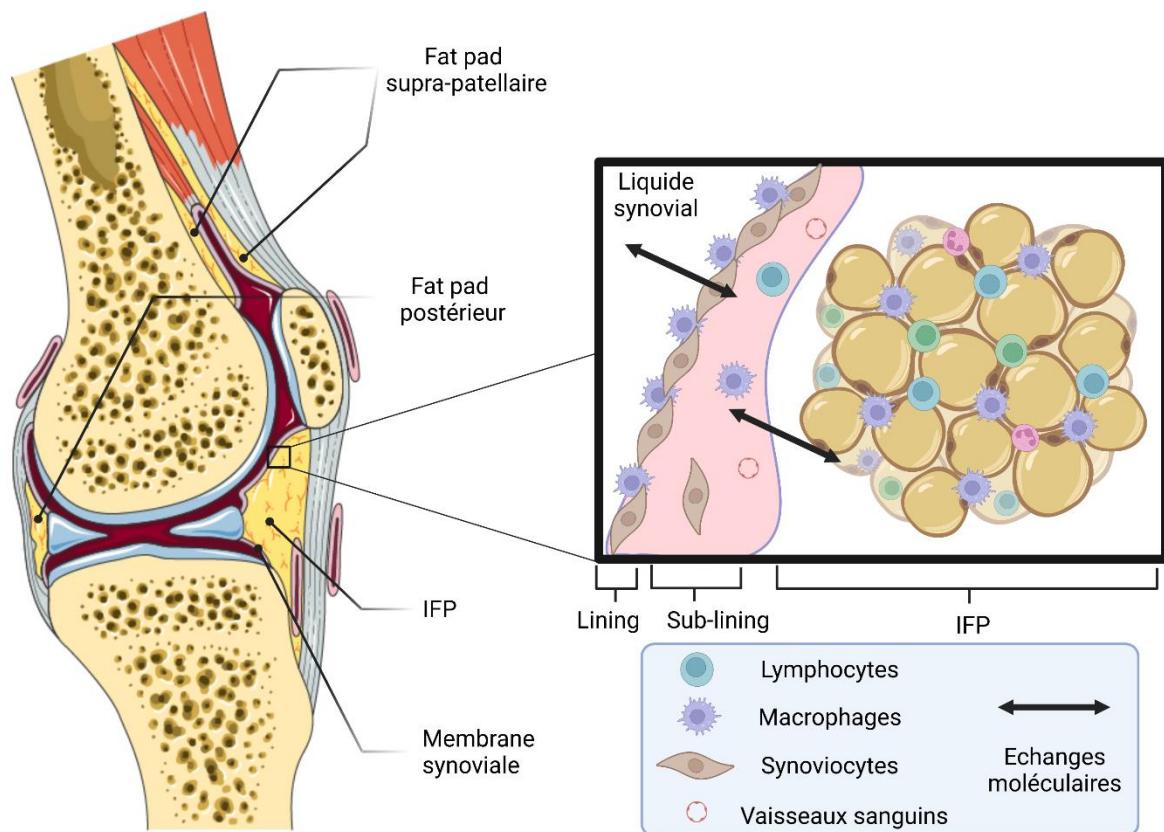


Figure 11 : Unité anatomo-fonctionnelle de l'IFP et de la membrane synoviale.

L'inflammation de la membrane synoviale (la synovite) chez les patients arthrosiques a été mise en évidence tant à des stades précoces de la maladie qu'à des stades avancés et a aussi été associée à l'apparition de douleurs [86]. De plus, Roemer et al. ont montré que sur 111 patients souffrant d'arthrose du genou, 99 (89%) présentaient une synovite [87]. Cette inflammation est donc une caractéristique importante associée à l'arthrose. La synovite se caractérise par une prolifération anormale des fibroblastes ainsi qu'un recrutement de macrophages [88] qui mène à une hyperplasie de la *lining*. L'activation des fibroblastes ainsi que des macrophages peut être la conséquence des produits de dégradation du cartilage, les DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns*), ou bien aussi de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , le TNF- α ou l'IL-6. La *sub-lining* quant à elle, est enrichie en macrophages, en lymphocytes T, B ainsi qu'en cellules endothéliales pour la composition des vaisseaux sanguins [89]. A l'instar des chondrocytes, des études de scRNA-seq [90], [91] ont permis de mettre en évidence différents phénotypes fibroblastiques et ainsi de mieux appréhender la répartition et le rôle pathologique de chacun de ces phénotypes au cours de l'arthrose. Par exemple, les fibroblastes CD34-THY⁻ qui sont localisés dans la *lining* sont plus abondants dans les membranes arthrosiques que dans des membranes arthritiques [92]. En

effet, ces fibroblastes ont la particularité d'exprimer le promoteur BMP-6 (*Bone morphogenetic protein-6*) qui participe à la formation des ostéophytes, ce qui corrèle en effet à ce qui peut être observé au cours de l'arthrose. De plus, une étude de scRNA-seq a permis de mettre en évidence qu'au cours de l'arthrose, une population de fibroblastes de la *lining* exprimant le gène codant pour la R-spondine 2, un agoniste de la voie Wnt/ β -caténine, ainsi que des niveaux élevés de *Prg4* favorise le développement d'arthrose post-traumatique [93]. Ainsi, ces exemples illustrent le rôle clé que les fibroblastes de la membrane synoviale peuvent jouer dans le développement de l'arthrose. Enfin, les macrophages ne sont pas en reste. En effet, une hétérogénéité importante des sous-types de macrophages est présente au sein de la membrane synoviale des patients arthrosiques [85]. Ainsi, une fine compréhension du rôle de ces différents acteurs pourrait alors permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour l'arthrose.

La membrane synoviale est, de plus en plus, décrite comme faisant partie d'une unité fonctionnelle et anatomique comprenant aussi le tissu adipeux de l'articulation ou fat pad [94]. Au sein d'un genou il existe plusieurs fat pad qui se distinguent par leur localisation dans l'articulation, pour autant ils sont tous situés entre la capsule et la membrane synoviale (**Figure 11**). Cependant, le fat pad qui est le plus largement étudié est le fat pad infra-patellaire (IFP), aussi appelé *Hoffa's pad* [95]. L'IFP se compose d'adipocytes, de fibroblastes mais aussi de cellules immunitaires, notamment de macrophages [96]. De nombreux échanges moléculaires peuvent donc avoir lieu entre la membrane synoviale et le fat pad qui partagent des types cellulaires communs en plus d'une proximité anatomique (**Figure 11**). De plus, les phénomènes de fibrose et d'inflammation sont des caractéristiques partagées au cours de l'arthrose entre le fat pad et la membrane synoviale. Cette interaction favorise de part et d'autre le développement de ces processus pathologiques. Ainsi, tout comme la membrane synoviale, le fat pad participe lui aussi à la dégradation du cartilage [97]. L'inhibition de la fibrose pouvant survenir dans le fat pad a alors récemment été associée à une diminution de la dégradation du cartilage mais aussi de la douleur dans des modèles de rats arthritiques [98].

B. [Les cibles thérapeutiques dans l'arthrose](#)

Les différents facteurs de risques associés à la maladie qui ont été présentés précédemment sont à l'origine de mécanismes cellulaires divers, mais cependant d'intérêt dans la

compréhension de la maladie. Ainsi différentes cibles thérapeutiques émergent des dérégulations cellulaires décrites de façon plus approfondie dans la suite de cette partie.

1. Le vieillissement

Comme évoqué précédemment, le vieillissement et l'arthrose partagent des mécanismes très similaires. Le ciblage de ces différentes altérations liées à l'âge représente alors une piste thérapeutique pour le traitement de l'arthrose.

a. La sénescence

La sénescence cellulaire se caractérise par différents attributs, un arrêt irréversible du cycle cellulaire, des altérations lysosomales, l'hypertrophie cellulaire, la réorganisation de l'ADN, les dommages à l'ADN et le *Senescence Associated Secretory Phenotype* (SASP). Parmi ces différentes caractéristiques, l'arrêt du cycle cellulaire et le SASP, sont les plus caractéristiques (**Figure 12**). La composition de ce SASP pouvant changer en fonction du type cellulaire et du type d'induction de la sénescence, sa composition n'est pas complètement connue. Cependant au sein des composants les plus représentés du SASP, on retrouve de nombreuses cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α), des chimiokines (CCL2, GRO α), des protéases (MMP1, 3 ou 13), ou encore des facteurs de croissance (TGF- β , IGFbps) [99].

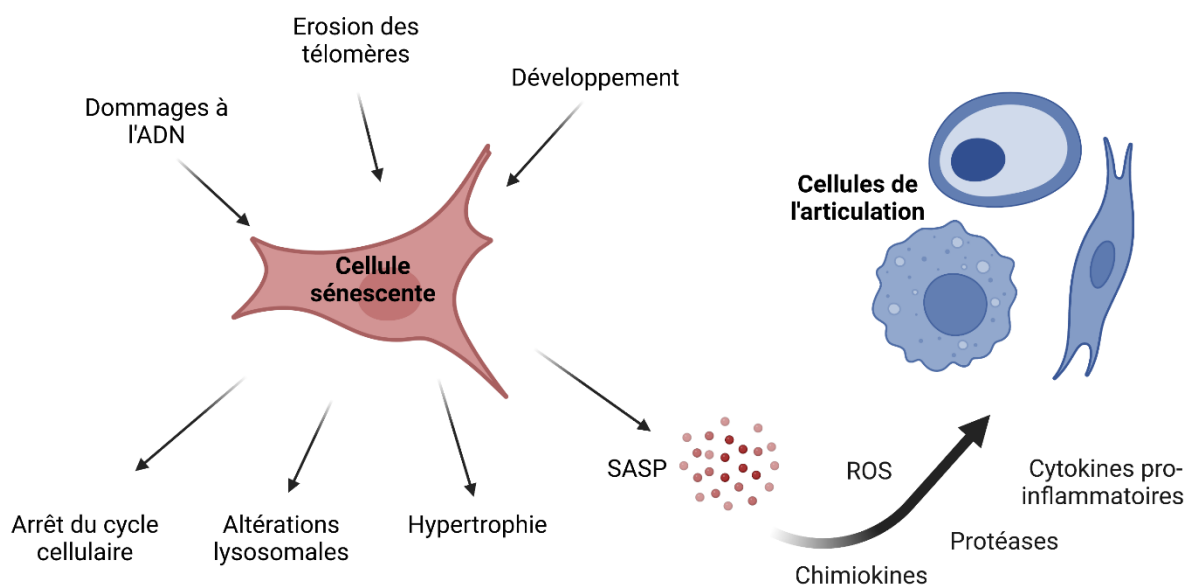


Figure 12 : Caractéristiques des cellules sénescentes et influence du SASP sur les cellules de l'articulation (chondrocytes, synoviocytes, cellules immunitaires...)

La sénescence est un état cellulaire nécessaire à de nombreux mécanismes physiologiques, mais qui peut aussi être détourné à des fins pathologiques. En effet, les cellules sénescentes

permettent le remodelage de nombreux tissus, passant par un état sénescence qui mène ensuite à leur élimination, et jouent ainsi un rôle fondamental au cours du développement [100]–[103]. Au cours du vieillissement, la sénescence joue aussi un rôle protecteur en permettant l'élimination des cellules ayant accumulées des défauts au fil du temps. Mais lorsque les cellules sénescence persistent et ne peuvent plus être éliminées assez rapidement par le système immunitaire, leur activité résiduelle – de sécrétion du SASP notamment – devient délétère et participe à de nombreuses pathologies ainsi qu'au vieillissement. Par conséquent, il a été montré que la suppression des cellules sénescence permettait de limiter l'apparition de pathologies liées à l'âge [104].

Dans l'articulation aussi, on observe, au cours du vieillissement, une accumulation des cellules sénescence que ce soit des chondrocytes, des fibroblastes synoviaux ou même des ostéocytes [105], [106]. Les traumatismes articulaires ou les stress mécaniques anormaux ont aussi été associés à une augmentation du nombre de chondrocytes sénescence ainsi qu'à une dégradation accélérée du cartilage [107], [108]. Ces éléments réunis font donc de l'augmentation anormale du nombre de cellules sénescence un élément important participant au développement de l'arthrose.

D'un point de vue moléculaire, certaines caractéristiques des cellules sénescence sont communes avec des processus délétères qui apparaissent au cours de l'arthrose. Par exemple, les cellules sénescence produisent une quantité anormale d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), elles peuvent aussi exprimer anormalement des protéines de surface comme par exemple l'activateur d'urokinase plasminogène (uPAR) [109], ou enfin sécréter des molécules pro-inflammatoires *via* le SASP, autant d'éléments qui sont aussi retrouvés dans une articulation arthrosique (**Figure 12**). Les cellules sénescence gardent aussi leur capacité de sécrétion des vésicules extracellulaires. Ces vésicules extracellulaires peuvent transporter des ARNs ou des protéines favorisant le développement de la sénescence dans les cellules voisines [110], et participant ainsi à une présence anormale de cellules sénescence [111]. De plus, ces éléments participent au maintien d'une inflammation locale et d'un déséquilibre du stress oxydant. Ainsi, il a été montré que l'élimination des cellules sénescence exprimant p16^{INK4a} dans l'articulation protégeait du développement d'arthrose post-traumatique ou liée à l'âge dans des modèles murins [112].

La sénescence apparaît alors comme une cible d'intérêt pour la thérapie de l'arthrose. Deux stratégies sont envisagées : l'utilisation de sénolytiques, des molécules permettant l'élimination des cellules sénescents, ou bien de sénomorphiques, des molécules permettant la modulation des phénotypes pathogènes associés aux cellules sénescents, comme la modulation de l'activité des constituants du SASP. Parmi les sénolytiques actuellement en essai clinique, la molécule UBX-0101 est en évaluation de phase II. Malgré les résultats précliniques très prometteurs [112], les résultats de l'essai clinique ne semblent pas mettre en évidence une amélioration de la mobilité et de la douleur des patients traités à l'UBX-0101, quelle que soit la dose, comparés à ceux traités avec un placebo et ceci malgré l'évaluation de différents scores de douleurs (NCT04129944).

b. L'autophagie

Il existe un lien fort entre la sénescence et l'autophagie [113]. L'autophagie est un processus intracellulaire qui permet la dégradation de protéines ou d'organelles anormales par les lysosomes permettant ainsi le maintien de l'homéostasie cellulaire. Il existe trois types d'autophagie : la micro-autophagie, la macro-autophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes [114]. La macro-autophagie (ci-après nommée, autophagie) est la plus étudiée d'une façon générale ainsi que dans le contexte de l'arthrose. Cette voie autophagique implique que les molécules à éliminer soient, dans un premier temps, isolées du cytoplasme et séquestrées dans des vésicules cellulaires possédant une double-membrane, les autophagosomes. Le contenu des autophagosomes sera ensuite dégradé par la fusion de l'autophagosome avec le lysosome, formant ainsi un autolysosome (**Figure 13**). Bien que souvent considéré comme un mécanisme protecteur, il est important de garder à l'esprit qu'il existe aussi une mort cellulaire qui peut être accélérée par les processus autophagiques, et que la modulation de l'autophagie dans un contexte thérapeutique n'est alors pas si évidente [115].

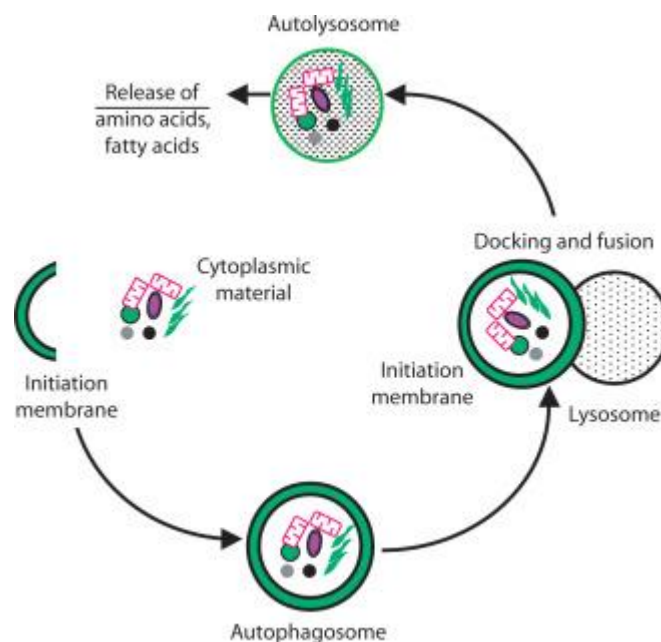


Figure 13 : Le cycle de l'autophagie. Tirée de Lieberthal et al. 2008.

D'un point de vue moléculaire l'autophagie est un processus pouvant être séparé en différentes étapes : l'initiation, la nucléation du phagophore, l'élongation de ce dernier pour former l'autophagosome, la formation de l'autolysosome et la dégradation. Initialement décrit chez la levure *S. cerevisiae*, les gènes codant pour les protéines responsables de la formation des autophagosomes sont nommés *Autophagy-related genes*, *Atg*. L'initiation de l'autophagie en réponse à un stress se manifeste par une activation de l'AMP kinase suite à une élévation du taux d'AMP, qui inhibe alors le complexe mTOR 1 (mTORC1), permettant finalement l'activation des protéines impliquées dans l'initiation (Atg13, Atg1/Ulk1, Atg101 ...) et dans la nucléation (Atg9, Atg14, Beclin-1...) de l'autophagie. Beclin-1 est une protéine clé dans la régulation de l'autophagie car elle peut être inhibée notamment par Bcl-2 via une interaction physique l'empêchant alors de se complexer avec Atg14, UVRAG, AMBRA1, VPS15 et VPS34 pour permettre la nucléation du phagophore. Après l'initiation, les protéines Atg4, Atg7 et Atg3 permettent la maturation de LC3 en LC3-I puis LC3-II. Avec l'aide des protéines PE (phosphatidyléthanolamine) et p62, LC3-II permet alors de former le cargo autophagique défini par l'association du phagophore en cours d'élongation et des organelles/agrégats protéiques devant être éliminés [116]. Une fois complètement formés les autophagosomes fusionnent alors avec les lysosomes. La lumière des autolysosomes ainsi formés est acidifiée activant des hydrolases initialement présentes dans les lysosomes, permettant finalement la dégradation du cargo autophagique. La dégradation médiée par le processus autophagique

permet la production d'acides aminés, de nucléotides, d'acides gras et de sucres (**Figure 13**). L'autophagie assure donc, en plus d'une protection contre les stimuli néfastes, le recyclage d'éléments essentiels à la cellule.

Malgré ses propriétés intéressantes, ce processus diminue peu à peu au cours de l'âge menant ainsi à l'accumulation de produits cellulaires anormaux pouvant devenir toxiques. Dans le cartilage sain, Ulk-1, Beclin-1 et LC3-II sont exprimés et suggèrent donc que l'autophagie est un processus actif [117]. Cependant, tout comme au cours du vieillissement, dans les stades avancés de l'arthrose, l'expression des marqueurs de l'autophagie est anormalement diminuée [118]. La régulation des marqueurs de l'autophagie est notamment médiée par les facteurs de transcription de la famille FOXO (*Forkhead box O*). En effet, les protéines FOXO sont capables de protéger du vieillissement cellulaire mais aussi de l'arthrose en participant à la régulation de l'autophagie mais aussi à la régulation du stress oxydant [119]. D'autre part, la restauration de l'autophagie peut avoir des effets bénéfiques sur la survie des chondrocytes ou la dégradation de la MEC, protégeant ainsi du développement de l'arthrose [120]–[122]. De façon intéressante, il a aussi été montré dans des macrophages que l'inhibition de l'autophagie pouvait favoriser la production d'IL-1 β [123], suggérant que la promotion de l'autophagie puisse jouer un rôle protecteur au sein de l'articulation à travers différents mécanismes.

De plus, une extinction inductible et cartilage spécifique de PPAR- γ , un facteur de transcription impliqué dans l'adipogenèse, dans un modèle murin d'arthrose, a mis en évidence une diminution de l'autophagie associée à une accélération du processus d'arthrose [124]. Une diminution de l'autophagie a aussi été mise en évidence chez les patients obèses ou présentant un syndrome métabolique [125]. La diminution de l'autophagie n'est donc pas simplement associée au vieillissement mais aussi à d'autres facteurs de risque de l'arthrose, renforçant alors l'idée que la restauration de l'autophagie au sein de l'articulation puisse être une piste thérapeutique.

c. Les facteurs anti-vieillessement

(1) α -Klotho, une molécule anti-âge d'intérêt pour l'arthrose ?

Le vieillissement et le développement de l'arthrose partagent donc des mécanismes très proches [126]. Cette proximité, et le manque de réussite des stratégies thérapeutiques visant à cibler indépendamment une dérégulation parmi d'autres, mènent à l'hypothèse que des molécules aux propriétés anti-âge pouvant agir sur différents aspects en lien avec le vieillissement et donc aussi en lien avec le développement de l'arthrose pourraient être d'un intérêt thérapeutique. Parmi ces molécules, un rapide focus sera fait sur la protéine α -klotho sur laquelle mon projet de thèse se portait initialement.

(2) Propriétés anti-âge d' α -Klotho

La protéine α -Klotho (Klotho) a été fortuitement découverte pour ses propriétés anti-âges par Kuro-o et al. en 1997 [127]. En effet, les souris invalidées pour Klotho (*kl/kl*) développent un phénotype ressemblant à celui des patients présentant un syndrome de vieillissement prématuré. Ces souris présentent un retard de croissance qui apparaît dès l'âge de 3 semaines et meurent prématurément à l'âge de 8/9 semaines. Au cours de leur courte vie les souris *kl/kl* ont de nombreuses dérégulations, comme une perturbation de leur marche, une atrophie des organes génitaux ainsi que du thymus, de l'artériosclérose, l'apparition d'importantes calcifications ectopiques, de l'ostéoporose ou encore de l'emphysème. En revanche, une surexpression du gène klotho confère une espérance de vie plus longue de 20-30% aux souris [128].

Klotho, a initialement été décrit pour son rôle de régulation de l'absorption du phosphate et de l'activité de la 1,25-dihydroxyvitamine D3 [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$] principalement lié à son importante expression dans le rein [129]. En revanche, Klotho, qui peut être présent sous forme soluble présente aussi de nombreux autres rôles dans des tissus où il n'est pas nécessairement exprimé. De façon intéressante, Klotho est alors capable d'inhiber la sénescence [130], [131], le stress oxydant [132], la voie Wnt [133]–[135], la voie IGF-1 [136], [137], la voie TGF- β 1 [138], [139] ou encore de réguler l'autophagie [140]–[143], autant de processus dont la modulation a aussi été associée à des effets bénéfiques dans le cadre de l'arthrose.

(3) α -Klotho et l'arthrose

Malgré de nombreuses évidences d'un rôle de Klotho qui pourrait être protecteur, il n'existe à ce jour que peu d'études évaluant le rôle de Klotho dans l'arthrose. Néanmoins, des polymorphismes du gène de Klotho ont été associés à la survenue d'arthrose du genou [144] et de la main [145] dans différentes populations, renforçant l'idée du rôle de cette protéine dans l'arthrose. Ainsi, il a été mis en évidence que le rôle de Klotho sur la voie Wnt [146] et le stress oxydant dans le cartilage [147] ou encore sur la régulation de la dégradation du cartilage [148], [149] pouvait effectivement protéger des mécanismes arthrosiques. Klotho apparait ainsi effectivement comme une cible d'intérêt.

(4) D'autres exemples de molécules anti-vieillessement

Le facteur α -Klotho n'est pas la seule molécule anti-âge qui profite d'une attention particulière dans le contexte de l'arthrose. En effet, d'autres molécules anti-âges comme par exemple Sirt-1 [150], Sirt-6 [151] ou Gdf-11 (*Growth differentiation factor-11*) pourraient aussi s'avérer être intéressantes.

Sirt-1 et Sirt-6 appartiennent à la famille des sirtuines (Sirt-1 à Sirt-7 chez les mammifères). Les Sirt sont des enzymes capables d'enlever les groupes acyl des résidus lysines (K) de différentes protéines. Les protéines cibles des Sirt dépendent de la localisation de ces dernières. Les Sirt peuvent être localisées dans le noyau, dans le cytoplasme ou dans la mitochondrie. En l'occurrence, Sirt-1 et Sirt-6 sont nucléaires. Sirt-1 joue alors un rôle de régulateur épigénétique en ciblant l'acétylation des histones (par exemple : H3K9, H3K14 ou H3K16) ou encore en permettant la désacétylation de certains facteurs de transcription. Parmi les facteurs d'intérêt dans l'arthrose, NF- κ B (rôle dans l'inflammation), PGC-1 α (rôle dans les dérégulations métaboliques) et FOXO3a (rôle dans la régulation du stress oxydant et de l'autophagie) peuvent être régulés par Sirt-1 [152]. Sirt-6 quant à lui permet une régulation de la voie NF- κ B et de la longueur des télomères principalement à travers la désacétylation de H3K9 [151], [153]. Finalement, le rôle des Sirtuines dans l'articulation a été largement décrit par Almeida et al. mettant en évidence un rôle ambigu de ces protéines anti-âge dans le développement de l'arthrose [154].

Quant à Gdf-11 aussi connu sous le nom de BMP-11, son rôle initialement décrit est la régulation des réponses de prolifération et de différenciation cellulaire, et est fortement impliqué dans la croissance et le développement [155]. Ainsi, Gdf-11 décroît avec l'âge et la

supplémentation de cette protéine semble restaurer le niveau de certains processus diminués chez les souris au cours du vieillissement [156]. L'injection de Gdf-11 dans des souris âgées a notamment permis de promouvoir la prolifération de chondrocytes et la synthèse de MEC, grâce à une régulation de la voie TGF- β -Smad2/3 [157].

Ces différents exemples illustrent effectivement que des protéines impliquées dans le vieillissement sont intéressantes à étudier dans le contexte de l'arthrose. En effet, tout l'intérêt de ces molécules réside dans le ciblage de plusieurs mécanismes impliqués dans l'arthrose. En effet, au regard des espoirs thérapeutiques actuels, par exemple du lorecivivint qui permet une modulation de la voie Wnt ainsi que de l'inflammation, mettent en évidence le besoin de développer des molécules capables d'agir simultanément sur différents tissus et différents mécanismes [158]. Cette stratégie, complexifie en revanche le développement de thérapie. En effet, comme pour l'autophagie ou d'autres voies de signalisation comme celle du TGF- β [159], un fin équilibre peut exister entre l'excès et le manque, des molécules aux actions plus complètes deviennent alors d'autant plus difficiles à appréhender.

2. L'inflammation

L'inflammation est un mécanisme naturel permettant dans les cas non-pathogéniques de combattre une agression (bactérie, virus, traumatisme etc.). En revanche, lorsque cet état inflammatoire persiste et échappe à toutes régulations, il peut être associé à de nombreuses maladies comme les maladies auto-immunes, le cancer ou encore l'obésité [160]–[162]. Ce processus est aussi largement mis en jeu au sein de l'articulation au cours de l'arthrose [163], [164].

Le liquide synovial de patients arthrosiques se voit ainsi enrichi en plusieurs molécules pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF- α , l'IL-15 ou encore l'IL-18 [90]. Ces différentes molécules pro-inflammatoires peuvent aussi bien être produites par le cartilage, les cellules de la membrane synoviale [90] ou encore celles du fat pad [96]. L'articulation est donc impliquée dans sa globalité dans le maintien de cette inflammation de bas grade. Bien que moins importante que dans la polyarthrite rhumatoïde (PR), l'inflammation qui a lieu au sein d'une articulation arthrosique joue un rôle clé pouvant impacter tant les processus cataboliques du cartilage que le recrutement des cellules immunitaires au sein de la membrane synoviale ou du fat pad [96], [165], [166]. Ainsi, en plus d'être soutenue par de

nombreux tissus de l'articulation, cette inflammation a un impact sur chacun d'eux. De plus, l'inflammation est souvent associée à de nombreux autres processus aussi impliqués dans la pathogenèse de l'arthrose comme la sécrétion du SASP par les cellules sénescentes [167], l'autophagie [168], la dérégulation de la balance oxydative ou encore les dérégulations métaboliques [169]. De façon intéressante, des processus majeurs comme l'expression d'enzymes dégradant la MEC peuvent être régulés par de nombreuses voies de l'inflammation [170]. Ainsi les voies de signalisation directement liées à l'inflammation sont fortement impliquées dans les processus pathologiques. Parmi elles, les voies MAPK (ERKs, JNKs et p38), NF- κ B, JAK/STAT et Wnt sont retrouvées (**Figure 14**).

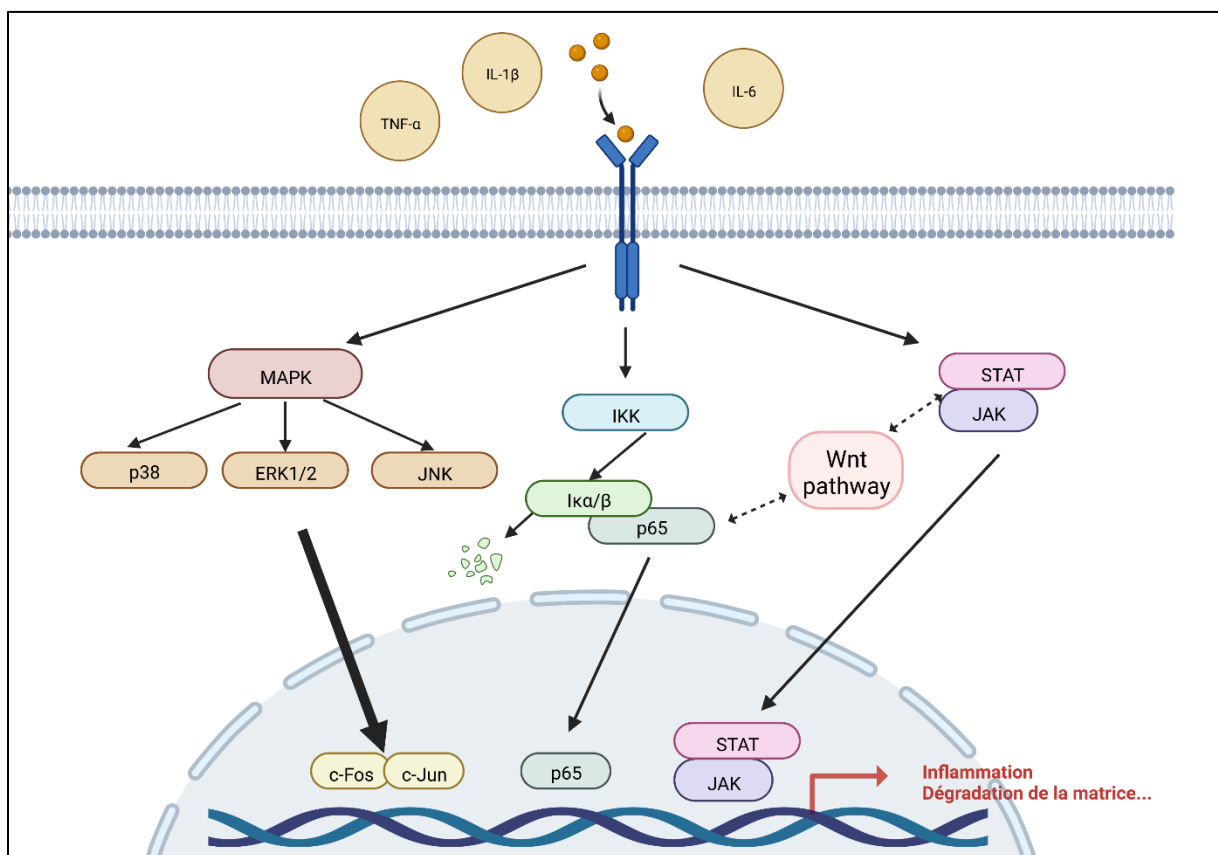


Figure 14 : Voies de signalisation associées l'inflammation

La voie des MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) se caractérise par une phosphorylation séquentielle de plusieurs acteurs [171]. Il existe différentes cascades de phosphorylations définies par les acteurs finaux qui peuvent être ERK1/2 (*extracellular signal-regulated protein kinases*), JNKs (*c-Jun-aminoterminal kinase*) ou p38. Ces trois familles de kinases sont particulièrement activées au cours de l'arthrose [172] et peuvent ainsi participer à la production de cytokines pro-inflammatoires ou de MMPs. De façon intéressante, les MAPK

peuvent aussi agir en tant que médiateurs de la douleur [173]. Cette voie de signalisation participant à divers processus néfastes peut notamment être activée par l'IL-1 β ou le TNF- α . Ces cytokines sont aussi impliquées, à travers leur interaction avec leur récepteur respectif, dans l'activation d'une autre des voies impliquées dans l'arthrose, la voie NF-kB.

Les membres de la famille des facteurs de transcription NF-kB sont au nombre de 5 : p65, RelB, c-Rel, p105 et p100. Pour être actifs, ces facteurs de transcription doivent agir en homo- ou en hétérodimères. L'activation de cette voie passe principalement par la levée de la séquestration de ces facteurs au sein du cytoplasme (**Figure 14**). Au cours de l'arthrose, cette voie est activée soit par des cytokines pro-inflammatoires soit par les DAMPs [174]. Une fois activée, la voie NF-kB va largement participer aux processus cataboliques en activant l'expression de cytokines (IL-1 β , TNF- α ou IL-6), iNOS ou COX-2 ou encore de MMPs (MMP1, MMP3, MMP13) [175], [176]. De plus, la voie NF-kB, à travers notamment son régulateur nucléaire I κ B- ζ , a récemment été associée à la régulation de la sénescence et à la production de ROS [177], [178]. Ainsi la voie NF-kB joue un rôle central d'entretien des processus pathologiques ayant lieu au cours de l'arthrose et apparaît depuis longtemps comme une cible thérapeutique d'intérêt [174].

La présence exacerbée dans le liquide synovial de patients arthrosiques de cytokines comme l'IL-1 β et le TNF- α ainsi que leur implication dans ces voies qui participent aux mécanismes pathologiques de l'arthrose font de ces deux cytokines, des cibles thérapeutiques intéressantes depuis de nombreuses années [179]–[181]. Ainsi, plusieurs traitements anti-IL-1 et anti-TNF ont été évalués dans le contexte de l'arthrose. Pour l'IL-1, des études *in vitro* [182]–[184] puis *in vivo* chez le lapin [185], le chien [186] et le cheval [187], [188] ont montré une efficacité prometteuse de l'IL-1Ra, l'antagoniste du récepteur à l'IL-1. Des anti-TNF se sont eux aussi montrés efficaces *in vitro* [189] ainsi que dans des études pré-cliniques chez le rat et la souris [190], [191].

Pour autant, les essais cliniques ne sont pas aussi satisfaisants. Par exemple, un essai clinique de phase II évaluant le rôle du lutikizumab (ABT-981), un anti-IL-1 α/β , chez des patients présentant de l'arthrose associée à une synovite, n'a pas montré d'amélioration de la douleur perçue, ni de la synovite. Plusieurs autres essais cliniques évaluant des anti-IL-1 chez des patients présentant de l'arthrose du genou ou de la main n'ont pas non plus montré d'effet bénéfiques, ni sur la douleur, ni sur les résultats d'imagerie [192], [193]. De la même manière,

un essai clinique évaluant l'efficacité d'un anti-TNF, l'etanercept, chez des patients atteints d'arthrose de la main n'a pas permis de mettre en évidence une amélioration de la douleur [194].

L'IL-6 est la troisième cytokine importante dans l'arthrose. Lorsque l'IL-6 se complexe à son récepteur IL-6R α ainsi qu'à son co-récepteur, le gp130, il est alors capable d'activer la voie JAK/STAT (**Figure 14**). Les facteurs de transcription STAT (*Signal transducers and activators of transcription*) sont activés par JAK (*Janus kinases*). La voie de signalisation JAK/STAT peut donc être activée par des cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-6, ou bien par la levée des inhibiteurs de JAK/STAT comme SOCS (*Suppressor of Cytokines Signaling*). La présence importante de cytokines pro-inflammatoires dans l'articulation [90] ainsi que la diminution de l'expression de SOCS dans le cartilage arthrosique [195] participe alors à l'activation de JAK/STAT au cours de l'arthrose. Le rôle prépondérant des JAKs dans l'inflammation est notamment mis en évidence dans la PR, où l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des JAKs s'avèrent être bénéfiques [196]. De plus, la voie JAK/STAT, participe à la régulation de l'activité de Sox9 qui est lui-même un facteur de transcription important dans le maintien du phénotype articulaire. Ainsi en réponse à l'IL-6, l'expression de Sox9 est inhibée, et le maintien du phénotype chondrocytaire compromis [197]. JAK/STAT, à travers notamment l'IL-6, en plus de promouvoir l'inflammation à travers la transcription de différentes cytokines pro-inflammatoires compromet alors aussi le maintien de l'homéostasie du cartilage [197]. Dans ce contexte prometteur, le tocilizumab, un anti-IL-6 a aussi été évalué chez des patients atteints d'arthrose de la main, mais n'a malheureusement pas permis de diminuer la douleur chez ses patients [198].

Enfin, la voie de signalisation Wnt joue un rôle clé dans la pathologie. Son importance est telle, que le lorecivint (SM04690), un inhibiteur de la voie Wnt, fait partie des rares molécules prometteuses pour l'arthrose ayant atteint un essai clinique de phase 3. La voie Wnt se caractérise, sous sa forme canonique, par l'activation de β -caténine. En condition, non active, β -caténine est séquestrée et dégradée par un complexe inhibiteur constitué de GSK-3 β , APC, Axin1/Axin2, Dishevelled et CK1. Lorsque les ligands Wnt interagissent avec leurs récepteurs, Frizzled et LRP5/6, β -caténine est libérée de son complexe et peut alors être transloquée au noyau afin d'activer les facteurs de transcriptions TCF/LEF qui vont alors permettre l'expression des gènes cibles de la voie Wnt (**Figure 15**). Parmi les ligands Wnt associés à

l'arthrose, le ligand Wnt7b semble particulièrement lié à la progression de l'arthrose chez l'homme [199]. Il existe aussi des antagonistes naturels des ligands Wnt, parmi eux, DKK-1 [200], est inversement corrélé au score radiographique d'arthrose du genou [201]. De plus, l'un des gènes cibles de la voie Wnt, WISP-1 (*Wnt1-inducible-signaling pathway protein 1*) qui peut induire la dégradation du cartilage via l'expression de différentes MMPs, est sur-exprimé chez l'homme et chez les souris qui présentent de l'arthrose [202]. D'autres voies alternatives comme les voies Wnt dépendantes du calcium ou les Wnt/PCP, indépendantes de la β -caténine, peuvent être activées par des ligands Wnt. Notamment, le ligand Wnt5a retrouvé comme étant surexprimé dans le cartilage arthrosique, est capable d'activer ces voies alternatives [203].

Alors qu'il existe de nombreuses évidences de l'implication de la voie Wnt dans l'arthrose, son association à l'inflammation n'est pas aussi évidente que les voies précédemment décrites. Pour autant, il a récemment été mis en évidence que l'action du lorecivint passait notamment par l'inhibition de NF- κ B et de STAT3 indépendamment de la β -caténine [204] (**Figure 14**). Les ligands Wnt apparaissent alors, principalement à travers l'activation de voies non-canoniques, comme des régulateurs secondaires de l'inflammation. Cependant des interactions entre NF- κ B et la voie canonique de Wnt existent aussi [205].

Finalement, les essais cliniques visant à évaluer le rôle du lorecivint ont donné des résultats convaincants [206] uniquement lorsque les patients présentant une douleur bilatérale ou une autre douleur associée ont été exclus [158]. Cet exemple illustre parfaitement la nécessité de stratification des patients et pourrait ainsi permettre d'expliquer les échecs cliniques associés au ciblage de l'inflammation qui apparaît pourtant jouer un rôle fondamental dans l'arthrose.

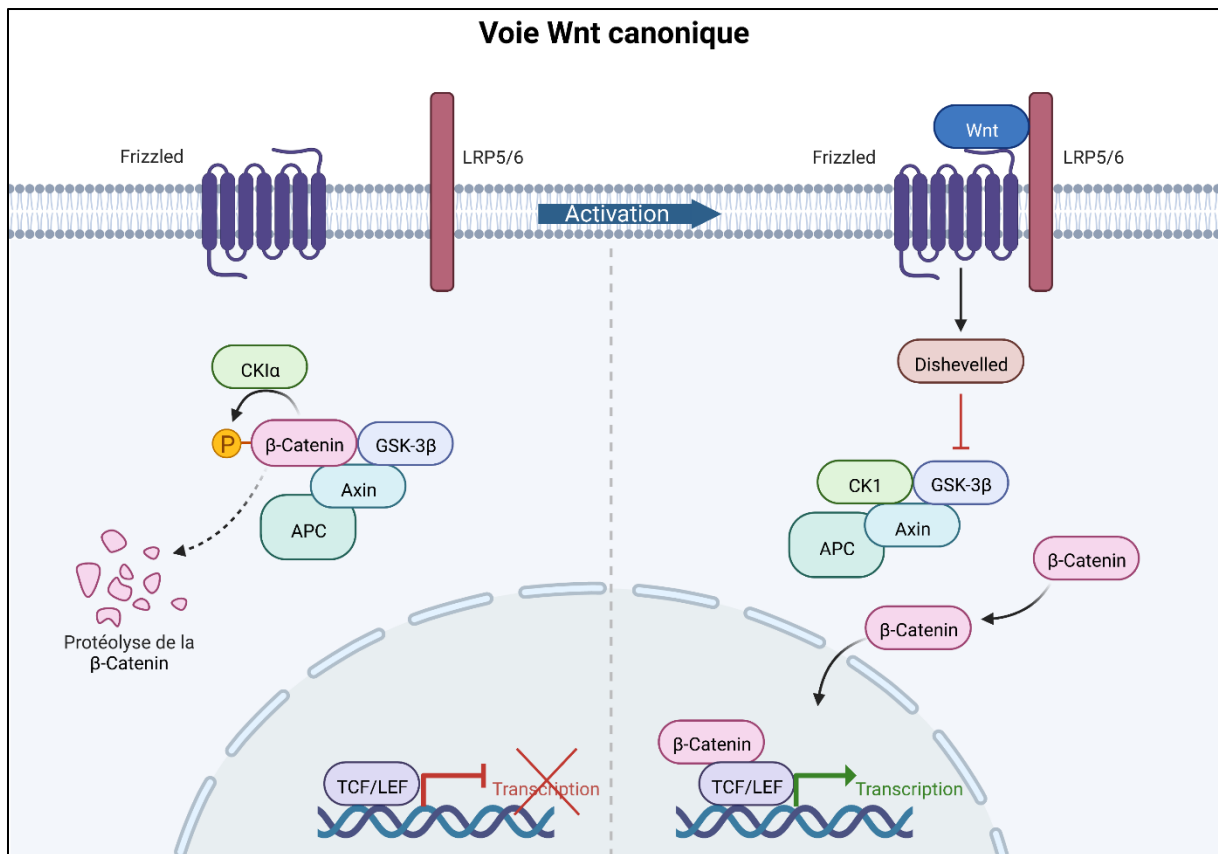


Figure 15 : La voie canonique de Wnt

3. Le métabolisme

Comme exposé précédemment, les troubles métaboliques sont des facteurs de risque du développement de l'arthrose, qui participent dans nos sociétés, en plus de l'âge, à une nette augmentation de la prévalence de l'arthrose. La compréhension du rôle du métabolisme dans l'arthrose ainsi que l'identification de cibles thérapeutiques éventuelles sont alors des enjeux majeurs.

a. Le métabolisme énergétique

La source majeure d'énergie pour la cellule est l'adénosine triphosphate (ATP). La molécule d'ATP peut être produite par certaines réactions de la glycolyse (**Figure 16**), ou bien par la phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS) alimentée par les produits du cycle de Krebs (**Figure 17**). La production d'ATP par la glycolyse est beaucoup moins efficace que l'OXPHOS car le résultat net est de seulement 2 molécules d'ATP produites par molécule de glucose. Physiologiquement, lorsque les cellules ont accès à l'oxygène, le glucose est réduit par la glycolyse en 2 molécules de pyruvate qui sont oxydés afin d'alimenter le cycle de Krebs en acétyl-coenzyme-A (acétyl-coA) (**Figure 16**). Le cycle de Krebs génère alors 2 molécules

d'ATP et 8 molécules de nicotinamide adénine di-nucléotide (NADH) et 2 molécules de flavine adénine dinucléotide (FADH₂) (**Figure 17**) qui participent respectivement à la production de 21 et 4 molécules d'ATP grâce à l'OXPPOS (**Figure 18**). L'OXPPOS nécessite cependant de l'oxygène pour pouvoir consommer le NADH et le FADH₂, c'est pourquoi, lorsque les cellules n'ont pas accès à une quantité suffisante d'oxygène comme c'est le cas des cellules musculaires lors d'un effort intense par exemple, le pyruvate est alors préférentiellement réduit en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH, Réaction 9 de la glycolyse). La production d'énergie repose alors sur le processus, rapide mais moins efficace, de la glycolyse (**Figure 16**).

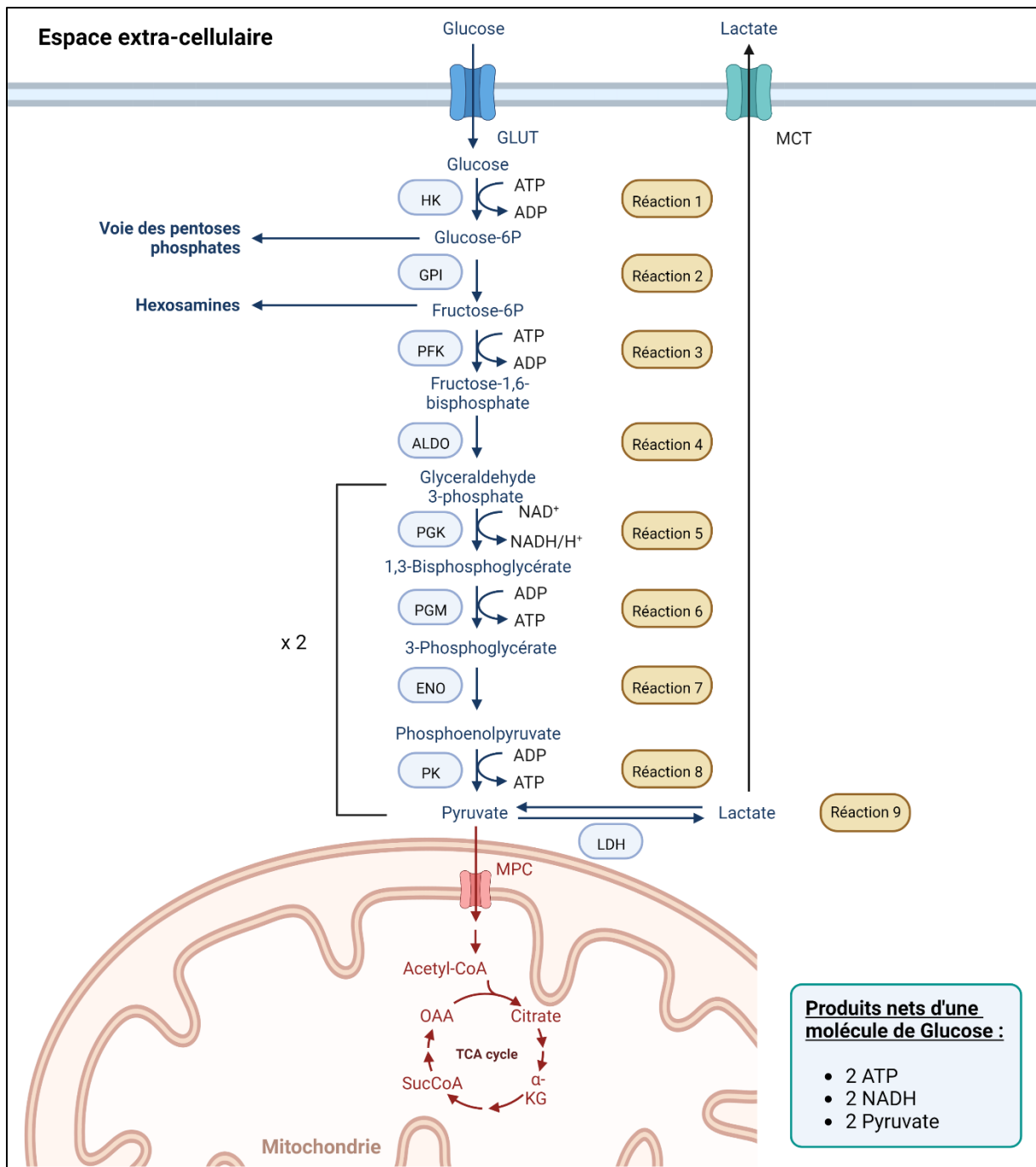


Figure 16 : Réactions moléculaires associées à la glycolyse.

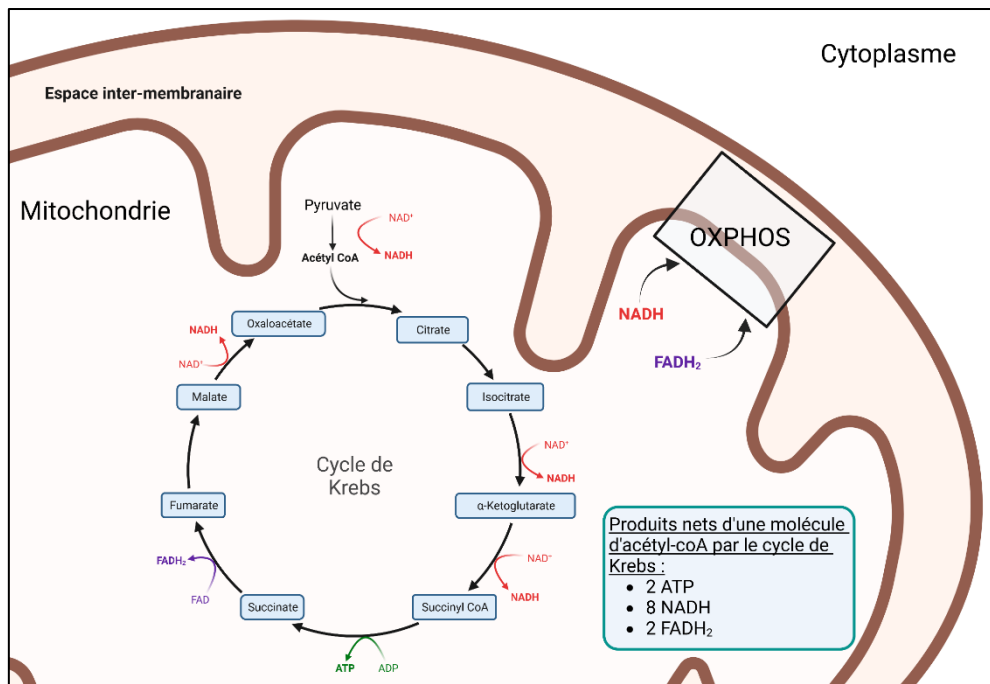


Figure 17 : Le cycle de Krebs.

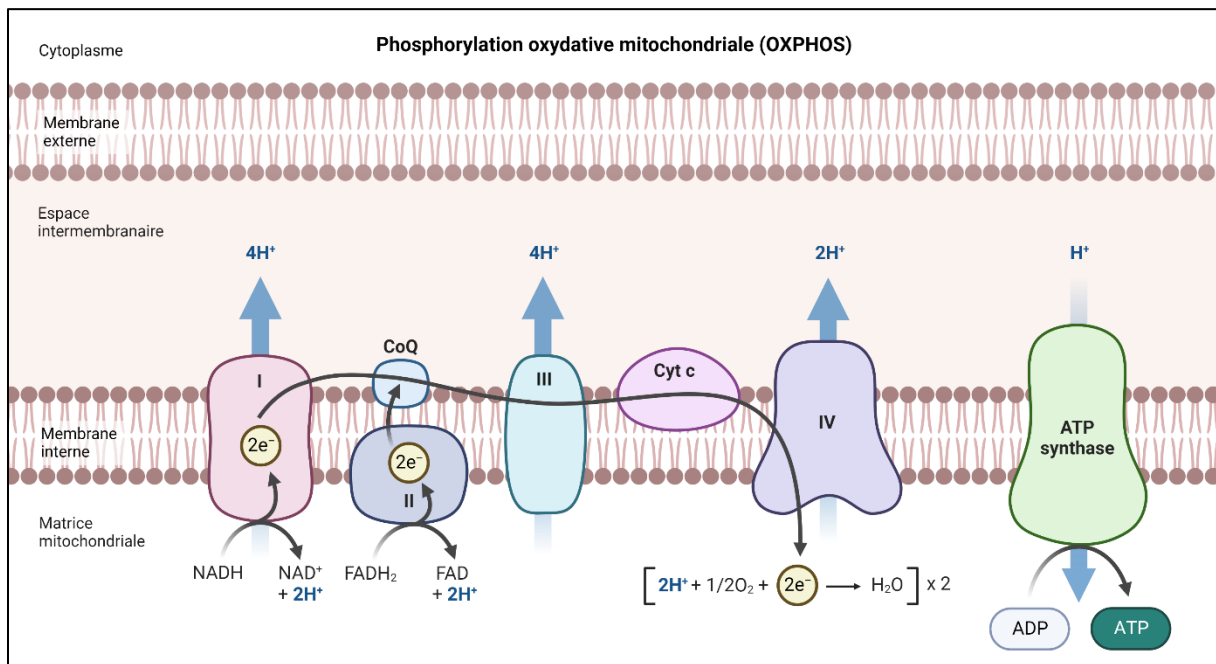


Figure 18 : La phosphorylation oxydative mitochondriale.

Le cartilage articulaire est un tissu avasculaire en condition physiologique, les chondrocytes ont donc un accès à l'oxygène limité. La tension en oxygène dans le cartilage est ainsi estimée à moins de 8%, avec une variation dans l'épaisseur du cartilage et l'OXPHOS représente la source de seulement 25% de l'ATP produit dans le cartilage [207]. Il pourrait alors être assez intuitif d'émettre l'hypothèse, qu'en condition arthrosique, lorsque le cartilage se dégrade et

laisse place à l'infiltration de quelques vaisseaux, les cellules s'appuient préférentiellement sur un processus aérobie, l'O₂PHOS, plus efficace pour la production d'énergie. Pourtant plusieurs études suggèrent un processus tout à fait différent, associé à une altération mitochondriale [208], ne permettant au chondrocyte arthrosique de produire de l'ATP quasiment exclusivement grâce à la glycolyse [209]. Ce phénomène assez contre-intuitif, peut s'expliquer par l'effet « Crabtree » qui a été mis en évidence dans les chondrocytes, signifiant qu'une quantité importante de glucose inhibe la consommation d'oxygène [210]. Comme la quantité de glucose retrouvée dans le liquide synovial de patients arthrosiques est plus élevée que celle retrouvée chez des patients PR [211], ajouté au fait que cette quantité augmente avec l'IMC [212], on peut alors penser, qu'en condition arthrosique, l'augmentation de glucose disponible dans le liquide synovial, prédomine sur l'augmentation de la disponibilité de l'oxygène, expliquant ainsi l'augmentation de l'activité glycolytique. De nombreuses enzymes clés de la glycolyse ont alors été associées à des dérégulations liées à l'apparition de l'arthrose : hexokinase II (HK2) [213], pyruvate kinase M2 (PKM2) [5], [214], lactate déshydrogénase A (LDHA) [177], [215]. En plus des enzymes impliquées dans la glycolyse, des métabolites en lien avec la glycolyse, comme l'alanine, la sérine et le lactate ont été retrouvés comme étant surreprésentés dans le liquide synovial de chiens ou encore de brebis atteintes d'arthrose [216]. De plus, une récente étude a mis en évidence que l'utilisation de 2-déoxyglucose (2-DG), un analogue du glucose non métabolisable qui inhibe alors l'activité de HK2, ou le remplacement du glucose par du galactose permettait de protéger le cartilage humain de la dégradation [217]. Ainsi les différents acteurs de la régulation de la glycolyse et de la respiration mitochondriale apparaissent comme des cibles thérapeutiques intéressantes.

(1) Les transporteurs de glucose

La glycolyse est initiée par l'import de glucose à travers des transporteurs membranaires. Il existe deux types de transporteurs de glucose : les protéines de la famille Glut qui facilite le transport de glucose de façon passive à travers la membrane cellulaire, et les transporteurs sodium-dépendant (Sodium-Dependent Glucose Transporters, SGLTs) qui permettent une entrée active de glucose. Les SGLTs n'ont encore jamais été décrits dans le contexte de l'arthrose, notre intérêt se portera donc sur les Glut.

Les Glut se composent de 14 membres, Glut1-14. La régulation du transport de glucose passe alors par deux mécanismes principaux, la modification de l'expression de Glut à la membrane

[218] ou la modification de son affinité pour le glucose par des modifications post-traductionnelles [219]. Les Glut sont des acteurs majeurs du métabolisme, car l'entrée du glucose qu'il facilite peut alors alimenter la glycolyse dont certains produits participent activement à d'autres voies métaboliques comme la voie des pentoses phosphates, la voies de synthèse des hexosamines ou encore la production d'acides aminés. Parmi les transporteurs Glut, Glut-1, Glut-3 et Glut-9 sont exprimés dans les chondrocytes articulaires humains [220]. Glut-1, codé par *Slc3a2*, est le plus représenté dans les chondrocytes murins et est nécessaire au maintien de l'homéostasie des chondrocytes pendant la croissance [221]. Glut-1 est aussi le plus important dans le contexte de l'arthrose parce qu'à la différence des autres, il peut-être régulé dans le cartilage articulaire par des stimuli externes, comme l'IL-1 β , le TNF- α , le TGF- β ou encore des modulations du niveau de glucose extra-cellulaire [222], [223].

Ainsi, dans les chondrocytes sains, l'expression de Glut-1 à la membrane est régulée : en présence d'une quantité extra-cellulaire trop importante de glucose, Glut-1 est dégradé par voie lysosomale. Ce mécanisme de régulation est perdu dans les chondrocytes arthrosiques, menant alors à l'accumulation de glucose dans les chondrocytes arthrosiques ce qui participe à l'augmentation des ROS [218], [224]. De plus, l'expression de Glut-1 est augmentée dans les chondrocytes arthrosiques en présence d'un stimulus pro-inflammatoire [218], [222] mettant en évidence un lien étroit entre l'augmentation de l'activité glycolytique et l'inflammation.

Cependant, des résultats contradictoires quant au rôle de Glut-1 dans le cartilage ont également été mis en évidence par d'autres équipes. Shikhman et al. ont ainsi montré qu'un traitement à l'IL-1 β , une molécule aux effets cataboliques ou au TGF- β , ici considéré par les auteurs comme une molécule aux effets anaboliques, induisait une augmentation de l'utilisation du glucose par les chondrocytes [223]. Cependant, les mécanismes mis en jeu dans cette augmentation ne sont pas les mêmes. Le traitement à l'IL-1 β induit une régulation au niveau de l'expression de Glut-1, alors que le traitement au TGF- β induit probablement une régulation du transport du glucose par des processus post-traductionnels. De plus, une très récente étude a mis en évidence une augmentation de l'expression de Glut-1 dans un modèle murin d'arthrose induite par DMM, ainsi qu'un effet protecteur de la surexpression de Glut-1 dans ce même modèle [225]. Ces résultats suggèrent alors, que bien que Glut-1 soit jusqu'alors le facilitateur de transport de glucose le plus étudié dans le cadre de l'arthrose,

d'autres Glut pourraient jouer un rôle important et être impliqués dans des processus de régulations métaboliques différents de ceux mis en jeu dans le cadre d'un processus inflammatoire.

La régulation de Glut-1 est aussi fortement impliquée dans la détermination du phénotype de cellules immunitaires. Ainsi, Glut-1 apparaît alors dans la PR comme une cible thérapeutique d'intérêt [226]. En effet, la PR est une maladie articulaire auto-immune menant à l'apparition d'une inflammation importante de la membrane synoviale en comparaison de l'inflammation de bas grade présente au sein des patients arthrosiques. Cependant, l'arthrose est aussi associée à une infiltration anormale de cellules immunitaires participant à l'inflammation de la membrane synoviale. Glut-1, bien que moins exprimé dans les FLS issus de patients arthrosiques que dans ceux issus de patients PR [227], apparaît donc aussi comme une cible d'intérêt dans le contexte de l'arthrose tant pour pallier à des dysfonctionnements du cartilage que de la membrane synoviale. Ainsi il a été mis en évidence chez des patients présentant de l'arthrose dans un contexte diabétique que l'expression de Glut-1 était largement augmentée [228]. Par ailleurs, des co-cultures de FLS pré-conditionnés avec des milieux plus ou moins riches en glucose et de chondrocytes, ont mis en évidence que l'hyperglycémie participait à rendre les FLS plus inflammatoires, et via une sécrétion accrue de cytokines pro inflammatoires à participer au phénotype pro-catabolique des chondrocytes [228].

Une technique d'imagerie utilisant le utilisant le $[^{18}\text{F}]\text{FDG-PET}$ (*Fluorodesoxyglucose positron emission tomography*) peut être utilisée afin de déterminer quelle région du corps est plus consommatrice de glucose. Très utilisée en suivi clinique dans le cadre du cancer, cette technique d'imagerie reste couteuse et n'est donc pas utilisée de façon routinière dans le cadre de l'arthrose. Cependant certaines études ont évalué la pertinence de cette technique d'imagerie dans le cadre de l'arthrose et ils ont confirmé que l'articulation arthrosique est le siège d'une augmentation de l'activité glycolytique souvent associée aux zones les plus inflammées [229], [230].

(2) HK2

L'héxokinase est l'enzyme impliquée dans la première réaction de la glycolyse, responsable de la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate (G6P). C'est l'une des enzymes clés du métabolisme du glucose [231]. Il existe 5 types d'héxokinase, parmi lesquelles, HK2 est

principalement exprimée dans le système musculo-squelettique et est finement régulée par la concentration de G6P [232], [233]. HK2 est ainsi l'héxokinase d'intérêt dans le contexte de l'arthrose.

La surexpression d'HK2 a été mise en évidence en réponse à un traitement pro-inflammatoire dans des FLS issus de patients arthrosiques. En parallèle la capacité de HK2 à induire l'expression des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8) ou des MMPs a aussi été montrée [234]. Ces observations renforcent le lien fort qu'il existe entre l'inflammation et les dérégulations associées au métabolisme.

Le rôle d'HK2 est particulièrement central, car en plus d'être l'un des régulateurs du flux glycolytique [235], HK2 est impliqué dans la régulation de l'autophagie, ainsi que de la mort cellulaire et peut jouer un rôle sur la régulation de la transcription de certains gènes [236]. La modulation de l'activité de HK2 semble alors une piste intéressante pour le traitement de l'arthrose.

(3) PKM2

La pyruvate kinase (PK) est l'enzyme qui catalyse la réaction 8 de la glycolyse, responsable de la formation du pyruvate et d'une molécule d'ATP associée (**Figure 16**). Il existe deux isoformes de la PK, PKM1 et PKM2. L'expression de PKM2 est particulièrement importante au cours du développement, dans les tumeurs cancéreuses et au cours de la réparation tissulaire [237]. De façon intéressante, seul PKM2 est retrouvé comme étant sur-exprimé au sein des chondrocytes arthrosiques [209], [238]. De façon similaire à HK2, en plus de son implication dans la glycolyse, PKM2 est capable de se transloquer au noyau, de phosphoryler STAT3 et ainsi d'augmenter la production d'IL-6 et d'IL-1 β [239]. PKM2 fonctionne alors en homodimère ou tétramère, sa forme tétramérique étant associée à son activité au sein de la glycolyse alors que sa forme dimérique participe à son activité nucléaire. L'activité de PKM2, bien que pouvant être délétère, est nécessaire à la production d'ATP par la glycolyse, et son inhibition a ainsi été associée d'un côté, à une diminution des marqueurs chondrocytaires tels que Sox9 ou COL2A1 [209] et de l'autre, à une réduction de la douleur chez le rat dans un modèle de douleur neuropathique [240]. Ce nouvel exemple illustre la forte implication des enzymes glycolytiques dans les processus tels que l'inflammation ou la douleur, mais aussi la difficulté à cibler des voies qui restent malgré tout nécessaires au bon fonctionnement cellulaire.

(4) LDHA

Il existe 2 isoformes de LDH, LDHA et LDHB. Chacune de ces isoformes peut permettre dans un sens ou dans l'autre la formation de lactate à partir de pyruvate ou la formation de pyruvate depuis le lactate (**Figure 16**). Cependant, en condition physiologique, lorsque les 2 isoformes sont présentes la LDHA est majoritairement impliquée dans la réduction du pyruvate en lactate, et la LDHB catalyse préférentiellement la formation de pyruvate. L'arthrose étant associée à des défauts mitochondriaux qui seront détaillés dans la section suivante, le pyruvate, plutôt que d'être transféré à la mitochondrie pour participer au Cycle de Krebs, est largement réduit en lactate. Ainsi, la LDHA joue un rôle clé.

Son expression est notamment augmentée en réponse à l'inflammation dans des chondrocytes murins et associée à la production de ROS [177]. De plus, le lactate ainsi produit peut alors être exporté notamment par les échangeurs lactate/H⁺ (MCT-4), participant ainsi à l'acidification du milieu extracellulaire. Or, la diminution du pH a été associée à une activité catabolique accrue du cartilage. On comprend alors, que cette augmentation de l'activité glycolytique qui mène à la production de lactate participe activement aux processus arthrosiques.

Néanmoins, la réduction du pyruvate en lactate permet aussi la (ré)génération de NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide). Le NAD⁺ diminue avec l'âge mais aussi avec la sénescence [241], [242], et les ratios NAD⁺/NADH sont eux aussi diminués lorsque la cellule présente des défauts mitochondriaux [243]. Il est très probable que cette diminution ne soit pas liée à un défaut de production mais plutôt à une consommation plus importante de la cellule [244]. Le NAD⁺ est, d'une part, un co-facteur important dans le métabolisme énergétique, nécessaire à certaines réactions de la glycolyse (**Figure 16**) et du Cycle de Krebs (**Figure 17**). D'autre part, le NAD⁺ joue un rôle de co-substrat pour plusieurs enzymes : les Sirt, les PARP (poly(ADP-ribose) transférase), et les cADPR (cyclique ADP-ribose) synthases comme CD38 ou CD157 [241]. L'inhibition de LDHA en association avec une supplémentation en précurseurs de NAD⁺ pourrait alors s'avérer intéressante dans le contexte de l'arthrose.

(5) La mitochondrie et l'ATP

La respiration mitochondriale est le processus le plus efficace pour produire de l'ATP, la source majeure d'énergie de la cellule. Or, l'ATP s'avère être essentiel notamment dans l'homéostasie du cartilage [245]. Néanmoins au cours de l'arthrose, des défauts de la

biogénèse de la mitochondrie se mettent en place dans le cartilage [246]. D'un point de vue moléculaire, ces défauts sont principalement médiés par la voie AMPK/Sirt-1/PGC-1 α . En effet, AMPK α , la sous-unité catalytique de l'AMPK [247], [248] ainsi que Sirt-1 sont sous-exprimés au cours de l'arthrose, entraînant la diminution de l'activité transcriptionnelle de PGC-1 α qui dépend de sa phosphorylation par AMPK ainsi que de sa désacétylation par Sirt-1. L'activation d'AMPK permet aussi la surexpression de FOXO3a qui régule l'expression de PGC-1 α [246]. Or, tous ces acteurs moléculaires ont été associés à une chondroprotection, mettant en évidence le caractère délétère des défauts mitochondriaux pouvant apparaître au cours de l'arthrose [246]–[249].

Ces défauts mitochondriaux sont associés à une dérégulation de la balance oxydative. La balance oxydative résulte du rapport entre les quantités de ROS et celles des anti-oxydants. Une dérégulation peut alors être médiée soit par une augmentation de la production de ROS, soit par un défaut de la production d'anti-oxydants. Au cours de l'arthrose les 2 processus participent à la dérégulation de la balance oxydative. La production anormale de ROS résulte dans les chondrocytes, d'une part des défauts mitochondriaux, et d'autre part de mécanismes métaboliques annexes comme par exemple l'accumulation des produits de peroxydation des lipides [250]. Les deux ROS principalement retrouvés sont du O₂⁻ et du NO. Ces deux types de ROS peuvent aussi mener à la formation de peroxynitrite (ONOO⁻) particulièrement indésirable pour la cellule. Le NO est produit par la NO synthase (NOS) alors que O₂⁻ est principalement produit par la NADPH oxydase. Les chondrocytes expriment deux types de NOS, iNOS et eNOS [251]. iNOS, est inductible au niveau transcriptomique par différents stimuli comme les stress mécaniques ou l'inflammation, qui favorise alors la production de NO. Finalement, l'accumulation de NO mène à un défaut de production de MEC médiée par une diminution de l'O₂PHOS et de la production d'ATP [252] illustrant la forte interaction entre la mitochondrie et la production de ROS. Pour prévenir une accumulation aberrante de ROS, les cellules peuvent compter sur la présence d'anti-oxydants, capables de détoxifier les cellules (**Figure 19**). Les chondrocytes possèdent différents types d'anti-oxydants, les SODs qui permettent la production d'O₂ à partir d'O₂⁻, la catalase (CAT), la glutathione peroxidase (GPX) et la peroxiredoxine (PRX) qui permettent d'emprisonner l'H₂O₂ l'intermédiaire de la détoxification d'O₂⁻ et de l'éliminer. La PRX joue aussi un rôle important dans la détoxification des ONOO⁻.

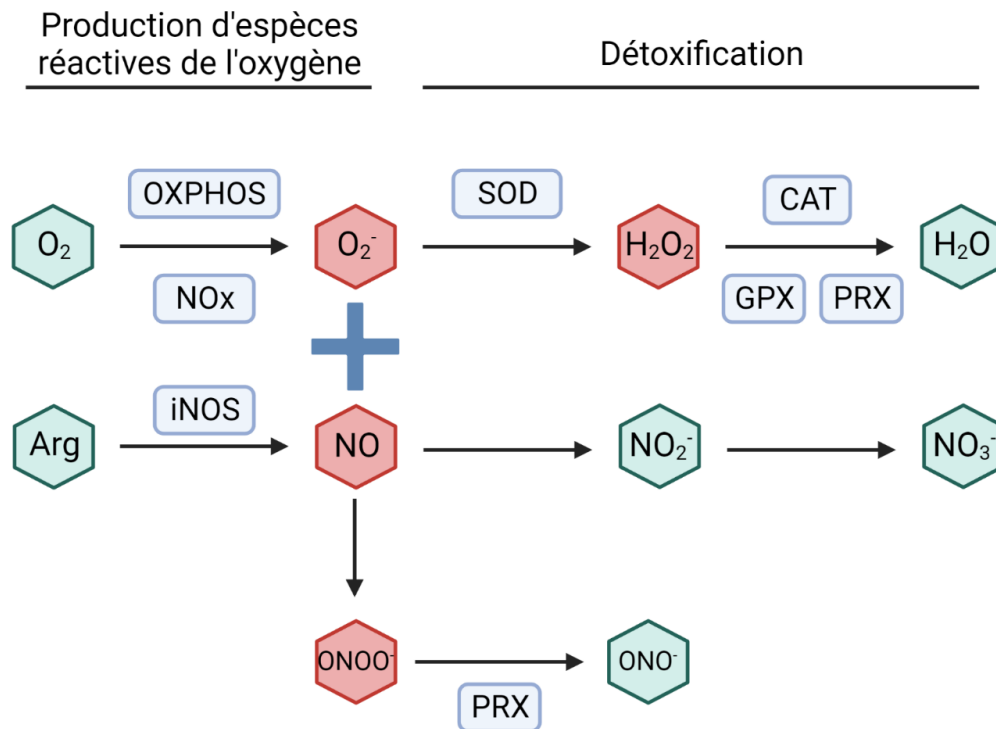


Figure 19 : Mise en évidence des différents systèmes anti-oxydants disponibles au sein des chondrocytes.

Enfin, des liens étroits ont été mis en évidence entre la voie purinergique, associée dans les tissus endommagés à la présence importante d'ATP en extra-cellulaire et le maintien de l'intégrité du cartilage. En effet le récepteur P2X7 (P2X7R) peuvent être activés par l'ATP ou l'ADP extracellulaires [253]. Lorsque le récepteur est faiblement activé il fonctionne comme un simple échangeur d'ions sodium, calcium et potassium (entrée de Na^+ et de Ca^{2+} , et sortie de K^+) permettant le clivage et la sécrétion de certaines cytokines [254]. Alors que lorsqu'il est fortement activé, il peut former des pores membranaires permettant le passage de nombreuses molécules comme par exemple des cytokines pro-inflammatoires actives comme l'IL-1 β [255].

b. Les autres voies métaboliques altérées au cours de l'arthrose

D'une manière plus générale, le métabolisme de l'articulation est altéré au cours du développement de l'arthrose. En effet, le métabolome de liquide synovial issu de patients sains diffère significativement de celui de patients arthrosiques [256].

Nous avons précédemment mis l'accent sur le rôle du glucose en tant que substrat de la glycolyse. D'autres sous-produits du glucose permettent cependant d'initier d'autres voies

métaboliques. Parmi elles, la voie des pentoses phosphates (VPP) est initiée par le G6P [257]. Cette voie ne participe ni à la production d'ATP ni à la production de NADH, en revanche elle permet la synthèse du ribose-5-phosphate qui est un précurseur de la synthèse des nucléotides, et à la formation de NADPH indispensable à la réduction du glutathione (GSH). La VPP participe alors à la fois aux processus anaboliques et à la protection de la cellule des processus oxydatifs grâce à la production de GSH, un anti-oxydant [258]. L'augmentation de l'activité de la VPP dans un contexte d'arthrose peut alors être considérée comme un processus précoce de défense contre les mécanismes délétères de dégradation du cartilage [177], [259], [260].

La voie de biosynthèse des hexosamines (HBP, *Hexosamine biosynthetic pathway*) dépend elle aussi d'un produit de la glycolyse, le fructose-6-phosphate (F6P). L'étape régulatrice de la HBP est catalysée par l'enzyme limitante GFAT (Glutamine fructose-6-phosphate aminotransférase) qui permet la production de glucosamine-6-phosphate à partir de glutamine et de F6P. Il existe 2 isoformes de GFAT, GFAT-1 (qui possède aussi au moins un transcrit alternatif décrit à ce jour [261] et GFAT-2. Alors que l'expression de GFAT-1 est ubiquitaire et a déjà été montrée dans l'articulation [262], l'expression de GFAT-2 a lieu majoritairement au sein du système nerveux central [263]. De façon très intéressante, la transduction de GFAT dans des synoviocytes a permis de réduire l'effet pro-inflammatoire de ces cellules sur des chondrocytes mis en co-culture [264], suggérant l'importance de la voie HBP dans l'articulation.

Le produit final de la HBP est l'UDP-GlcNAc (uridine diphosphate N-acetylglucosamine). L'UDP-GlcNAc peut participer à l'ajout de glycosylation sur les protéines, à la synthèse des protéoglycanes et notamment de l'acide hyaluronique, composant essentiel de la MEC des chondrocytes, ou encore à l'ajout de motifs O-GlcNAc sur les protéines [265]–[267]. Ainsi il a été montré que le glucose est le principal précurseur de la synthèse des GAGs dans les chondrocytes [222]. De plus, l'accumulation de protéines O-GlcNAcylées a été mise en évidence dans le cartilage de patients arthrosiques [268]. Enfin, SIRT1 [269], FOXO1 [270], p65 [271] ou encore PGK1 [272] sont des protéines pouvant être O-GlcNAcylées, mettant en évidence le possible rôle de la O-GlcNAcylation dans la régulation des processus impliqués dans l'arthrose.

Quant à la glucosamine, impliquée dans la voie des HBP, elle semble aussi pouvoir protéger de l'arthrose [273]. La glucosamine, qui a montré un bénéfice modeste dans le traitement de l'arthrose peut permettre *via* la voie HBP et indépendamment de GFAT de produire de l'UDP-GlcNAc [274] qui a son tour pourra participer à la synthèse des GAGs indispensables à l'intégrité du cartilage [222], [266], [267].

C. Outils thérapeutiques en développement

Après avoir mis en évidence différents mécanismes cellulaires qui pourraient permettre d'identifier des cibles thérapeutiques d'intérêt pour le développement de DMOADs. Cette partie visera donc à mettre en évidence les outils thérapeutiques actuellement utilisés ou en développement permettant la modulation soit des cibles thérapeutiques potentielles, soit des mécanismes précédemment identifiés.

1. Traitement acellulaire : systèmes de délivrance

L'injection directe de molécules telles que des facteurs de croissance ou des anti-cytokines fait partie des stratégies en développement. Parmi les anti-cytokines, l'anakinra, de l'IL-1Ra, a initialement démontré une supériorité par rapport au placebo chez des patients arthrosiques au jour 4 de traitement, avant de perdre tout bénéfice aux temps les plus longs [275]. Cet exemple illustre alors, l'une des principales limites à l'efficacité thérapeutique d'une molécule, sa durée d'efficacité. Cet aspect est d'autant plus important dans une maladie comme l'arthrose qui se met en place avec des processus lents et continus. Beaucoup d'études développent alors aujourd'hui des procédés de délivrance contrôlée et prolongée.

Plusieurs systèmes de délivrance de molécules comme des nanoparticules métalliques [276], des liposomes [277] ou des micelles [278] sont étudiés pour augmenter le temps de résidence des molécules injectées. Utilisés dans leur forme la plus simple ces systèmes ont eux aussi plusieurs limites comme la faible quantité de molécules pouvant être chargée ainsi qu'un manque de moyen pour contrôler le relargage de ces molécules [279]. Pour rendre ces systèmes encore plus intéressants, il est alors intéressant de pouvoir développer des systèmes de relargage stimuli-dépendants. Parmi les stimuli étudiés pour l'injection intra-articulaire dans des articulations arthrosiques, le pH est un élément qui semble prometteur [279]–[281]. En effet, comme nous l'avons souligné précédemment, le liquide synovial d'une articulation arthrosique a tendance à s'acidifier sous l'influence des processus liés à l'inflammation.

D'autres matériaux permettant un relargage dépendant de l'activité d'enzymes comme les matériaux sensibles aux MMPs [281], aux ROS [282], [283] ou encore à l'oxyde nitrique [284] sont aussi développés.

Ces systèmes de délivrance peuvent aussi eux-mêmes permettre une amélioration de la fonction articulaire. Par exemple, l'acide hyaluronique, hydrophile, peut d'une part, permettre de faciliter l'utilisation de certains matériaux hydrophobes [285] et peut d'autre part médié des effets bénéfiques comme une diminution de l'inflammation [286], [287] et une augmentation de la lubrification articulaire [288]. Pour autant, l'utilisation d'acide hyaluronique en traitement intra-articulaire de type visco-supplémentation s'est révélée plus à même de participer au développement d'effets secondaires qu'à l'amélioration des signes cliniques de l'arthrose [289]. Ainsi, il faudra être vigilant sur l'utilisation de l'acide hyaluronique dans l'amélioration des systèmes de délivrance.

De façon très intéressante, ces systèmes de délivrance peuvent être combinés à d'autres approches comme la thérapie cellulaire [290]–[292] ou la thérapie génique [293] et ainsi permettre une synergie entre les différentes approches.

2. Thérapie cellulaire

Pour permettre le transfert de molécules aux effets bénéfiques dans l'articulation, certaines stratégies s'appuient sur l'utilisation de cellules. L'injection de ces cellules permet alors par leurs facteurs sécrétés ou encore par leur capacité intrinsèque de régénération une amélioration des mécanismes pathologiques mis en jeu au cours de l'arthrose [294]. Cependant, cette stratégie est associée à plusieurs limites, car elle sous-entend l'injection chez le patient de matériel vivant avec les contraintes de sécurité et de production que cela implique.

On associe à cette stratégie l'injection de plasma riche en plaquettes (PRP). Ce produit, issu d'une centrifugation spécifique du sang du patient est alors enrichi, comme son nom l'indique, en plaquettes. Ces plaquettes contiennent de nombreuses protéines parmi lesquelles on retrouve notamment des facteurs de croissance favorisant la régénération de l'articulation [295]. Malgré son utilisation récurrente en clinique, le bénéfice sur l'atteinte articulaire reste discuté comme ceci est illustré par l'absence d'approbation de la FDA quant à l'utilisation de

ce produit. D'autres concentrés comme le concentré de moelle osseuse ou la fraction stromale vasculaire issu de tissu adipeux sont notamment composés de cellules [296].

Le transfert de chondrocytes quant à lui peut aussi être envisagé, dans une visée clinique de réparation des défauts cartilagineux pouvant ainsi prévenir la survenue d'arthrose secondaire [297]. Cette technique, développée en 1994 par Brittberg [298] a notamment mené au transfert de chondrocytes nasaux chez des patients atteints de défauts cartilagineux au niveau de la trochlée ou de la tête fémorale [299]. Par ailleurs, la combinaison de la thérapie cellulaire avec la thérapie génique via le transfert de cellules génétiquement modifiées peut également être envisagée. Cette stratégie a d'ailleurs récemment été évaluée avec le produit Tissue-GeneC. Tissue-GeneC consiste en une association de chondrocytes non transduits et de cellules de lignées GP2-293 irradiées après avoir été transduits avec un lentivirus codant pour le TGF- β 1 [300]. Ce produit est en cours d'évaluation clinique chez des patients présentant de l'arthrose (score de Kellgren-Lawrence compris entre 1 et 2, associé à un rétrécissement articulaire gradé à 1-2) (NCT03203330).

Aujourd'hui, la thérapie cellulaire la plus prometteuse semble cependant être basée sur l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (MSCs). Ainsi, dans la maladie de Crohn par exemple, l'alofisel, une thérapie à base de MSCs est aujourd'hui autorisée par l'agence de médecine européenne mettant en évidence la faisabilité de l'utilisation des MSCs en clinique [301]. Les MSCs ont été identifiées dans de nombreux tissus où elles permettent le maintien de l'homéostasie tissulaire. Elles présentent l'avantage de pouvoir s'auto-renouveler ou se différencier notamment en cellules du cartilage, de l'os ou du gras, mais aussi de pouvoir médier des messages cellulaires par une activité sécrétoire [302]. Leur provenance (tissu adipeux, moelle osseuse, cordon ombilical) peut cependant impacter leur efficacité [303]. L'environnement dans lequel elles sont jouent aussi un rôle sur leur activité [304]. Par exemple, dans un environnement pro-inflammatoire, les MSCs adopteront préférentiellement un phénotype pro-régénératif et immuno-modulateur [305]. Ainsi, les MSCs à travers la sécrétion de différents facteurs (PGE2, NO,IDO,...) [306] ou de vésicules extra-cellulaires (EVs) sont capables de moduler la polarisation des macrophages [307], de promouvoir le phénotype régulateur des lymphocytes T (T_{reg}) ou encore de supprimer l'activation des cellules NK (*Natural killer*) [307]. Les MSCs semblent donc d'intérêt pour résoudre les dérégulations liées aux cellules immunitaires qui peuvent survenir au cours de l'arthrose. Enfin, d'autres éléments

comme la sécrétion de TGF- β 1 [308], ou encore l'activation de l'autophagie [309] sont aussi des effets protecteurs que peuvent médiés les MSCs. A la vue de tous ces éléments prometteurs, une récente revue recensait 10 essais cliniques aux résultats encourageants [310] laissant présager de futurs succès cliniques.

La thérapie cellulaire peut aussi être associée à deux autres approches : l'utilisation de biomatériau ou l'ingénierie par transfert de gènes. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence que les propriétés des matériaux utilisés pour encapsuler les MSCs peuvent influencer leurs propriétés thérapeutiques [311]–[313]. Ainsi, ces connaissances grandissantes autour du contrôle de l'activité des MSCs pourraient permettre de développer le biomatériau adapté, en fonction de l'application recherchée. De plus, il a été montré que de forcer, grâce à des outils de thérapie génique, l'expression de molécules d'intérêt comme HO-1 (Heme-oxygénase-1), PDGF (*Platelet-derived growth factor*) ou encore IL-4 dans des MSCs pouvaient favoriser leurs effets bénéfiques [314], [315].

3. Thérapie génique

a. Avant-propos

Comme illustré dans la partie précédente de ce manuscrit (I.C Outils thérapeutiques en développement), différentes cibles thérapeutiques tendent à émerger à partir des connaissances toujours plus nombreuses des mécanismes physiopathologiques de l'arthrose. Cependant, les succès cliniques font encore défauts, et cela s'explique notamment par un manque de stratification des patients [158], [206]. D'autres éléments, comme l'utilisation de molécules ciblant un seul mécanisme ou un tissu de l'articulation alors que l'arthrose est une maladie complexe impliquant toute l'articulation [316], ou encore les difficultés à définir les signes d'amélioration clinique [317] dans un contexte où le placebo a souvent un effet bénéfique assez important [318], participent aussi à expliquer le manque de succès à ce jour.

Dans ce contexte, il apparaît intéressant, en parallèle de la mise en évidence de cibles thérapeutiques, de disposer d'outils pouvant transporter la molécule thérapeutique désirée en fonction des besoins du patient. Parmi les outils disponibles (protéines recombinantes, système de délivrance synthétique, injections intra-articulaire répétées), la thérapie génique apparaît comme très prometteuse. Les récentes mises sur le marché de produits de thérapie génique participent aujourd'hui à la rationalisation de l'utilisation de cet outil en médecine

humaine [319]. Pour autant certaines limites, comme les réactions immunitaires induites par ces outils ou le ciblage spécifique des cellules d'intérêt, existent encore [320]. La revue qui suit retrace alors les succès actuels de la thérapie génique dans le contexte de l'arthrose ainsi que les pistes à explorer pour aller plus loin.

« Gene therapy for osteoarthritis » : En préparation

b. Revue de la littérature en préparation

Title:

Gene therapy for osteoarthritis

Authors:

A. Defois¹, N. Bon¹, M. Mével², O. Adjali², Y. Maugars¹, J. Guicheux^{1*}, C. Vinatier^{1*§}

Affiliation:

¹ Nantes Université, Oniris, CHU Nantes, INSERM, Regenerative Medicine and Skeleton, RMeS, UMR 1229, F-44000 Nantes, France.

² Translational Gene Therapy Laboratory, Nantes Université, CHU Nantes, INSERM UMR, 1089, Nantes, France

* Co-last

§ claire.vinatier@univ-nantes.fr

Funding:

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) through the project KLOTHOA (ANR-18-CE14-0024-01; CV), by the region “Pays de la Loire” (RFI Bioregate, GenOA, CV, AD).

How gene therapy could be useful for OA treatment?

Joint disorders are very common, often chronic and a source of considerable pain and disability leading to a huge socio-economic cost worldwide. Among these joint disorders, osteoarthritis (OA) is the most common form affecting a total of 500 million people worldwide (Leifer et al., 2022). In developed countries, estimated costs for OA consequences are between 1% and 2.5% of gross domestic product (O'Neill et al., 2018). Moreover, according to the World Health Organization, worldwide estimates are that 9.6% of men and 18.0% of women aged over 60 years have symptomatic OA, illustrating that women are more often affected. Age is the most important risk factor for OA with a prevalence peak at around 50 years of age for knee OA (**Figure 20**) (Cross et al., 2014). Obesity is the second major OA risk factors and thus, with age lead to a huge prevalence rise in modern society, highlighting the medical emergency to find a cure for OA. However, despite intensive research for a long time, and sometimes promising pre-clinical studies, no etiological Disease-Modifying OA Drug (DMOAD) has yet been successfully translated in daily clinical practice. These clinical failures could be explained by the complex and multifactorial etiology of OA, which makes the transposition between the results obtained in preclinical animal models developing a very controlled OA and the clinical studies in humans, who develop different OA from one patient to another very uncertain.

In this context, facing the absence of treatment, the development of a gene therapy (GT) platform that can vectorize the appropriate nucleic acids targeting each of the joint tissues as needed appears to be a promising approach. It has recently been considered with a growing interest, with 5 gene therapies for OA currently in clinical trials (**Table 1**). In this manuscript, a comprehensive overview of current gene therapy in OA will be given before discussing the various options for improvements related to the adenoviruses and adeno-associated viruses (AAVs).

Osteoarthritis (OA)

[OA main pathophysiologic characteristics](#)

OA affects joints, such as the knee, hip, shoulder, or hand, continually stressed over years. Recently, OA has been described as a syndrome rather than a single disease driven by

activation of a wide range of underlying pathways, leading to similar outcomes of joint destruction through mechanical, pro-inflammatory, and metabolic factors (Hunter & Bierma-Zeinstra, 2019). The disease is characterized by abnormal remodeling of the whole joint (**Figure 20**) (Loeser et al., 2012). Indeed, although the timing of the onset of the various joint disorders may differ from one patient to another, ultimately, all joint tissues are affected due to their intimate physical and functional association (Martel-Pelletier et al., 2016).

While having been underestimated for long in OA pathogenesis, tendons, menisci, and ligaments appears to be essential to the stability of the whole joint. Therefore, traumatic injuries of these tissues could lead to OA, through destabilization of the entire joint. In post-traumatic OA (PTOA), mechanical dysregulations are key pathogenesis drivers. Nevertheless, these tissues are also affected in OA independently of traumatism, and a better understanding of the underlying molecular mechanisms could lead to the identification of new therapeutic targets (Rai et al., 2019).

The synovial membrane, which has also been underestimated for a long time, is now receiving increased attention. Notably, chronic low-grade inflammation is largely sustained by the synovial membrane and now appears to be a key element in understanding the pathophysiology. Indeed, synovitis could be present in all stages of OA and even before visible cartilage degeneration has occurred, reinforcing the important role of the synovium in the pathogenesis of OA (Mathiessen & Conaghan, 2017). The close topography of the infrapatellar fat pad (IFP), located in the knee joint between the synovium and the joint capsule inferiorly to the patella, and the synovial membrane associated with their possible cross-talk have emerged the idea that these two structures may be considered as a morpho-functional unit (Macchi et al., 2018). And, although the IFP is often omitted from diagrams, this tissue also plays an important role in the pathophysiology of OA. The IFP is rich in adipose tissue which can secrete pro-inflammatory cytokines, adipokines, and growth factors that influence synovitis (Jiang et al., 2019). Like the synovium, the IFP is composed of immune cells, such as macrophages, and fibroblasts favoring cross-talk and enhancement of fibrosis and inflammation in both tissues.

Along with the morpho-functional unit of synovium and IFP, subchondral bone plays an important role in the initiation and progression of OA (Hügle & Geurts, 2017). The subchondral bone in OA undergoes an uncoupled remodeling process, which is notably characterized by

bone marrow lesions, increased vascularity, macrophage infiltration, osteoclast formation, and increased osteoblast activity leading to osteosclerosis (Donell, 2019). Another bony feature of OA is osteophyte formation at the joint margins where new bone is added and may serve to stabilize the joint (Martel-Pelletier et al., 2016).

On the surface of the subchondral bone, articular cartilage is the tissue that initially attracted all the attention. Indeed, articular cartilage loss, first described in OA early in history, in 1741 by J.B. Morgagni (Mimpen & Snelling, 2019), is a macroscopically assessable parameter. The first signs of cartilage damage are surface fibrillation and, as the pathological process continues, deep fissures develop, ultimately leading to cartilage fragments delamination and exposure of calcified cartilage and the underlying bone (Martel-Pelletier et al., 2016). Articular cartilage shows a poor ability for spontaneous healing since it is avascular. Moreover, mature chondrocytes, are essentially non-mitotic and represent no more than 5% of cartilage volume (Huey et al., 2012). During the degradation process, the extracellular matrix undergoes striking changes in its composition and structure, and chondrocyte density decreases in part due to dysregulation in the autophagy and senescence processes (Vinatier et al., 2018). These changes and the poor repair ability of articular cartilage ultimately lead to its unstoppable degradation.

[OA symptoms, diagnosis, management, and translational research](#)

From a clinical perspective, pain is the major OA symptom and cause of health service use (**Figure 20**). The presence and severity of pain are associated with specific features of OA like bone marrow lesions and synovitis (O'Neill & Felson, 2018). Other symptoms can help for clinical diagnoses such as transient morning stiffness, crepitus on joint motion, joint instability (buckling or giving-way), swelling, muscle weakness, bony enlargement, and more generally, fatigue. However, in the early stages of the disease, symptoms are often intermittent, barely detectable, but become more frequent and severe with disease progression. Imaging tools (radiography, arthroscopy, and MRI) can be helpful for diagnosis, but there is a poor association between structural change observed by imaging tools and joint pain (Hunter & Bierma-Zeinstra, 2019). The difficulty of OA early diagnosis finally leads to an almost unavoidable gradual loss of joint function.

The general guidelines for OA management are focused on treating the main symptoms of pain and joint motion (**Figure 20**). The first line of treatments consists of non-pharmacological methods such as weight loss, physical activity, and patient education (Skou & Roos, 2019). If insufficient symptoms improvement is obtained with non-pharmacological approaches, pharmacological treatments using non-steroidal anti-inflammatory drugs could reduce pain and inflammation (Bannuru et al., 2019). Moreover, intra-articular injections of corticosteroids or hyaluronic acid or a combination of both attempt to improve symptoms in patients who have not responded to the classical road for analgesics although their long-term efficacy and safety are still controversial (Pereira et al., 2022; Smith et al., 2019). Finally, joint surgeries such as arthroscopy or osteotomy could delay the ultimate step of joint replacement which is only considered for end-stage OA.

As briefly previously exposed, OA medical care consists of symptoms relief but there is still no drug able to efficiently modify the underlying pathophysiological mechanisms, reduce OA progression, and potentially inhibit the structural damage to prevent or reduce long-term disability with relevant symptomatic relief (Oo et al., 2021). The identification of disease-modifying OA drugs (DMOADs) is an active area of research and 1 835 OA-related clinical studies (clinicaltrials.gov, 09/25/2022) are currently ongoing. Among the various molecules expected to be of clinical value in OA, sprifermin, a recombinant human FGF18 analog, and lorecivivint, a Wnt pathway modulator, (SM04690) are drugs that recently undergo phase II clinical trials. Interestingly, despite encouraging preliminary results highlighting anti-inflammatory effect and cartilage function improvements in rodent animal models (Deshmukh et al., 2018, 2019), dogs and rabbits (Ladel, 2013) these trials highlighted important needs to well stratified patients to re-evaluate drug efficiency (J. Li et al., 2021; Tambiah et al., 2021; Yazici et al., 2020) and thus an important need to develop flexible therapeutic strategies.

« Gene therapy for osteoarthritis » : En préparation

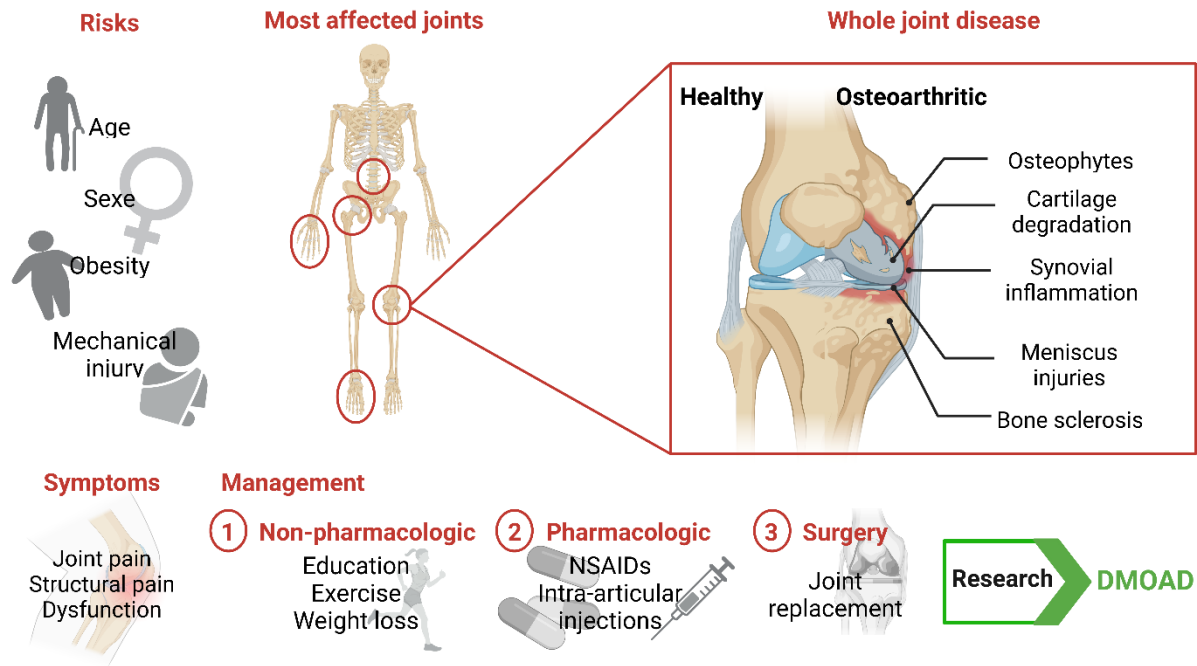


Figure 20 : Overview of osteoarthritis main characteristics. Major OA risk factors are age and obesity. Women and patients with a history of trauma are also more prone to OA. The pathology affects all joints and all joint tissues. The main disabling symptom is pain. For now, only the management of symptoms are available. First, non-pharmacological options are envisaged then, pharmacological ones including non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) as well as intra-articular injections of glucocorticoids and ultimately surgery for replacement of the defective joint. However, a Disease Modifying OA Drug (DMOAD) is still awaited to emerge from research area.

These clinical disappointments associated with sprifermin and lorecivint converge towards an urgent need for personalized medicine, requiring a fine stratification of patients and the consideration of the joint as a whole, with therapies allowing long-term combined actions on various mechanisms and different target tissues. Gene therapies could make this possible, but improvements are still needed, on the one hand, to identify the right element to transfer and on the other hand, to make the vectorization tools as efficient and safe as possible. In this work we will focus mainly on gene therapy tools to highlight current advances and future challenges that will make gene therapy vectors essential for tomorrow's DMOADs.

Gene therapy in OA

[Gene Therapy: Presentation](#)

The GT concept appeared in the early 1970s with the advent of molecular biology (Friedmann & Roblin, 1972). Initially, the goal of GT was to restore an absent or defective gene, but this idea suffers from the lack of a tool that would allow the gene to reach and enter its cellular target without being degraded. Indeed, naked DNA exhibited a 10 minutes half-life after intravenous injection in mice (Kawabata et al., 1995) and, can hardly enter cells due to its negative charge. These intrinsic limitations due to the nature of nucleic acids, highlighted the need for an appropriate delivery vehicle, namely a vector, to efficiently transport and protect the DNA until it reaches and enters the targeted cells in vivo.

The concept of GT has now been extended not only to DNA delivery but also to the delivery of all nucleic acids (cDNA, miRNA, shRNA...) (Maeder & Gersbach, 2016). All these tremendous possibilities have enlarged the field of GT application from monogenic diseases to more complex diseases such as neurological diseases, cardiovascular diseases, or cancer. The various opportunities related to GT have led to a 2-fold increase in the number of clinical trials since the 2000s, as well as to 12 GT currently being approved (**Table 2**). Despite these first successes, GT development faces several issues, such as the specific targeting of cells of interest, the entry and processing in these cells leading to the efficient use of vectorized nucleic acids, and the immune responses which can target the vector or even directly the transferred nucleic acids (transgene) (Balakrishnan & Jayandharan, 2016; Ding et al., 2005). Two types of vectors can be used for GT, viral vectors and synthetic vectors. Viral vectors are based on hijacking the viral machinery, whereas the non-viral or synthetic vectors are engineered from scratch.

First, synthetic vectors consist of chemical-based particles able to encapsulate, protect, and deliver nucleic acids. Two types of synthetic vectors can be distinguished: organic vectors (composed at least of carbon, hydrogen, and oxygen) including cationic polymers and lipid nanoparticles, and inorganic vectors including gold or other metal-based nanoparticles (Watkins et al., 2020; Zu & Gao, 2021). All synthetic vectors share several advantages, they are preserved from a pre-existing immunity due to their non-natural origin, they can package nucleic acids of almost unlimited size, and from an industrial point of view, their large-scale

production is easier than viral vectors (Yin et al., 2014). Despite these advantages, of the 12 approved GTs, only one, Patisiran (Onpattro) (**Table 2**), an organic non-viral vector indicated for hereditary transthyretin amyloidosis, was approved by the Food Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA) in 2018 (Khalil et al., 2020). This unique clinical success is due to the difficulties of these synthetic vectors to reach their target cells and deliver intact nucleic acids. However, this vectorization strategy, boosted by the success of mRNA vaccines enclosed in lipid nanoparticles (Moderna and Pfizer/BioNTech), is growing rapidly and is therefore one of the strategies to be considered in OA.

Regarding viral vectors, thanks to their natural ability to infect cells, they have an important advantage over synthetic vectors. Viruses, from which viral vectors are derived, are organized by family based on several of their characteristics, such as their genome composed of RNA or DNA, both single or double-stranded, and their morphology defined by the capsid surrounding the viral genome, which presents various compositions according to the type of virus, and the existence or not of an envelope around the capsid. These wild-type characteristics can be modified or not to use viruses as GT vectors. For example, while all or part of their viral genome is removed from wild-type viruses to add transgene instead, wild-type capsid and/or envelope are not modified at first glance. Among viruses, lentiviruses, adenoviruses, and AAVs, whose characteristics are summarized in **Table 3**, are the most frequently used to deliver nucleic acid. Briefly, lentiviruses, adenoviruses, and AAVs share a similarity in their ability to infect both dividing and non-dividing cells. However, lentiviruses, which are integrative RNA viruses, differ from adenoviruses and AAVs, which are non-integrative DNA viruses. Although the transgene integration with lentiviruses allows maintenance of its expression even in dividing cells, this is accompanied by an important risk of mutagenesis. However, non-integrative viruses, AAVs, and adenoviruses, while safer from this point of view, suffer from a limited expression in time due to the transgene dilution during cell divisions. Adenoviruses and AAVs diverge in their pathogenicity, indeed adenoviruses are known to induce different diseases, whereas AAVs have never been shown to cause disease in humans. Thus, adenoviruses suffer from higher immunogenicity than AAVs. This makes adenoviruses-based vectors preferentially used for vaccination, as for the SARS-CoV-2 vaccination campaign (AstraZeneca, Vaxzevria). Each viral vector cited here may therefore be adapted to specific needs. For example, lentiviruses are mainly used for CAR T-cell production, AAVs for genetic

diseases, and adenoviruses in an oncolytic context (**Table 2**). As lentivirus, AAVs, and adenoviruses are currently used in OA clinical trials, viral vectors appear to be also of interest for therapeutic development.

Both viral and non-viral vectors are the subject of promising studies in the field of OA, which are presented below.

[Non-viral vectors-based GT in OA](#)

Non-viral vectors can be subdivided into two main categories: organic vectors, and inorganic vectors. Because non-viral vectors have been thoroughly reviewed elsewhere (Uzeliene et al., 2021; P. Wu et al., 2018), we will only discuss here the promising XT-150 GT currently in a clinical trial in OA (NCT04841512) (**Table 1**). XT-150 is a plasmid DNA encoding a variant of human IL-10 (pDNA-hIL-10v), an anti-inflammatory cytokine. Surprisingly, while the use of naked DNA is the least effective method to infect target cells, this strategy exhibited long-lasting relief of allodynia in models of various neuropathic diseases, such as multiple sclerosis. Moreover, a previous study highlighted that the use of D-mannose, as an adjuvant of pDNA-hIL-10v, allows for increased uptake of the naked plasmid by phagocytic cells such as M2-type macrophages. Development of IL-10 transfer into the joint is a more than 20 years story that has gone through Adenoviruses-based vectors (Whalen et al., 1999) and AAV-based vectors before finally reaching the clinic with a plasmid DNA. While this strategy is attractive, particularly for this anti-inflammatory molecule which targets M2-type macrophages, more efficient strategies using organic and inorganic vectors could be considered to carry other transgenes (Zu & Gao, 2021).

[Lentivirus-based GT in OA](#)

The lentiviruses belong to the RNA viruses sub-family, the retroviruses, so named for their unique ability to express retrotranscriptase. Lentiviruses are composed of an 8kb single-strand RNA genome packed in an enveloped capsid of 80 to 120 nm in diameter (**Table 3**). Moreover, lentiviruses allow long-term transgene expression due to their ability to integrate the host genome. However, these integrations can also lead to random mutagenesis, which if occurring in the area of a proto-oncogene or a tumor suppressor, can ultimately lead to tumor development. However, new generations of increasingly safer lentivirus vectors have been developed and led to their use in several authorized treatments (**Table 2**). In addition, all

approved treatments using retroviruses, are ex vivo GT (or cell-mediated GT), i.e. transduction of autologous cell of interest before reimplantation in patient limiting the risk for unknown integration.

Interestingly, among retrovirus-based GT approved; Invossa-K/TissueGene-C (TG-C) was the first approved GT for degenerative joint disease. However, this drug was withdrawn from the market by the Korean FDA in 2019 due to a lack of information regarding the product composition. The current formulation of TG-C seems to consist of a 3:1 ratio of allogenic chondrocytes and irradiated human embryonic kidney cell line GP2-293 transduced with a retroviral vector coding for TGF- β 1. Despite this point to be clarified, a phase III clinical trial evaluating TG-C in patients with OA (Kellgren-Lawrence grade 2-3 and medial joint space narrowing grade 1-2) is ongoing (NCT03203330).

Nevertheless, lentiviruses are widely used as a tool to transfect joint cells in vitro. For pre-clinical studies in small animal models (mice and rats), repetitive injections of lentivirus vectors are required to permit a sufficient expression of the transgene and not easily translatable to the human clinic (M. Li et al., 2021; Liu et al., 2022; Song et al., 2021; Xu et al., 2021; Zhou et al., 2020). In this context, lentivirus vectors are considered an interesting strategy when restricted to cell-mediated GT, and thus could be applied for the repair of osteochondral defects.

[Adenovirus-based GT in OA](#)

Adenoviruses (Ad) are composed of a linear double-strand DNA genome packed in a non-enveloped icosahedral capsid of 60 to 90 nm in diameter. Different serotypes of Ad, as characterized by their capsid composition, exist. The Ad serotype 5 (Ad-5), the most widely used serotype for gene transfer, has a 36kb wild-type genome. Interestingly, its genome remains episomal in the nucleus of host cells, thus avoiding germ-line transmission and insertional carcinogenesis. And, Ad can infect a wide range of dividing and non-dividing mammalian cells (**Table 3**).

Gendicine and Oncorine were the two first Ad-based GT authorized on the market in 2003 and 2006 respectively (**Table 2**). They are indicated in patients with cancer, based on their oncolytic abilities. Indeed, Ad are pathogenic viruses able to trigger strong cellular and humoral immune responses, making Ad-based vectors very interesting for vaccine or as

oncolytic vectors (the infected cells can be rapidly eliminated by cytotoxic T cells (Yang et al., 1994)). In other contexts, such as OA GT, the immune response mediated by Ad-based vector remains the most challenging issue (Burgert et al., 2002), responsible for rapid clearance of infected cells, and a short expression of the transgene, as well as possible immune-drive toxicity (Raper et al., 2003). This issue is solved with the development of different Ad-generations. Indeed, Ad vectors are divided into three generations, depending on the progressive viral gene deletion. The first Ad-generation, only deleted of 8.2kb (Danthinne & Imperiale, 2000), is the one used as vaccine vectors, illustrated by AstraZeneca vaccine developed during the SARS-CoV2 widespread. The second Ad-generation is depleted of 14kb (Curiel, 2016) and has been surpassed by the third generation also named helper-dependent adenoviruses (HD-Ad), which is depleted of all its viral genome except a small part needed for genome replication and packaging (Barry et al., 2020). The latter, in addition to being the less immunogenic Ad vector (Brunetti-Pierri & Ng, 2016), allows transport of 36kb transgenes, opening up GT not only to short nucleic fragments but also to long sequences that may contain several genes (Crenshaw et al., 2019). Moreover, HD-Ads have been shown to permit a long-term transgene expression (> 1 year) in different animal models (Brunetti-Pierri & Ng, 2011; Toietta et al., 2005). It is therefore this third generation of Ad that is of interest for OA. However, HD-Ad production requires a helper virus expressing adenoviral genes, which complicates the purification of HD-Ad and has long slowed its use in clinics (Schwartz et al., 2022). Different efficient production strategies are currently developed (Phillips et al., 2022) leading to HD-Ad evaluation in various clinical trials. Among HD-Ad in clinical trials, Flexion Therapeutics, Inc. has developed an HD-Ad-based GT for patients with knee OA, FX-201 (**Table 1**). FX201 coding for IL-1Ra is currently in phase I clinical trial (NCT04119687). Previous pre-clinical evaluations of HD-Ad-IL-1Ra in mice, rats, and equine models of OA exhibited no adverse events, good tolerability, joint function improvement, and protection from severe OA-induced pain (**Table 4**) (Senter et al., 2022, Nixon et al., 2018).

As discussed previously, the large transgene packaging capacity of HD-Ad can also be advantageous to package more than one gene. Stone A. *et al.*, used HD-Ad coding for Prg4 or IL-1Ra alone or in combination, and showed a greater efficiency of the combinatorial treatment compared to the single HD-Ad injection (Stone et al., 2019) (**Table 4**). Very interestingly, both genes are not under the same promoter, Prg4 expression is driven by the

constitutively active elongation factor 1 (EF-1) promoter, whereas IL-1Ra is driven by an inducible NF- κ B promoter, allowing its expression only under an inflammatory stimulus. If FX201 phase I clinical trial results exhibit good tolerability and safety, this would open up a promising avenue for the development of HD-Ad that will package two or more genes coding for therapeutic molecules.

However, there is still one downside, because although HD-Ad is the least immunogenic of the Ad-based vectors, humans naturally develop antibodies that neutralize these viruses. Thus, most of humans expressed antibodies directed against Ad, among which Ad-5. These antibodies can not only limit gene transfer but also causes inflammation reactions that are undesirable in OA. To address this antigenic issue, different capsid modifications can reduce or even abolish its recognition by pre-existing neutralizing antibodies (Croyle et al., 2005; O’Riordan et al., 2004). Some of the most promising strategies to impair neutralization and improve transduction specificity will be discussed in the last part of this section.

[Adeno-Associated Viruses \(AAVs\)-based GT in OA](#)

AAVs are composed of a 20-25 nm diameter non-enveloped icosahedral capsid, which contains a single-stranded DNA genome of ~4.7kb composed of three open-reading frames, *rep*, *cap*, and *AAP*, respectively required for replication, capsid protein production, and capsid assembly. These three open-reading frames are flanked by inverted terminal repeats (ITRs), which are essential for replication and genome packaging into the capsid. *Cap* sequence defines proteins that composed AAV capsid and thus, the serotype of each AAV. The different AAV serotypes differ in their cellular tropism and pre-existing immunity to each of them (**Table 5**). Pre-existing immunity is reflected in the presence of neutralizing antibodies that may be found in the synovial fluid of patients. Thus, for GT, the choice of the appropriate AAV serotype is critical. Moreover, in GT, recombinant AAVs (rAAVs) are depleted of all the viral sequences, except for the ITRs, which are thus replaced by nucleic acids of interest.

The use of rAAVs for GT has several advantages. They are non-pathogenic and transgenes delivered by rAAVs persist in an episomal form that reduces the risk of insertional mutagenesis, allowing them to maintain long-term expression. In addition, rAAVs can target both dividing and non-dividing cells. These various advantages have made rAAVs a popular

tool for GT development in OA, leading to 3 ongoing or recently completed clinical trials (**Table 1**).

The first clinical trial concerns ART-I02, a rAAV2/5-based vector carrying a transgene encoding IFN- β driven by an element of the NF- κ B promoter. The rAAV2/5 corresponds to the serotype 5 AAV capsid with serotype 2 ITR sequences. The serotype 5 capsid was chosen due to its preferential tropism for synovial cells compared to other serotypes (Aalbers et al., 2015). IFN- β is an immunomodulatory cytokine able to reduce the production of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 which are cytokines involved in OA. Thus, ART-I02 was evaluated in patients with hand inflammation diagnosed with rheumatoid arthritis or OA. Pre-clinical studies in rats (Aalbers et al., 2015) and rhesus monkeys (Bevaart et al., 2015) have shown that intra-articular injection of ART-I02 was well tolerated and no adverse events were reported. However, despite promising pre-clinical results, the phase I/II clinical trial has highlighted insufficient safety and tolerability to pursue clinical trials (Vrouwe et al., 2022b).

The second clinical trial involves ICM-203, a rAAV2.5-based vector carrying a transgene coding for NKX-3.2 also named Bapx1. Serotype 2.5, different from 2/5 previously described, is a hybrid serotype engineered to address various GT issues, such as the limited transgene expression, notably due to neutralizing antibodies and the specific tropism. In this context, AAV-2.5 was designed to enhance cartilage targeting. Indeed, NKX-3.2 is a key player in the early stages of chondrocyte development (Minsun Park et al., 2007), but its expression decreases during chondrocyte maturation (Provot et al., 2006) and in the cartilage of OA patients (Caron et al., 2015). Nkx-3.2 is able to promote early chondrogenic differentiation, support chondrocyte survival, and inhibit chondrocyte hypertrophy, at least through Runx2 inhibition (Provot et al., 2006). Maintaining its expression then slows the development of OA in mice pre-clinical models (Oh et al., 2021; M. Park et al., 2021).

Finally, similarly to the Ad-based GT under evaluation, FX-201, an AAV-based vector carrying IL-1Ra is currently in phase I clinical trial (NCT02790723). Interestingly, this GT is based on a self-complementary rAAV (scAAV), which differs from a classical rAAV by the composition of its genome, which instead of being single-stranded, is already double-stranded. Self-complementary AAV permits skipping the DNA replication require for transgene expression in host cells. This strategy will also be further discussed in the next part of this review. Interestingly, this clinical trial in parallel with the FX-201 trial will allow comparing the results

of the same transgene delivered to OA patients in a very similar pathological context with the two most promising viral vectors.

These three clinical trials open a route to further development of GT therapeutics in OA.

What enhancements can be made to viral vector-based GTs for application to OA?

As described above, despite promising development, viral vectors, among which the most promising in OA are Ad- and AAV-based vectors, still suffer from two main limitations: the host immune response and the optimum tissue-specific transgene persistent expression (**Figure 21**). Although intra-articular injections are widely preferred to enhance joint cell transduction, entry into the joint target cell of interest can be complicated. Indeed, some cells such as synovial cells, ligament cells or even fat pad cells are more accessible than chondrocytes embedded in a dense extra-cellular matrix (ECM), thus, specifically drive the viral vector to the target cell of interest is a real challenge. Moreover, intracellular trafficking impairments could decrease viral vector transduction efficiency. To address these issues, modifying the capsids or optimizing the carried nucleic sequence, have been contemplated with growing interest.

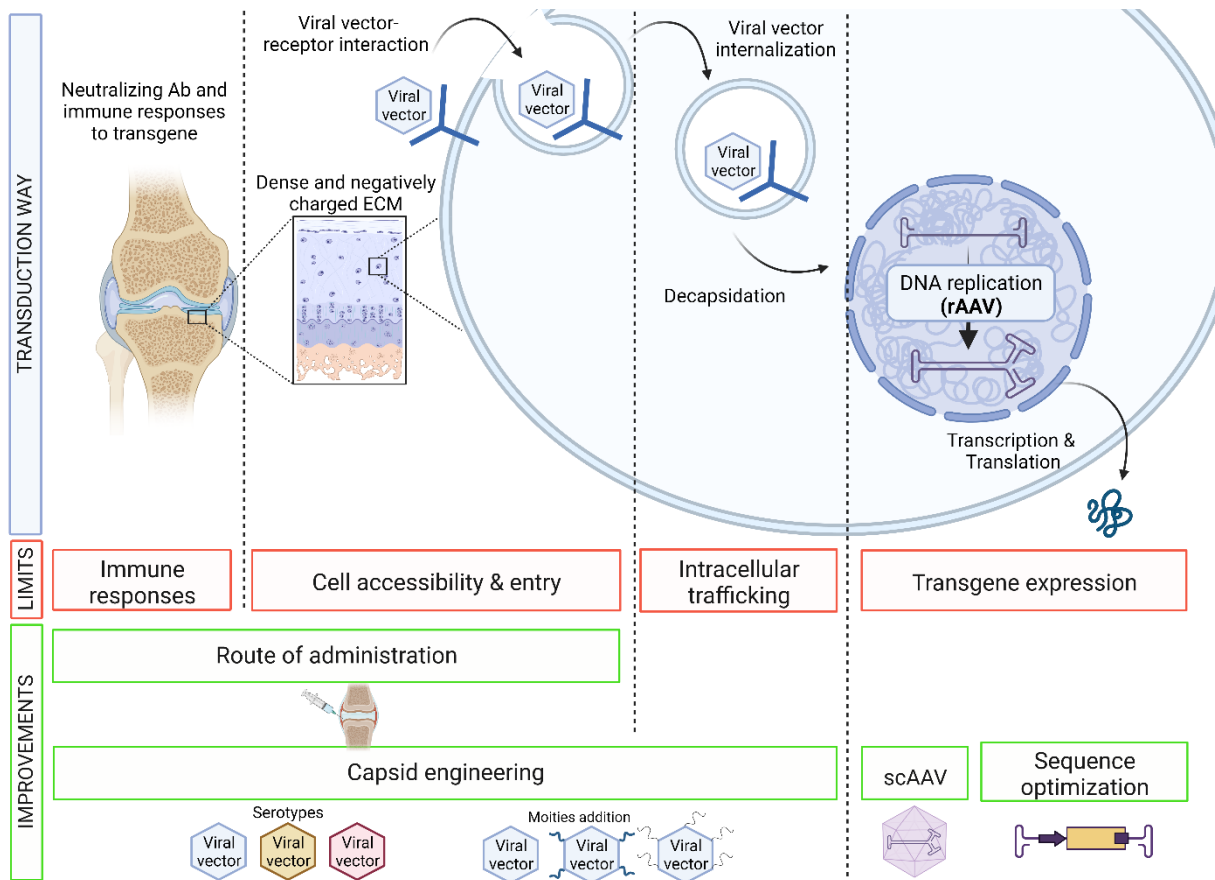


Figure 21 : Limitations and improvements to enhance viral vector transduction. To be efficiently used by targeted cells the transgene first has a long route to completion inside its vector. The viral vector must evade neutralizing antibodies, find the cells even if they are embedded in a dense extracellular matrix (ECM), penetrate them until it decapsids and finally release the transgene. To finish, transgene must be processed by the cell for DNA replication (for the particular example of rAAV) to translation. All steps of this journey could limit viral vector transduction. To improve it, intra-articular injection of the vector with the appropriate capsid and transgene should be considered.

Capsid modifications

As illustrated with AAV, capsid, which defines serotypes, is responsible for the natural ability of viruses to preferentially target a cell type rather than another (**Table 5**). Indeed, capsids are the first element in contact with the targeted tissues/cells and the determining element of the intracellular trafficking efficiency. In addition to promoting tropism, surface capsid proteins of Ads or AAVs can be recognized by neutralizing antibodies. These neutralizing antibodies are also of concern in the context of intra-articular injections because they are not only found in the circulation but also in the synovial fluid (Adriaansen et al., 2005). This is why patients included in clinical trials are screened for their pre-existing neutralizing antibodies. Thus, to

dedicate a GT to as many patients as possible, it will be interesting to develop vectors for which neutralizing antibodies don't pre-exist. In this context, capsids naturally appear as targets of choice to improve viral vector-based GT.

AAV capsids

Considering rAAV, some variable regions coding for surface capsid proteins are responsible for specific interaction with targeted cells through membrane receptors (**Table 5**) that are needed for rAAV internalization, rAAV intracellular processing (Rossi et al., 2019), and the subsequent transgene expression (Tseng & Agbandje-McKenna, 2014). These regions are the main targets of rAAV capsid modifications, directed evolution and rational design are the main technological strategies used to modify rAAV capsid (C. Li & Samulski, 2020; Tabebordbar et al., 2021). Briefly, directed evolution allows, from a functional capsid protein, the creation of new proteins with improved functions through repeated cycles of mutation-selection. Through this technique, several improved pseudoserotype or hybrid serotypes have yet emerged. Among them, rAAV DJ has already been successfully used in a pre-clinical rat model of OA (Martinez-Redondo et al., 2020). This pseudoserotype is mainly composed of some AAV2, AAV8, and AAV9 capsid sequences (Tseng & Agbandje-McKenna, 2014). Initially, rAAV-DJ was selected for its improved transduction efficiency in different cell types in vitro (Grimm et al., 2008). Grimm et al. notably showed that this improvement may be due to enhanced intracellular trafficking, which could explain its high transduction efficiency in many cell types. Another hybrid serotype of interest in OA, is rAAV2.5 used in the ICM-203 clinical trial (**Table 1**). rAAV-2.5 is a chimera of AAV 1 and AAV2 in which 5 amino acids of AAV 1 substitute 5 others of AAV 2 to exhibit AAV 2 affinity with heparan sulfate and to evade the immune response against AAV 2. This hybrid serotype was rationally designed to develop a GT directed against Duchenne muscular dystrophy and appeared safe and well tolerated without cellular immune response detected against the AAV2.5 capsid during a phase I clinical trial (Bowles et al., 2012). In this hopeful context, rAAV 2.5 carrying an IL-1Ra transgene has also been evaluated in preclinical models of equine OA, highlighting no adverse events, a reduced joint lameness, as well as an improved repair of the damaged bone, and a protection of the adjacent cartilage (Watson Levings, Broome, et al., 2018).

The variable regions of the rAAV capsid can also be the target of genetic modifications (Büning & Srivastava, 2019). As proposed by Müller O et al., inserting a suitable peptide sequence selected from a random peptide library in AAV sequence can improve cell-type specific targeting (Müller et al., 2003). Although to our knowledge, this design approach has not yet been evaluated in OA, Eichhoff et al. designed an rAAV able to preferentially target cells overexpressing the P2X₇ purinergic receptor (P2X₇R) (Eichhoff et al., 2019) as described in OA chondrocytes compared to healthy chondrocytes (W. Zhang et al., 2018). In addition to this example, rAAV capsids could be genetically modified to specifically target receptors overexpressed by OA joint cells such as the cannabinoid receptors (Dunn et al., 2016) or ROR2 (Thorup et al., n.d.) in chondrocytes. Other genetic modification strategies adding stimulus-dependent motifs that can activate or deactivate the ability of rAAV to interact with the target cell may also be of interest to specifically target OA joint cells. For example, given the significant secretion of MMPs during OA, the addition of MMP cleavable moieties as tetra-aspartic peptides to the rAAV capsid, could allow a better control of the infection timing and specificity of targeted cells (Judd et al., 2014).

Finally, rAAV capsid could also be chemically modified, avoiding tricky AAV genome manipulations. Due to their high chemical reactivity, lysines that are highly exposed at the surface of rAAV capsid (>300 moieties), are a relevant target for the chemical engineering of rAAV capsids (Mével et al., 2020). This allows a wide range of chemical compounds to be coupled to the rAAV capsids: from the chemotherapy drug paclitaxel (Wei et al., 2012) to ligands such as N-acetylgalactosamine (Mével et al., 2020). In addition to allowing more specific addressing, this strategy also prevents rAAV recognition by neutralizing antibodies. In the same way, as suggested previously with genetic modifications, chemically added peptides may target proteins overexpressed in OA joint cells compared to healthy ones. Peptides specifically designed to enhance targeting of cells of interest, such as Chondrocyte-Affinity-Peptide (CAP) discovered by phage display (Cheung et al., 2013) and designed to target chondrocytes, could enhance the targeting of chondrocytes by rAAVs. Previous in vitro data highlighted the potential of this peptide (Chongchai et al., 2021), however recent in vivo trials in our team have not been as convincing (unpublished data). Our example illustrates the limitation of modifying rAAV capsids which have many functions that these different modifications can rapidly compromise.

Ad capsids

Ad capsid is composed of a total of 252 proteins divided into three protein types: hexons, penton, and fibers (reviewed in Lee et al., 2017) (**Figure 22**). Like the variable regions for rAAV capsids, both pentons and fibers contribute to the interaction of Ad with cellular receptors and the internalization of Ad for further transgene processing, whereas the outer surface of hexons is the primary target of neutralizing antibodies. For over 20 years, PEGylation strategies (addition of Polyethylene Glycol – PEG – moieties) of Ad capsid have been developed. Various sizes of PEG and different covalent attachment strategies have been tested in various contexts, allowing to limit off-target effects as well as escaping from neutralizing antibodies (Croyle et al., 2005; De Geest et al., 2005; Mok et al., 2005; O’Riordan et al., 2004; Prill et al., 2005). Other polymers such as poly-*N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) have also been widely used to overcome the undesirable properties of Ad (Klionsky et al., 2021). To our knowledge, these Ad modifications have not been evaluated in the context of OA or joint diseases, but it would be interesting, to effectively escape from neutralizing antibodies present in synovial fluid and compare the transduction efficiency of modified or unmodified HD-Ad after intra-articular injections. In addition to the chemical addition of fragments, genetic manipulation of capsid sequences is also currently used. The most promising genetic manipulation consists of the generation of chimeric Ad by replacing the fiber domains with their homolog from other serotypes (Weklak et al., 2021). As for rAAV pseudoserotype, this chimeric Ad has acquired a new tropism and can escape neutralizing antibodies directed against the parental Ad serotype. The peptide could also be genetically included in the fiber end to enhance gene transfer into the targeted cells (H. Wu et al., 2002). These strategies, closely related to those previously described in rAAV, have not yet been evaluated in OA joint cells, but modifications similar to those proposed for rAAV could be considered.

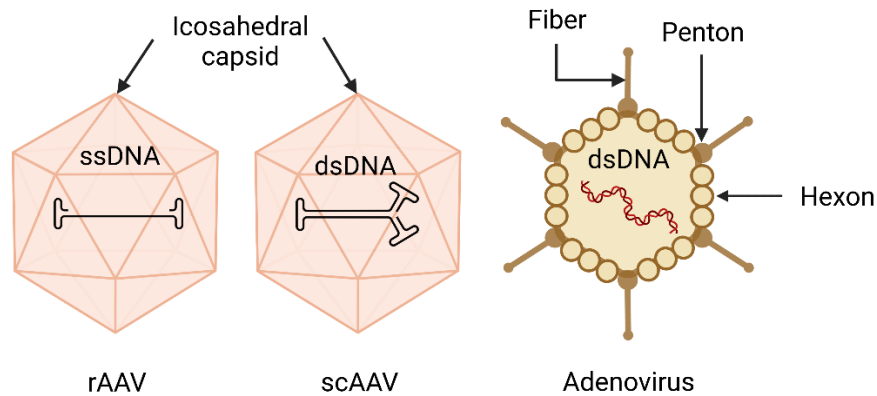


Figure 22 : Schematic representation of the currently most promising viral vectors for OA GT. Capsid and genome representations of AAVs and Ads highlighting differences in the single-stranded DNA (ssDNA) genome of recombinant AAV (rAAV) and in the double-stranded DNA (dsDNA) genome of self-complementary AAV (scAAV).

Transgene optimization

Transgene engineering should also be considered to improve the final steps of the transduction process (**Figure 21**). Indeed, considering a transgene leading to a therapeutic protein, it is necessary to choose the appropriate transgene units. First, depending of the desired effect, different types of promoters can be used, either inducible promoters or ubiquitous promoters. Then, the addition of regulatory sequences such as the Kozak sequence and the appropriate design of cDNA sequences for optimal transduction and translation (species-specific coding mRNA, codon optimization for example) should also be considered. Finally, it is also possible to adapt the termination site depending of the viral packaging capacity. As illustrated in OA, an inflammation-sensitive promoter such as NF- κ B promoter used in the ART-I02 clinical trial could be considered when the transgene of interest is an anti-inflammatory molecule. If a ubiquitous promoter is chosen, preliminary studies for evaluating several promoters are important, because from one ubiquitous promoter to another, transgene expression can vary from simple to double depending on cell type. For example, IL-1Ra with chicken β -actin hybrid (CBh) promoter compared to cytomegalovirus (CMV) promoter can induce similar IL-1Ra concentration in chondrocytes but about 10 000 pg/mL for CBh against 24 000 pg/mL for CMV in synoviocytes (Goodrich et al., 2013).

Among the final steps of the transduction process, AAVs have a disadvantage compared to Ads. Indeed, AAVs have a single-stranded genome that must be replicated before transgene expression can occur. The use of self-complementary AAV (scAAV), composed of a double-stranded DNA genome allows for bypassing this step (**Figure 22**). As illustrated, scAAVs have

been widely used to transduce chondrocytes in which the DNA replication machinery may not be very active due their very low proliferation rate (Watson Levings, Smith, et al., 2018; Watson et al., 2013). If the desired target is chondrocytes and the transgene is short enough, then scAAVs seem more suitable. Indeed, the maximum size of the nucleic acid sequence that can be packaged with scAAVs is limited to 2.2kb, about half of what an rAAV allows, which limits their use to short cDNA sequences, siRNA or even miRNA. Thus, in addition to the viral vector used, particular attention must be paid to the sequence to be transferred.

Conclusion

This review outlines the many possibilities that exist around OA gene therapy. Among viral vectors, Ad and AAV appear to be the most promising. However, as illustrated by the increasing number of clinical trials aimed at developing therapeutics based on rAAV-based vectors rather than Ad, the rAAV was previously the vector of choice in a setting where inflammation may be deleterious and long-term expression of the transgene is required after a single injection. Nevertheless, the significant progress made with Ad-based vectors is leading the scientific community to reconsider their use, particularly in cases where the transgene to be delivered is long and cannot be carried by an AAV-based vector. In the future, to continue to improve the Ad-based vector for OA GT, it will be very interesting to transpose the knowledge acquired on the modifications in rAAV for OA to Ads. However, improvements in both Ad and AAV are still needed as illustrated by the recent disappointing tolerability results of ART-I02 (Vrouwe et al., 2022a).

A very promising path not addressed in this review would be to encapsulate viral vectors in biocompatible materials that can be finely tuned. This biomaterial-mediated GT takes advantage of the significant knowledge of biocompatible materials already widely used for cartilage regeneration. This strategy improves transduction efficiency, increases the stability of transgene expression, and permits to escape from neutralizing antibodies (for review see (Balakrishnan & David, 2019)). In OA and cartilage repair contexts Cucchiari et al. have successfully used this strategy to improve transgene delivery in several studies (Maihöfer et al., 2021; Rey-Rico et al., 2017, 2018), including a proof of concept study in a large animal model (adult sheep) that had raised hopes for future clinical successes (Lange et al., 2021).

« Gene therapy for osteoarthritis » : En préparation

The range of possibilities for improvement of already promising GT tools in OA suggests great future clinical successes.

Tables

Drug name	GT vector	Transgene	Clinical trial phase	Route of administration	Enrolled patients	Primary outcomes evaluated	ClinicalTrials.gov identifier
XT-150	Naked plasmid	CAG-hIL-10v	II	Knee injection	Painful knee OA (KL 2-3, WOMAC \geq 8)	KOOS and WOMAC	NCT04124042
TissueGene-C	Lentivirus	TGF- β 1	III	Knee injection	Knee OA (KL 2-3, Osteoarthritis research society international medial JSN 1-2)	WOMAC, Knee pain assessed by VAS	NCT03203330
ART-102	AAV2/5	NF-kBprom-IFN β	I/II	Hand joints injection	Inflammatory hand arthritis (RA or OA diagnosis)	Adverse events	NCT02727764
ICM-203	AAV2.5	NKX-3.2 (also named Bapx1)	I/IIa	Knee injection	Knee OA (KL 2-3)	Adverse events, Knee pain and function, Articular cartilage grade, JSW	NCT05454566
sc-rAAV2.5IL-1Ra	AAV2/5	IL-1Ra	I	Knee injection	Knee OA (moderate)	Adverse events	NCT02790723
FX-201	HD-Adenovirus	IL-1Ra	I	Knee injection	Knee OA (KL 2-4)	Adverse events	NCT04119687

Table 1 : Summary of clinical trials related to gene therapy for OA. CAG : Cytomegalovirus early enhancer/chicken β -actin, KOOS : Knee injury and osteoarthritis outcome Score, WOMAC : Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index, KL : Kellgren-Lawrence, RA : Rheumatoid arthritis, OA : Osteoarthritis, JSW : Joint space width, JSN : Joint space narrowing, VAS : Visual analog scale

« Gene therapy for osteoarthritis » : En préparation

Table 2 : Summary gene therapies authorized on the market. EMA : European medicine agency, FDA : Food drug and administration, GT : gene therapy

	Trade name (Proper name)	Disease targeted	Year of market approval	Health authorities
Non Viral vectors				
In vivo GT	Patisiran (Onpattro)	Hereditary transthyretin-mediated amyloidosis	2018	FDA/EMA
Retroviruses (Lentiviruses)				
Ex vivo GT	Zalmoxis (onasemnogene abeparvovec-xioi)	Adjunctive treatment in haploidentical haematopoietic stem cell transplantation with high-risk haematological malignancies	2016 – 2019 (withdrawn)	EMA
	Strimvelis (GSK2696273)	Severe Combined Immunodeficiency due to Adenosine Deaminase deficiency	2016	EMA
	Invossa-K/TissueGene-C (Tonogenchoncel-L)	Osteoarthritis/Cartilage defect	2017-2019	Korea FDA
	Kymriah (tisagenlecleucel)	B-cell acute lymphoblastic leukaemia or Diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma	2018	EMA et FDA
	Yescarta (axicabtagene ciloleucel)	Lymphoma	2018	EMA et FDA
	Tecartus (Brexucabtagene autoleucel)	Mantle cell lymphoma; Acute lymphoblastic leukemia	2020	FDA

« Gene therapy for osteoarthritis » : En préparation

	Abecma (Idecabtagene vicleucel)	Multiple Myeloma	2021	FDA et EMA
	Breyanzi (Lisocabtagene maraleucel)	Diffuse large B-cell lymphoma; Primary mediastinal large B-cell lymphoma; Follicular lymphoma grade 3B	2022	EMA et FDA
	Carvykti (Ciltacabtagene autoleucel)	Multiple Myeloma	2022	EMA et FDA
HSV-1				
In vivo GT	Imlygic (Talimogene laherparepvec)	Melanoma	2021	FDA/EMA
Adenovirus				
In vivo GT	Gendicine	Head & neck squamous cell carcinoma	2003	Chinese FDA
	Oncorine	Nasopharyngeal carcinoma	2006	Chinese FDA
AAV				
In vivo GT	Glybera (alipogenic tiparvovec)	Familial lipoprotein lipase deficiency	2012 – 2017 (lack of demand)	EMA
	Luxturna (voretigene neparvovec)	Leber's congenital amaurosis	2017	FDA/EMA
	Zolgensma (onasemnogene abeparvovec)	Spinal muscular atrophy (type 1) in children (< 2 years old)	2019/2020	FDA/EMA

« Gene therapy for osteoarthritis » : En préparation

Table 3 : Features of viral vectors

	Lentivirus	Adenovirus	AAV
Virus coat	Enveloped capsid	Non-enveloped icosahedral capsid	Non-enveloped icosahedral capsid
Virus diameter	80-120 nm	60-90 nm	20-25 nm
Viral genome	ssRNA	dsDNA	ssDNA
Viral genome size	8 kb	36 kb	4.7 kb
Immunogenicity	Low	High	Very low
Target cells	Dividing or not	Dividing or not	Dividing or not
Transduction efficiency	Moderate	High	Moderate
Transgene process	Integrative	Non-integrative (episomal)	Non-integrative (episomal)
Advantage	Long transgene expression	Low to no risk of mutagenesis	No human disease associated to AAV
Disadvantage	Risk of mutagenesis	High immunogenicity	Low packaging capacity

« Gene therapy for osteoarthritis » : En préparation

Table 4 : Pre-clinical studies evaluating HD-Ad efficiency in OA animal models. Vp : viral particles DMM : destabilization of the medial meniscus, CLT : Cruciate ligament transection, ACLT : Anterior cruciate ligament transection, gc : genome copies

Animal (OA induction)	Transgene	Promoter	Injected particles	Age at the time of surgery	Injection time (relative to surgery)	End time point of outcome measurements	Outcomes
Mice (CLT)	Prg4	?	1E8 vp or 1E9 vp	8 week-old	2 days before (preventive) or 2 weeks after-surgery (curative)	4 weeks post-surgery (preventive or 8 weeks post-surgery (curative)	Preventive treatment: no dose-effect, decrease in OARSI score, Curative treatment: dose-effect, decrease of OARSI score with the higher dose
Mice (CLT)	murine IL-1Ra	NF-kB endothelial leukocyte adhesion molecule	1E8 vp	8 or 12 week-old	2 days after surgery	6 weeks post-surgery	OARSI score improvement, cartilage volume improvement, no synovitis score change, protect to thermal hyperalgesia
Rats (ACLT)	rat IL-1Ra	NF-kB endothelial leukocyte adhesion molecule	3.6E7 gc or 3.1E8 gc	8-9 week-old	7 days after surgery	12 weeks post-surgery	Dose-dependent mitigation of OA-like changes of cartilage, bone

« Gene therapy for osteoarthritis » : En préparation

							and synovial membral
Rats (ACLT)	rat IL-1Ra or human IL-1Ra (FX201)	NF-kB endothelial leukocyte adhesion molecule	rat: 3.2E8 gc or 3.1E9 gc or 4.3E10 gc / human: 4.1E10 gc	8-9 week- old	28 days after surgery	36, 57, 120 days post-surgery	Biodistribution: FX201 remains locally, low copy number detected in spleen, liver, lung, lymph nodes and well tolerability throughout the study
Horses (osteocondral fragmentation)	equine IL-1Ra	NF-kB endothelial leukocyte adhesion molecule	2E11 vp (low dose) or 2E12 vp (high dose)	3-6 year- old	5 days after surgery	72 days	No local adverse events after injection, good tolerability, joint mobility improvement, better cartilage status
Mice (DMM and CLT)	Prg4 and IL- 1Ra	Elongation factor-1 (driven Prg4) and inflammation sensitive NF-kB promoter (driven IL-1Ra)	1E8 vp of each HD-Ad	8 week-old	2 weeks after surgery	2.5 or 3.5 months after surgery	Combinatorial injection of HD- Ad-IL-1Ra and HD- Ad-Prg4 provides higher benefit on pain and cartilage degradation

« Gene therapy for osteoarthritis » : En préparation

Table 5 : AAV serotypes, their preferential tropism and their described receptor to be process.

AAV serotypes	Preferential targeted cells	Known receptor interactions	References
AAV 1	Skeletal muscle, Central Nervous Sytem (CNS)	α -2,3- and α -2,6-N-linked sialic acids	(Z. Wu et al., 2006; R. Zhang et al., 2019)
AAV 2	Kidney	Heparan sulfate proteoglycan, hepatocyte growth factor, fibroblast growth factor receptor 1, integrin α V β 5/ α 5 β 1	(Summerford & Samulski, 1998)
AAV 3	Liver	Heparan sulfate proteoglycan, hepatocyte growth factor receptor	(Ling et al., 2010)
AAV 4	CNS	α -2,3-O-linked sialic acid	(Kaludov et al., 2001)
AAV 5	CNS	α -2,3-N-linked sialic acid	(Kaludov et al., 2001)
AAV 6	Skeletal muscle	α -2,3- and α -2,6-N-linked sialic acids	(Z. Wu et al., 2006)
AAV 7	Skeletal muscle	?	
AAV 8	Liver, Skeletal muscle, Pancreas, Heart	?	
AAV 9	Liver, Skeletal muscle, Lung	?	

- Aalbers, C. J., Bevaart, L., Loiler, S., De Cortie, K., Wright, J. F., Mingozi, F., Tak, P. P., & Vervoordeldonk, M. J. (2015). Preclinical Potency and Biodistribution Studies of an AAV 5 Vector Expressing Human Interferon- β (ART-I02) for Local Treatment of Patients with Rheumatoid Arthritis. *PLoS One*, *10*(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0130612>
- Adriaansen, J., Tas, S., Klarenbeek, P., Bakker, A., Apparailly, F., Firestein, G., Jorgensen, C., Vervoordeldonk, M., & Tak, P. (2005). Enhanced gene transfer to arthritic joints using adeno-associated virus type 5: implications for intra-articular gene therapy. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *64*(12), 1677–1684. <https://doi.org/10.1136/ard.2004.035063>
- Balakrishnan, B., & David, E. (2019). Biopolymers augment viral vectors based gene delivery. *Journal of Biosciences*, *44*(4), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9905-3>
- Balakrishnan, B., & Jayandharan, G. R. (2016). Intracellular Trafficking of AAV5 Vectors. *Human Gene Therapy Methods*, *27*(2), 47–48. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2016.020>
- Bannuru, R. R., Osani, M. C., Vaysbrot, E. E., Arden, N. K., Bennell, K., Bierma-Zeinstra, S. M. A., Kraus, V. B., Lohmander, L. S., Abbott, J. H., Bhandari, M., Blanco, F. J., Espinosa, R., Haugen, I. K., Lin, J., Mandl, L. A., Moilanen, E., Nakamura, N., Snyder-Mackler, L., Trojian, T., ... McAlindon, T. E. (2019). OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, *27*(11), 1578–1589. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.06.011>
- Barry, M. A., Rubin, J. D., & Lu, S. (2020). Retargeting adenoviruses for therapeutic applications and vaccines. *FEBS Letters*, 1873-3468.13731. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13731>
- Bevaart, L., Aalbers, C. J., Vierboom, M. P. M., Broekstra, N., Kondova, I., Breedveld, E., Hauck, B., Wright, J. F., Tak, P. P., & Vervoordeldonk, M. J. (2015). Safety, Biodistribution, and Efficacy of an AAV-5 Vector Encoding Human Interferon-Beta (ART-I02) Delivered via Intra-Articular Injection in Rhesus Monkeys with Collagen-Induced Arthritis. *Human Gene Therapy. Clinical Development*, *26*(2), 103–112. <https://doi.org/10.1089/HUMC.2015.009>
- Bowles, D. E., McPhee, S. W. J., Li, C., Gray, S. J., Samulski, J. J., Camp, A. S., Li, J., Wang, B., Monahan, P. E., Rabinowitz, J. E., Grieger, J. C., Govindasamy, L., Agbandje-Mckenna, M., Xiao, X., & Samulski, R. J. (2012). Phase 1 Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy Using a Translational Optimized AAV Vector. *Molecular Therapy*, *20*(2), 443–455. <https://doi.org/10.1038/MT.2011.237>
- Brunetti-Pierri, N., & Ng, P. (2011). Helper-dependent adenoviral vectors for liver-directed gene therapy. *Human Molecular Genetics*, *20*(R1), R7. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDR143>
- Brunetti-Pierri, N., & Ng, P. (2016). Helper-Dependent Adenoviral Vectors. In *Adenoviral Vectors for Gene Therapy: Second Edition* (pp. 423–450). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800276-6.00017-6>
- Büning, H., & Srivastava, A. (2019). Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, *12*, 248–265. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.01.008>
- Burgert, H. G., Ruzsics, Z., Obermeier, S., Hilgendorf, A., Windheim, M., & Elsing, A. (2002). Subversion of host defense mechanisms by adenoviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *269*, 273–318. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59421-2_16
- Caron, M. M. J., Emans, P. J., Surtel, D. A. M., Van Der Kraan, P. M., Van Rhijn, L. W., & Welting, T. J. M. (2015). BAPX-1/NKX-3.2 acts as a chondrocyte hypertrophy molecular switch in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, *67*(11), 2944–2956. <https://doi.org/10.1002/ART.39293>

- Cheung, C. S. F., Lui, J. C., & Baron, J. (2013). Identification of chondrocyte-binding peptides by phage display. *Journal of Orthopaedic Research*, 31(7), 1053–1058. <https://doi.org/10.1002/jor.22325>
- Chongchai, A., Waramit, S., Wongwichai, T., Kampangtip, J., Phitak, T., Kongtawelert, P., Hajitou, A., Suwan, K., & Pothacharoen, P. (2021). Targeting human osteoarthritic chondrocytes with ligand directed bacteriophage-based particles. *Viruses*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/V13122343/S1>
- Crenshaw, B. J., Jones, L. B., Bell, C. R., Kumar, S., & Matthews, Q. L. (2019). Perspective on Adenoviruses: Epidemiology, Pathogenicity, and Gene Therapy. *Biomedicines*, 7(3), 61. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7030061>
- 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. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(7), 1323–1330. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204763>
- Croyle, M. A., Le, H. T., Linse, K. D., Cerullo, V., Toietta, G., Beaudet, A., & Pastore, L. (2005). PEGylated helper-dependent adenoviral vectors: highly efficient vectors with an enhanced safety profile. *Gene Therapy*, 12(7), 579–587. <https://doi.org/10.1038/SJ.GT.3302441>
- Curiel, D. T. (2016). Adenoviral Vectors for Gene Therapy: Second Edition. *Adenoviral Vectors for Gene Therapy: Second Edition*, 1–848. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-15164-1>
- Danthinne, X., & Imperiale, M. J. (2000). Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Therapy*, 7(20), 1707–1714. <https://doi.org/10.1038/SJ.GT.3301301>
- De Geest, B., Snoeys, J., Van Linthout, S., Libyens, J., & Collen, D. (2005). Elimination of innate immune responses and liver inflammation by PEGylation of adenoviral vectors and methylprednisolone. *Human Gene Therapy*, 16(12), 1439–1451. <https://doi.org/10.1089/HUM.2005.16.1439>
- Deshmukh, V., Hu, H., Barroga, C., Bossard, C., KC, S., Dellamary, L., Stewart, J., Chiu, K., Ibanez, M., Pedraza, M., Seo, T., Do, L., Cho, S., Cahiwat, J., Tam, B., Tambiah, J. R. S., Hood, J., Lane, N. E., & Yazici, Y. (2018). A small-molecule inhibitor of the Wnt pathway (SM04690) as a potential disease modifying agent for the treatment of osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis and Cartilage*, 26(1), 18–27. <https://doi.org/10.1016/J.JOCA.2017.08.015>
- Deshmukh, V., O'Green, A. L., Bossard, C., Seo, T., Lamangan, L., Ibanez, M., Ghias, A., Lai, C., Do, L., Cho, S., Cahiwat, J., Chiu, K., Pedraza, M., Anderson, S., Harris, R., Dellamary, L., KC, S., Barroga, C., Melchior, B., ... Yazici, Y. (2019). Modulation of the Wnt pathway through inhibition of CLK2 and DYRK1A by lorecivint as a novel, potentially disease-modifying approach for knee osteoarthritis treatment. *Osteoarthritis and Cartilage*, 27(9), 1347–1360. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.05.006>
- Ding, W., Zhang, L., Yan, Z., & Engelhardt, J. F. (2005). Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Therapy*, 12(11), 873. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302527>
- Donell, S. (2019). Subchondral bone remodelling in osteoarthritis. *EFORT Open Reviews*, 4(6), 221–229. <https://doi.org/10.1302/2058-5241.4.180102>
- Dunn, S. L., Wilkinson, J. M., Crawford, A., Bunning, R. A. D., & Le Maitre, C. L. (2016). Expression of Cannabinoid Receptors in Human Osteoarthritic Cartilage: Implications for Future Therapies. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 3–15.

- <https://doi.org/10.1089/can.2015.0001>
- Eichhoff, A. M., Börner, K., Albrecht, B., Schäfer, W., Baum, N., Haag, F., Körbelin, J., Trepel, M., Braren, I., Grimm, D., Adriouch, S., & Koch-Nolte, F. (2019). Nanobody-Enhanced Targeting of AAV Gene Therapy Vectors. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 15, 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.09.003>
- Friedmann, T., & Roblin, R. (1972). Gene therapy for human genetic disease? *Science (New York, N.Y.)*, 175(4025), 949–955. <https://doi.org/10.1126/science.175.4025.949>
- Goodrich, L. R., Phillips, J. N., McIlwraith, C. W., Foti, S. B., Grieger, J. C., Gray, S. J., & Samulski, R. J. (2013). Optimization of scAAVIL-1ra in vitro and in vivo to deliver high levels of therapeutic protein for treatment of osteoarthritis. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2(2), e70. <https://doi.org/10.1038/mtna.2012.61>
- Grimm, D., Lee, J. S., Wang, L., Desai, T., Akache, B., Storm, T. A., & Kay, M. A. (2008). In Vitro and In Vivo Gene Therapy Vector Evolution via Multispecies Interbreeding and Retargeting of Adeno-Associated Viruses. *Journal of Virology*, 82(12), 5887–5911. <https://doi.org/10.1128/jvi.00254-08>
- Huey, D. J., Hu, J. C., & Athanasiou, K. A. (2012). Unlike Bone, Cartilage Regeneration Remains Elusive. *Science*, 338(November), 917–921. <https://doi.org/10.1126/science.1222454>
- Hügler, T., & Geurts, J. (2017). What drives osteoarthritis?-Synovial versus subchondral bone pathology. *Rheumatology*, 56(9), 1461–1471. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew389>
- Hunter, D. J., & Bierma-Zeinstra, S. (2019). Osteoarthritis. *The Lancet*, 393(10182), 1745–1759. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30417-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30417-9)
- Jiang, L.-F., Fang, J.-H., & Wu, L.-D. (2019). Role of infrapatellar fat pad in pathological process of knee osteoarthritis: Future applications in treatment. *World Journal of Clinical Cases*, 7(16), 2134–2142. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v7.i16.2134>
- Judd, J., Ho, M. L., Tiwari, A., Gomez, E. J., Dempsey, C., Van Vliet, K., Igoshin, O. A., Silberg, J. J., Agbandje-Mckenna, M., & Suh, J. (2014). Tunable protease-Activatable virus nanonodes. *ACS Nano*, 8(5), 4740–4746. <https://doi.org/10.1021/nn500550q>
- Kaludov, N., Brown, K. E., Walters, R. W., Zabner, J., & Chiorini, J. A. (2001). Adeno-Associated Virus Serotype 4 (AAV4) and AAV5 Both Require Sialic Acid Binding for Hemagglutination and Efficient Transduction but Differ in Sialic Acid Linkage Specificity. *Journal of Virology*, 75(15), 6884–6893. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.15.6884-6893.2001/ASSET/98D626E2-AB70-44E6-85E1-D34EA8CCAEE1/ASSETS/GRAPHIC/JV1510207005.JPEG>
- Kawabata, K., Takakura, Y., & Hashida, M. (1995). The Fate of Plasmid DNA After Intravenous Injection in Mice: Involvement of Scavenger Receptors in Its Hepatic Uptake. *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 12(6), 825–830. <https://doi.org/10.1023/A:1016248701505>
- Khalil, I. A., Younis, M. A., Kimura, S., & Harashima, H. (2020). Lipid Nanoparticles for Cell-Specific in Vivo Targeted Delivery of Nucleic Acids. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 43(4), 584–595. <https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00743>
- Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M. H., Abudu, Y. P., Acevedo-Arozena, A., Adamopoulos, I. E., Adeli, K., Adolph, T. E., Adornetto, A., Aflaki, E., Agam, G., Agarwal, A., Aggarwal, B. B., Agnello, M., ... Tong, C.-K. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 1–382. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>
- Ladel, C. (2013). SP0089 Pre-Clinical Proof for Dmoad Activity of FGF-18 (Sprifermin). *Annals*

- of the Rheumatic Diseases*, 72(Suppl 3), A21–A21. <https://doi.org/10.1136/ANNRHEUMDIS-2013-EULAR.89>
- Lange, C., Madry, H., Venkatesan, J. K., Schmitt, G., Speicher-Mentges, S., Zurakowski, D., Menger, M. D., Laschke, M. W., & Cucchiari, M. (2021). rAAV-Mediated sox9 Overexpression Improves the Repair of Osteochondral Defects in a Clinically Relevant Large Animal Model Over Time In Vivo and Reduces Perifocal Osteoarthritic Changes. *The American Journal of Sports Medicine*, 49(13), 3696–3707. <https://doi.org/10.1177/03635465211049414>
- Lee, C. S., Bishop, E. S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E. M., Yan, S., Zhao, C., Zeng, Z., Shu, Y., Wu, X., Lei, J., Li, Y., Zhang, W., Yang, C., Wu, K., Wu, Y., Ho, S., Athiviraham, A., Lee, M. J., ... He, T. C. (2017). Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes & Diseases*, 4(2), 43–63. <https://doi.org/10.1016/J.GENDIS.2017.04.001>
- Leifer, V. P., Katz, J. N., & Losina, E. (2022). The burden of OA-health services and economics. *Osteoarthritis and Cartilage*, 30(1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2021.05.007>
- Li, C., & Samulski, R. J. (2020). Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 21, Issue 4, pp. 255–272). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0205-4>
- Li, J., Wang, X., Ruan, G., Zhu, Z., & Ding, C. (2021). Sprifermin: a recombinant human fibroblast growth factor 18 for the treatment of knee osteoarthritis. <https://doi.org/10.1080/13543784.2021.1972970>, 30(9), 923–930. <https://doi.org/10.1080/13543784.2021.1972970>
- Li, M., Xiao, Y. bo, Wang, X. tao, Zhuang, J. peng, & Zhou, C. long. (2021). Proline-Serine–Threonine Phosphatase-Interacting Protein 2 Alleviates Diabetes Mellitus-Osteoarthritis in Rats through Attenuating Synovial Inflammation and Cartilage Injury. *Orthopaedic Surgery*, 13(4), 1398. <https://doi.org/10.1111/OS.13000>
- Ling, C., Lu, Y., Kalsi, J. K., Jayandharan, G. R., Li, B., Ma, W., Cheng, B., Gee, S. W. Y., McGoogan, K. E., Govindasamy, L., Zhong, L., Agbandje-Mckenna, M., & Srivastava, A. (2010). Human Hepatocyte Growth Factor Receptor Is a Cellular Coreceptor for Adeno-Associated Virus Serotype 3. <https://doi.org/10.1089/HUM.2010.075>, 21(12), 1741–1747. <https://doi.org/10.1089/HUM.2010.075>
- Liu, L., Zhao, C., Zhang, H., Lu, Y., Luo, B., Yao, Z., Shao, Y., Zeng, H., Zeng, C., Zhang, R., Fang, H., Pan, J., Bai, X., & Cai, D. (2022). Asporin regulated by miR-26b-5p mediates chondrocyte senescence and exacerbates osteoarthritis progression via TGF-β1/Smad2 pathway. *Rheumatology*, 61(6), 2631–2643. <https://doi.org/10.1093/RHEUMATOLOGY/KEAB725>
- Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R., & Goldring, M. B. (2012). Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis and Rheumatism*, 64(6), 1697–1707. <https://doi.org/10.1002/art.34453>
- Macchi, V., Stocco, E., Stecco, C., Belluzzi, E., Favero, M., Porzionato, A., & De Caro, R. (2018). The infrapatellar fat pad and the synovial membrane: an anatomic-functional unit. *Journal of Anatomy*, 233(2), 146–154. <https://doi.org/10.1111/joa.12820>
- Maeder, M. L., & Gersbach, C. A. (2016). Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Molecular Therapy*, 24(3), 430–446. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.10>
- Maihöfer, J., Madry, H., Rey-Rico, A., Venkatesan, J. K., Goebel, L., Schmitt, G., Speicher-Mentges, S., Cai, X., Meng, W., Zurakowski, D., Menger, M. D., Laschke, M. W., & Cucchiari, M. (2021). Hydrogel-Guided, rAAV-Mediated IGF-I Overexpression Enables

- Long-Term Cartilage Repair and Protection against Perifocal Osteoarthritis in a Large-Animal Full-Thickness Chondral Defect Model at One Year In Vivo. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 33(16). <https://doi.org/10.1002/ADMA.202008451>
- Martel-Pelletier, J., Barr, A. J., Cicuttini, F. M., Conaghan, P. G., Cooper, C., Goldring, M. B., Goldring, S. R., Jones, G., Teichtahl, A. J., & Pelletier, J. P. (2016). Osteoarthritis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.72>
- Martinez-Redondo, P., Guillen-Guillen, I., Davidsohn, N., Wang, C., Prieto, J., Kurita, M., Hatanaka, F., Zhong, C., Hernandez-Benitez, R., Hishida, T., Lezaki, T., Sakamoto, A., Nemeth, A. N., Hishida, Y., Esteban, C. R., Shojima, K., Huang, L., Shokhirev, M., Nuñez-Delicado, E., ... Belmonte, J. C. I. (2020). α KLOTHO and sTGF β R2 treatment counteract the osteoarthritic phenotype developed in a rat model. *Protein and Cell*, 11(3), 219–226. <https://doi.org/10.1007/s13238-019-00685-7>
- Mathiessen, A., & Conaghan, P. G. (2017). Synovitis in osteoarthritis: Current understanding with therapeutic implications. *Arthritis Research and Therapy*, 19(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1229-9>
- Mével, M., Bouzelha, M., Leray, A., Pacouret, S., Guilbaud, M., Penaud-Budloo, M., Alvarez-Dorta, D., Dubreil, L., Gouin, S. G., Combal, J. P., Hommel, M., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Blouin, V., Moullier, P., Adjali, O., Deniaud, D., & Ayuso, E. (2020). Chemical modification of the adeno-associated virus capsid to improve gene delivery. *Chemical Science*, 11(4), 1122–1131. <https://doi.org/10.1039/c9sc04189c>
- Mimpen, J. Y., & Snelling, S. J. B. (2019). Chondroprotective Factors in Osteoarthritis: a Joint Affair. *Current Rheumatology Reports*, 21(8), 41. <https://doi.org/10.1007/s11926-019-0840-y>
- Mok, H., Palmer, D. J., Ng, P., & Barry, M. A. (2005). Evaluation of polyethylene glycol modification of first-generation and helper-dependent adenoviral vectors to reduce innate immune responses. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 11(1), 66–79. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2004.09.015>
- Müller, O. J., Kaul, F., Weitzman, M. D., Pasqualini, R., Arap, W., Kleinschmidt, J. A., & Trepel, M. (2003). Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nature Biotechnology*, 21(9), 1040–1046. <https://doi.org/10.1038/nbt856>
- Nixon, A. J., Grol, M. W., Lang, H. M., Ruan, M. Z. C., Stone, A., Begum, L., Chen, Y., Dawson, B., Gannon, F., Plutizki, S., Lee, B. H. L., & Guse, K. (2018). Disease-Modifying Osteoarthritis Treatment With Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene Therapy in Small and Large Animal Models. *Arthritis and Rheumatology*, 70(11), 1757–1768. <https://doi.org/10.1002/art.40668>
- O'Neill, T. W., & Felson, D. T. (2018). Mechanisms of Osteoarthritis (OA) Pain. *Current Osteoporosis Reports*, 16(5), 611–616. <https://doi.org/10.1007/s11914-018-0477-1>
- O'Neill, T. W., McCabe, P. S., & McBeth, J. (2018). Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*, 32(2), 312–326. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2018.10.007>
- O'Riordan, C. R., Lachapelle, A., Delgado, C., Parkes, V., Wadsworth, S. C., Smith, A. E., & Francis, G. E. (2004). PEGylation of Adenovirus with Retention of Infectivity and Protection from Neutralizing Antibody in Vitro and in Vivo. <https://Home.Liebertpub.Com/Hum>, 10(8), 1349–1358. <https://doi.org/10.1089/10430349950018021>
- Oh, H. K., Park, M., Choi, S. W., Jeong, D. U., Kim, B. J., Kim, J. A., Choi, H. J., Lee, J., Cho, Y.,

- Kim, J. H., Seong, J. K., Choi, B. H., Min, B. H., & Kim, D. W. (2021). Suppression of Osteoarthritis progression by post-natal Induction of Nkx3.2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 571, 188–194. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2021.07.074>
- Oo, W. M., Little, C., Duong, V., & Hunter, D. J. (2021). The Development of Disease-Modifying Therapies for Osteoarthritis (DMOADs): The Evidence to Date. *Drug Design, Development and Therapy*, 15, 2921–2945. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S295224>
- Park, M., Oh, H.-K., Choi, S.-W., & Kim, D.-W. (2021). Amelioration of osteoarthritis severity by compensation of NKX3.2 expression. *Osteoarthritis and Cartilage*, 29(2021), S407. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2021.02.529>
- Park, Minsun, Yong, Y., Choi, S. W., Kim, J. H., Lee, J. E., & Kim, D. W. (2007). Constitutive RelA activation mediated by Nkx3.2 controls chondrocyte viability. *Nature Cell Biology* 2007 9:3, 9(3), 287–298. <https://doi.org/10.1038/ncb1538>
- Pereira, T. V, Jüni, P., Saadat, P., Xing, D., Yao, L., Bobos, P., Agarwal, A., Hincapié, C. A., & Costa, B. R. da. (2022). Viscosupplementation for knee osteoarthritis: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 378, e069722. <https://doi.org/10.1136/BMJ-2022-069722>
- Phillips, S., Ramos, P. V., Veeraraghavan, P., & Young, S. M. (2022). VikAD, a Vika site-specific recombinase-based system for efficient and scalable helper-dependent adenovirus production. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 24, 117. <https://doi.org/10.1016/J.OMTM.2021.12.001>
- Prill, J.-M., Espenlaub, S., Samen, U., Engler, T., Schmidt, E., Vetrini, F., Rosewell, A., Grove, N., Palmer, D., Ng, P., Kochanek, S., & Kreppel, F. (n.d.). Modifications of Adenovirus Hexon Allow for Either Hepatocyte Detargeting or Targeting With Potential Evasion From Kupffer Cells. *Molecular Therapy*, 19, 83–92. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.229>
- Provot, S., Kempf, H., Murtaugh, L. C., Chung, U. Il, Kim, D. W., Chyung, J., Kronenberg, H. M., & Lassar, A. B. (2006). Nkx3.2/Bapx1 acts as a negative regulator of chondrocyte maturation. *Development*, 133(4), 651–662. <https://doi.org/10.1242/DEV.02258>
- Rai, M. F., Brophy, R. H., & Sandell, L. J. (2019). Osteoarthritis following meniscus and ligament injury: insights from translational studies and animal models. *Current Opinion in Rheumatology*, 31(1), 70–79. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000566>
- Raper, S. E., Chirmule, N., Lee, F. S., Wivel, N. A., Bagg, A., Gao, G. P., Wilson, J. M., & Batshaw, M. L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Molecular Genetics and Metabolism*, 80(1–2), 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2003.08.016>
- Rey-Rico, A., Venkatesan, J. K., Schmitt, G., Concheiro, A., Madry, H., Alvarez-Lorenzo, C., & Cucchiari, M. (2017). rAAV-mediated overexpression of TGF- β via vector delivery in polymeric micelles stimulates the biological and reparative activities of human articular chondrocytes in vitro and in a human osteochondral defect model. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 6985–6996. <https://doi.org/10.2147/IJN.S144579>
- Rey-Rico, A., Venkatesan, J. K., Schmitt, G., Speicher-Mentges, S., Madry, H., & Cucchiari, M. (2018). Effective Remodelling of Human Osteoarthritic Cartilage by sox9 Gene Transfer and Overexpression upon Delivery of rAAV Vectors in Polymeric Micelles. *Molecular Pharmaceutics*, 15(7), 2816–2826. <https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.8B00331>
- Rossi, A., Dupaty, L., Aillot, L., Zhang, L., Gallien, C., Hallek, M., Odenthal, M., Adriouch, S., Salvetti, A., & Büning, H. (2019). Vector uncoating limits adeno-associated viral vector-mediated transduction of human dendritic cells and vector immunogenicity. *Scientific*

- Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40071-1>
- Schwartz, J., Havenga, M., Bakker, W., Bradshaw, A., & Nicklin, S. (2022). Adenoviral vectors for cardiovascular gene therapy applications: a clinical and industry perspective. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 100(6), 875. <https://doi.org/10.1007/S00109-022-02208-0>
- Senter, R., Boyce, R., Repic, M., Martin, E. W., Chabicovsky, M., Langevin-Carpentier, G., Bédard, A., & Bodick, N. (2022). Efficacy and Safety of FX201, a Novel Intra-Articular IL-1Ra Gene Therapy for Osteoarthritis Treatment, in a Rat Model. *Human Gene Therapy*, 33(9–10), 541–549. <https://doi.org/10.1089/HUM.2021.131>
- Skou, S. T., & Roos, E. M. (2019). Physical therapy for patients with knee and hip osteoarthritis: supervised, active treatment is current best practice. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 37(5), 112–117.
- Smith, C., Patel, R., Vannabouathong, C., Sales, B., Rabinovich, A., McCormack, R., Belzile, E. L., & Bhandari, M. (2019). Combined intra-articular injection of corticosteroid and hyaluronic acid reduces pain compared to hyaluronic acid alone in the treatment of knee osteoarthritis. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 27(6), 1974–1983. <https://doi.org/10.1007/s00167-018-5071-7>
- Song, Y., Hao, D., Jiang, H., Huang, M., Du, Q., Lin, Y., Liu, F., & Chen, B. (2021). Nrf2 Regulates CHI3L1 to Suppress Inflammation and Improve Post-Traumatic Osteoarthritis. *Journal of Inflammation Research*, 14, 4079. <https://doi.org/10.2147/JIR.S310831>
- Stone, A., Grol, M. W., Ruan, M. Z. C. C., Dawson, B., Chen, Y., Jiang, M.-M. M., Song, I. W., Jayaram, P., Cela, R., Gannon, F., & Lee, B. H. L. L. (2019). Combinatorial Prg4 and Il-1ra Gene Therapy Protects Against Hyperalgesia and Cartilage Degeneration in Post-Traumatic Osteoarthritis. *Human Gene Therapy*, 30(2), 225–235. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.106>
- Summerford, C., & Samulski, R. J. (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *Journal of Virology*, 72(2), 1438–1445. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.2.1438-1445.1998>
- Tabebordbar, M., Lagerborg, K. A., Stanton, A., King, E. M., Ye, S., Tellez, L., Krunnusz, A., Tavakoli, S., Widrick, J. J., Messemer, K. A., Troiano, E. C., Moghadaszadeh, B., Peacker, B. L., Leacock, K. A., Horwitz, N., Beggs, A. H., Wagers, A. J., & Sabeti, P. C. (2021). Directed evolution of a family of AAV capsid variants enabling potent muscle-directed gene delivery across species. *Cell*, 184(19), 4919–4938.e22. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.08.028>
- Tambiah, J. R. S., Kennedy, S., Swearingen, C. J., Simsek, I., Yazici, Y., Farr, J., & Conaghan, P. G. (2021). Individual Participant Symptom Responses to Intra-Articular Lorecivint in Knee Osteoarthritis: Post Hoc Analysis of a Phase 2B Trial. *Rheumatology and Therapy*, 8(2), 973–985. <https://doi.org/10.1007/S40744-021-00316-W/FIGURES/4>
- Thorup, A.-S., Strachan, D., Caxaria, S., Poulet, B., Thomas, B. L., Eldridge, S. E., Nalesso, G., Whiteford, J. R., Pitzalis, C., Aigner, T., Corder, R., Bertrand, J., Dell'accio, F., & Affiliations, *. (n.d.). Title: ROR2 blockade as a therapy for osteoarthritis Single Sentence Summary ROR2 blockade improves the functional and structural outcomes of osteoarthritis in preclinical animal models by inhibiting YAP signaling.
- Toietta, G., Mane, V. P., Norona, W. S., Finegold, M. J., Ng, P., Mcdonagh, A. F., Beaudet, A. L., & Lee, B. (2005). Lifelong elimination of hyperbilirubinemia in the Gunn rat with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0500930102

- Tseng, Y.-S., & Agbandje-McKenna, M. (2014). Mapping the AAV Capsid Host Antibody Response toward the Development of Second Generation Gene Delivery Vectors. *Frontiers in Immunology*, 5(JAN), 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00009>
- Uzeliene, I., Kalvaityte, U., Bernotiene, E., & Mobasher, A. (2021). Non-viral Gene Therapy for Osteoarthritis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.618399/PDF>
- Vinatier, C., Domínguez, E., Guicheux, J., & Caramés, B. (2018). Role of the inflammation-autophagy-senescence integrative network in Osteoarthritis. *Frontiers in Physiology*, 9(JUN), 1–25. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00706>
- Vrouwe, J. P. M., Meulenberg, J. J. M., Klarenbeek, N. B., Navas-Cañete, A., Reijnierse, M., Ruitkamp, G., Bevaart, L., Lamers, R. J., Kloppenburg, M., Nelissen, R. G. H. H., Huizinga, T. W. J., Burggraaf, J., & Kamerling, I. M. C. (2022a). Administration of an adeno-associated viral vector expressing interferon- β in patients with inflammatory hand arthritis, results of a phase I/II study. *Osteoarthritis and Cartilage*, 30(1), 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2021.09.013>
- Vrouwe, J. P. M., Meulenberg, J. J. M., Klarenbeek, N. B., Navas-Cañete, A., Reijnierse, M., Ruitkamp, G., Bevaart, L., Lamers, R. J., Kloppenburg, M., Nelissen, R. G. H. H., Huizinga, T. W. J., Burggraaf, J., & Kamerling, I. M. C. (2022b). Administration of an adeno-associated viral vector expressing interferon- β in patients with inflammatory hand arthritis, results of a phase I/II study. *Osteoarthritis and Cartilage*, 30(1), 52–60. <https://doi.org/10.1016/J.JOCA.2021.09.013>
- Watkins, L. R., Chavez, R. A., Landry, R., Fry, M., Green-Fulgham, S. M., Coulson, J. D., Collins, S. D., Glover, D. K., Rieger, J., & Forsayeth, J. R. (2020). Targeted interleukin-10 plasmid DNA therapy in the treatment of osteoarthritis: Toxicology and pain efficacy assessments. *Brain, Behavior, and Immunity*, 90, 155–166. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2020.08.005>
- Watson Levings, R. S., Broome, T. A., Smith, A. D., Rice, B. L., Gibbs, E. P., Myara, D. A., Hyddmark, E. V., Nasri, E., Zarezadeh, A., Levings, P. P., Lu, Y., White, M. E., Dacanay, E. A., Foremny, G. B., Evans, C. H., Morton, A. J., Winter, M., Dark, M. J., Nickerson, D. M., ... Ghivizzani, S. C. (2018). Gene therapy for osteoarthritis: Pharmacokinetics of intra-articular self-complementary adeno-associated virus interleukin-1 receptor antagonist delivery in an equine model. *Human Gene Therapy Clinical Development*, 29(2), 90–100. <https://doi.org/10.1089/humc.2017.142>
- Watson Levings, R. S., Smith, A. D., Broome, T. A., Rice, B. L., Gibbs, E. P., Myara, D. A., Hyddmark, E. V., Nasri, E., Zarezadeh, A., Levings, P. P., Lu, Y., White, M. E., Dacanay, E. A., Foremny, G. B., Evans, C. H., Morton, A. J., Winter, M., Dark, M. J., Nickerson, D. M., ... Ghivizzani, S. C. (2018). Self-complementary adeno-associated virus-mediated interleukin-1 receptor antagonist gene delivery for the treatment of osteoarthritis: Test of efficacy in an equine model. *Human Gene Therapy Clinical Development*, 29(2), 101–112. <https://doi.org/10.1089/humc.2017.143>
- Watson, R. S., Broome, T. A., Levings, P. P., Rice, B. L., Kay, J. D., Smith, A. D., Gouze, E., Gouze, J. N., Dacanay, E. A., Hauswirth, W. W., Nickerson, D. M., Dark, M. J., Colahan, P. T., & Ghivizzani, S. C. (2013). ScAAV-mediated gene transfer of interleukin-1-receptor antagonist to synovium and articular cartilage in large mammalian joints. *Gene Therapy*, 20(6), 670–677. <https://doi.org/10.1038/gt.2012.81>
- Wei, F., McConnell, K. I., Yu, T. K., & Suh, J. (2012). Conjugation of paclitaxel on adeno-associated virus (AAV) nanoparticles for co-delivery of genes and drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(3), 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.02.022>

- Weklak, D., Pembaur, D., Koukou, G., Jönsson, F., Hagedorn, C., & Kreppel, F. (2021). Genetic and Chemical Capsid Modifications of Adenovirus Vectors to Modulate Vector–Host Interactions. *Viruses*, *13*(7). <https://doi.org/10.3390/V13071300>
- Whalen, J. D., Lechman, E. L., Carlos, C. A., Weiss, K., Kovessi, I., Glorioso, J. C., Robbins, P. D., & Evans, C. H. (1999). Adenoviral transfer of the viral IL-10 gene periarticularly to mouse paws suppresses development of collagen-induced arthritis in both injected and uninjected paws. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *162*(6), 3625–3632. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10092823>
- Wu, H., Seki, T., Dmitriev, I., Uil, T., Kashentseva, E., Han, T., & Curiel, D. T. (2002). Double modification of adenovirus fiber with RGD and polylysine motifs improves coxsackievirus-adenovirus receptor-independent gene transfer efficiency. *Human Gene Therapy*, *13*(13), 1647–1653. <https://doi.org/10.1089/10430340260201734>
- Wu, P., Chen, H., Jin, R., Weng, T., Ho, J. K., You, C., Zhang, L., Wang, X., & Han, C. (2018). Non-viral gene delivery systems for tissue repair and regeneration. *Journal of Translational Medicine*, *16*(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1402-1>
- Wu, Z., Miller, E., Agbandje-McKenna, M., & Samulski, R. J. (2006). α 2,3 and α 2,6 N-Linked Sialic Acids Facilitate Efficient Binding and Transduction by Adeno-Associated Virus Types 1 and 6. *Journal of Virology*, *80*(18), 9093–9103. <https://doi.org/10.1128/JVI.00895-06/ASSET/11E4242C-A734-4E91-8869-A3EC2A0F95A6/ASSETS/GRAPHIC/ZJV0180681950010.JPEG>
- Xu, K., He, Y., Moqbel, S. A. A., Zhou, X., Wu, L., & Bao, J. (2021). SIRT3 ameliorates osteoarthritis via regulating chondrocyte autophagy and apoptosis through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *International Journal of Biological Macromolecules*, *175*, 351–360. <https://doi.org/10.1016/j.IJBIOMAC.2021.02.029>
- Yang, Y., Nunes, F. A., Berencsi, K., Furth, E. E., Gönczöl, E., & Wilson, J. M. (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(10), 4407–4411. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.10.4407>
- Yazici, Y., McAlindon, T. E., Gibofsky, A., Lane, N. E., Clauw, D., Jones, M., Bergfeld, J., Swearingen, C. J., DiFrancesco, A., Simsek, I., Tambiah, J., & Hochberg, M. C. (2020). Lorecivint, a Novel Intraarticular CDC-like Kinase 2 and Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinase 1A Inhibitor and Wnt Pathway Modulator for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Phase II Randomized Trial. *Arthritis and Rheumatology*, *72*(10), 1694–1706. <https://doi.org/10.1002/ART.41315/>
- Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R., & Anderson, D. G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics*, *15*(8), 541–555. <https://doi.org/10.1038/nrg3763>
- Zhang, R., Xu, G., Cao, L., Sun, Z., He, Y., Cui, M., Sun, Y., Li, S., Li, H., Qin, L., Hu, M., Yuan, Z., Rao, Z., Ding, W., Rao, Z., & Lou, Z. (2019). Divergent engagements between adeno-associated viruses with their cellular receptor AAVR. *Nature Communications*, *10*(1), 3760. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11668-x>
- Zhang, W., Zhong, B., Zhang, C., Luo, C., & Zhan, Y. (2018). miR-373 regulates inflammatory cytokine-mediated chondrocyte proliferation in osteoarthritis by targeting the P2X7 receptor. *FEBS Open Bio*, *8*(3), 325–331. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12345>
- Zhou, X., Li, J., Zhou, Y., Yang, Z., Yang, H., Li, D., Zhang, J., Zhang, Y., Xu, N., Huang, Y., & Jiang, L. (2020). Down-regulated ciRS-7/up-regulated miR-7 axis aggravated cartilage degradation and autophagy defection by PI3K/AKT/mTOR activation mediated by IL-17A

« Gene therapy for osteoarthritis » : En préparation

in osteoarthritis. *Aging (Albany NY)*, 12(20), 20163.
<https://doi.org/10.18632/AGING.103731>

Zu, H., & Gao, D. (2021). Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. *The AAPS Journal*, 23(4). <https://doi.org/10.1208/S12248-021-00608-7>

c. La thérapie génique combinée à l'utilisation de matériaux biocompatibles

Dans la revue ci-dessus, nous avons ainsi illustré les principales limites existantes à l'utilisation des virus comme vecteurs de thérapie génique : les réactions immunitaires dirigées contre le vecteur [321], l'entrée ou l'expression insuffisante du transgène spécifiquement dans les cellules cibles [322]. L'une des solutions intéressantes pour dépasser ces limites est alors d'allier les vecteurs viraux aux avantages des vecteurs non-viraux comme notamment leur très faible immunogénicité [323]. Cette stratégie est évaluée depuis longtemps, car Faller et Baltimore ont montré dès 1984, que l'encapsulation de rétrovirus dans des liposomes augmentait l'efficacité de transduction de ces virus [324]. L'encapsulation des virus dans des biomatériaux permet alors de les protéger des anticorps neutralisants, de les maintenir plus longtemps sur le site d'injection, et enfin, de favoriser la spécificité cellulaire et l'expression du transgène (**Tableau 1**).

L'utilisation de vecteurs viraux assistés de biomatériaux a aussi été éprouvée dans le contexte de l'arthrose. Ainsi des AAVr transportant un transgène codant pour l'IGF-1, le TGF- β , ou encore Sox9 ont été associés à des matériaux comme de l'alginate [325] ou des micelles de PEO-PPO-PEO (PPO : poly(oxide de propylène) et PEO : poly(oxide d'éthylène) [326], [327]. Ces études ont mis en évidence un potentiel thérapeutique important de cette stratégie notamment dans un modèle d'arthrose associée à un défaut cartilagineux chez le minipig [328].

Limites	Solutions apportées par les biomatériaux	Vecteur viral	Références
Rapide élimination du vecteur viral	Contrôle de la délivrance de vecteur dans le temps par l'encapsulation ou l'immobilisation réversible des vecteurs viraux	Adénovirus	[329], [330]
		Lentivirus	[331], [332]
		AAV	[333]
Fuite du vecteur viral du site d'injection	Amélioration de la spécificité cellulaire, propriétés physico-chimiques limitant voire empêchant l'échappement dans la circulation sanguine	Adénovirus	[334]–[336]
		AAV	[337], [338]
Efficacité de transduction du type cellulaire désiré	Augmentation des capacités d'endocytose permettant l'internalisation du vecteur viral, et augmentation de la spécificité	Adénovirus	[339], [340]
		Lentivirus	[341]

Tableau 1 : Amélioration de l'efficacité des vecteurs viraux grâce à leur association avec des biomatériaux. Adapté d'après Wang et al. 2021 [342].

II. Objectifs de la thèse

Comme nous l'avons mis en évidence au cours de l'introduction, l'arthrose, est une maladie aux enjeux majeurs, du fait de sa prévalence élevée [343], et de son incidence grandissante dans les pays où le vieillissement et l'obésité augmentent eux aussi [8]. De plus, la prise en charge actuelle ne repose que sur le soulagement des symptômes [6], et il n'existe aucun DMOAD. Cette absence de solutions thérapeutiques s'explique notamment par la complexité de l'arthrose, qui est une maladie aux divers mécanismes moléculaires menant à l'altération de tous les tissus de l'articulation [344]. Dans ce contexte, les stratégies thérapeutiques les plus intéressantes apparaissent être celles capables de moduler différents paramètres de la maladie, comme c'est le cas du lorecivivint qui a récemment complété un essai clinique de phase III (NCT03928184) par exemple [158]. D'ailleurs, les thérapies mono-cibles comme celles impliquant les anti-cytokines [198], [345], [346] ne se sont pas révélées efficaces pour le traitement de l'arthrose.

L'identification de cibles ou de mécanismes aux effets pléiotropes sur les tissus de l'articulation apparaît donc comme une stratégie pertinente de développement de futures DMOADs. Dans ce travail de thèse, j'ai, d'une part, eu pour objectif d'identifier des mécanismes cellulaires importants dans l'inflammation des chondrocytes. Ce travail fait l'objet d'un article scientifique : «Osteoarthritic chondrocytes undergo a -related metabolic switch upon exposure to IL-1 β and TNF- α treatments » actuellement soumis pour publication dans Science Advances.

D'autre part, le développement de thérapies pour l'arthrose nécessite une fois l'identification de la « bonne drogue pour le bon patient », d'être en mesure de moduler cette cible sur le long terme et/ou au bon moment [345]. Pour aboutir à ce deuxième objectif, la thérapie génique [347], [348], et particulièrement les AAV apparaissent comme des candidats intéressants [349]. L'utilisation des AAV comme vecteur de thérapie génique nécessite cependant d'établir de nombreuses connaissances autour des différentes possibilités d'améliorations qui s'offrent à ce domaine [342]. Le second objectif de ce travail était alors de renforcer les connaissances actuelles [350]–[353] sur l'utilisation des AAVs en injection intra-articulaire dans des espèces pouvant servir de modèles pré-cliniques d'arthrose. En l'occurrence, notre modèle d'intérêt est la souris et nous avons donc grâce à cette étude pu

évaluer l'efficacité de différents sérotypes d'AAV dans la transduction des cellules articulaire mais aussi évaluer des stratégies d'amélioration par modification chimique des AAV 2. Enfin, ce travail a aussi permis de comparer différents éléments du transgène d'un AAV comme son promoteur ou encore sa forme avec des AAV en comparaison d'un scAAV (double brin).

III. Résultats

A. Dérégulations du métabolisme énergétique de chondrocytes issus d'articulations arthrosiques après un traitement pro-inflammatoire

1. Rationnel de l'étude

L'introduction a tenté de mettre en évidence la complexité de la maladie arthrosique et des facteurs impliqués. Parmi eux, l'inflammation [163], [354], et particulièrement les cytokines pro-inflammatoires, TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6, semblent jouer un rôle prépondérant dans l'arthrose [90]. Pour autant, des éléments de compréhension des mécanismes impliquant ces cytokines dans les chondrocytes manquent encore, comme l'illustrent les échecs cliniques en lien avec l'utilisation d'anti-cytokines [198], [345], [346]. Ce premier article vise donc à établir de nouvelles données concernant le rôle de ces cytokines dans les chondrocytes en s'appuyant notamment sur des technologies d'analyses à haut-débit, le RNA-seq et la spectrométrie de masse en tandem.

2. Article expérimental soumis dans Science Advances :
“Osteoarthritic chondrocytes undergo a glycolysis-related metabolic
switch upon exposure to IL-1 β or TNF- α ”

FRONT MATTER

Title

- Osteoarthritic chondrocytes undergo a glycolysis-related metabolic switch upon exposure to IL-1 β or TNF- α
- Short title: Inflammation alters OA chondrocytes metabolism

Authors

Anais Defois¹, Nina Bon¹, Alexandre Charpentier¹, Melina Georget¹, Frederic Blanchard¹,
Antoine Hamel¹, Denis Waast¹, Jean Armengaud², Ophelie Renoult⁴, Claire Pecqueur⁴, Yves
Maugars¹, Marie-Astrid Boutet^{1,3}, Jerome Guicheux^{1*}, Claire Vinatier^{1*}

Affiliations

¹Nantes Université, Oniris, CHU Nantes, INSERM, Regenerative Medicine and Skeleton, RMeS, UMR 1229, F-44000 Nantes, France.

² Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 30200, Bagnols-sur-Cèze, France.

³ Centre for Experimental Medicine & Rheumatology, William Harvey Research Institute and Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London; London, UK.

⁴ Nantes Université, INSERM, CNRS, CRCI2NA, F-44000 Nantes, France.

* Jerome.guicheux@univ-nantes.fr, claire.vinatier@univ-nantes.fr

Abstract

25 Inflammation, which is mainly sustained by pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β ,
26 TNF- α , and IL-6, plays an important role in osteoarthritis progression. However, the
27 therapeutic failures of recent clinical trials evaluating anti-IL-1, anti-TNF, and anti-IL-6
28 drugs highlight the lack of overall understanding of the effects of these cytokines on
29 chondrocytes. Here, we generated a comprehensive transcriptomic and proteomic dataset of
30 osteoarthritic chondrocytes treated with these cytokines to describe their pro-inflammatory
31 signature and compare it to the transcriptome of non-osteoarthritic chondrocytes. We first
32 identified specific dysregulation of metabolic-related genes in OA chondrocytes. A
33 metabolic shift, toward increased glycolysis at the expense of mitochondrial respiration,
34 was specifically identified and confirmed by Seahorse[®] assay of osteoarthritic chondrocytes
35 treated with IL-1 β or TNF- α . These data show a strong association between inflammation
36 and metabolism, indicating that understanding metabolic dysregulations should be a focus
37 of future investigations for the design of therapies for osteoarthritis.

39 **Teaser**

40 A pro-inflammatory environment induces a pro-glycolysis metabolic switch in
41 chondrocytes from osteoarthritis patients.
42

44 **Introduction**

45 Osteoarthritis (OA), the most common joint disease in humans, affects over 500 million people
46 worldwide, including a significant proportion of the elderly population, resulting in pain and
47 disability (1). The incidence of OA and its socioeconomic costs, representing between 1% and 2.5%
48 of the gross domestic product in developed countries (2), are expected to rise with the increase
49 in global life expectancy. However, there is currently no cure for OA, and management of this
50 debilitating condition only consists of diet and lifestyle changes, pain management, and prosthetic
51 joint replacement at late stages. Thus, the development of disease-modifying osteoarthritis drugs
52 (DMOADs) is a major challenge and requires a better understanding of OA pathophysiology.

53 Although long considered to be only a cartilage disease, it is now widely recognized that OA affects
54 all joint tissues through inflammatory and degenerative processes (3). Chronic low-grade
55 inflammation appears to play a key role in OA development, and joint inflammation is largely
56 sustained by the synovium. Indeed, synovitis correlates with the severity of OA (4), and synovium
57 changes can arise before the visible onset of cartilage degradation, thus highlighting the
58 significance of synovial inflammation in OA. There is nonetheless a close relationship between the
59 synovium and cartilage during OA. Chondrocytes, through the production of damage-associated
60 molecular patterns, undergo and support local inflammation of the synovial tissue by producing
61 and releasing pro-inflammatory cytokines. In this chronic pro-inflammatory environment,
62 chondrocytes acquire a pro-catabolic and pro-inflammatory phenotype, leading to the production
63 of a plethora of proteins, such as proteases and pro-inflammatory cytokines (5),(6).

64 Moreover, IL-1 β , TNF- α , and, to a lesser extent IL-6, the three main pro-inflammatory cytokines
65 found in abundance in OA synovial fluid (7), are commonly used to mimic pro-catabolic and pro-
66 inflammatory chondrocyte phenotypes in vitro. Thus, several mechanisms are altered by these
67 cytokines. They decrease the capacity of chondrocytes to produce extracellular matrix, while
68 broadly enhancing their catabolic activity (8), ultimately leading to extracellular matrix (ECM)
69 degradation. Moreover, pro-inflammatory stimulation of chondrocytes results in IL-1 β , TNF- α , and
70 IL-6 overexpression (5), ultimately promoting deleterious mechanisms involved in OA, such as
71 cellular senescence (9) and oxidative stress (10).

72 Given the crucial role played by these cytokines in perpetuating the low-grade inflammation
73 characteristic of OA, it appeared relevant to evaluate the effect of anti-TNF- α (e.g., etanercept,
74 adalimumab), anti-IL-1 (e.g., anakinra, lutikizumab), and anti-IL-6 (tocilizumab) drugs as DMOADs.
75 According to the regulatory requirements, a DMOAD must improve symptoms, such as pain
76 and/or disability, and stop or at least slow the loss of joint space width (11). However, despite
77 promising results in OA animal models (12)–(14) and efficacy in other types of inflammatory
78 rheumatism, all of these anti-cytokine drugs failed to relieve pain in patients with OA (15).
79 Specifically, the recently developed dual anti-IL1 α/β molecule lutikizumab was tested in OA
80 patients with synovitis and demonstrated only limited improvement in pain scores and synovial
81 inflammation (16). Similarly, etanercept (17) and tocilizumab (15) failed to relieve pain in patients
82 with hand OA. Thus, given the therapeutic failure of individual targeting of IL-1 β , TNF- α , or IL-6, a
83 thorough investigation of shared dysregulated pathways may allow identification of common
84 clinically relevant therapeutic targets for the development of higher-impact therapies for OA.

85 Here, the role of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in OA chondrocytes was thoroughly explored. Multi-omics
86 analyses were performed in articular chondrocytes from OA joints (OACs) to decipher common
87 transcriptional and proteomic changes in response to these pro-inflammatory stimuli. To unravel
88 whether the common inflammatory signature identified is specific to OACs, the transcriptome of
89 chondrocytes from non-osteoarthritic joints (NCs) following pro-inflammatory stimuli was used as
90 an internal control and compared to the transcriptome of OACs. In this study we highlighted, for
91 the first time, OAC-specific metabolic dysregulations driven by pro-inflammatory stimuli, thus
92 opening novel avenues for future therapeutic research in OA.

93

94 **Results**

95 [Transcriptomic analysis revealed overlapping but non-redundant NC and OAC pro-](#) 96 [inflammatory responses](#)

97 Following RNA-sequencing, OAC principal component analysis (PCA) showed that the samples
98 treated with either IL-1 β or TNF- α significantly clustered away from the untreated samples (**Fig.**
99 **2A**). By contrast, samples treated with IL-6 overlapped with untreated samples. Interestingly the
100 sample segregation observed on NC PCA was not as distinct as on OAC PCA, exhibiting only
101 significant segregation of IL-1 β -treated samples from untreated ones (**Fig. 2B**). Altogether these
102 data suggest a more pronounced pro-inflammatory response by OACs compared to NCs.

103 As expected from the PCAs, very few differentially expressed genes (DEGs) were identified
104 between IL-6-treated and untreated samples in OACs (56 DEGs), and no DEGs were identified in
105 NCs (data not shown). We identified 3365 DEGs in response to IL-1 β and 1607 DEGs in response
106 to TNF- α in OACs, while only 537 and 499 DEGs were found in response to IL-1 β and TNF- α ,
107 respectively, in NCs (**Fig. 2C**). Indeed, volcano plots indicated that the overall responses of OACs
108 (**Fig. 2D-E**) to either IL-1 β or TNF- α were greater compared to NCs (**Fig. 2F-G**). Moreover, OACs
109 exhibited a higher number of DEG in response to IL-1 β (3365 DEGs) than to TNF- α treatment (1607
110 DEGs). Nevertheless, 78% of the DEGs identified in response to TNF- α (1239/1607) were common
111 to those identified in response to IL-1 β , highlighting strong redundancy of the TNF- α response
112 with that of IL-1 β (**Fig. 2C**).

113 Despite the overall differences observed between NC and OAC responses, 408 DEGs in response
114 to IL-1 β and 411 DEGs in response to TNF- α were found to be common in both cell types (Supp
115 Fig. 1A, B). Among these common DEGs overexpressed in both cell types in response to IL-1 β and
116 TNF- α , there were several key players of OA, such as *MMP1* (18); *SOD2* (19), *SERPINE2* (20),(21),
117 and *Slc39a8* (22) (**Fig. 2H**).

118 Nevertheless, among the 1249 DEGs identified as common to both cytokines in OACs, the DEGs of
119 interest, 1079 (\approx 86%) were specific to OACs and warranted further examination.

120 [Multi-omics analysis identified a canonical pro-inflammatory signature in OACs](#)

121 To decipher the specific OAC signature in response to pro-inflammatory stimuli and to complete
122 the description of OACs upon exposure to pro-inflammatory stimuli, in addition to the 3' SRP

123 analysis, we performed tandem mass spectrometry analysis of the proteins extracted from OAC
124 lysates (5 OA patients) treated the same way as the samples described previously (Fig. 1). This
125 analysis, validated and quantified 2688 proteins and, for the entire dataset, we were able to assign
126 794,053 MS/MS spectra, or an average of 26,468 per sample. The PCA analysis of proteomic
127 samples revealed one significant outlier patient despite the absence of previously obvious
128 differences with other samples (**Fig. 3A**, in black). Following the removal of this patient from our
129 analysis, the variability between the different samples was drastically decreased, as illustrated by
130 the percentage of variance associated with the first component (PC1), which changed from 67%
131 (N=5) to 26% (N=4) (**Fig. 3B**). Similar to the transcriptomic results, a low number (52) of
132 differentially expressed proteins (DEPs) were identified in samples treated with IL-6 (data not
133 shown). In light of the small number of DEGs and DEPs identified in response to IL-6, our
134 subsequent analyses focused only on samples treated with either IL-1 β or TNF- α . Interestingly,
135 whereas a significant difference in the number of DEGs in response to IL-1 β (3365) or TNF- α (1607)
136 was observed at the transcriptomic level, at the proteomic level a similar number of DEPs was
137 found in response to IL-1 β (154 DEP) or TNF- α (140 DEPs) (**Fig. 3C, D**). Among these identified
138 DEPs, 89 (**Fig. 3C**) and 82 (**Fig. 3D**) DEPs matched with identified DEGs in response to IL-1 β or TNF-
139 α , respectively. The KEGG pathways analysis based on these common DEGs/DEPs revealed key
140 over-represented pathways such as “Antigen processing and presentation” and “NF- κ B signaling
141 pathway” that are shared by both the IL-1 β and TNF- α responses (**Fig. 3E, F**).

142 Thereafter, to define the pro-inflammatory signature in OACs, we mainly focused on the
143 similarities between the IL-1 β and TNF- α responses at both the transcriptomic and proteomic
144 levels. With these criteria, we identified 56 matched DEPs/DEGs found in both the IL-1 β and TNF-
145 α responses, which determined a canonical pro-inflammatory signature in OACs (**Fig. 3G, Table 1**).
146 To begin the exploration of this pro-inflammatory signature, we performed a KEGG enrichment
147 analysis. Among the KEGG-enriched pathways identified using this list of 56 DEPs/DEGs, some
148 were expected, such as the “NF- κ B signaling pathway” (10) and the “HIF-1 signaling pathway” (23),
149 whereas others, such as “Antigen presentation” (24) and “Ferroptosis” (25), were more recently
150 identified in the context of OA inflammation (**Fig. 3H**).

151 [OACs exhibit disease-specific metabolic features following pro-inflammatory](#)
152 [exposure](#)

153 Following the description of the canonical pro-inflammatory signature characterizing OACs, we
154 wished to determine whether the same pro-inflammatory signature could also be observed in
155 non-OA chondrocytes. To address this question, the 56 matched DEPs/DEGs defining the canonical
156 pro-inflammatory signature of OACs were searched in the 214 common DEGs identified in NCs
157 in response to IL-1 β or TNF- α (**Fig. 4A**). These 214 DEGs comprised 21 of the 56 DEGs/DEPs identified
158 in OACs (**Table 1**, bold genes) (**Fig. 4B**). To further characterize the differences in the inflammatory
159 responses of OACs versus NCs, protein-protein networks were constructed, using either the 56
160 DEGs/DEPs of OACs (**Fig. 4C**) or the 21 DEGs retrieved in NCs (**Fig. 4D**). Interestingly, the 56
161 DEGs/DEPs characterizing the pro-inflammatory signature of OACs revealed three interacting
162 groups of proteins (**Fig. 4C**): one group was characterized by common pro-inflammatory targets
163 (Blue: SOD2, ICAM-1, EGFR, etc.), another was associated with proteins involved in antigen
164 presentation (Yellow: HLA-B, B2M, PSME2, etc.), and a third group was composed of metabolism-
165 related proteins (Green: SLC2A1, HK2, SLC16A3, and GFPT2). A similar analysis using the 21 DEGs
166 characterizing the NCs response to IL-1 β and TNF- α (**Fig. 4D**) demonstrated that, while the
167 common pro-inflammatory targets (Blue) and antigen presentation (Yellow) groups were shared
168 between both the NC and OAC pro-inflammatory responses, the group related to metabolism was
169 specific to the OAC response. This metabolism group is composed of four proteins: Glut-1 (Solute
170 Carrier Family 2 Member 1 – *Slc2a1*), a glucose transporter; MCT-4 (Solute Carrier Family 16
171 Member 3 – *Slc16a3*), a lactate/H⁺ exporter; HK2 (hexokinase 2), the enzyme catalyzing the first
172 step in glycolysis; and GFAT2 (Glutamine-Fructose-6-Phosphate Transaminase 2 – *Gfpt2*), the rate-
173 limiting enzyme of the hexosamine biosynthesis pathway. Among these, *Gfpt2* expression was
174 also increased in NCs, but the expression of Glut-1, MCT-4, and HK2 was specifically modulated in
175 OACs (**Table 1**). Using RT-qPCR, we then validated the overexpression of Glut-1, MCT-4, and HK2
176 in OACs by both cytokine treatments as well as the overexpression of GFAT2 in response to either
177 IL-1 β or TNF- α in OACs and NCs (**Fig. 4E**).

178 Since Glut-1, MCT-4, and HK2 are involved in the key steps controlling glycolytic flux (26), we used
179 the glycolysis/gluconeogenesis-related KEGG pathway annotation (*hsa00010*) to construct
180 heatmaps and visualize dysregulations occurring in OACs versus NCs in response to pro-
181 inflammatory cytokines (**Fig. 5A**). This analysis revealed an overall increase in the expression of
182 glycolysis enzymes specifically in OACs treated with either IL-1 β or TNF- α (**Fig. 5A**). As the final
183 product of glycolysis is pyruvate, which is a metabolite that can initiate the tricarboxylic acid cycle

184 (TCA, or citrate/Krebs cycle), we examined TCA-related genes using unsupervised heatmap
185 analysis based on the TCA-related KEGG annotation (*hsa00020*). The TCA heatmap showed an
186 overall decrease in TCA-related genes in OACs but not in NCs (Fig. 5B). To strengthen our results,
187 glycolytic and TCA gene dysregulation were also explored in two public datasets: GSE162510,
188 which explored the transcriptomic changes upon IL-1 β treatment, and E-MTAB-6266, which
189 compared gene expression between the cartilage of OA knees and the cartilage of healthy knees
190 from multi-organ donors as a control. Interestingly, both datasets confirmed the expression
191 profile highlighted in our study, with overexpression of the genes associated with glycolysis (Fig.
192 5C), and downregulation of the genes related to TCA (Fig. 5D) in OA conditions compared to the
193 controls (untreated chondrocytes or chondrocytes from non-OA joints).

194 To better understand the impact of this glycolytic increase on the overall cellular metabolism, we
195 also explored other metabolic pathways directly related to glycolysis, such as the hexosamine
196 biosynthetic pathway and the pentose phosphate pathway. No regulation as clear and specific as
197 the one observed for glycolysis was revealed for these pathways (Supp Fig. 3A, B). Moreover, in
198 keeping with the increase observed in the expression of glycolysis enzymes and the decrease in
199 the expression of TCA enzymes, our results revealed overexpression of *LDHA* and, as previously
200 described, overexpression of MCT-4 (*Slc16a3*) at both the transcriptomic and proteomic levels in
201 response to either IL-1 β or TNF- α in OACs (Fig. 5A, **Table 1**). Based on these observations, we
202 examined whether lactate was abnormally secreted in OACs treated with IL-1 β or TNF- α , and we
203 found a significant increase in the extracellular lactate concentrations in treated OACs compared
204 to NCs (Fig. 5E). These data suggest a metabolic shift of OACs in response to pro-inflammatory
205 cytokines.

206 [Real-time cell metabolic analysis confirmed induction of OAC-specific metabolism by](#) 207 [pro-inflammatory stimuli](#)

208 To strengthen our multi-omic analysis, we then examined whether the metabolic shift has a
209 functional impact on cellular metabolism. This was addressed by performing Seahorse[®] real-time
210 metabolic assays. We evaluated both the extracellular acidification rate (ECAR) during a glycolytic
211 stress test and the oxygen consumption rate (OCR) during a mitochondrial stress test in both OACs
212 and NCs upon IL-1 β and TNF- α treatments. As expected, according to previous results presented
213 in Fig. 5, OACs and NCs had distinct metabolic profiles. Indeed, the ECAR measured during the

214 glycolytic stress assay revealed an altered profile of OACs treated with IL-1 β or TNF- α compared
215 with untreated cells, while this was not observed in NCs (**Fig. 6A, B**). Unexpectedly, OAC and NC
216 samples did not exhibit differences in glycolysis levels, irrespective of the applied treatments (**Fig.**
217 **6C**). However, pro-inflammatory stimuli significantly decreased the glycolytic reserve of OACs but
218 not NCs (**Fig. 6D**). Interestingly, non-glycolytic acidification was increased only in treated OAC
219 samples but not in treated NC samples (**Fig. 6E**), suggesting that other pathways are involved in
220 the acidification of the OAC environment.

221 In parallel, the mitochondrial stress assay revealed altered oxidative phosphorylation (OXPHOS)
222 in response to IL-1 β or TNF- α in OACs (**Fig. 6F**) compared to the expected NC profiles (**Fig. 6G**).
223 Consequently, the OAC basal respiration level was significantly decreased by pro-inflammatory
224 stimuli (**Fig. 6H**), and it was associated with a significant reduction in ATP production by OXPHOS
225 (**Fig. 6I**). Consistent with our RNA-seq data, pro-inflammatory stimuli did not alter OXPHOS or ATP
226 production in NCs (**Fig. 6H-J**). Interestingly, non-mitochondrial O₂ consumption (NMOC) increased
227 specifically in OACs upon IL-1 β and TNF- α treatments (**Fig. 6J**). An increased NMOC suggests that
228 OACs treated with cytokines consumed O₂ in other ways than OXPHOS, such as NO and/or ROS
229 production. Of note, the nitrite (NO₂⁻) concentration was specifically increased in OAC
230 supernatants by pro-inflammatory stimuli (**Fig. 6K**). Since nitrite production resulted from NO
231 oxidation, part of the increased NMOC observed in OACs but not in NCs could, therefore, be
232 explained by NO production.

233

234 **Discussion**

235 Using a multi-omics approach, this study presents, for the first time, a description of IL-1 β and
236 TNF- α responses of chondrocytes from OA compared to chondrocytes from non-OA joints. Our
237 multi-omics approach based on a 3'-seq RNA analysis and mass spectrometry analysis of OAC
238 lysates identified 56 targets of interest that define a canonical pro-inflammatory signature of OACs
239 induced in response to either IL-1 β or TNF- α . The protein-protein network analysis of the 56
240 targets identified in the canonical pro-inflammatory signature of OACs defined three main
241 interactome modules. By comparing the OAC canonical pro-inflammatory signature to NCs, we
242 identified that the module corresponding to metabolism appears to be a unique feature of OACs
243 exposed to pro-inflammatory stimuli.

244 This metabolism module comprises four proteins: Glut-1, HK2, MCT-4, and GFAT2. Thus, a special
245 focus on energetic metabolism pathways such as glycolysis and TCA at the transcriptomic level
246 revealed that the expression of glycolytic enzymes and TCA enzymes are inversely regulated in
247 OACs. Indeed, our study showed that the expression of most genes involved in glycolysis is
248 increased whereas the expression of those related to TCA is decreased specifically in OACs. These
249 observations are in line with previous studies that highlighted ATP production exclusively related
250 to glycolysis (27). Moreover, while our study compared osteoarthritic and non-osteoarthritic
251 chondrocytes from different anatomical sites, these results were confirmed by public data sets of
252 OA knees and healthy knees of age-matched multi-organ donors (E-MTAB-6266) (28). Overall,
253 these data emphasize, for the first time, that the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α
254 induce a specific metabolic switch in OA chondrocytes compared to non-OA chondrocytes.

255 We further examined the bioenergetic profiles of chondrocytes using real-time cell metabolic
256 assays. Interestingly, we confirmed the functional impact specific in OACs of the metabolic gene
257 modulations identified in our transcriptomic analysis. Indeed, Seahorse[®] glycolytic stress assay
258 showed that pro-inflammatory conditions forced OACs to use glycolysis at their full capacity,
259 which was not observed in NCs. Furthermore, a significant increase in non-glycolytic acidification
260 was specifically observed in OACs upon treatment with IL-1 β or TNF- α . An acidic
261 microenvironment is a hallmark of inflamed tissue as well as cartilage from OA patients (29) and
262 has been associated with decreased glycosaminoglycan production and increased MMP activity in
263 cartilage (30). Microenvironment acidification could be due to TCA activity, glycogenolysis, or
264 lactate export (linked to glycolysis) (31). In our study, the increased expression of LDHA and MCT-

265 4 expression suggests enhanced lactate secretion in OACs following exposure to pro-inflammatory
266 stimuli. We confirmed that lactate concentrations increased in the supernatants of OACs
267 compared to NCs under pro-inflammatory conditions. An increase in synovial fluid lactate levels
268 has already been associated with inflammatory joint diseases, such as rheumatoid arthritis (32),
269 and in OA animal models (33),(34). Altogether, these data confirmed that disease-specific
270 metabolic dysregulation characterizes OACs.

271 In parallel, our results showing decreased expression in TCA-related genes and a decrease in basal
272 respiration and ATP production suggest impaired mitochondrial function in OACs by IL-1 β and
273 TNF- α treatments. Consistent with our data, several metabolic dysregulations, such as
274 impairments in OXPHOS complexes, in OA chondrocytes have been shown previously (35). Here,
275 our study adds that pro-inflammatory stimuli exacerbate OXPHOS dysfunction in OA
276 chondrocytes.

277 Interestingly, in OACs but not in NCs, both IL-1 β and TNF- α induced an increase in NMOC
278 associated with an increase in nitrite production, reflecting O₂ consumption for NO production.
279 As NO is a known chondrocyte catabolic product found in OA (36),(37), this increased nitrite
280 production strengthens the association of these metabolic dysfunctions with pathogenic OA
281 processes. Our observations, therefore, suggest that the inflammatory and/or catabolic
282 environment chondrocytes experience in OA joints for several years makes them more responsive
283 to metabolic changes induced by pro-inflammatory stimuli. Whether sustained treatment of NCs
284 with low-grade pro-inflammatory stimuli could sensitize them to this metabolic shift warrants
285 being analyzed further.

286 It is increasingly recognized that there is a close link between inflammation and metabolic
287 adaptation in diseases, and even in inflammatory joint disease (38). In rheumatoid arthritis (RA),
288 several deleterious metabolism changes have been described, particularly in synovial (immune)
289 cells (39),(40). The importance of metabolic dysregulations in RA is notably highlighted by the
290 current clinical use of drugs such as glucocorticoids (41), methotrexate (42), and tofacitinib (43)
291 that target metabolic pathways. Interestingly, impairment of adenosine metabolism by
292 methotrexate (42) has been shown to significantly improve pain and stiffness in OA patients, while
293 drugs targeting pro-inflammatory cytokines failed to improve it (44), thus confirming that
294 metabolism should be considered a key player in the clinical response to treatment. Although our
295 study focused on glycolysis and TCA due to its OACs specificity, other pathways, such as the

296 hexosamine pathway or pentose phosphate pathway, which are closely related to glycolysis, could
297 also be explored in depth.

298 Interestingly our study also highlighted a lack of relevant transcriptomic and proteomic changes
299 by IL-6 exposure in human chondrocytes (osteoarthritic and non-osteoarthritic) under the
300 experimental conditions tested. This result may seem surprising as studies have described a
301 protective effect of IL-6 inhibition in preclinical models of OA (12),(45),(46), suggesting that IL-6 is
302 a key signaling cytokine in joints. However, anti-IL-6 clinical trials have been ineffective in OA,
303 highlighting the species variability in IL-6 signaling. This is consistent with our data, where a
304 transcriptomic response to the same IL-6 treatment was observed in murine chondrocytes (530
305 DEGs, data not shown) but not in human chondrocytes.

306 The design of our study does not completely rule out the possibility that the differences observed
307 in response to pro-inflammatory stimuli are related to the use of chondrocytes from different
308 joints. However, all of our observations are consistent with the literature and have been
309 substantiated by additional studies using publicly available datasets. Nevertheless, since accessing
310 a healthy knee joint is challenging, complementation of this study with others in animal models
311 such as dogs or horses would be substantial. These future studies should also complement the
312 pro-inflammatory signature with data on secretome dysregulations. Despite these limitations, the
313 main importance of our study lies in the multi-omics approach complemented by a functional
314 approach to investigate the action of two different pro-inflammatory treatments.

315 Our study identified a canonical pro-inflammatory signature in chondrocytes from OA joints and
316 its specific signaling pathways compared to chondrocytes from non-OA joints. Our work also
317 highlighted specific impairment in energy metabolism in OACs, which represents a key pathway
318 involved in OA pathogenesis. Further studies may help design relevant strategies to efficiently
319 target inflammation-related changes occurring in OACs.

320

321 **Materials and Methods**

322 [Experimental design](#)

323 Primary human chondrocytes, isolated from osteoarthritic knees of OA patients (OACs) and from
324 vertebral transverse costal facet joints of non-OA patients (NCs), were treated for 24 h with or
325 without 1 ng/mL of IL-1 β or 25 ng/mL of TNF- α or 50 ng/mL of IL-6/IL-6 soluble receptor (IL-6).
326 Sequencing by 3' SRP was performed on OAC and NC samples. Moreover, mass-spectrometry was
327 performed on OACs. The pro-inflammatory signature was defined with matched transcripts and
328 proteins dysregulated by IL-1 β or TNF- α treatments. NC transcriptomics data were then compared
329 to the OAC pro-inflammatory signature (Fig. 1).

330 [Cell culture](#)

331 [Human chondrocytes](#)

332 Primary human chondrocytes were isolated from osteoarthritic joints of OA patients undergoing
333 total knee surgery (OACs, 71–81 years old, patient number indicated in the figure legends) *and*
334 *from vertebral transverse costal facet joints of non-OA patients undergoing scoliosis surgery (NCs,*
335 *patient number indicated in the figure legends, 15–21 years old). According to the Declaration of*
336 *Helsinki, all human articular cartilage samples were harvested from patients after they had*
337 *provided informed consent.* This study was carried out following the recommendation of the
338 Committee for Person Protection of Pays de La Loire and approved by the French Ministry of
339 Higher Education and Research (registration number: DC-2017-2987). *Briefly, cartilage was cut*
340 *into small slices and placed in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, L0606-500, Biowest)*
341 *supplemented with 10% penicillin–streptomycin solution (PS, 1000 U/mL, 15140122, Thermo*
342 *Fisher Scientific) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ for up to 5 h. Then, small slices*
343 *were digested for 30 minutes in 0.2% collagenase (125 U/mg, C6885, Sigma-Aldrich), and*
344 *chondrocytes were released by overnight digestion (~14 h) in 0.03% collagenase in high-glucose*
345 *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, 31966-021, Gibco) containing 10% fetal calf serum*
346 *(FCS, Dominique Dutscher) and 1% PS (complete medium) and passed through a 70 μ m filter to*
347 *remove undigested cartilage fragments. Isolated chondrocytes were seeded at a density of 6.0 x*
348 *10⁴ cells/cm² for OACs and 1.5 x10⁴ cells/cm² for NCs and used at passage 1 after reaching 90%*
349 *confluence.*

350 [Chondrocyte treatments](#)

351 Primary human chondrocytes (OACs and NCs) were seeded at 6×10^4 cells/cm² in complete medium
352 and cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. After 24 h, cytokines were added
353 as follows: 1 ng/mL IL-1 β (Merck, IL038) or 25 ng/mL TNF- α (Miltenyi Biotec 130-094-023) or 50
354 ng/mL IL-6/IL-6 soluble receptor (R&D, 8954-SR-025) for 24 h. At the end of the treatments, the
355 supernatants were collected and the cells were lysed before being stored immediately at -80°C
356 until further analysis.

357 For the transcriptomic analysis, total RNA was extracted from lysed chondrocytes using
358 NucleoSpin RNA XS (740902.50, Macherey-Nagel) according to the supplier's instructions. The
359 RNA yield and RNA quality were assessed for the 3' SRP analysis using a NanoDrop™
360 spectrophotometer and an Agilent Bioanalyzer system (Agilent Technologies), respectively. The
361 RNA Integrity Number was greater than 9 for each RNA sample.

362 For the mass spectrometry analysis, cells were trypsinized, washed with PBS, and then pelleted
363 before being snap-frozen and stored at -80°C until further analysis.

364 [Chondrocytes analysis](#)

365 [qRT-PCR](#)

366 RNAs were reverse transcribed to cDNA using a Verso™ cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher
367 Scientific, AB-1453/B). The diluted cDNA was then amplified with specific primers (MCT-4-Fw:
368 CCACAAGTTCTCCAGTGCCATTG; MCT-4-Rv: CGCCAGGATGAACACGTACATG; HK2-Fw:
369 GAGTTTGACCTGGATGTGGTTGC; HK2-Rv: CCTCCATGTAGCAGGCATTGCT; Glut-1-Fw:
370 TTGCAGGCTTCTCCAAGTGGAC; Glut-1-Rv: CAGAACCAGGAGCACAGTGAAG; GFAT2-Fw:
371 GCTCATCGTGATTGGCTGTGGA; GFAT2-Rv: CAACCATCACAGGAAGCTCAGTC; GusB-Fw:
372 CGCCCTGCCTATCTGTATTC; GusB-Rv: TCCCCACAGGGAGTGTGTAG; 18S-Fw:
373 AGCAAACCCCAACTCAACC; 18S-Rv: GTCCCTCAGAAGGGGTGAC) using the SYBR® Select Master Mix
374 (Thermo Fisher Scientific, 4472897). qPCR was then performed using a CFX96™ Touch Deep Well
375 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

376 [Supernatants analysis](#)

377 Nitrite concentrations were determined using the Griess reaction. Aliquots of 100 μ L of cell
378 supernatants were mixed with 100 μ L of Griess solution (v/v mixture of a 0.1% aqueous solution
379 of naphthylendiamine dihydrochloride and a 1% solution of sulfanilamide in 5% H₃PO₄). The

380 absorbance was then measured at 550 nm, and the nitrite concentration was determined using a
381 standard range of nitrites diluted in complete medium. Lactate concentrations were determined
382 using a Lactate Assay Kit (Sigma-Aldrich, MAK064) with 1 μ L of the cell supernatants following the
383 manufacturer's instructions.

384 [Measurement of cellular metabolism by Seahorse[®] assay](#)

385 Primary human chondrocytes (OACs or NCs) were seeded in Seahorse[®] XFp plates at 15 000 cells
386 per well (1.3×10^5 cells/cm²) and treated with IL-1 β (1 ng/mL) or TNF- α (25 ng/mL). After 24 h, the
387 complete medium was replaced with DMEM (Sigma-Aldrich, 5030) with 1% P/S and glutamine (4
388 mM) for the glycolytic stress assay or glutamine (4 mM), glucose (25 mM), and pyruvate (1 mM)
389 for the mitochondrial stress test. The plate was then preincubated at 37°C for 45 minutes in the
390 absence of CO₂. The glycolytic stress assay consisted of the sequential addition of glucose (25
391 mM), oligomycin (1 μ M), and 2-deoxy-D-glucose (2-DG, 50 mM) according to the manufacturer's
392 instructions. The mitochondrial stress test consisted of the sequential addition of oligomycin (1
393 μ M), carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazone (CCCP, 1 μ M), and rotenone/antimycin A (1 μ M
394 each). Measurements of the extracellular acidification rate (ECAR) and the oxygen consumption
395 rate (OCR) were performed every 5 minutes before and after the addition of the various drugs as
396 indicated in the figures. The data analysis was performed using Wave software (Agilent).

397 [3' Seq-RNA Profiling \(3' SRP\)](#)

398 [Preparation of the sequencing library](#)

399 The 3'seq-RNA profiling was performed as described by Charpentier et al., 2021 and (48). Samples
400 were randomly plated and diluted to a concentration of 2.5 ng/ μ L to construct the library. The
401 library was prepared from 10 ng of total RNA in 4 μ L. The mRNA poly-A tails were tagged with
402 universal adapters, well-specific barcodes, and unique molecular identifiers (UMIs) during
403 template-switching reverse transcriptase (Thermo Scientific[™], EP0751, Maxima H Minus Reverse
404 Transcriptase). Barcoded cDNAs from 96 samples were then pooled and purified using a Zymo kit.
405 cDNAs were treated with exonuclease I (NEB, M0293S) before being amplified (12 cycles) and
406 fragmented using a transposon-fragmentation approach that enriched for 3' ends of cDNA. The
407 fragments were size controlled on a 2200 TapeStation system (Agilent Technologies) to form a

408 library of 350–800 bp in length. Finally, the library was validated with fragments of approximately
409 484 pb length and with 38.5 nM of properly tagged cDNA.

410 [Sequencing and primary analysis](#)

411 Sequencing and primary analysis were performed according to Charpentier et al., 2021. Briefly,
412 the library was sequenced on a NovaSeq 6000 using NovaSeq 6000 SP Reagent Kit 100 cycles
413 (#20027464, Illumina) with 17*-8-105* cycle reads (* addition of one cycle according to Illumina's
414 recommendation). Bioinformatics steps were performed using a Snakemake (49) pipeline
415 (<https://bio.tools/3SRP>). Sample sequences were demultiplexed using a python script, and raw
416 paired-end fastq files were transformed into a single-end fastq file for each sample and aligned
417 on the Ensembl transcriptome hg38 using bwa.

418 [Public datasets analysis](#)

419 Two public datasets, E-MTAB-6266 and GSE162510, were uploaded to explore the regulation of
420 metabolism-associated genes. E-MTAB-6266 compared gene expression between the cartilage of
421 58 OA knees and 10 non-OA knees. GSE162510 explored the transcriptomic changes occurring in
422 chondrocytes from 10 OA patients following 24 h of IL-1 β treatment (0.2 ng/mL). A differential
423 expression analysis table of the E-MTAB-6266 public dataset was uploaded from
424 <https://github.com/souli/OAstratification> (28), while GSE162510 was uploaded with the R
425 package GEO query (2.62.2). Data visualization was then performed as previously described.

426 [Mass-spectrometry](#)

427 [Proteome sample preparation and tandem mass spectrometry](#)

428 Cell pellets were dissolved in 25 μ L of LDS buffer (26.5 mM Tris HCl, 35.25 mM Tris base, 0.5% LDS,
429 2.5% glycerol, 0.13 mM EDTA, supplemented with 5% beta-mercaptoethanol) per mg of pellet.
430 Samples were heated for 5 min at 99°C in a thermomixer (Eppendorf). For each sample, a volume
431 of 20 μ L (i.e., 10 μ g of protein) was subjected to a 5 min denaturing electrophoresis on a NuPAGE
432 4%–12% gradient gel with MES SDS as the running buffer (50 mM MES ([2-(N-morpholino) ethane
433 sulfonic acid), 50 mM Tris Base, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7.3). Following electrophoresis, the gel
434 was briefly washed with Milli-Q® water, stained with SimplyBlue™ SafeStain (Thermo Fisher
435 Scientific) for 5 min to visualize proteins, and then washed extensively with Milli-Q® water. Each
436 proteome was extracted as a single polyacrylamide band with a volume of approximately 100 μ L.

437 Each sample was processed as previously described (50) and then proteolyzed with Trypsin Gold
438 (Promega) in 50 mM NH_4HCO_3 in the presence of ProteaseMAX™ detergent (Promega). A volume
439 of 10 μL of the resulting peptide mixture (45 μL) was injected into a nanoscale C18 PepMap™ 100
440 capillary column (3 μm , 100 Å, 75 μm internal diameter x 50 cm length, LC Packings) mounted with
441 a desalting pre-column and resolved with a 65-minute gradient of acetonitrile (4.8%–24.8% in 60
442 min followed by 24.8%–40% in 5 min), 0.1% formic acid, at a flow rate of 0.25 $\mu\text{L}/\text{min}$. The peptides
443 resolved by reverse-phase chromatography were analyzed by tandem mass spectrometry with an
444 Exploris™ 480 mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) connected directly to the column exit.
445 The instrument was operated in data-dependent acquisition mode, with a full scan of peptide ions
446 acquired at a resolution of 120,000 from m/z 350 to 1500 and with a dynamic exclusion of 10 sec.
447 Each MS scan was followed by high-energy collisional dissociation and MS/MS scans at a
448 resolution of 15,000 on the 20 most abundant precursor ions identified within the full scan,
449 selecting only ions with a charge of 2⁺ or 3⁺.

450 [Label-free shotgun proteomic interpretation](#)

451 MS/MS spectra were assigned to peptide sequences by the MASCOT Daemon 2.3.2 search engine
452 (Matrix Science) in follow-up mode using first the contaminant database described by Pereira et
453 al. (51) including the 23 most abundant proteins from fetal calf serum, and then the SwissProt
454 *Homo sapiens* database (20,396 polypeptide sequences). Standard search parameters included:
455 trypsin as a proteolytic enzyme with two possible miss-cleavages at maximum, tolerances of 5
456 ppm and 0.02 Da for the MS and MS/MS signals, respectively, oxidation of methionine,
457 deamidation of glutamine and asparagine, and acetylation of N-termini, as variable modifications,
458 carbamidomethylation of cysteine as fixed modification, and a peptide p-value below 0.01. A
459 protein was considered validated when at least two different peptides were detected, resulting in
460 a protein identification false discovery rate below 1% as verified with a reverse decoy database
461 search. To account for possible genome heterogeneity between patients, only peptides common
462 between all patients (at least identified once in a patient sample) were used for the comparative
463 proteomics. Spectral counts corresponding to the number of MS/MS spectra assigned per protein
464 were used as a proxy for the abundance of the proteins in each condition, taking into account only
465 unambiguous peptides (listed only once in the database).

466 [Omic data processing](#)

Differential expression analyses

Aligned reads were parsed, and UMIs were counted for each gene in each sample to create an expression matrix containing the absolute abundance of mRNAs in all samples. Reads aligned on multiple genes or containing more than three mismatches with the reference were discarded. The expression matrix was normalized and differentially expressed genes (DEG) were searched using the R package DeSeq2 (52) (thresholds used: *adjusted p-value* < 0.01 and $\log_2(\text{Fold-Change}) > 0.58$). *Supplementary R packages compiled with R version 4.1.1 were used to generate data visualization: ggplot2 (3.3.5), VennDiagram (1.7.3), enrichR (3.0), and ComplexHeatmap (2.8.0).*

Protein-protein network

Protein-protein network analysis, using the 56 DEGs/DEPs identified in OACs and the 21 DEGs of NCs, were determined using the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING) database version 11.5 (<https://string-db.org/>). All available interactions were mapped with an interaction score cutoff of 0.4, and unconnected nodes were removed.

Statistical analysis

The statistical analyses used in the transcriptomic analysis were performed using the R software package DESeq2 (52) with a Benjamini & Hochberg correction. The PCA and biplots were created using the `prcomp` function from the `stats` package within R statistics (version 4.1.1) and the `factoextra` R package (1.0.7). Differences in continuous variables were assessed using the non-parametric Mann–Whitney test ($n < 30$), and p-values less than 0.05 were considered to be statistically significant. The statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0v software.

489 **References**

- 490 1. Leifer, V. P., Katz, J. N. & Losina, E. The burden of OA-health services and economics.
491 *Osteoarthr. Cartil.* **30**, 10–16 (2022).
- 492 2. Hunter, D. J. & Bierma-Zeinstra, S. Osteoarthritis. *Lancet* **393**, 1745–1759 (2019).
- 493 3. Martel-Pelletier, J. *et al.* Osteoarthritis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2**, (2016).
- 494 4. Mathiessen, A. & Conaghan, P. G. Synovitis in osteoarthritis: Current understanding with
495 therapeutic implications. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 1–9 (2017).
- 496 5. Jenei-Lanzl, Z., Meurer, A. & Zaucke, F. Interleukin-1 β signaling in osteoarthritis –
497 chondrocytes in focus. *Cell. Signal.* **53**, 212–223 (2019).
- 498 6. Ansari, M. Y., Ahmad, N. & Haqqi, T. M. Oxidative Stress and Inflammation in Osteoarthritis
499 Pathogenesis: Role of Polyphenols. *Biomed. Pharmacother.* **129**, 110452 (2020).
- 500 7. Chou, C. H. *et al.* Synovial cell cross-talk with cartilage plays a major role in the pathogenesis
501 of osteoarthritis. *Sci. Rep.* **10**, (2020).
- 502 8. Lv, M. *et al.* Identification of Chondrocyte Genes and Signaling Pathways in Response to
503 Acute Joint Inflammation. *Sci. Rep.* **9**, 1–12 (2019).
- 504 9. Wang, Q. *et al.* Celecoxib prevents tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced cellular
505 senescence in human chondrocytes. *Bioengineered* **12**, 12812–12820 (2021).
- 506 10. Lepetsos, P., Papavassiliou, K. A. & Papavassiliou, A. G. Redox and NF- κ B signaling in
507 osteoarthritis. *Free Radic. Biol. Med.* **132**, 90–100 (2019).
- 508 11. Oo, W. M., Little, C., Duong, V. & Hunter, D. J. The Development of Disease-Modifying
509 Therapies for Osteoarthritis (DMOADs): The Evidence to Date. *Drug Des. Devel. Ther.* **15**,
510 2921–2945 (2021).
- 511 12. Latourte, A. *et al.* Systemic inhibition of IL-6/Stat3 signalling protects against experimental
512 osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 748–755 (2017).
- 513 13. Wang, F. *et al.* IL-1 β receptor antagonist (IL-1Ra) combined with autophagy inducer (TAT-
514 Beclin1) is an effective alternative for attenuating extracellular matrix degradation in rat
515 and human osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* **21**, 171 (2019).

- 516 14. Chisari, E., Yaghmour, K. M. & Khan, W. S. The effects of TNF-alpha inhibition on cartilage:
517 a systematic review of preclinical studies. *Osteoarthritis and Cartilage* at
518 <https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.09.008> (2019).
- 519 15. Richette, P. *et al.* Efficacy of tocilizumab in patients with hand osteoarthritis: double blind,
520 randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Ann. Rheum. Dis.* **80**, 349–355 (2021).
- 521 16. Chevalier, X. & Eymard, F. Anti-IL-1 for the treatment of OA: dead or alive? *Nat. Rev.*
522 *Rheumatol.* **15**, 191–192 (2019).
- 523 17. Kloppenburg, M. *et al.* Etanercept in patients with inflammatory hand osteoarthritis
524 (EHOA): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Rheum.*
525 *Dis.* **77**, 1757–1764 (2018).
- 526 18. Eitner, A. *et al.* Osteoarthritis-Induced Metabolic Alterations of Human Hip Chondrocytes.
527 *Biomedicines* **10**, 1349 (2022).
- 528 19. Bolduc, J. A., Collins, J. A. & Loeser, R. F. Reactive oxygen species, aging and articular
529 cartilage homeostasis. *Free Radic. Biol. Med.* **132**, 73–82 (2019).
- 530 20. Conde, J. *et al.* Identification of Novel Adipokines in the Joint. Differential Expression in
531 Healthy and Osteoarthritis Tissues. *PLoS One* **10**, (2015).
- 532 21. Ajekigbe, B. *et al.* Identification of long non-coding RNAs expressed in knee and hip
533 osteoarthritic cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* **27**, 694 (2019).
- 534 22. Kim, J.-H. H. *et al.* Regulation of the catabolic cascade in osteoarthritis by the zinc-ZIP8-
535 MTF1 axis. *Cell* **156**, 730–743 (2014).
- 536 23. Zhang, F. J., Luo, W. & Lei, G. H. Role of HIF-1 α And HIF-2 α In osteoarthritis. *Joint Bone Spine*
537 vol. 82 144–147 at <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2014.10.003> (2015).
- 538 24. Sengprasert, P. *et al.* Upregulation of antigen presentation function and inflammation in
539 chondrocytes by induction of proteoglycan aggrecan peptides (P16-31 and P263-280). *Clin.*
540 *Exp. Rheumatol.* **40**, 596–607 (2022).
- 541 25. Lv, Z. *et al.* Single cell RNA-seq analysis identifies ferroptotic chondrocyte cluster and
542 reveals TRPV1 as an anti-ferroptotic target in osteoarthritis. *EBioMedicine* **84**, (2022).

- 543 26. Tanner, L. B. *et al.* Four Key Steps Control Glycolytic Flux in Mammalian Cells. *Cell Syst.* **7**,
544 49-62.e8 (2018).
- 545 27. Yang, X. *et al.* Pyruvate Kinase M2 Modulates the Glycolysis of Chondrocyte and
546 Extracellular Matrix in Osteoarthritis. *DNA Cell Biol.* **37**, 271–277 (2018).
- 547 28. Soul, J. *et al.* Stratification of knee osteoarthritis: Two major patient subgroups identified
548 by genome-wide expression analysis of articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* **77**, 423–430
549 (2018).
- 550 29. Konttinen, Y. T. *et al.* Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the
551 superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **46**, 953–960 (2002).
- 552 30. Razaq, S., Wilkins, R. J. & Urban, J. P. G. The effect of extracellular pH on matrix turnover by
553 cells of the bovine nucleus pulposus. *Eur. Spine J.* **12**, 341 (2003).
- 554 31. Pike Winer, L. S. & Wu, M. Rapid Analysis of Glycolytic and Oxidative Substrate Flux of
555 Cancer Cells in a Microplate. *PLoS One* **9**, e109916 (2014).
- 556 32. Haas, R. *et al.* Lactate Regulates Metabolic and Pro-inflammatory Circuits in Control of T
557 Cell Migration and Effector Functions. *PLoS Biol.* **13**, (2015).
- 558 33. Mickiewicz, B. *et al.* Metabolic analysis of knee synovial fluid as a potential diagnostic
559 approach for osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* **33**, 1631–1638 (2015).
- 560 34. Damyanovich, A. Z., Styaples, J. R. & Marshall, K. W. 1H NMR investigation of changes in the
561 metabolic profile of synovial fluid in bilateral canine osteoarthritis with unilateral joint
562 denervation. *Osteoarthr. Cartil.* **7**, 165–172 (1999).
- 563 35. Maneiro, E. *et al.* Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human
564 articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **48**, 700–708 (2003).
- 565 36. Yang, Z. *et al.* Large-scale generation of functional mRNA-encapsulating exosomes via
566 cellular nanoporation. *Nat. Biomed. Eng.* (2019).
- 567 37. López-Armada, M. J. *et al.* Mitochondrial activity is modulated by TNF α and IL-1 β in normal
568 human chondrocyte cells. *Osteoarthr. Cartil.* **14**, 1011–1022 (2006).
- 569 38. Farah, H. *et al.* Differential Metabotypes in Synovial Fibroblasts and Synovial Fluid in Hip

- 570 Osteoarthritis Patients Support Inflammatory Responses. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 3266 (2022).
- 571 39. Garcia-Carbonell, R. *et al.* Critical Role of Glucose Metabolism in Rheumatoid Arthritis
572 Fibroblast-like Synoviocytes. *Arthritis Rheumatol.* **68**, 1614–1626 (2016).
- 573 40. Pucino, V. *et al.* Lactate Buildup at the Site of Chronic Inflammation Promotes Disease by
574 Inducing CD4+ T Cell Metabolic Rewiring. *Cell Metab.* **30**, 1055 (2019).
- 575 41. Kuhnke, A., Burmester, G. R., Krauss, S. & Buttgerit, F. Bioenergetics of immune cells to
576 assess rheumatic disease activity and efficacy of glucocorticoid treatment. *Ann. Rheum. Dis.*
577 **62**, 133–139 (2003).
- 578 42. Cronstein, B. N. & Aune, T. M. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory
579 arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2020 163 16**, 145–154 (2020).
- 580 43. McGarry, T. *et al.* JAK/STAT Blockade Alters Synovial Bioenergetics, Mitochondrial Function,
581 and Proinflammatory Mediators in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **70**, 1959–
582 1970 (2018).
- 583 44. Mathieu, S., Tournadre, A., Soubrier, M. & Sellam, J. Effect of Disease-Modifying Anti-
584 Rheumatic Drugs in Osteoarthritis: a Meta-Analysis. *Jt. bone spine* 105444 (2022).
- 585 45. Porée, B. *et al.* Interleukin-6 (IL-6) and/or soluble IL-6 receptor down-regulation of human
586 type II collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of Sp1·Sp3
587 ratio and of the binding activity of both factors to the COL2A1 promoter. *J. Biol. Chem.* **283**,
588 4850–4865 (2008).
- 589 46. Nasi, S., So, A., Combes, C., Daudon, M. & Busso, N. Interleukin-6 and chondrocyte
590 mineralisation act in tandem to promote experimental osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **75**,
591 1372–1379 (2016).
- 592 47. Charpentier, E. *et al.* 3' RNA sequencing for robust and low-cost gene expression profiling.
593 (2021).
- 594 48. Soumillon, M., Cacchiarelli, D., Semrau, S., Oudenaarden, A. van & Mikkelsen, T. S.
595 Characterization of directed differentiation by high-throughput single-cell RNA-Seq. *bioRxiv*
596 003236 (2014).
- 597 49. Köster, J. *et al.* Sustainable data analysis with Snakemake. *F1000Research* **2021 1033 10**, 33

- 598 (2021).
- 599 50. Rubiano-Labrador, C. *et al.* Proteogenomic insights into salt tolerance by a halotolerant
600 alpha-proteobacterium isolated from an Andean saline spring. *J. Proteomics* **97**, 36–47
601 (2014).
- 602 51. Pereira, S. *et al.* Low doses of gamma-irradiation induce an early bystander effect in
603 zebrafish cells which is sufficient to radioprotect cells. *PLoS One* **9**, (2014).
- 604 52. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for
605 RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 1–21 (2014).
- 606 53. Perez-Riverol, Y. *et al.* The PRIDE database resources in 2022: a hub for mass spectrometry-
607 based proteomics evidences. *Nucleic Acids Res.* **50**, D543–D552 (2022).
- 608
609

610 **Acknowledgments**

611 We are most grateful to the Genomics Core Facility GenoA, member of Biogenouest and
612 France Genomique and to the Bioinformatics Core Facility BiRD, member of Biogenouest
613 and the Institut Français de Bioinformatique (IFB) (ANR-11-INBS-0013) for the use of
614 their resources and their technical support.

615 We thank Jean-Charles Gaillard (ProGénomix Platform, CEA-Marcoule) for help with the
616 mass spectrometry analysis.
617

618 **Funding:** This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) through
619 the project KLOTHOA (ANR-18-CE14-0024-01; CV), by the region “Pays de la Loire” (RFI Bioregate,
620 GenOA, CV, AD), and by research grants from the Arthritis Foundation and the “Société Française
621 de Rhumatologie” (CV).

622 **Author contributions:**

623 Conceptualization: AD, CV, and JG

624 Methodology: AD, CP, CV, FB, JA, JG, MAB, and NB

625 Investigation: AC, AD, JA, MG, NB, and OR

626 Samples providers: AH and DW

627 Supervision: AD, CV, JG, and YM

628 Writing—original draft: AD and CV

629 Writing—review & editing: AD, CV, JA, JG, MAB, and NB
630

631 **Competing interests:**

632 The authors declare that they have no competing interests

633 **Data and materials availability:**

634 [Proteomics data deposition](#)

635 The mass spectrometry and proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange
636 Consortium via the PRIDE (53) partner repository with the dataset identifiers PXD037145 and
637 10.6019/PXD037145.

638 [Transcriptomic data deposition](#)

639 All sequencing 3' SRP data are publicly available via the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO)
640 using the accession number GSE215039.

Figures and Tables

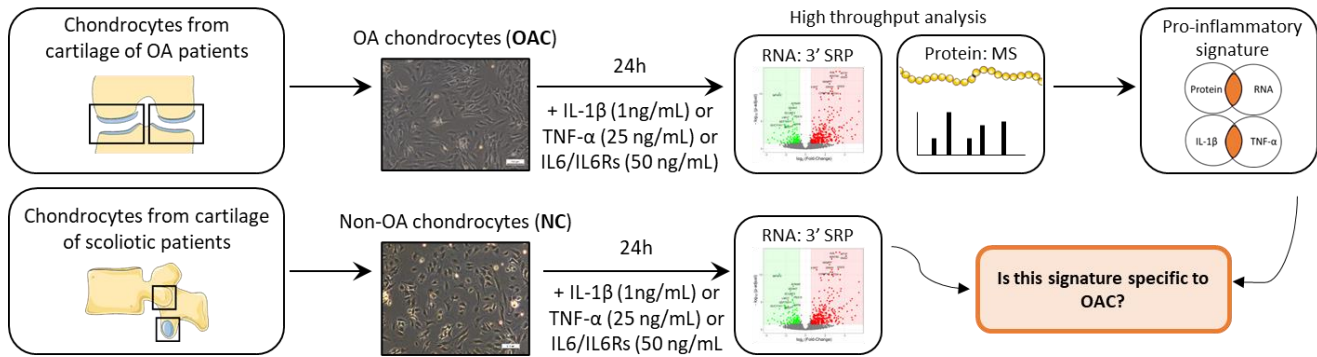
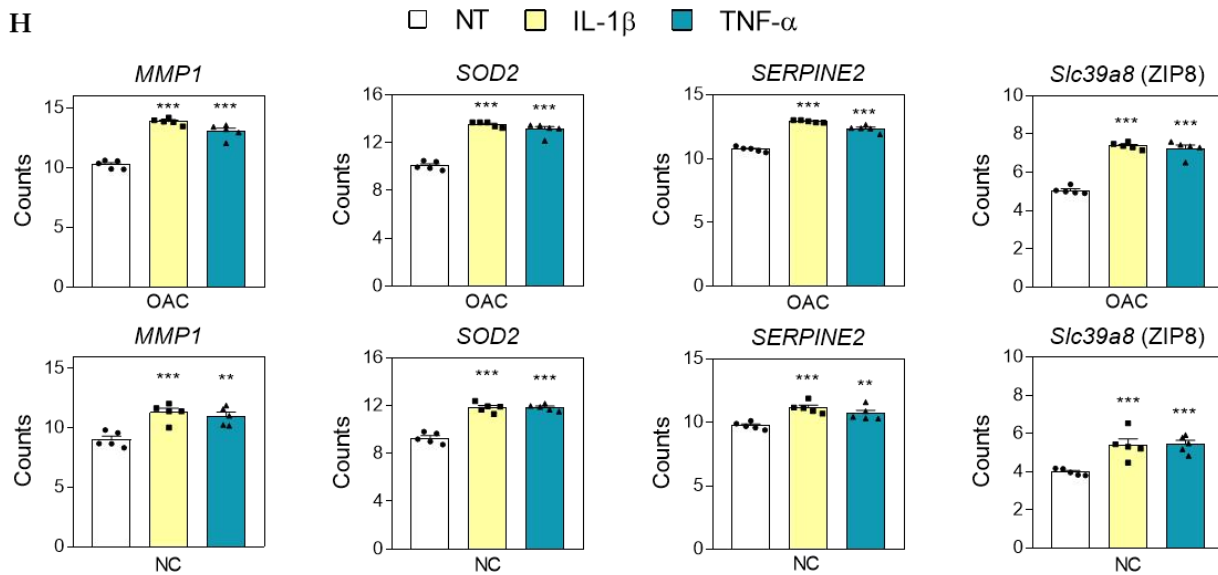
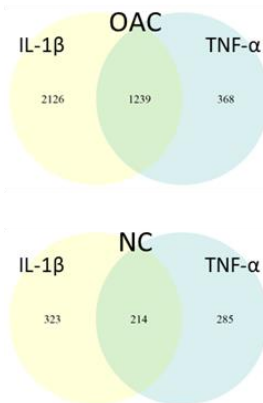
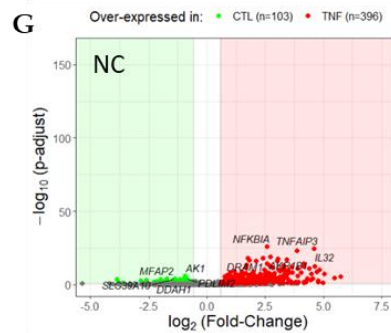
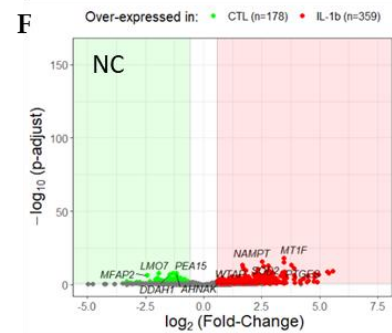
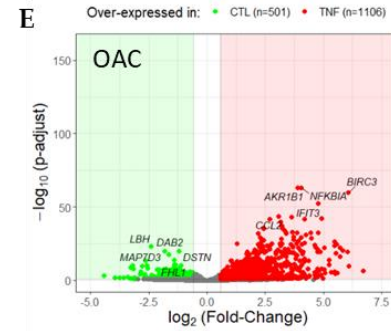
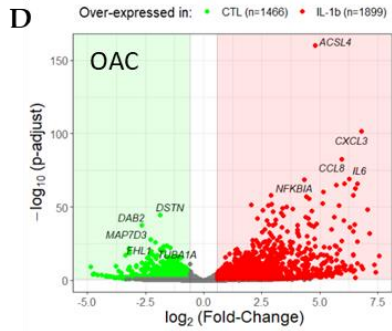
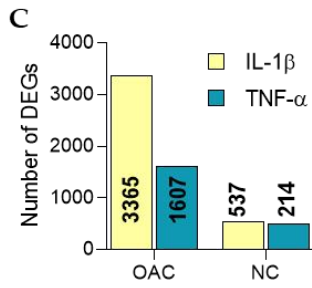
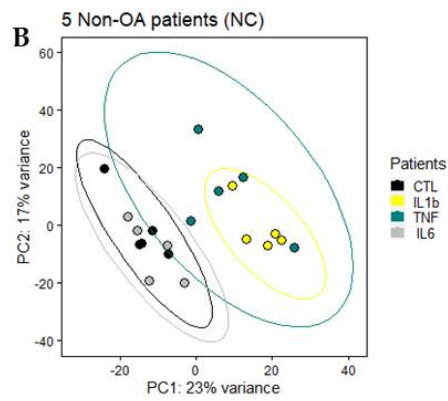
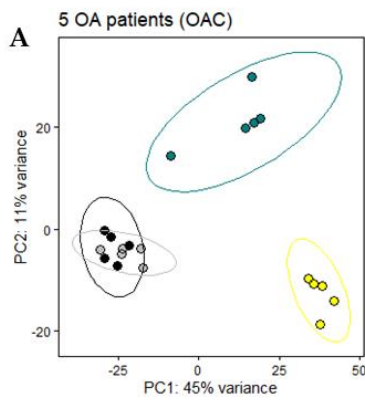
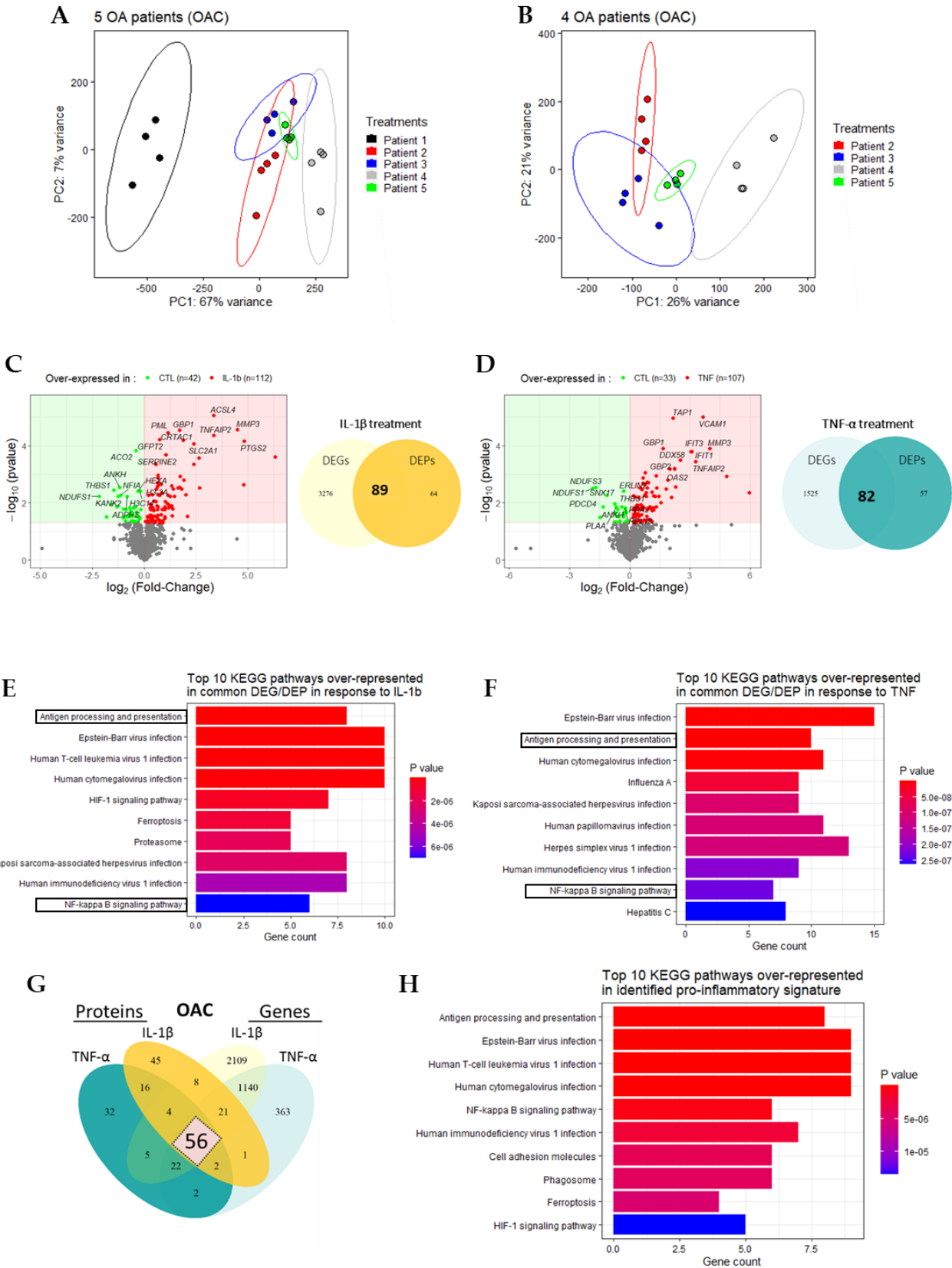


Fig. 1 Overview of the study design. OA chondrocytes (OACs) and non-OA chondrocytes (NCs) were treated for 24 h with or without pro-inflammatory cytokines. A multi-omic (RNA 3' SRP and protein MS) approach was used in OACs to identify a pro-inflammatory signature. Then, NC transcriptomics data were compared to the OAC pro-inflammatory signature to define disease-specific expression features.



650 **Fig. 2 OAC and NC RNA-seq data.** (A, B) Principal component analysis (PCA) was performed on the
651 expression data of OAC (A) and NC samples (B). The first two eigenvalues were plotted with data
652 ellipses for each treatment. (C) Summary of the number of DEGs in each condition and DEGs
653 common between IL-1 β and TNF- α treatments highlighted by Venn diagrams. (D, E, F, G) Volcano
654 plots representing DEGs (p -adjust < 0.10; $\log_2(\text{Fold-Change}) > |0.58|$) in OACs (D, E) and NCs (F,
655 G) in response to 1 ng/mL IL-1 β (D, F) or 25 ng/mL TNF- α (E, G). (H) Histograms representing
656 normalized *MMP1*, *SOD2*, *SERPINE2*, and *Slc39a8* (ZIP8) gene counts in OACs and NCs; ** $P < 0.01$
657 and *** $P < 0.001$, versus untreated condition using multiple t-tests with Benjamini & Hochberg
658 correction; N = 5 per group. Values are expressed as means \pm SEM.



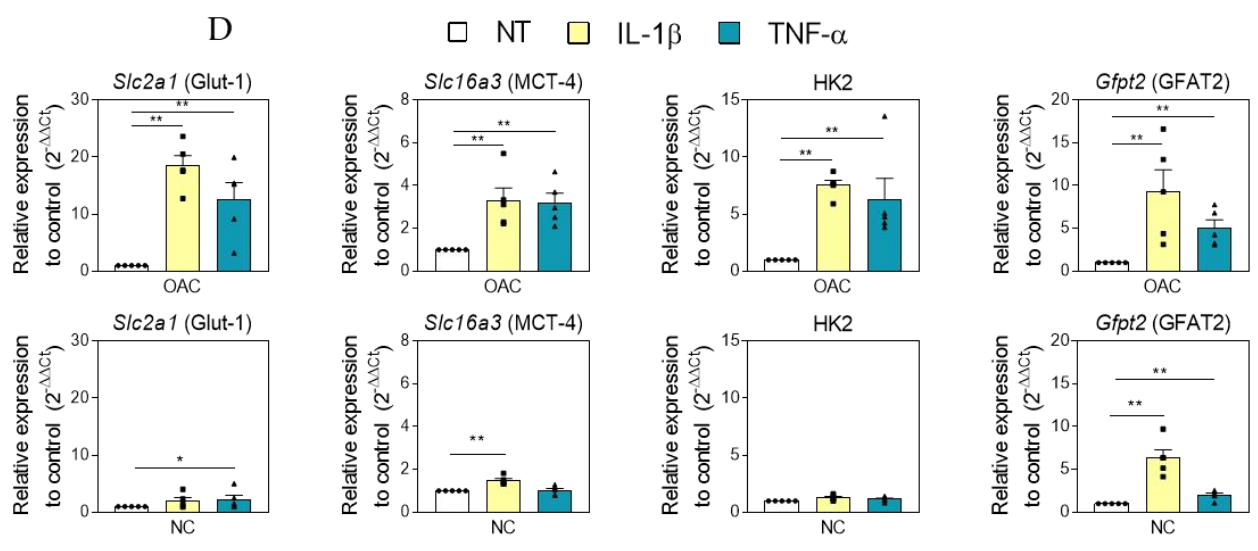
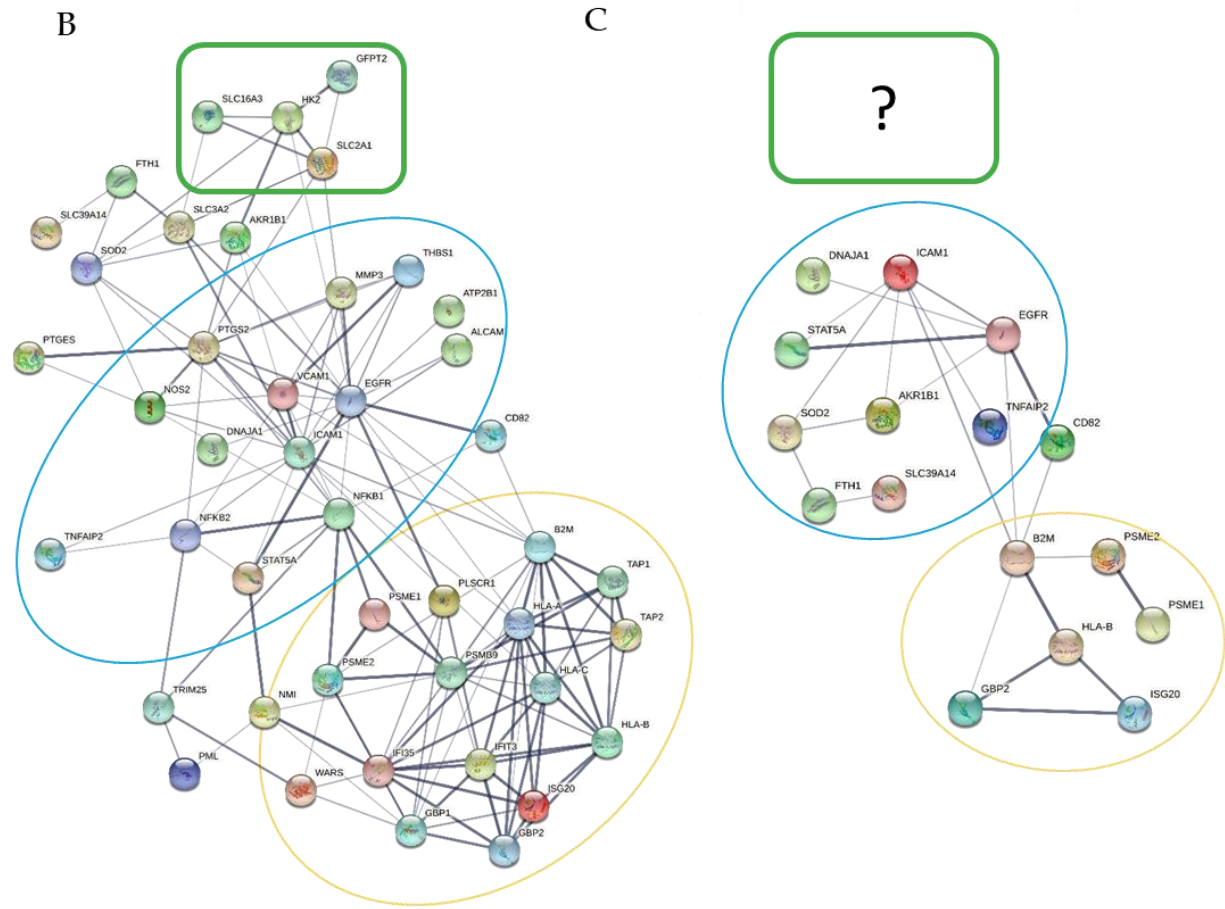
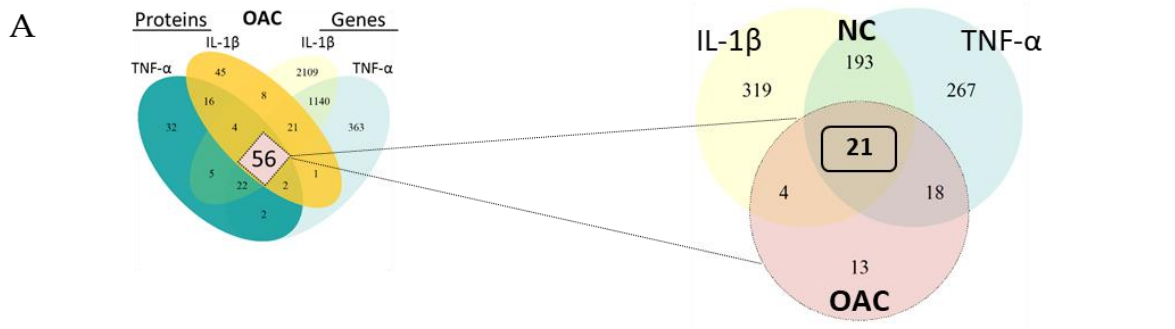
660

661

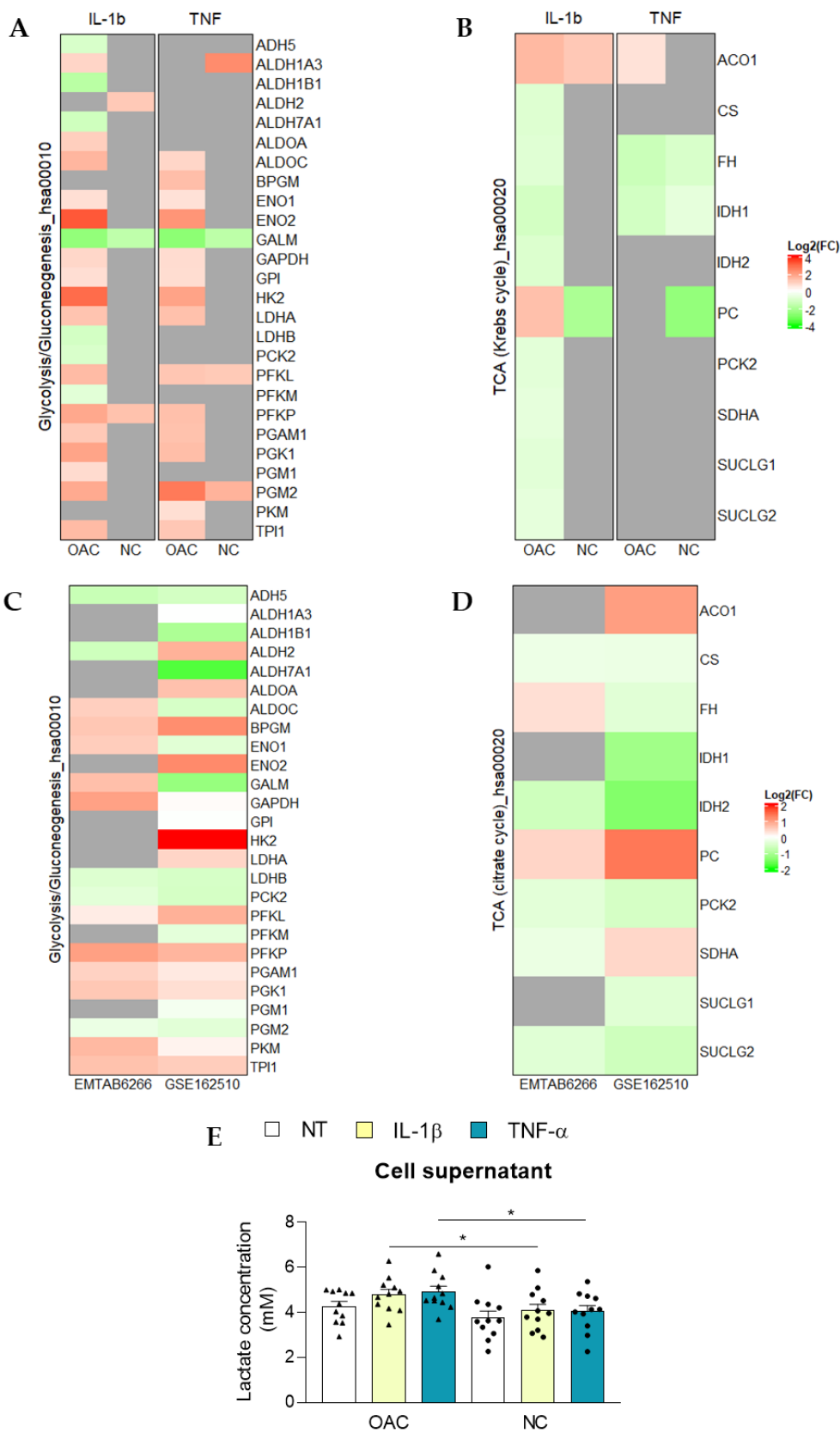
662

Fig. 3 Definition of the canonical pro-inflammatory signature in OACs. (A, B) PCAs performed on the protein expression data from (A) 5 OA patients or (B) the 4 selected patients. The first two

663 eigenvalues were plotted with data ellipses for each patient. **(C, D)** Volcano plots representing
664 DEPs ($p\text{-value} < 0.05$; $|\log_2(\text{Fold-Change})| > 0$) and Venn diagram highlighting DEPs and DEGs
665 matched in OAC in response to **(C)** 1 ng/mL IL-1 β , or **(D)** 25 ng/mL TNF- α compared to the
666 untreated condition. **(E, F)** KEGG enrichment analysis based on DEGs/DEPs in response to **(E)** IL-
667 1 β or **(F)** TNF- α . **(G)** Venn diagram highlighting 56 DEGs/DEPs common between IL-1 β and TNF- α
668 responses. **(H)** KEGG enrichment analysis using the list of 56 matched DEPs/DEGs.



670 **Fig. 4 Identification of a specific feature of OACs.** (A) Venn diagram showing the 21 common DEGs
671 among the 56 defining the pro-inflammatory signature of OACs and TNF- α and IL-1 β responses in
672 NCs. (B) Protein-protein network analysis using the pro-inflammatory signature identified in OACs
673 (C) and using the 21 DEGs also found in response to IL-1 β and TNF- α treatments in NCs. (D) RT-
674 qPCR analysis of Glut-1, MCT-4, HK2, and GFAT2 expression in OACs and NCs after 24 h of IL-1 β or
675 TNF- α treatment; *P < 0.05, ** P<0.01 using the Mann–Whitney test; N= 5 per group. Values are
676 expressed as means \pm SEM



677

678 **Fig. 5 Evidence of an OAC-specific metabolic switch.** (A, B) Heatmaps displaying the $\log_2(\text{Fold}$
 679 $\text{Change})$ in OACs or NCs for genes annotated in the KEGG database for (A) glycolysis/neo-
 680 glucogenesis and (B) the Krebs cycle (TCA). Heatmaps from the public transcriptome dataset (E-

681 MTAB-6266 and GSE162510) highlighting glycolysis (C) and TCA (D) gene modulation. (E) Lactate
682 measurement in OAC (N=11) and NC (N=11) supernatants; *P < 0.05 using the Mann–Whitney
683 test; N= 11 per group. Values are expressed as means ± SEM.

684

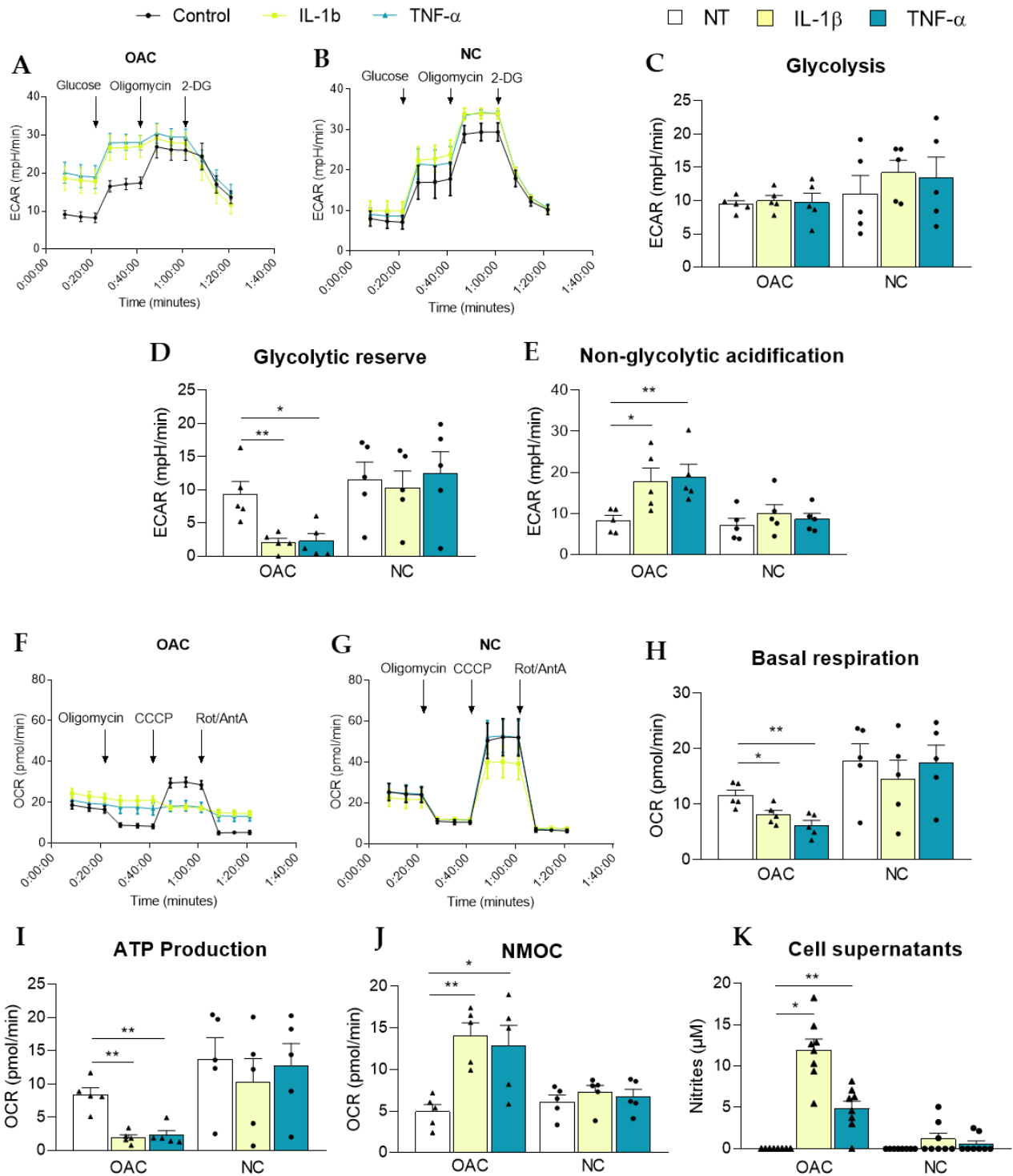


Fig. 6 Investigation of OAC-specific functional metabolic changes. (A-E) Seahorse[®] assay evaluating ECAR measurements in the glycolysis stress test in OACs (A) and NCs (B). (C) Quantification of glycolysis, (D) glycolytic reserve, and (E) non-glycolytic acidification from the glycolysis stress tests. (F-J) Seahorse[®] assay evaluating OCR measurements in the mitochondrial stress assay in OACs (F) and NCs (G). (H) Quantification of basal respiration, (I) ATP production, and (J) non-mitochondrial oxygen consumption (NMOC) from the mitochondrial stress assay. (K) Nitrite measurements in OAC and NC supernatants; *P < 0.05, **P < 0.01 or ***P < 0.001 using the Mann-Whitney

686
687
688
689
690
691
692
693
694

695
696

test; N= 5 (Seahorse[®] assays) or N=8 (nitrite measurements) per group. Values are expressed as means \pm SEM

Name	OAC: Transcriptomics				OAC: Proteomics				NC: Transcriptomics			
	TNF- α		IL-1 β		TNF- α		IL-1 β		TNF- α		IL-1 β	
	Log2(FC)	Adj. p-value	Log2(FC)	Adj. p-value	Log2(FC)	P-value	Log2(FC)	P-value	Log2(FC)	Adj. p-value	Log2(FC)	Adj. p-value
<i>AKR1B1</i>	3.89	7.46E-64	2.63	7.13E-27	0.78	8.80E-04	0.64	1.95E-03	2.74	8.23E-20	1.79	3.46E-07
<i>APOL2</i>	1.81	8.64E-13	1.63	8.64E-10	0.87	1.75E-02	0.74	4.98E-02	1.25	5.75E-05	0.77	9.05E-02
<i>B2M</i>	1.37	1.58E-09	1.69	2.72E-13	0.68	1.38E-02	0.49	4.98E-02	1.00	6.66E-07	0.77	1.47E-03
<i>CD82</i>	3.41	1.56E-32	3.62	3.42E-34	1.17	1.54E-02	2.00	5.21E-03	2.10	3.35E-04	1.88	6.01E-03
<i>DNAJA1</i>	0.92	6.91E-07	1.07	1.02E-08	0.44	1.75E-02	0.44	1.75E-02	0.86	2.96E-04	0.73	9.26E-03
<i>EGFR</i>	1.59	3.85E-11	1.42	2.63E-08	1.26	5.99E-03	1.26	5.99E-03	1.69	3.96E-03	1.31	9.11E-02
<i>FNDC3B</i>	0.92	4.46E-06	1.42	2.39E-13	0.41	1.48E-02	0.45	8.85E-03	0.79	4.74E-02	1.39	3.04E-05
<i>FTH1</i>	2.44	4.35E-36	2.72	2.20E-41	0.63	1.38E-02	0.58	3.31E-03	1.70	5.55E-14	1.71	3.26E-12
<i>GBP2</i>	2.30	2.48E-08	3.81	4.48E-21	2.24	6.37E-04	2.65	2.75E-04	2.01	4.37E-04	1.56	3.23E-02
<i>GFPT2</i>	1.08	1.16E-07	2.90	1.81E-58	0.52	2.98E-03	0.75	6.04E-05	1.16	1.72E-02	2.17	1.85E-07
<i>HLA-B</i>	2.21	1.93E-12	2.10	1.87E-10	0.88	2.97E-03	0.69	3.81E-02	1.67	2.58E-08	1.08	5.39E-03

<i>ICAM1</i>	4.65	1.56E-23	4.62	2.12E-21	4.82	1.21E-03	4.79	2.31E-03	2.52	7.06E-07	1.45	4.32E-02
<i>ISG20</i>	3.71	1.67E-19	4.08	7.24E-22	1.46	5.99E-03	1.46	5.99E-03	2.68	9.94E-09	1.38	4.71E-02
<i>PSME1</i>	2.19	4.14E-25	1.74	9.07E-15	0.68	2.02E-03	0.72	2.24E-03	1.68	2.98E-12	0.87	7.49E-03
<i>PSME2</i>	2.35	4.83E-28	1.81	1.95E-15	0.36	1.34E-02	0.36	1.63E-02	1.82	1.82E-17	0.81	6.13E-03
<i>PTGES</i>	3.41	2.87E-33	4.55	2.64E-56	1.12	4.49E-02	1.32	1.30E-02	3.09	1.23E-10	3.79	4.04E-14
<i>SERPINE2</i>	2.21	1.16E-32	2.92	2.00E-52	0.69	1.49E-02	1.04	2.09E-04	1.41	8.09E-03	1.94	1.22E-04
<i>SLC39A14</i>	2.44	6.94E-28	2.98	3.84E-38	0.87	1.89E-03	0.82	2.23E-03	1.99	2.65E-09	2.35	2.72E-11
<i>SOD2</i>	4.18	2.90E-42	4.65	4.83E-48	1.19	5.62E-03	1.32	2.56E-03	3.42	6.68E-18	3.46	1.02E-15
<i>STAT5A</i>	0.84	1.25E-02	1.37	1.44E-06	1.81	3.24E-03	1.91	1.61E-03	1.56	8.47E-05	1.02	9.38E-02
<i>TNFAIP2</i>	4.08	5.05E-25	4.15	5.59E-24	3.29	3.57E-04	3.36	4.34E-05	3.29	1.32E-13	1.87	1.11E-03
<i>ACSL3</i>	1.36	7.07E-06	1.68	2.01E-08	0.45	6.79E-03	0.66	1.08E-03				
<i>ALCAM</i>	2.59	2.28E-14	1.92	1.64E-07	1.26	5.99E-03	1.14	5.42E-03				
<i>ANKH</i>	-1.08	1.83E-03	-1.00	4.78E-03	-0.68	1.38E-02	-1.19	2.90E-03				
<i>ATP2B1</i>	2.20	1.60E-12	3.00	1.86E-21	0.41	2.36E-02	0.38	5.21E-03				
<i>CRTAC1</i>	1.50	3.92E-05	2.43	1.99E-12	1.32	1.14E-03	1.87	6.51E-05			2.09	1.51E-02
<i>DTX3L</i>	2.17	8.01E-19	1.80	4.20E-12	1.26	5.99E-03	1.00	1.75E-02	1.78	6.66E-07		

<i>FAM162A</i>	1.93	4.31E-09	2.22	3.94E-11	0.87	1.75E-02	0.87	1.75E-02				
<i>GBP1</i>	2.69	3.78E-14	4.10	1.24E-30	1.65	1.24E-04	1.72	2.85E-05	1.55	4.72E-04		
<i>HK2</i>	1.91	1.40E-08	2.92	2.26E-19	0.66	1.37E-03	0.66	1.37E-03				
<i>HLA-A</i>	1.46	2.42E-04	1.41	4.76E-04	0.81	4.42E-03	0.48	4.39E-02	1.39	4.62E-02		
<i>HLA-C</i>	1.60	3.96E-10	1.53	1.02E-08	0.94	1.98E-03	0.66	5.25E-03	1.36	8.01E-04		
<i>IFI35</i>	2.78	1.12E-25	1.98	3.46E-12	2.00	6.43E-04	1.38	1.67E-02	2.27	5.49E-08		
<i>IFIT3</i>	4.78	7.25E-53	3.41	4.73E-25	3.05	1.61E-04	2.10	2.92E-02	3.63	1.72E-12		
<i>MMP3</i>	2.95	3.06E-20	4.05	9.13E-35	4.00	1.25E-04	4.49	2.77E-05			2.35	2.48E-02
<i>NFIA</i>	-1.61	8.43E-08	-2.01	2.06E-10	-0.65	3.00E-02	-1.14	5.42E-03				
<i>NFKB1</i>	1.54	5.20E-10	2.44	7.06E-25	1.00	1.50E-02	1.13	1.08E-02	1.42	7.66E-04		
<i>NFKB2</i>	2.71	1.28E-03	2.93	3.25E-04	1.91	1.61E-03	1.91	1.61E-03	2.03	8.39E-02		
<i>NMI</i>	1.81	1.36E-14	1.97	2.02E-16	1.00	1.38E-02	0.74	4.98E-02	1.47	8.92E-05		
<i>NOS2</i>	4.88	4.95E-20	5.43	7.54E-23	5.95	4.49E-03	6.32	2.45E-04	2.26	6.64E-02		
<i>PLSCR1</i>	2.30	3.91E-20	1.55	1.28E-08	1.00	1.38E-02	1.00	1.38E-02	1.92	4.17E-08		
<i>PML</i>	2.02	1.20E-06	1.86	1.30E-05	1.10	4.29E-03	1.15	3.60E-05	1.17	8.78E-02		
<i>PSMB9</i>	3.21	4.05E-29	3.06	2.19E-25	0.83	5.99E-03	0.74	5.42E-03	2.55	1.61E-07		

<i>PTGS2</i>	1.71	7.32E-05	5.85	1.80E-51	1.46	5.99E-03	4.83	6.86E-05			2.51	1.37E-03
<i>SLC16A3</i>	1.03	8.98E-02	1.08	5.33E-02	0.55	4.36E-02	0.62	3.28E-02				
<i>SLC2A1</i>	3.39	1.03E-16	3.79	2.26E-19	2.29	2.83E-03	2.39	8.60E-05				
<i>SLC3A2</i>	0.72	2.46E-03	1.21	1.23E-08	0.34	1.23E-02	0.56	4.47E-04				
<i>SMS</i>	1.26	3.16E-08	2.65	1.92E-35	0.29	4.98E-02	0.35	1.75E-02				
<i>TAP1</i>	3.09	5.86E-16	3.42	7.08E-19	2.17	1.08E-05	1.74	1.21E-03	2.11	3.63E-04		
<i>TAP2</i>	2.47	1.19E-12	2.71	9.54E-15	1.91	1.61E-03	1.32	1.38E-02	1.25	1.13E-02		
<i>TENT5A</i>	1.31	7.75E-11	1.47	1.16E-12	1.32	1.38E-02	1.17	1.54E-02				
<i>THBS1</i>	-0.68	7.20E-04	-0.87	8.91E-06	-0.74	1.08E-02	-1.47	3.54E-03				
<i>TRIM25</i>	2.55	3.08E-10	1.82	3.67E-05	1.19	1.82E-02	0.89	4.36E-02	1.16	1.50E-02		
<i>UACA</i>	-1.39	2.47E-11	-1.20	5.22E-08	-1.49	3.28E-02	-1.81	3.05E-02			-1.17	1.89E-02
<i>VCAM1</i>	3.63	8.57E-44	1.97	4.06E-12	3.64	9.87E-06	2.66	3.08E-03	2.25	3.14E-07		
<i>WARS1</i>	1.98	4.16E-11	2.93	3.19E-22	0.41	4.17E-02	0.39	3.73E-02	0.86	4.46E-02		

697

698 **Table 1 List of the 56 common DEG/DEPS defining the canonical OAC pro-inflammatory signature.** Summarized log₂(Fold-Change) and
699 associated p-value for the 56 targets that define the OAC pro-inflammatory signature are shown. The first 21 genes, in bold, are also
700 differentially expressed in NCs in response to either IL-1β or TNF-α.

3. Perspectives de l'étude

Comme nous l'avons mis en évidence au cours de l'introduction de ce manuscrit, différentes études mettent en évidence une dérégulation du métabolisme énergétique dans les chondrocytes au cours de l'arthrose. Ainsi, une augmentation de l'activité glycolytique [228], [229] associée à des défauts mitochondriaux [252], [355] ont été mis en évidence au cours de l'arthrose. Dans ce contexte, notre étude a permis, d'une part, de renforcer le rôle de l'inflammation dans la mise en place de ce switch métabolique défini par une inhibition de l'utilisation de l'O₂ au profit de l'utilisation de la glycolyse, et d'autre part, de mettre en évidence le fait que ce mécanisme soit spécifique des chondrocytes issus d'une articulation arthrosique.

La première partie de ce travail s'est appuyée sur une analyse transcriptomique réalisée dans deux types de chondrocytes primaires humains utilisés au laboratoire. D'une part, les chondrocytes issus d'articulations arthrosiques, les OACs, récupérées lors d'opération de pose de prothèse totale de genou et d'autre part, des chondrocytes non-arthrosiques, les NCs, récupérés sur les apophyses transverses de jeunes patients se faisant opérer de pathologies telles que la scoliose. Comme on s'y attend, ces deux types de chondrocytes ont un transcriptome différent, qui reflète aussi leur comportement en culture (**Figure 20**). En effet, nous avons pu remarquer en culture que les NCs prolifèrent plus rapidement que les OACs. Il serait alors intéressant de pouvoir caractériser plus spécifiquement, par des analyses histologiques [356] mais aussi de cytométrie en flux [357], ces deux types de chondrocytes afin de comprendre plus précisément ce qui les différencie au-delà de leur provenance d'une articulation arthrosique ou non. En parallèle, cela pourrait aussi être complété par la caractérisation d'autres types de chondrocytes articulaires provenant d'autres articulations comme la hanche ou les doigts mais aussi d'autres sources comme des donneurs post-mortem d'âges différents, afin de pouvoir éventuellement corréler l'expression de certains gènes ou de certaines protéines à des facteurs comme l'âge ou l'articulation.

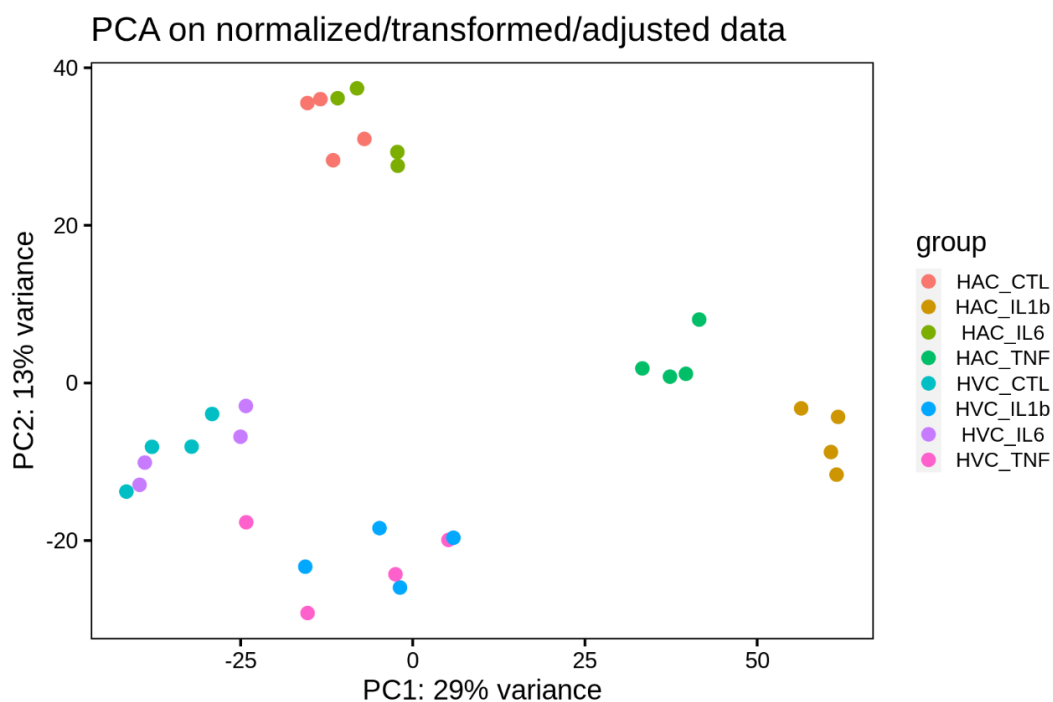


Figure 20 : Analyse en composante principale (Composantes 1 et 2) des données de transcriptomique obtenues dans les OACs (HAC) et dans les NCs (HVC).

Malgré cette interrogation, l'approche multi-omique combinant la transcriptomique et la protéomique sur lysat cellulaire dans les OACs a permis d'identifier 56 cibles dérégulées tant au niveau transcriptomique que protéomique en réponse à l'IL-1 β et au TNF- α . En dehors des protéines associées au métabolisme, sur lesquelles notre étude s'est focalisée, plusieurs de ces protéines forment un groupe associé à la présentation antigénique. Bien qu'émettre des hypothèses quant au rôle de cette hypothétique fonction dans des cellules qui résident seules dans leur tissu ne soit pas intuitif, d'autres études ont mis en évidence la capacité des chondrocytes à présenter des antigènes [358], [359]. Aller explorer plus largement le rôle de cette fonction dans l'arthrose pourrait alors peut-être permettre d'élucider des mécanismes encore méconnus.

Concernant le lien spécifique entre les modifications métaboliques et l'inflammation que nous avons mis en évidence dans les OACs, il pourrait être intéressant d'aller plus loin dans la compréhension de ce mécanisme. En effet, bien que le lien entre shift métabolique et inflammation soit déjà très décrit dans la littérature dans d'autres contextes comme notamment le cancer [360], le fait de ne pas observer ce mécanisme dans les NCs soulève de nombreuses questions, notamment en lien avec nos conditions d'expérimentation, telles que le temps et la dose de traitement pro-inflammatoire. De précédentes études ont montré

l'influence du temps et de la dose sur les réponses inflammatoires observées dans les chondrocytes [361], [362]. Il serait alors intéressant d'éprouver le fait que d'évoluer dans un contexte inflammatoire depuis longtemps puisse rendre les OACs plus sensibles que les NCs à ces modifications métaboliques. Pour cela, nous pourrions alors mettre les NCs en contact prolongé avec de très faibles doses d'IL-1 β et/ou de TNF- α avant de réaliser de nouveau des analyses fonctionnelles du métabolisme, ou encore augmenter les doses d'IL-1 β et de TNF- α utilisées pour voir si cela permet finalement d'induire le même shift métabolique dans les NCs que dans les OACs. D'autre part, des analyses histologiques complémentaires permettant de valider une corrélation entre les scores d'inflammation (score de Krenn) et/ou d'atteinte du cartilage (OARSI) avec l'expression des marqueurs observés en protéomique (MCT-4, Glut-1 et HK2) sont en cours. Cela pourrait permettre de renforcer le lien entre l'inflammation et les dérégulations métaboliques dans le contexte de l'arthrose.

Les mitochondries, très impliquées dans le métabolisme énergétique cellulaire, sont le siège de différentes altérations au cours de l'âge comme au cours de l'arthrose [246], [252], [363]. Aller observer l'aspect, ainsi que le nombre des mitochondries des OACs et des NCs soumis ou non à des stress pro-inflammatoires plus ou moins prolongés pourraient alors renforcer l'hypothèse que les dérégulations mitochondriales puissent être le mécanisme initiateur des dérégulations métaboliques. Une analyse de l'ADN mitochondrial pourrait également compléter ce travail voire ouvrir de nouvelles hypothèses de recherche.

Pour aller plus loin, nous pouvons aussi nous questionner sur les conditions de notre expérimentation. En effet, nous nous sommes placés à une tension en oxygène de 21% et dans des conditions de fortes concentrations de glucose dans le milieu en comparaison des conditions physiologiques, ce qui tend à favoriser les conditions de mise en place de l'effet « Crabtree » [210]. On pourrait alors questionner le lien qu'il existe entre ces conditions expérimentales et les dérégulations observées en modifiant ces paramètres de culture. Notamment, une étude précédente a permis de mettre en évidence que le remplacement du glucose dans le milieu par du galactose permettait de réduire les réponses inflammatoires observées dans les chondrocytes [217]. La présence excessive de glucose n'explique cependant pas à elle seule les réponses que l'on a pu observer dans notre étude et qui ont aussi été renforcées et validées dans le jeu de données publiques E-MTAB-6266 [364] comparant du cartilage sain et arthrosique sans avoir été en contact avec du milieu de culture.

Finalement, une analyse métabolomique permettrait également d'avoir une vue d'ensemble de la régulation du métabolisme cellulaire, et non pas seulement du métabolisme énergétique, médiée par l'inflammation.

Bien que ces résultats n'aient pas été approfondis et présentés dans ce manuscrit, j'ai aussi pu étudier le transcriptome d'iMACs traités ou non, comme les OACs et les NCs, avec de l'IL-1 β , du TNF- α ou de l'IL-6 couplé à son récepteur soluble. Il sera alors intéressant de mettre en perspective les résultats obtenus dans des chondrocytes murins par rapport à ceux obtenus dans les chondrocytes humains afin de pouvoir par exemple identifier des hypothèses quant aux différences observées entre les mécanismes cellulaires murins et humains associés à l'arthrose.

B. Evaluation de différents AAVr en injection intra-articulaire chez la souris

1. Rationnel de l'étude

Dans la partie introductive de cette thèse, nous avons souligné, en raison de l'incidence grandissante de l'arthrose [8] l'urgence de développer des DMOADs [365]. Pour cela il faut alors tout d'abord identifier des cibles thérapeutiques d'intérêt, et d'autre part développer des moyens de les transférer *in vivo* en site articulaire et de permettre leur activité sur le long terme. En effet, l'arthrose est une maladie chronique, au développement lent [366] et nécessite alors des molécules aux effets thérapeutiques durables [345]. D'autre part, la répétition des injections intra-articulaires n'est pas envisageable car cela peut favoriser l'inflammation et les dommages articulaires. Dans ce contexte, la persistance des molécules au site d'injection peut être favorisée par leur délivrance *via* des systèmes tels que des nanoparticules métalliques [276], des liposomes [277] ou des micelles [278]. D'autres stratégies, comme la thérapie cellulaire [310] ou encore la thérapie génique peuvent aussi être envisagées. La thérapie génique présente l'avantage de pouvoir permettre le transfert d'acides nucléiques dans les cellules cibles qui peuvent alors l'utiliser sur le long terme [347], [348]. Plusieurs outils de thérapie génique peuvent alors être utilisés comme des vecteurs synthétiques, ou des vecteurs dérivés de lentivirus, d'adénovirus ou encore de virus adéno-associés (AAVr). Parmi ces stratégies, l'utilisation d'AAVr apparaît intéressante au vue de la faible immunogénicité associée à l'utilisation de ces vecteurs, l'expression prolongée du transgène qu'ils permettent et leur caractère non intégratif évitant de potentiels effets mutagènes [349]. Ainsi, pouvoir disposer d'informations suffisantes sur le tropisme articulaire ainsi que la bio-distribution de différents AAVr est nécessaire pour de futurs développements thérapeutiques. En effet, la modification des éléments définissant un AAVr, la capside ou le transgène, peuvent influencer leur tropisme, leur efficacité de transduction ainsi que leur bio-distribution [367].

Les différents sérotypes naturels d'AAVr présentent un tropisme varié (**Table 5**). Dans l'articulation comme dans la littérature en général, l'AAV 2 est souvent le sérotype utilisé. Cela s'explique par le fait que ce soit l'un des premiers sérotypes à avoir été décrits. En revanche, la transduction des AAVr peut-être limitée par la présence d'anticorps neutralisants. Or, les anticorps neutralisants dirigés contre l'AAV 2 sont les plus répandus chez l'Homme (devant

l'AAV 5, l'AAV 9 et l'AAV 8) [368], et ils peuvent aussi être retrouvés dans le liquide synovial [369]. Dans ce contexte, l'AAV 5 s'est alors montré efficace pour le transfert de gènes dans l'articulation [370], [371]. De plus, l'utilisation de sérotypes hybrides, comme l'AAV 2.5 [187] ou l'AAV DJ [149] est très intéressante car ils présentent notamment l'avantage d'être très peu reconnus par les anticorps neutralisants [372] et ont été développés pour présenter des capacités de transduction supérieures aux AAVr naturels [373], [374].

L'optimisation du transgène est aussi importante pour favoriser l'expression de ce dernier. Les AAVr sont classiquement composés d'un transgène simple brin, cela représente une limite à l'expression de ce dernier qui doit alors dans un premier temps être répliqué avant de pouvoir être exprimé (**Figure 21**). Cela peut représenter une limite d'autant plus grande pour cibler des cellules qui ne sont pas prolifératives comme les chondrocytes. Dans ce contexte, le recours à un scAAV (*self-complementary AAV*) composé d'un double brin d'ADN peut être intéressant (**Figure 22**). Les scAAV sont alors souvent choisis dans des contextes articulaires [187], [353]. Pour autant, l'utilisation de scAAV limite la taille disponible pour l'insertion du transgène à ~2.2kb. Enfin, le choix du promoteur qui va permettre l'expression du transgène est aussi crucial et peut permettre de doubler la quantité de protéines finalement produites [188]. Lorsque cela est possible, le choix s'oriente vers un promoteur ubiquitaire pouvant médier une expression forte. Parmi ces promoteurs ubiquitaires le CMV est largement utilisé, pour autant l'expression médiée par le CMV semble controversée en fonction des types cellulaires et de l'environnement dans lequel il doit être fonctionnel [375], [376] c'est pourquoi notre étude initiale a utilisé le CAG, un autre promoteur ubiquitaire. En revanche, le CAG, présente lui l'inconvénient d'être un promoteur long (~1600 pb) en comparaison du promoteur CMV (~500 pb). Le promoteur CAG ne peut alors pas être utilisé pour la production d'AAVr avec un gène trop long. Ainsi, le CAG ne permet pas de produire des scAAV-GFP.

Dans notre étude nous avons donc étudié, d'une part, l'influence de la capsid sur la transduction du cartilage, en comparant différents sérotypes d'AAVr (Tableau 2), et d'autre part, l'influence de la structure du transgène sur l'efficacité de transduction et son expression. Dans ce but nous avons comparé le promoteur CMV au promoteur CAG ainsi que l'AAVr au scAAV. Pour cela, nous avons réalisés des expérimentations *in vitro* sur des chondrocytes primaires humains et murins et *in vivo* chez la souris (**Figure 21**).

2. Matériel et Méthodes

a. Culture cellulaire

(1) Isolation des chondrocytes primaires

Les chondrocytes primaires sont isolés à partir des déchets opératoires de patients se faisant poser des prothèses totales de genou (OACs) et à partir des genoux de jeunes souris C57BL/6 à P5/P6 (iMACs). La dissection des pièces de cartilage pour l'isolation des iMACs est effectuée selon Gosset et al. [377]. Concernant les OACs, conformément à la Déclaration d'Helsinki, les échantillons de cartilage articulaire humain ont été prélevés sur des patients après leur consentement éclairé, suivant la recommandation du Comité de protection des personnes des Pays de La Loire et approuvée par le ministère français de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (numéro d'enregistrement : DC-2017-2987).

Ainsi, de fines pièces de cartilages sont récupérées et placées dans de l'HBSS (Hanks' balanced salt solution, Biowest) avec 10% d'une solution de pénicilline-streptomycine (PS, 1000 U/mL, Thermo Fisher Scientific) à 37°C dans une atmosphère humidifiée avec 5% de CO₂. Ensuite, le cartilage est pré-digéré pendant 30 minutes dans une solution de collagénase à 0,2% (125 U/mg, C6885, Sigma-Aldrich) dans du DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, 31966-021, Gibco), avant d'être complètement digérés sur la nuit (~14h) dans une solution de collagénase à 0,03% dans du DMEM complétement digérés sur la nuit (~14h) dans une solution de collagénase à 0,03% dans du DMEM complétement avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Dominique Dutscher) et 1% PS (soit du milieu complet). Suite à cette digestion, les débris sont filtrés à travers un tamis cellulaire de 70 µm. Les OACs ainsi isolés sont ensemencés à une densité de 6.0×10^4 cellules/cm² pour être amplifiés. Les iMACs, eux, sont directement ensemencés pour les expérimentations suivantes.

(2) Transduction

La veille de l'infection, les chondrocytes sont ensemencés à 56 000 cellules/cm² en MW24. Le jour de l'infection, les cellules d'un puit sont décollées à la trypsine puis comptées afin de déterminer la quantité d'AAV à utiliser pour l'infection. Ainsi, le milieu complet est changé par du milieu complet contenant les AAV (**Tableau 2**) à une MOI (*multiplicity of infection*) de 1^{E3}, 1^{E4} ou 1^{E5}. Après 48h ou 72h d'infection, les cellules sont décollées à la trypsine avant d'être analysées au FACS.

AAV évalué	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i> (1 ^E 10 vg)	<i>In vivo</i> (3 ^E 10 vg)	<i>In vivo</i> (8 ^E 10 vg)
AAV 1-CAG-GFP	Oui	Oui		
AAV 2-CAG-GFP	Oui	Oui		Oui
AAV 5-CAG-GFP	Oui	Oui		Oui
AAV 8-CAG-GFP	Oui	Oui		Oui
AAV 9-CAG-GFP	Oui	Oui		Oui
AAV DJ-CAG-GFP	Oui	Oui		Oui
AAV 8-CMV-GFP			Oui	
AAV 9-CMV-GFP			Oui	
scAAV 8-CMV-GFP			Oui	

Tableau 2 : Récapitulatif des différents AAV évalués au cours de cette étude

(3) Analyse FACS (*Fluorescence activated cell sorting*)

Les cellules sont collectées et centrifugées 5 minutes à 300g, puis lavées aux PBS deux fois de suite. Finalement les cellules ainsi lavées sont remises en suspension dans du PBS/BSA 0,2% et placées dans des tubes de FACS (Falcon). La quantification des cellules GFP positive est réalisée sur un cytomètre BD LSRII appartenant à la plateforme Cytocell. Les données ont ensuite été analysées avec le logiciel FlowJo 10.6.1 (FlowJo).

b. *Expérimentation in vivo : Injections intra-articulaires*

(1) Aspect éthique et schéma expérimental

Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées conformément aux directives européennes pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoires (2010/63/EU) et à l'autorisation du ministère français de la recherche (APAFIS #21834 et #28686). Des souris mâles âgées de 9 à 10 semaines et hébergées en cages ventilées par 5 maximum sont soumises à une injection intra-articulaire des deux genoux. Après quoi, pendant 6 semaines, ces souris sont pesées et suivies 2 fois par semaine afin de surveiller la survenue d'éventuels points limites. 6 semaines après l'injection, les souris sont sacrifiées et les genoux, le foie, les poumons ainsi que la rate sont alors, directement placés dans de l'azote liquide pour les analyses moléculaires ou en paraformaldéhyde (PFA) 4% pour les analyses histologiques (**Figure 21**).

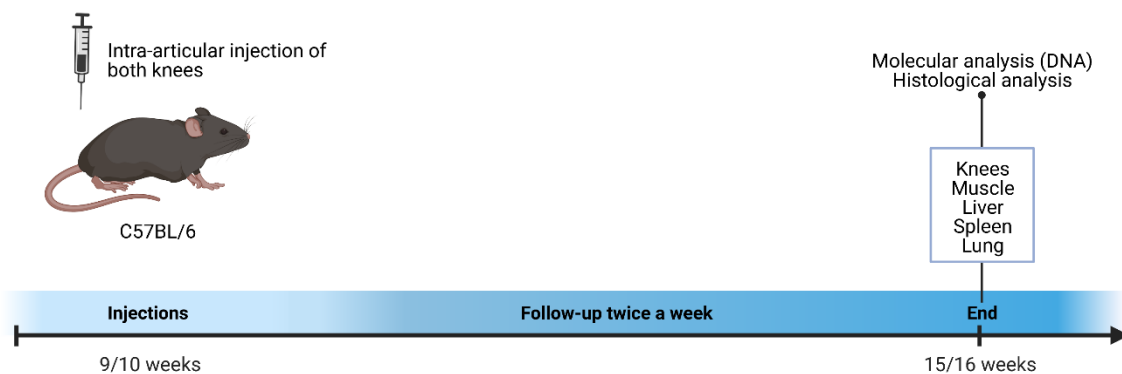


Figure 21 : Schéma expérimental des expérimentations d'injections intra-articulaires d'AAVs.

(2) Chirurgie et suivi

Pour commencer, une analgésie péri-opératoire a été réalisée avec des injections sous cutanées de Buprénorphine (0.1 mg/kg, soit 3 μ l de solution à 0.03mg/ml par g) et de meloxicam (5 mg/kg, soit 2,5 μ l de solution à 2 mg/mL par g) environ 30 minutes avant l'intervention chirurgicale. Les souris ont ensuite été anesthésiées par inhalation à l'isoflurane/oxygène (4% d'isoflurane/L d'air en induction puis 1 à 2 % d'isoflurane/L d'air en maintien d'anesthésie) et maintenues sur tapis chauffant le temps de l'intervention chirurgicale. Une courte incision a été réalisée au niveau du ligament rotulien. L'injection intra-articulaire de 5 μ L d'AAV (**Tableau 2**) a ensuite été réalisée à travers le ligament infra-patellaire à l'aide d'une seringue Hamilton et d'une aiguille de 26G. Des mouvements de flexion/extension ont été effectués pour permettre une répartition optimale du liquide injectée avant de refermer l'incision avec 1 à 2 points de suture. Les souris ont ensuite été placées dans une cage de réveil sur un tapis chauffant et observées jusqu'à leur réveil. Une fois vigile, les souris ont été remises avec leur groupe, puis observées et pesées 2 fois par semaine jusqu'à leur sacrifice. Six semaines après l'injection, les souris ont été sacrifiées puis les genoux, le foie, la rate et les poumons récupérés et soit conservés à sec à -80°C pour les analyses moléculaires, soit placés dans du PFA 4% pour les analyses histologiques.

(3) Analyses moléculaires

Les échantillons congelés à -80°C ont été placés dans du tampon de lyse du kit Genra Puregene Cell kit (Qiagen). Les genoux sont broyés à l'aide d'un Fast-Prep (MP biomedical, 24 5G) et les tissus mous avec un piston. L'ADN a ensuite été extrait selon les instructions du fournisseur, puis quantifié à l'aide d'un NanoDrop 1000 (Ozyme).

Des analyses en qPCR ont ensuite permis de déterminer le nombre de copies du transgène codant la GFP contenu dans chacun de nos échantillons a été déterminé à l'aide d'analyses en qPCR. Ainsi, 50 ng d'ADN ont été amplifiés à l'aide d'amorces spécifiques (**Tableau 3** Erreur ! Source du renvoi introuvable.) et le nombre de copies du transgène a été déterminé à l'aide d'une gamme réalisée à partir d'un vecteur exprimant la GFP et normalisé par le nombre de copies du gène murin de l'albumine.

mAlb1-Fw	ACATAGCTTGCTTCAGAACGGT
mAlb1-Rv	AGTGTCTTCATCCTGCCCTAAA
GFP-Fw	AGTCCGCCCTGAGCAAAGA
GFP-Rv	GCGGTCACGAACTCCAGC

Tableau 3 : Liste des amorces utilisées

(4) Analyses histologiques

Après avoir été explantés, les différents tissus ont été fixés pendant 24h dans du PFA à 4%. Les tissus mous ont ensuite été déshydratés puis imprégnés en paraffine, alors que les genoux ont été décalcifiés pendant 10 jours dans de l'EDTA 10% avant d'être imprégnés dans de l'OCT (Q path®) et congelés. Des coupes de 5µm de tissus mous ont été réalisées et disposées sur des lames traitées poly-L-lysine puis préparées pour observation selon le protocole ci-dessous :

Etape	Réactif	Durée d'incubation	Conditions
Déparaffinage	Bains de méthyl cyclohexane	3 X 5 Minutes	T°A
Déshydratation	Ethanol 100%	1 minute	T°A
Déshydratation	Ethanol 95%	1 minute	T°A
Déshydratation	Ethanol 75%	1 minute	T°A
Rinçage	H ₂ O	5 minutes	T°A
Rinçage	PBS 1X	5 minutes	T°A
Coloration noyaux	Hoescht (2 µg/mL)	10 minutes	T°A (à l'abri de la lumière)

Montage	ProLong™ Gold Antifade mountant – Invitrogen	-	T°A
---------	--	---	-----

Tableau 4 : Protocole de préparation des coupes en paraffine de 5µm de tissus mous avant observation.

Pour les genoux, des coupes de 8µm ont été effectuées à l'aide d'un cryostat puis les coupes ont été préparées pour observation selon le protocole ci-dessous :

Etape	Réactif	Durée d'incubation	Conditions
Attendre 10 minutes à l'abri de la lumière que les échantillons décongèlent			
Rinçage	PBS 1X	5 minutes	T°A
Coloration noyaux	Hoescht (2 µg/mL)	10 minutes	T°A (à l'abri de la lumière)
Montage	ProLong™ Gold Antifade mountant – Invitrogen	-	T°A

Tableau 5 : Protocole de préparation des coupes congelées de 8µm de tissus durs (genoux) avant observation.

Les lames ont ensuite été observées au moins 24h après le montage et les images acquises au Nanozoomer Hamamatsu (Plateforme Micropicell).

3. Résultats expérimentaux

a. Efficacité de transduction de 6 sérotypes d'AAVr in vitro sur des chondrocytes primaires

Dans un premier temps, nous avons comparé l'efficacité de transduction de différents sérotypes d'AAVr sur des chondrocytes primaires issus de genoux de patients arthrosiques (OACs), et sur des chondrocytes primaires issus des genoux de souris à P5/P6 (iMACs) (**Figure 22**). Nous avons évalué les AAV 1, AAV 2, AAV 5, AAV 8, AAV 9 et l'AAV DJ, un sérotype hybride composé de séquences de capsides issues des sérotypes 2, 8 et 9 [378]. Nous observons une nette différence d'efficacité de transduction dans les iMACs comparés aux OACs qui sont plus complexes à transduire *in vitro*. En effet, alors que l'AAV 1 et l'AAV DJ sont capables de transduire respectivement jusqu'à environ 60% et 90% des iMACs (**Figure 22A**), ils ne transduisent pas plus de 5% des OACs (**Figure 22B**). De plus, l'AAV 2 utilisé à une MOI de 1^{E5} qui ne transduit pas plus de 20% des OACs après 72 heures de mise en contact, est capable de transduire 50% des iMACs dans ces mêmes conditions.

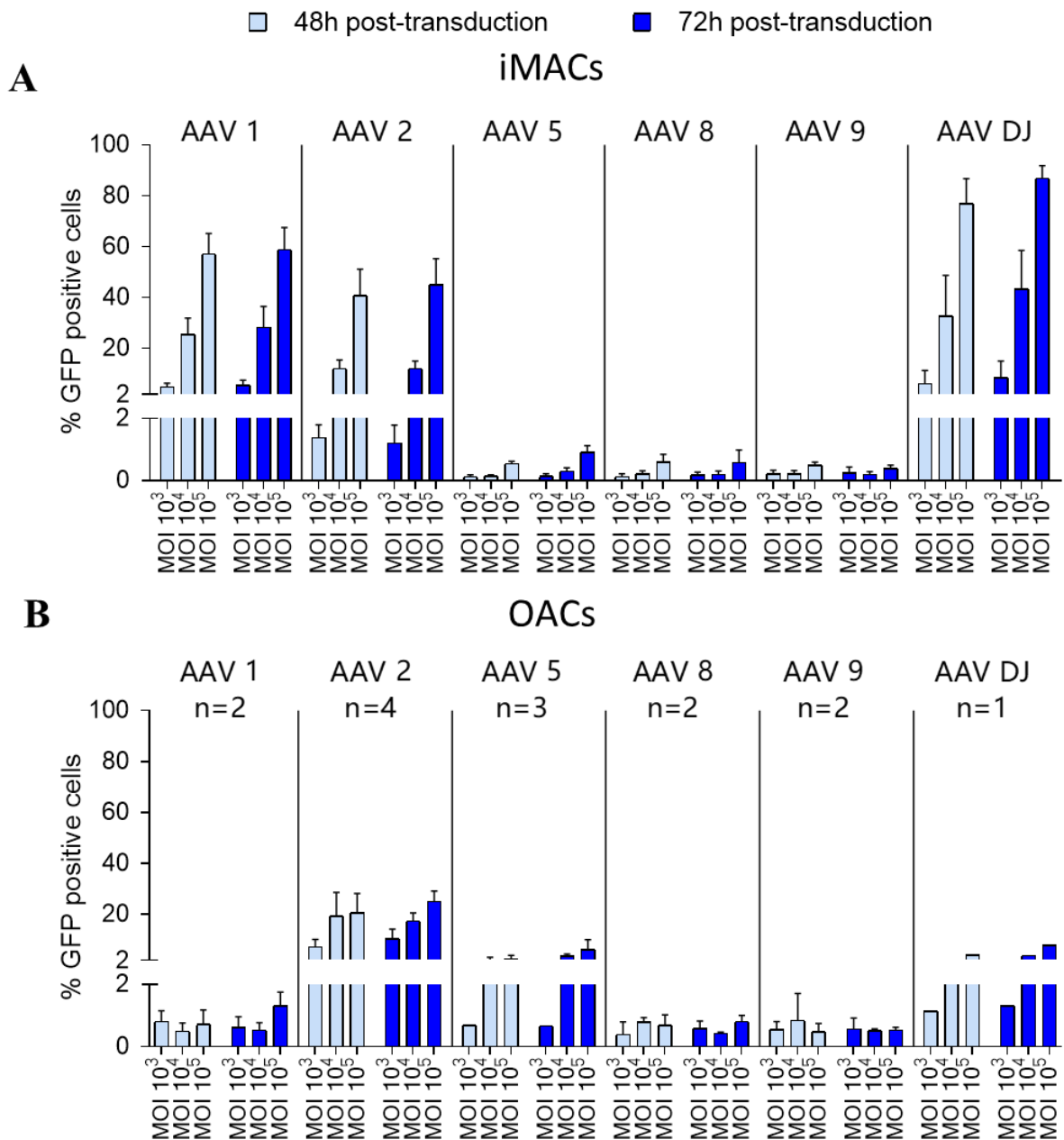


Figure 22 : Efficacité de transduction *in vitro* des AAV 1, 2, 5, 8, 9 et de l'AAV DJ dans des iMACs (A) et des OACs (B). Deux temps d'infection (48h et 72h), et trois quantités (MOI 1^{E3}, 1^{E4} et 1^{E5}) ont été évalués par des analyses FACS mettant en évidence le nombre de cellules exprimant la GFP dans chacun des conditions. iMACs, N=3 ; OACs, N=1 à 4 tels qu'indiqués sur la figure.

Nous observons également, que le nombre de cellules GFP positives, quelle que soit la condition regardée, ne varie pas entre 48h et 72h de mise en contact avec les AAV. La transduction semble donc avoir lieu dès les premières 48 heures de contact. En revanche, la quantité injectée (MOI 1^{E3} à 1^{E5}) met en évidence une dose-réponse, suggérant que la quantité d'AAVr disponibles a une influence sur l'efficacité de transduction.

b. Influence du sérotype sur l'efficacité de transduction in vivo

Les AAVr ne sont pas des vecteurs qui présentent des fortes capacités d'infection *in vitro*. C'est pourquoi, tous les sérotypes précédemment évalués *in vitro*, ont été évalués en injection intra-articulaire chez la souris C57BL/6 à deux quantités différentes : 1^{E10} vg et 8^{E10} vg par articulation, à l'exception de l'AAV 1 évalué seulement à 1^{E10} vg.

De manière générale, la dose de 1^{E10} vg n'a pas permis de mettre en évidence une transduction importante des cellules de l'articulation. Nos analyses moléculaires mettent en évidence une moyenne de plus d'un génome viral par cellule seulement avec l'AAV 8 (**Figure 23A**, Knee). Il est important de noter ici que les analyses moléculaires ont été faites sur des prélèvements nettoyés du muscle au maximum et coupés au plus proche possible de la cavité articulaire. Cependant, nous ne pouvons pas totalement exclure une contamination par des cellules musculaires. Ainsi, nous avons chaque fois mis en parallèle les résultats obtenus dans le genou avec ceux obtenus dans un muscle prélevé à proximité. Ici nous retrouvons dans le muscle la présence de génome viral pour les AAV DJ, AAV 8 et AAV 9, suggérant une capacité de ces AAV à gagner le système vasculaire pour aller investir d'autres organes. De façon intéressante, ces résultats obtenus dans le muscle permettent d'écarter l'influence majoritaire de la présence de cellules musculaires dans nos échantillons de genoux (**Figure 23A**, Muscle).

Les analyses histologiques quant à elles, mettent en évidence une transduction des cellules de l'articulation avec les AAV 8 et 9 et dans une moindre mesure avec l'AAV DJ (**Figure 23B**). Le tropisme de l'AAV 8 semble dirigé principalement vers les structures ligamentaires, le périoste et le cartilage, celui de l'AAV 9 principalement vers la membrane synoviale et le périoste et enfin l'AAV DJ semble transduire quelques cellules du cartilage.

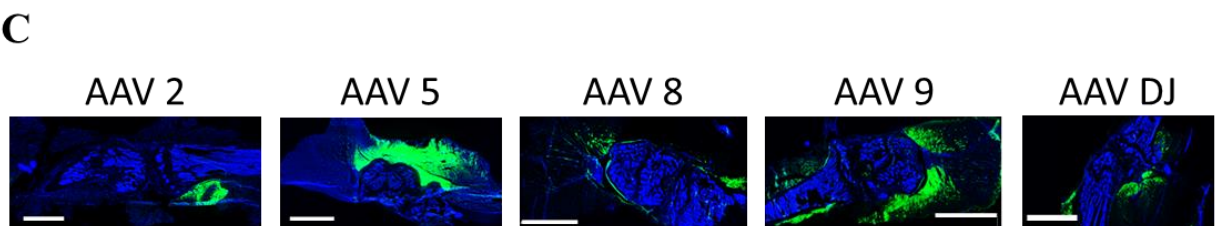
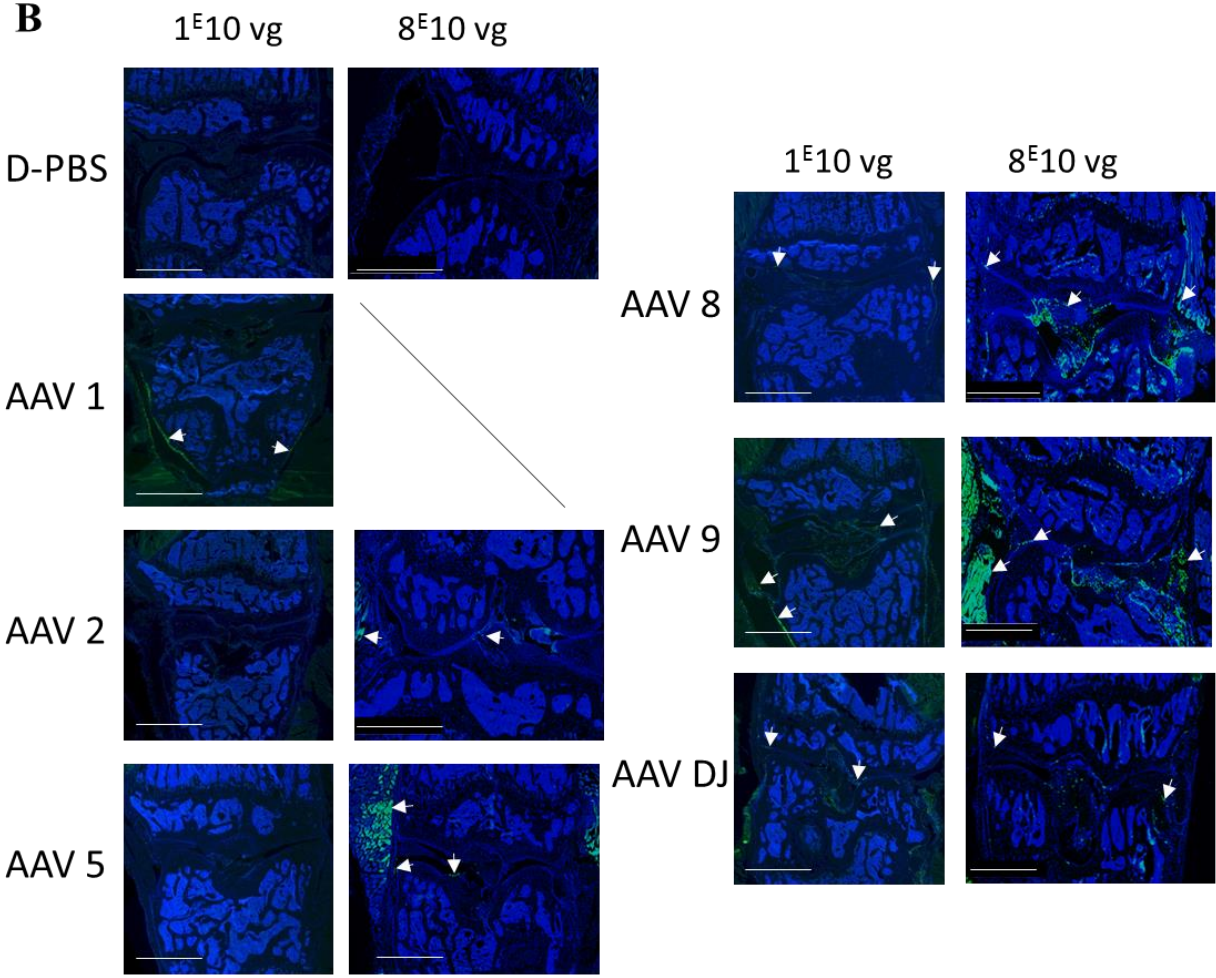
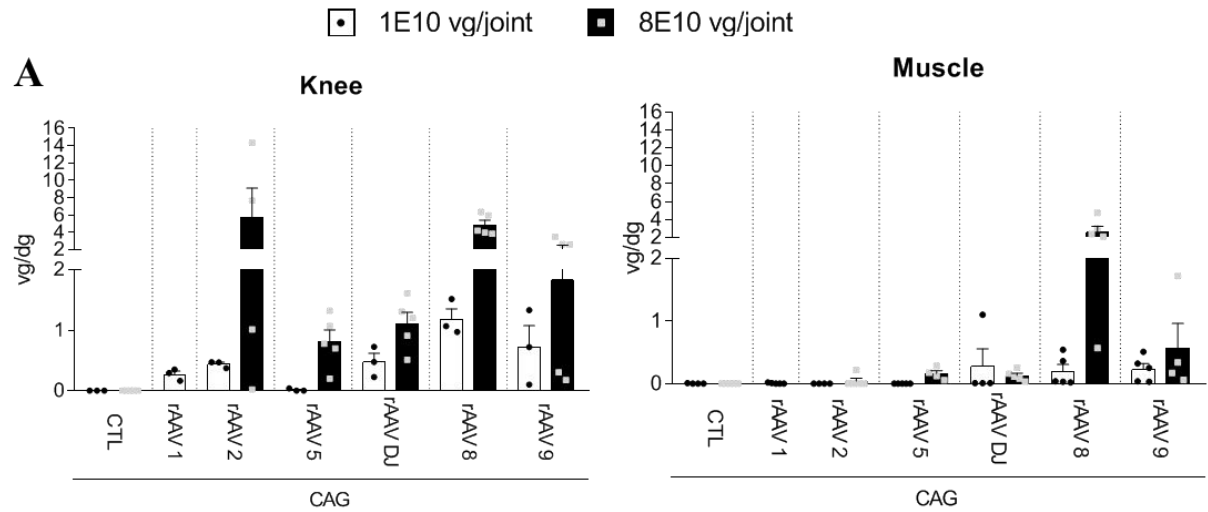


Figure 23 : Efficacité de transduction *in vivo* des AAV 1, 2, 5, 8, 9 et DJ. **(A)** Nombre de génome viraux par génomes diploïdes (vg/dg) détectés dans le genou ainsi que dans le muscle. **(B)** Analyse histologique de l'expression de la GFP. Image d'une

articulation représentative des 5 souris injectées avec le même vecteur. Barre d'échelle = 1 mm (C) Vue histologique d'ensemble mettant en évidence la forte transduction des cellules musculaires à proximité de l'articulation après l'injection de 8×10^{10} génomes viraux (vg). Barre d'échelle = 2,5 mm

Une dose plus importante, de 8×10^{10} vg a alors été évaluée dans les mêmes conditions afin de voir si les signaux observés à 1×10^{10} vg pouvaient être améliorés. Seul l'AAV 1 n'a pas été injecté à une dose plus élevée car la dose la plus faible à 1×10^{10} vg mettait déjà en évidence un tropisme dirigé vers le périoste (**Figure 23B**). Au niveau moléculaire, cette nouvelle dose augmente la quantité de transgènes retrouvés dans le genou quel que soit l'AAVr (**Figure 23A**). Cette augmentation est particulièrement marquée avec l'AAV 2 (12 fois) et l'AAV 5 (8 fois). En revanche, les souris injectées avec de l'AAV 2 ou de l'AAV 9 présentent une forte variabilité. De plus, comme le suggère l'évaluation de la quantité de génomes viraux par rapport à la quantité de génomes diploïdes (vg/dg) détectés dans les muscles de la cuisse, l'augmentation de la dose a aussi favorisé la transduction de tissus autres que les tissus articulaires. Notamment, les muscles extraits des souris injectées avec l'AAV 8 présentent plus de deux copies du transgène par génome diploïde. Les résultats histologiques confirment ce résultat et mettent plus largement en évidence une forte transduction des muscles quel que soit le sérotype étudié (**Figure 23C**) cela pourrait participer à expliquer la forte variabilité observée dans les analyses moléculaires des échantillons de genou pour l'AAV 9. De plus, malgré les résultats prometteurs des analyses moléculaires il n'y a que très peu de cellules de l'articulation qui expriment la GFP suite à une injection intra-articulaire d'AAV 2, d'AAV 5 ou d'AAV DJ (**Figure 23B**). En revanche, les articulations injectées avec de l'AAV 8 ou de l'AAV 9 montrent des images qui semblent en accord avec les résultats moléculaires, c'est à dire qu'elles présentent plus de cellules articulaires exprimant la GFP. L'AAV 8 semble transduire les cellules du périoste et du muscle de façon plus nette avec cette forte dose de 8×10^{10} vg et l'AAV 9 semble lui aussi transduire encore plus largement les cellules musculaires (**Figure 23C**).

c. Evaluation de la bio-distribution des sérotypes étudiés

L'une des limites à l'utilisation des AAVr est leur tendance à pouvoir s'échapper du site d'injection et ainsi aller transduire des tissus non désirés. En effet, bien que les AAVr soient injectés dans la cavité articulaire, ils peuvent repasser dans la circulation et aller infecter des organes à distance de l'articulation. Parmi les organes privilégiés des AAVr on retrouve principalement le foie ainsi que la rate, et les poumons. Sans surprise, les transgènes vectorisés par les AAV 8 et 9, décrits pour leur tropisme hépatique [379], sont retrouvés dans

le foie de façon dose dépendante d'après les analyses moléculaires (**Figure 24A**). Une forte expression de la GFP est aussi retrouvée dans les cellules du foie des souris transduites avec ces AAV au niveau histologique (**Figure 24B**). À la dose de 1^{E10} vg par articulation, aucun autre échappement des AAVr n'a été observé dans les poumons ou dans la rate. Cependant, en augmentant la dose, le génome viral a aussi été retrouvé dans la rate des souris injectées avec l'AAV 5, l'AAV DJ ou l'AAV9 ainsi que, dans une moindre mesure, dans les poumons des souris injectées avec de l'AAV 8 ou de l'AAV 9 (**Figure 24C**). Ainsi, l'AAV 8 et l'AAV 9 qui sont les deux sérotypes testés les plus aptes à transduire les cellules articulaires fuient aussi énormément dans l'organisme de la souris.

Notons tout de même que ces résultats sont la conséquence d'injection de 1^{E10} vg ou 8^{E10} vg dans les deux genoux de chaque souris étudiée, soit d'une quantité totale susceptible de s'échapper de l'articulation de 2^{E10} vg ou $1,6^{E11}$ vg. Or, lors d'évaluation pré-clinique dans des modèles murins d'arthrose induites les études unilatérales sont souvent favorisées [380].

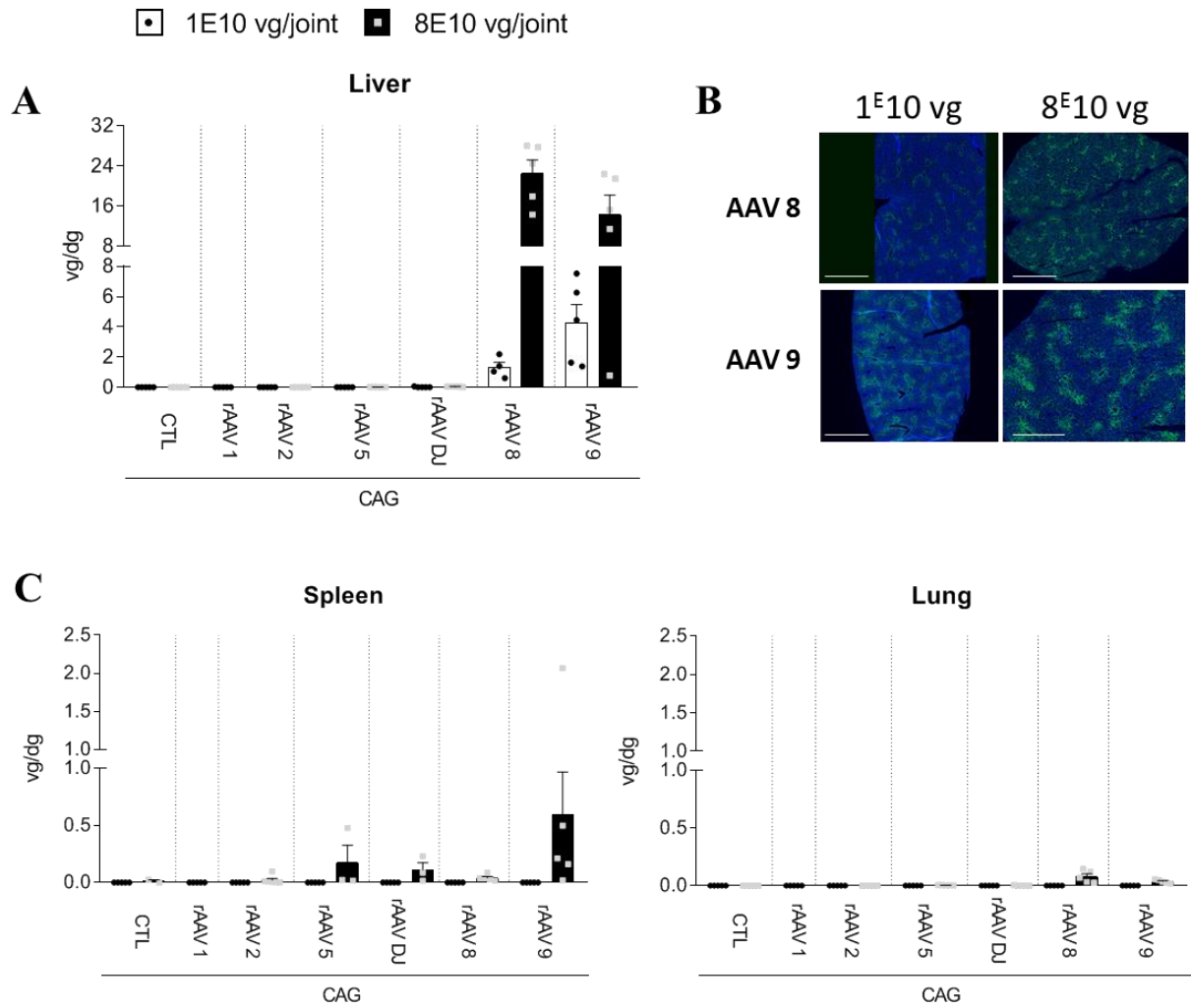


Figure 24 : Biodistribution des AAV 1, 2, 5, 8, 9 et DJ. **(A)** Nombre de copies de génomes viraux détectés dans le foie des souris injectées avec 1E10 vg ou 8E10 vg par articulation. **(B)** Analyse histologique de l'expression de la GFP dans le foie. **(C)** Nombre de génomes viraux dans les poumons et la rate. Injections de 1E10 vg, N=3 pour les analyses moléculaires, N=5 pour les analyses histologiques ; Injections de 8E10 vg, N=5. Barre d'échelle = 1 mm.

d. Influence du transgène sur l'efficacité de transduction in vivo

Après avoir évalué l'influence de la capside en testant différents sérotypes, nous avons voulu évaluer le rôle du transgène sur l'efficacité de transduction des AAV 8 et AAV 9 qui ont été, dans nos conditions, les plus prometteurs. Ainsi, nous avons comparé, dans un premier temps, l'expression médiée par le promoteur CAG, utilisé précédemment, avec l'expression médiée par le promoteur CMV que nous avons initialement exclu notamment car la littérature rapporte des régulations épigénétiques pouvant l'inhiber [381]. Nos résultats mettent en évidence une quantité de génomes viraux qui a tendance à être plus importante dans les genoux transduits avec l'AAV 8-CMV qu'avec l'AAV 8-CAG (**Figure 25A**). Pour autant, que ce soit pour l'AAV 8 ou pour l'AAV 9 les analyses histologiques mettent en évidence des cellules exprimant la GFP seulement dans les articulations injectées avec de l'AAV 8 ou 9 avec le promoteur CAG (**Figure 25B**). Ainsi, le promoteur CMV semble moins efficace pour permettre l'expression de la GFP dans les cellules de l'articulation. En parallèle, nous avons aussi voulu évaluer si la nature simple brin ou double brin du transgène pouvait notamment améliorer l'efficacité de transduction ou l'expression du transgène. Pour cela nous avons comparé l'efficacité de transduction de l'AAV 8-CMV -GFP (simple brin) au scAAV 8-CMV-GFP (double brin). D'un point de vue moléculaire, il ne semble pas y avoir d'augmentation de la présence de génome viral dans l'articulation avec le scAAV8-CMV-GFP par rapport à l'AAV 8-CMV-GFP. En revanche, les cellules des muscles analysées ont en moyenne intégré plus d'un génome viral (1,5), en comparaison de l'AAV 8-CMV qui permet la présence de seulement 0,6 génome viral par cellules en moyenne (**Figure 25A**). En accord avec ces résultats, les genoux injectés avec le scAAV 8-CMV ne présentent pas de cellules articulaires exprimant la GFP (comme l'AAV 8-CMV) alors que les cellules musculaires adjacentes à l'articulation l'expriment fortement (**Figure 21B**).

Enfin, l'analyse moléculaire met en évidence au moins autant de fuite des transgènes CMV (double ou simple brins) que CAG dans le foie (**Figure 25C**). Finalement, en plus de diminuer l'expression du transgène dans l'articulation, le promoteur CMV ne semble pas permettre de réduire l'expression indésirée dans d'autres organes.

Pour finir, nous avons voulu étudier l'impact d'une combinaison des AAV 8 et 9 qui présentent des tropismes articulaires différents. Avec ce mélange, nous avons obtenu une transduction

de plusieurs tissus articulaires. Ainsi nous avons retrouvé des cellules exprimant la GFP dans le périoste, dans la membrane synoviale ainsi que dans la zone ligamentaire (**Figure 25B**).

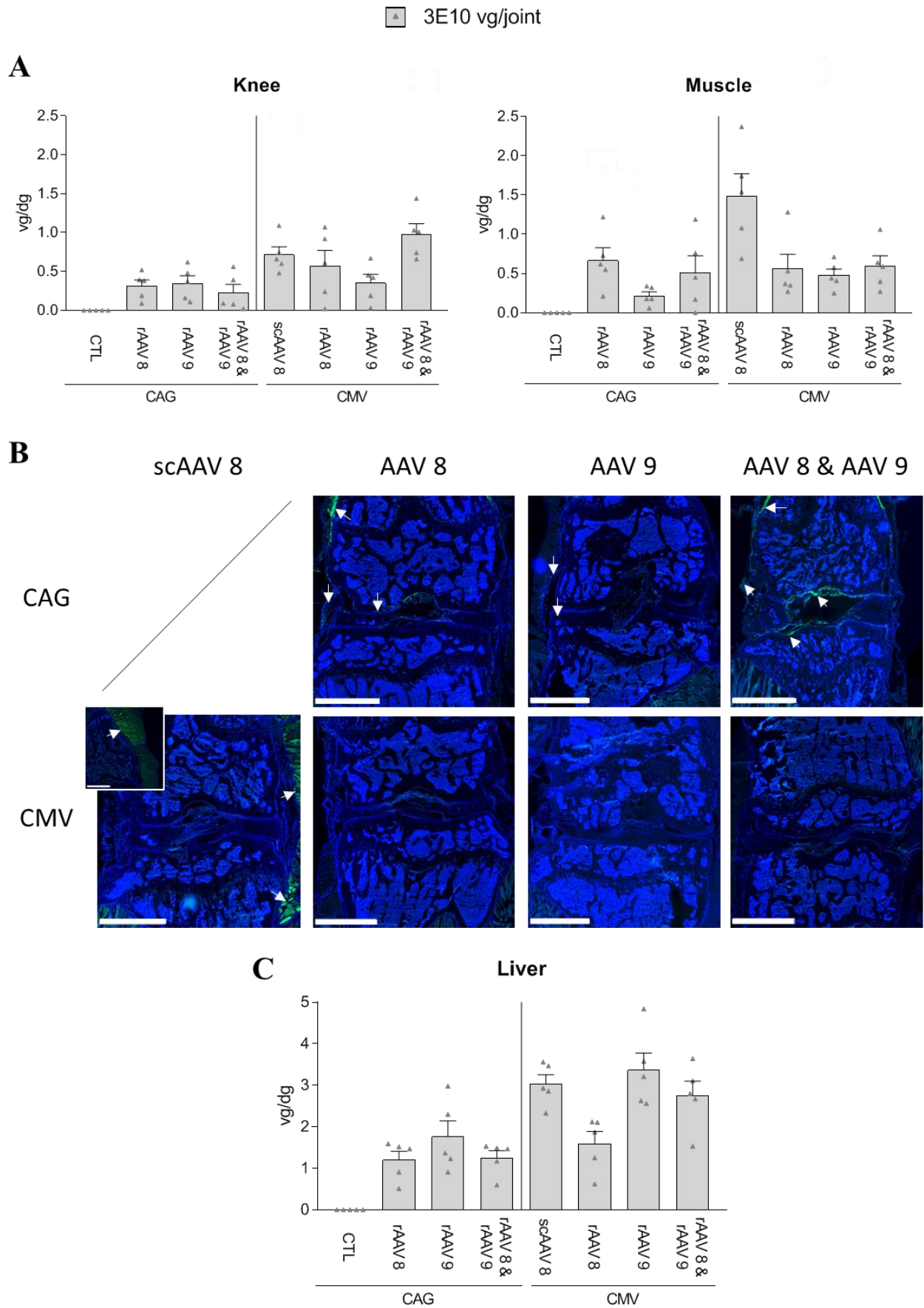


Figure 25 : Influence du promoteur du transgène sur l'efficacité de transduction des AAV 8 et 9 et sur l'expression du transgène. (A) Nombre de copies du transgène par génome diploïde (vg/dg) détectés dans le genou et dans le muscle de la

cuisse des souris injectées avec les différents types d'AAV. (B) Analyses histologiques d'expression de la GFP. Images représentatives des genoux obtenus dans chacune des conditions évaluées. Barre d'échelle = 1 mm. (C) Analyses moléculaires mettant en évidence l'influence du transgène sur la transduction non désirée d'AAV 8 et 9 dans le foie. N=5 dans chaque condition et chaque analyse.

4. Conclusion

Cette étude a permis de réaliser une comparaison de l'efficacité de transduction *in vitro* et *in vivo*, chez la souris après une injection intra-articulaire avec différentes quantités, de différents sérotypes d'AAV, mais aussi de comparer les promoteurs CAG et CMV ainsi que les AAVr et les scAAV. Le résultat principal de cette étude met en évidence que les AAVr 8 et 9 avec un promoteur CAG sont, dans nos conditions, les AAVr qui permettent l'expression de la GFP de façon la plus marquée dans l'articulation. Cependant, nous n'avons pu évaluer les scAAV qu'avec un transgène sous le contrôle d'un promoteur CMV, qui s'est montré inefficace dans l'expression de la GFP dans nos conditions. Il serait alors intéressant d'évaluer d'autres types de scAAV, sous le contrôle de promoteurs ubiquitaires plus courts que le CAG afin de pouvoir conclure sur l'infériorité de l'efficacité de ces scAAV en comparaison des AAVr. De plus, cette étude a permis d'évaluer pour la première fois l'efficacité de transduction dans l'articulation d'un même transgène médiée par deux sérotypes différents, l'AAV 8 et l'AAV 9. Cette stratégie permet d'étendre les zones articulaires transduites en comparaison de l'injection de l'AAV 8 ou de l'AAV 9 seuls. De plus, cela permet d'injecter deux fois moins de chaque sérotype, la quantité injectée finale restant la même que pour les sérotypes seuls (3×10^9 vg). Ainsi, on divise le risque de réaction immunitaire (anticorps neutralisant) dirigée contre la capsid.

Concernant nos résultats *in vitro*, des résultats similaires à ceux obtenus dans les iMACs ont été mis en évidence dans des ATDC5, une lignée cellulaire murine de progéniteurs chondrocytaires par Yang et al. En effet, Yang et al. ont mis en évidence que les sérotypes de l'AAV 1 et de l'AAV 2 (l'AAV DJ n'ayant pas été évalué dans leur étude) permettaient une production importante de GFP dans des ATDC5. En revanche, ce sont des scAAV qui ont été utilisés dans leur étude [382]. D'autre part, l'AAV DJ apparaît pour la première fois *in vitro* dans des iMACs comme un outil de transduction très efficace. Il serait alors intéressant de voir comment l'expression du transgène est conservée *in vitro* sur le long terme en comparaison d'autres systèmes de transfert de gènes, afin d'évaluer la pertinence de l'utilisation de l'AAV DJ comme un outil d'étude *in vitro*. Cela est cohérent avec le fait que l'AAV DJ a initialement été développé pour permettre une amélioration de la transduction de certaines lignées

cellulaires *in vitro* [373]. Cependant, malgré des résultats très encourageants *in vitro*, l'AAV DJ ne s'est pas montré capable de transduire efficacement les chondrocytes ou même d'autres tissus de l'articulation *in vivo*. Cela renforce l'idée que les mécanismes mis en jeu *in vivo* diffèrent énormément de ceux *in vitro* et que le screening d'AAV *in vitro* ne peut alors pas être mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux. En revanche, d'autres stratégies, comme l'utilisation d'explants pourraient être intéressantes afin de permettre un screening plus large de différents types d'AAV.

Concernant nos résultats *in vivo*, plusieurs éléments pourraient venir compléter et renforcer nos données. En effet, toutes les analyses histologiques que nous avons réalisées sont qualitatives, une quantification pourrait alors permettre d'analyser plus précisément les différents résultats. De plus, seul un niveau de coupe a été réalisé sur nos articulations, or, nous pouvons envisager que les cellules transduites ne soient pas réparties de façon homogène dans l'articulation. Ainsi, l'utilisation de plusieurs niveaux de coupe pourrait être intéressante. Enfin, les analyses réalisées avec le gène rapporteur que nous avons choisi, la GFP, nous permet d'avoir une information spatiale exacte quant aux cellules transduites, mais ne nous permet pas d'avoir d'information longitudinale de la transduction et du maintien de l'expression du transgène. En effet, des études similaires à la nôtre avaient regardé l'efficacité de transduction de différents AAV dans le cartilage et le synovium mais à des temps différents (2 semaines [383] et 8 semaines [384]) et avec une seule dose d'AAV testée. Ainsi, l'utilisation d'un autre gène rapporteur, comme la luciférase, dont l'expression peut être suivie dans le temps sans augmenter le nombre d'animaux pourrait nous permettre de compléter les informations disponibles [385].

Notre étude a également permis de comparer deux promoteurs, le CAG et le CMV, mais l'évaluation d'autres promoteurs ubiquitaires comme celui de la PGK ou le promoteur non viral EF-1 (*Elongation factor 1*) qui semble plus prometteur [386], pourraient là aussi permettre de compléter l'étude afin d'optimiser au mieux le vecteur utilisé dans de futurs modèles précliniques impliquant la souris. En effet, le promoteur EF-1 a déjà précédemment permis de mettre en évidence une expression plus homogène de la GFP que le CMV [387], alors que le promoteur PGK a montré une plus faible expression du transgène que le CAG après une injection intra-crâniale d'AAV [388]. Une précédente étude a ainsi d'ailleurs mis en

évidence le rôle fondamental du promoteur dans l'expression du transgène vectorisé par un scAAV dans des articulations de chevaux [188].

Finalement, les AAV thérapeutiques ont pour but d'être évalués, dans des modèles animaux d'arthrose. Ces derniers peuvent impliquer une intervention chirurgicale induisant l'arthrose. Il serait alors aussi intéressant de regarder chez la souris comment l'induction de l'arthrose influence l'efficacité de transduction des AAV, leur bio-distribution et leur capacité à exprimer le transgène. En effet, une étude précédente avait déjà permis de mettre en évidence que la présence d'un défaut ostéochondral pouvait augmenter l'efficacité de transduction des chondrocytes chez le lapin [389]. Il est donc probable que des cellules soumises à un stress soit plus permissives.

5. Perspectives

Mon projet de thèse visait initialement le développement d'un outil de thérapie génique permettant d'aller transduire efficacement et spécifiquement les chondrocytes. Pour cela, le choix de vecteur s'est tourné vers les AAVr qui présentent les avantages de ne pas être connus pour participer au développement de maladies chez l'Homme, mais aussi de permettre l'expression d'un transgène sur le long-terme [349]. La stratégie envisagée était donc de modifier chimiquement les capsides d'AAVr afin de modifier leurs propriétés physico-chimiques et de faciliter leur pénétration du cartilage ainsi que leur process dans les chondrocytes. Malheureusement, malgré 7 modifications différentes évaluées (**Tableau 6**), aucune n'a permis de mettre en évidence une transduction des chondrocytes ou même d'autres cellules de l'articulation. L'hypothèse initiale était alors que l'ajout d'un motif particulier modifierait les propriétés physico-chimiques de l'AAV et lui permettrait de pénétrer efficacement le cartilage pour aller transduire les chondrocytes. Ainsi, l'ajout de mannose (ligand du récepteur ubiquitaire au mannose, MRC) aurait pu permettre de faciliter les interactions cellulaires et l'entrée de l'AAV dans la cellule. L'ajout de guanidine, devait permettre de modifier la charge globale des AAV natifs en ajoutant des charges positives. Le cartilage étant chargé négativement [390] cela aurait pu favoriser des interactions électrostatiques comme cela avait déjà été mis en évidence pour cibler les poumons après une injection systémique [391]. Enfin, le peptide CAP (*Chondrocyte affinity peptide*) est un peptide qui a été découvert par phage display pour son interaction forte avec les chondrocytes [392] et qui a déjà permis de favoriser le ciblage des chondrocytes dans plusieurs études

[392]–[394]. Nous émettions alors l’hypothèse que son greffage à la surface des AAV pourrait potentialiser leur interaction avec les chondrocytes.

Acides aminés modifiés	Modification ajoutée
Lysines	Mannose
Tyrosines	Mannose
Lysines	Guanidine
Tyrosines	Guanidine
Lysines	Peptide CAP
Lysines ET tyrosines	Guanidine
Lysines ET tyrosines	Peptide et Guanidine

Tableau 6 : Les différentes modifications chimiques apportées à la surface de la capsid qui ont été évaluées au cours de mon projet

Plusieurs hypothèses peuvent alors expliquer le manque d’efficacité de ces différentes stratégies. La première hypothèse réside en la quantité d’AAVs injectés qui était très limitée d’une part, par le faible volume pouvant être injecté dans l’articulation de souris (5 à 10 μL) et d’autre part, par le faible titre des productions d’AAV modifiés. En effet, les modifications chimiques induisent une étape de dilution des productions initiales d’AAV compliquant alors l’obtention de production suffisamment concentrées pour l’injection d’une quantité importante dans un faible volume. Pour pallier à ce problème, des solutions de concentrations des productions modifiées ont été envisagées comme la lyophilisation [395] de ces dernières. Afin d’évaluer ces AAV modifiés il faudrait alors aussi peut-être envisager d’augmenter la taille du modèle animal utilisé et de changer le modèle murin pour un modèle avec des articulations permettant l’injection d’un volume plus important (25-50 μL) comme le rat [371], [396]. Une autre stratégie, qui n’a pas été éprouvée au cours de mon projet mais qui a déjà montré des résultats prometteurs consisterait à intégrer les AAV au sein d’un matériau biocompatible [342]. Cette stratégie, en association avec des matériaux qui font eux aussi l’objet de développements intéressants, permet aux AAVs d’échapper plus facilement aux anticorps neutralisants pouvant être présents dans le liquide synovial mais aussi de sortir du matériau progressivement et d’améliorer leur capacité à intégrer les tissus cibles (**Tableau 1**).

L’obtention de ces résultats n’ayant pas permis d’atteindre nos objectifs, ce travail a pourtant nécessité l’utilisation de nombreux animaux. Cela met en évidence le besoin important de

développer des méthodes de screening de l'efficacité des AAVr. En effet, le développement et les modifications des AAVr sont de mieux en mieux maîtrisés et si des solutions de screening peu coûteuses existaient, cela pourrait alors permettre la mise en place d'une plateforme de délivrance disponible au gré des besoins. Pour répondre à cela, nous avons initié au cours de cette thèse, le développement d'un modèle de transduction *ex vivo* sur des épiphyses de souriceaux qui pourraient permettre d'étudier les mécanismes de transduction limitant ou facilitant l'accès au cartilage (**Figure 26**). Pour poursuivre cet objectif de développement du screening d'AAVr à haut débit transposable aux résultats obtenus *in vivo* il pourrait aussi être envisagé de s'appuyer sur le développement d'« organ-on-chip ».

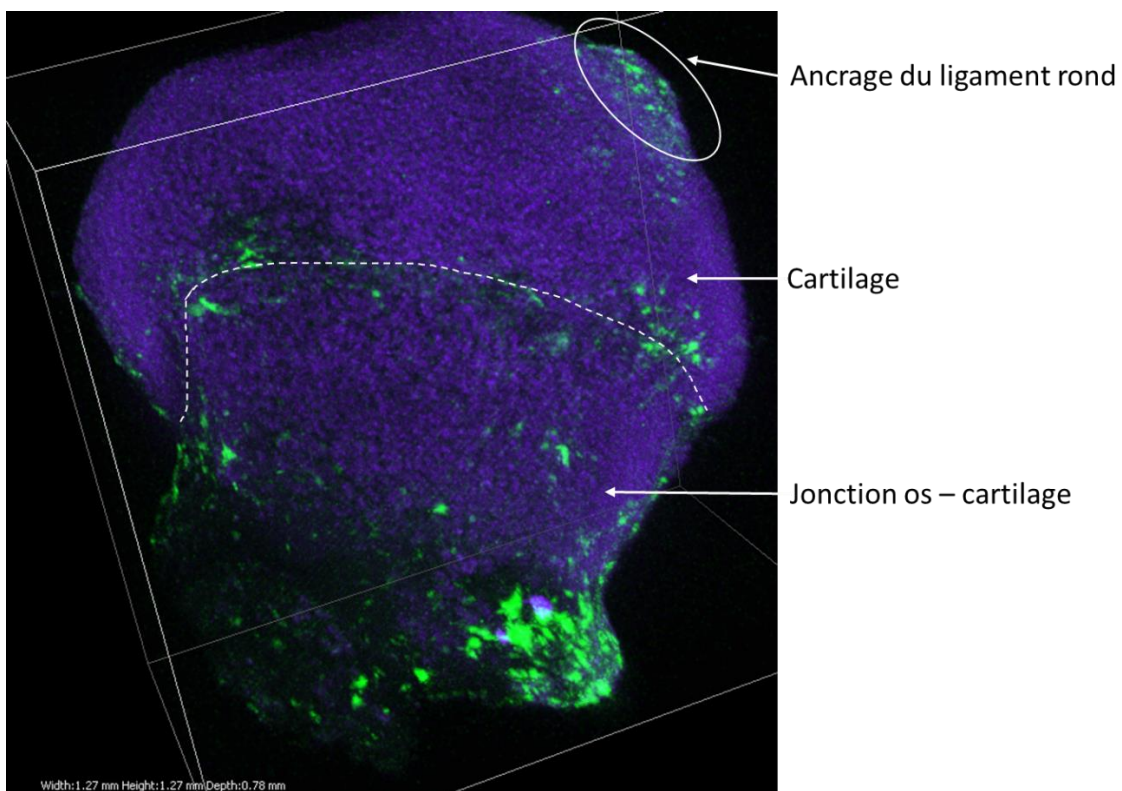


Figure 26 : Epiphyse fémorale de C57BL/6 (P5/P6) transparisé. L'épiphyse a été mis en présence d'AAV DJ-CAG-GFP pendant 48h dans du milieu complet, puis fixée toute une nuit dans du PFA 4%. Transparisation : RapiClear. Marquage des noyaux : TO-PRO (642/661).

IV. Conclusion générale

Pour finir, ce travail de thèse a donc permis d'apporter des éléments de réponses à deux axes majeurs dans le développement de DMOAD : l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, et le développement des outils permettant l'administration optimale de la molécule d'intérêt. En effet, nous avons mis en évidence dans la première partie de ce travail que l'IL-1 β et le TNF- α induisaient, spécifiquement dans des chondrocytes issus d'articulations arthrosiques, une augmentation de l'expression des gènes associés à la glycolyse, et une diminution de ceux associés au cycle de Krebs. Nous avons finalement validé que ces modulations transcriptomiques avaient un impact fonctionnel sur la cellule. Ainsi, en conditions inflammatoires, les chondrocytes arthrosiques ne sont plus capables d'utiliser l'OXPLOS pour générer de l'ATP mais utilisent en revanche la glycolyse au maximum de leur capacité. Dans la deuxième partie de ce travail, l'efficacité de différents AAVs a été évaluée à la suite d'une injection intra-articulaire chez la souris. Bien que des études similaires existent dans la littérature [383], [384], la nôtre a permis d'ajouter des informations supplémentaires, telles qu'un temps de transduction différent, plusieurs quantités d'AAV testées et a aussi permis de comparer deux promoteurs ainsi qu'un scAAV aux AAV simple brin. Finalement, dans nos conditions, les AAV 8 et 9 sous le contrôle d'un promoteur CAG, bien qu'ils fuient énormément dans le foie, semblent être les plus à même de transduire les cellules des tissus articulaires.

Pour conclure, si nous mettons en perspective ces travaux de thèse dans leur globalité, il apparaît pertinent de se demander dans quelle mesure l'utilisation d'un AAV pourrait être intéressante pour restaurer des fonctions mitochondriales. En effet, les pathologies mitochondriales peuvent survenir à la suite de mutations dans les gènes mitochondriaux ou bien dans certains gènes nucléaires [397]. Pour la restauration de gènes nucléaires associés à des fonctions mitochondriales, les AAV ont largement été éprouvés, et se sont révélés être une alternative thérapeutique intéressante [398]. Ceci laisse à penser que les altérations métaboliques qui peuvent survenir au cours de l'arthrose ne sont pas un frein au processus de transduction médié par les AAV. Cependant, comme notre étude ne permet pas de déterminer la cause des défauts métaboliques observés, il n'est pas impossible qu'ils soient directement médiés par des défauts de l'ADN mitochondrial. En effet, il a été montré que des

gènes mitochondriaux pouvaient être altérés au cours de l'arthrose [399]. Dans cet hypothétique contexte, l'utilisation d'AAV modifié capable d'aller transduire les mitochondries des cellules cibles apparait nécessaire. Ce type d'AAV a notamment été développé, et est en essai clinique dans le contexte de la neuropathie optique héréditaire de Leber [400], [401]. Bien que l'utilisation des AAV pour cibler les mitochondries rajoute des contraintes telles que le nombre important de mitochondries présentes dans les cellules et la présence de plusieurs copies du génome mitochondrial dans chacune d'elles, cela reste une stratégie qui pourrait être envisagée.

V. Bibliographie

- [1] V. P. Leifer, J. N. Katz, and E. Losina, "The burden of OA-health services and economics," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 30, no. 1, pp. 10–16, 2022.
- [2] T. W. O'Neill, P. S. McCabe, and J. McBeth, "Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis," *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, vol. 32, no. 2, pp. 312–326, 2018.
- [3] S. T. Skou and E. M. Roos, "Physical therapy for patients with knee and hip osteoarthritis: supervised, active treatment is current best practice," *Clin. Exp. Rheumatol.*, vol. 37, no. 5, pp. 112–117, 2019.
- [4] Z. Salis, B. Gallego, T. V. Nguyen, and A. Sainsbury, "Decrease in body mass index is associated with reduced incidence and progression of the structural defects of knee osteoarthritis: a prospective multi-cohort study," *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*, Aug. 2022.
- [5] B. Zhang *et al.*, "SQSTM1-dependent autophagic degradation of PKM2 inhibits the production of mature IL1B/IL-1 β and contributes to LIPUS-mediated anti-inflammatory effect," *Autophagy*, vol. 16, no. 7, p. 1262, Jul. 2020.
- [6] R. R. Bannuru *et al.*, "OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 27, no. 11, pp. 1578–1589, 2019.
- [7] A. Latourte *et al.*, "Do Glucocorticoid Injections Increase the Risk of Knee Osteoarthritis Progression Over 5 Years?," *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*, vol. 74, no. 8, Aug. 2022.
- [8] S. Safiri *et al.*, "Global, regional and national burden of osteoarthritis 1990-2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2017," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 0, pp. 1–10, 2020.
- [9] T. Vos *et al.*, "Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015," *Lancet*, vol. 388, no. 10053, pp. 1545–1602, Oct. 2016.
- [10] H. Long *et al.*, "Prevalence Trends of Site-Specific Osteoarthritis From 1990 to 2019: Findings From the Global Burden of Disease Study 2019," *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*, vol. 74, no. 7, Jul. 2022.
- [11] C. López-Otín, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, and G. Kroemer, "The Hallmarks of Aging," *Cell*, vol. 153, no. 6, p. 1194, Jun. 2013.
- [12] D. J. Hunter and S. Bierma-Zeinstra, "Osteoarthritis," *Lancet*, vol. 393, no. 10182, pp. 1745–1759, 2019.
- [13] C. G. Boer *et al.*, "Deciphering osteoarthritis genetics across 826,690 individuals from 9 populations," *Cell*, vol. 184, no. 18, pp. 4784-4818.e17, Sep. 2021.
- [14] V. K. Srikanth, J. L. Fryer, G. Zhai, T. M. Winzenberg, D. Hosmer, and G. Jones, "A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 13, no. 9, pp. 769–781, Sep. 2005.
- [15] C. L. Blaker, D. M. Ashton, N. Doran, C. B. Little, and E. C. Clarke, "Sex- and injury-based differences in knee biomechanics in mouse models of post-traumatic osteoarthritis," *J. Biomech.*, vol. 114, p. 110152, Jan. 2021.
- [16] H. L. Ma, T. J. Blanchet, D. Peluso, B. Hopkins, E. A. Morris, and S. S. Glasson, "Osteoarthritis severity is sex dependent in a surgical mouse model," *Osteoarthr.*

- Cartil.*, vol. 15, no. 6, pp. 695–700, Jun. 2007.
- [17] A. Molinero *et al.*, “Role of muscle IL-6 in gender-specific metabolism in mice,” *PLoS One*, vol. 12, no. 3, Mar. 2017.
- [18] Y. Liao *et al.*, “Interleukin-6 signaling mediates cartilage degradation and pain in posttraumatic osteoarthritis in a sex-specific manner,” *Sci. Signal.*, vol. 15, no. 744, p. eabn7082, Jul. 2022.
- [19] M. Alves-Simões, “Rodent models of knee osteoarthritis for pain research,” *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 30, no. 6, pp. 802–814, Jun. 2022.
- [20] Y. P. Xiao, F. M. Tian, M. W. Dai, W. Y. Wang, L. T. Shao, and L. Zhang, “Are estrogen-related drugs new alternatives for the management of osteoarthritis?,” *Arthritis Res. Ther.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–9, Jun. 2016.
- [21] J. H. Jung, C. H. Bang, G. G. Song, C. Kim, J. H. Kim, and S. J. Choi, “Knee osteoarthritis and menopausal hormone therapy in postmenopausal women: a nationwide cross-sectional study,” *Menopause*, vol. 26, no. 6, pp. 598–602, Jun. 2018.
- [22] S. Wang, H. Wang, W. Liu, and B. Wei, “Identification of Key Genes and Pathways Associated with Sex Differences in Osteoarthritis Based on Bioinformatics Analysis,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2019, 2019.
- [23] P. J. Cope, K. Ourradi, Y. Li, and M. Sharif, “Models of osteoarthritis: the good, the bad and the promising,” *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 27, no. 2, p. 230, Feb. 2019.
- [24] J. Lieberthal, N. Sambamurthy, and C. R. Scanzello, “Inflammation in Joint Injury and Post-Traumatic Osteoarthritis,” *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 23, no. 11, p. 1825, Nov. 2015.
- [25] S. J. Gilbert, C. S. Bonnet, and E. J. Blain, “Mechanical Cues: Bidirectional Reciprocity in the Extracellular Matrix Drives Mechano-Signalling in Articular Cartilage,” *Int. J. Mol. Sci.* 2021, Vol. 22, Page 13595, vol. 22, no. 24, p. 13595, Dec. 2021.
- [26] M. B. Ellman, D. Yan, K. Ahmadiania, D. Chen, H. S. An, and H. J. Im, “Fibroblast Growth Factor Control of Cartilage Homeostasis,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 114, no. 4, p. 735, Apr. 2013.
- [27] X. Tang *et al.*, “Connective tissue growth factor contributes to joint homeostasis and osteoarthritis severity by controlling the matrix sequestration and activation of latent TGF β ,” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 77, no. 9, pp. 1372–1380, Sep. 2018.
- [28] W. Wang, D. Rigueur, and K. M. Lyons, “TGF β signaling in cartilage development and maintenance,” *Birth Defects Res. C. Embryo Today*, vol. 102, no. 1, pp. 37–51, 2014.
- [29] L. J. Wang, N. Zeng, Z. P. Yan, J. T. Li, and G. X. Ni, “Post-traumatic osteoarthritis following ACL injury,” *Arthritis Res. Ther.*, vol. 22, no. 1, Mar. 2020.
- [30] P. P. Geusens and J. P. Van Den Bergh, “Osteoporosis and osteoarthritis: shared mechanisms and epidemiology,” *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol. 28, no. 2, pp. 97–103, Mar. 2016.
- [31] K. D. Allen and Y. M. Golightly, “State of the evidence,” *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol. 27, no. 3, pp. 276–283, May 2015.
- [32] S. Grässel and D. Muschter, “Recent advances in the treatment of osteoarthritis,” *F1000Research*, vol. 9, p. 325, May 2020.
- [33] A. Courties, O. Gualillo, F. Berenbaum, and J. Sellam, “Metabolic stress-induced joint inflammation and osteoarthritis,” *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 23, no. 11, pp. 1955–1965, Nov. 2015.
- [34] M. J. Pearson *et al.*, “IL-6 secretion in osteoarthritis patients is mediated by chondrocyte-synovial fibroblast cross-talk and is enhanced by obesity,” *Sci. Rep.*, vol. 7,

- no. 1, Dec. 2017.
- [35] P. Gratal *et al.*, "Purinergic System Signaling in Metainflammation-Associated Osteoarthritis," *Front. Med.*, vol. 7, p. 506, Aug. 2020.
- [36] T. Wang and C. He, "Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis," 2018.
- [37] J. L. Bowden *et al.*, "Core and adjunctive interventions for osteoarthritis: efficacy and models for implementation," *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2020.
- [38] L. A. Deveza, A. E. Nelson, and R. F. Loeser, "Phenotypes of osteoarthritis - current state and future implications," *Clin. Exp. Rheumatol.*, vol. 37, no. Suppl 120, p. 64, Sep. 2019.
- [39] F. Angelini *et al.*, "Osteoarthritis endotype discovery via clustering of biochemical marker data," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 81, no. 5, pp. 666–675, May 2022.
- [40] E. Kozhemyakina *et al.*, "Identification of a Prg4-expressing articular cartilage progenitor cell population in mice," *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*, vol. 67, no. 5, pp. 1261–1273, May 2015.
- [41] Z. Peng *et al.*, "The regulation of cartilage extracellular matrix homeostasis in joint cartilage degeneration and regeneration," *Biomaterials*, vol. 268, p. 120555, Jan. 2021.
- [42] K. C. Clause and T. H. Barker, "Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 24, no. 5, pp. 830–833, Oct. 2013.
- [43] A. J. S. Fox, A. Bedi, and S. A. Rodeo, "The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function," 2009.
- [44] Y. Luo *et al.*, "The minor collagens in articular cartilage," *Protein Cell*, vol. 8, pp. 560–573, 2017.
- [45] C. B. Knudson and W. Knudson, "Cartilage proteoglycans," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 12, no. 2, pp. 69–78, 2001.
- [46] V. Lee, L. Cao, Y. Zhang, C. Kiani, M. E. Adams, and B. B. Yang, "The Roles of Matrix Molecules in Mediating Chondrocyte Aggregation, Attachment, and Spreading," *J. Cell. Biochem*, vol. 79, pp. 322–333, 2000.
- [47] K. Maly, E. A. Sastre, E. Farrell, A. Meurer, and F. Zaucke, "COMP and TSP-4: Functional Roles in Articular Cartilage and Relevance in Osteoarthritis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 5, pp. 1–23, Mar. 2021.
- [48] F. H. Chen, K. T. Rousche, and R. S. Tuan, "Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering," *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, vol. 2, no. 7, pp. 373–382, Jul. 2006.
- [49] P. Singh, K. B. Marcu, M. B. Goldring, and M. Otero, "Phenotypic instability of chondrocytes in osteoarthritis: on a path to hypertrophy," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1442, no. 1, pp. 17–34, Apr. 2019.
- [50] Q. Ji *et al.*, "Single-cell RNA-seq analysis reveals the progression of human osteoarthritis," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 78, no. 1, pp. 100–110, 2019.
- [51] T. Li, J. Peng, Q. Li, Y. Shu, P. Zhu, and L. Hao, "The Mechanism and Role of ADAMTS Protein Family in Osteoarthritis," *Biomolecules*, vol. 12, no. 7, Jul. 2022.
- [52] C. Y. Yang, A. Chanalaris, and L. Troeberg, "ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis – looking beyond the 'usual suspects,'" *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 25, no. 7, p. 1000, Jul. 2017.
- [53] L. Troeberg and H. Nagase, "Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1824, no. 1, pp. 133–145, Jan. 2012.
- [54] W. Knudson, S. Ishizuka, K. Terabe, E. B. Askew, and C. B. Knudson, "The pericellular hyaluronan of articular chondrocytes," *Matrix Biol.*, vol. 78–79, pp. 32–46, May 2019.

- [55] P. Alberton *et al.*, "Aggrecan Hypomorphism Compromises Articular Cartilage Biomechanical Properties and Is Associated with Increased Incidence of Spontaneous Osteoarthritis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 5, Mar. 2019.
- [56] H. Nagase, R. Visse, and G. Murphy, "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs," *Cardiovasc. Res.*, vol. 69, no. 3, pp. 562–573, Feb. 2006.
- [57] K. Yamamoto, D. Wilkinson, and G. Bou-Gharios, "Targeting Dysregulation of Metalloproteinase Activity in Osteoarthritis," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 109, no. 3, pp. 277–290, Sep. 2021.
- [58] Q. Hu and M. Ecker, "Overview of MMP-13 as a Promising Target for the Treatment of Osteoarthritis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 4, pp. 1–22, Feb. 2021.
- [59] M. E. El-Sayed, K. F. Asmaa, and E.-B. S. Samar, "The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: An updated review," *Life Sci.*, p. 116786, Aug. 2019.
- [60] M. A. Karsdal, S. H. Madsen, C. Christiansen, K. Henriksen, A. J. Fosang, and B. C. Sondergaard, "Cartilage degradation is fully reversible in the presence of aggrecanase but not matrix metalloproteinase activity," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 10, no. 3, May 2008.
- [61] E. S. E. Mehana, A. F. Khafaga, and S. S. El-Blehi, "The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: An updated review," *Life Sci.*, vol. 234, no. June, p. 116786, 2019.
- [62] N.-G. Li *et al.*, "New hope for the treatment of osteoarthritis through selective inhibition of MMP-13," *Curr. Med. Chem.*, vol. 18, no. 7, pp. 977–1001, Mar. 2011.
- [63] P. S. Burrage, K. S. Mix, and C. E. Brinckerhoff, "Matrix metalloproteinases: role in arthritis," *Front. Biosci.*, vol. 11, no. 1 P.447-888, pp. 529–543, 2006.
- [64] U. Schönbeck, F. Mach, and P. Libby, "Generation of biologically active IL-1b by MMP: A novel caspase-1 independent pathway of IL-1b processing," 1998.
- [65] A. A. Pitsillides and F. Beier, "Cartilage biology in osteoarthritis--lessons from developmental biology," *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 7, no. 11, pp. 654–663, Nov. 2011.
- [66] M. M. G. Sun and F. Beier, "Chondrocyte hypertrophy in skeletal development, growth, and disease," *Birth Defects Res. C. Embryo Today*, vol. 102, no. 1, pp. 74–82, 2014.
- [67] E. Reichenberger, T. Aigner, K. von der Mark, H. Stöß, and W. Bertling, "In situ hybridization studies on the expression of type X collagen in fetal human cartilage," *Dev. Biol.*, vol. 148, no. 2, pp. 562–572, 1991.
- [68] M. Varela-Eirin *et al.*, "Cartilage regeneration and ageing: Targeting cellular plasticity in osteoarthritis," *Ageing Res. Rev.*, vol. 42, pp. 56–71, Mar. 2018.
- [69] Q. Ji *et al.*, "Single-cell RNA-seq analysis reveals the progression of human osteoarthritis," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 78, no. 1, p. 100, Jan. 2019.
- [70] H. Madry, C. N. van Dijk, and M. Mueller-Gerbl, "The basic science of the subchondral bone," *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, vol. 18, no. 4, pp. 419–433, Apr. 2010.
- [71] G. Li *et al.*, "Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 15, no. 6, p. 223, Dec. 2013.
- [72] T. D. Brown and M. S. Vrahas, "The apparent elastic modulus of the juxtarticular subchondral bone of the femoral head," *J. Orthop. Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 32–38, 1984.
- [73] X. L. Yuan *et al.*, "Bone–cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 22, no. 8, pp. 1077–1089, Aug. 2014.
- [74] R. Klose-Jensen *et al.*, "Subchondral bone turnover, but not bone volume, is increased in early stage osteoarthritic lesions in the human hip joint," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 23, no. 12, pp. 2167–2173, Dec. 2015.

- [75] D. B. Burr and M. A. Gallant, "Bone remodelling in osteoarthritis," *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 8, no. 11, pp. 665–673, Nov. 2012.
- [76] F. Intema *et al.*, "In early OA, thinning of the subchondral plate is directly related to cartilage damage: results from a canine ACLT-meniscectomy model," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 18, no. 5, pp. 691–698, May 2010.
- [77] W. Su *et al.*, "Angiogenesis stimulated by elevated PDGF-BB in subchondral bone contributes to osteoarthritis development," 2020.
- [78] D. T. Felson *et al.*, "Osteophytes and progression of knee osteoarthritis," *Rheumatology (Oxford)*, vol. 44, no. 1, pp. 100–104, Jan. 2005.
- [79] P. M. van der Kraan and W. B. van den Berg, "Osteophytes: relevance and biology," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 15, no. 3, pp. 237–244, Mar. 2007.
- [80] G. Guyton and R. Brand, "Apparent Spontaneous Joint Restoration in Hip Osteoarthritis," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 404, pp. 302–307, 2002.
- [81] D. M. Lee *et al.*, "Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis," *Science*, vol. 315, no. 5814, pp. 1006–1010, Feb. 2007.
- [82] A. Y. Hui, W. J. McCarty, K. Masuda, G. S. Firestein, and R. L. Sah, "A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease," *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, vol. 4, no. 1, pp. 15–37, Jan. 2012.
- [83] T. Pap, B. Dankbar, C. Wehmeyer, A. Korb-Pap, and J. Sherwood, "Synovial fibroblasts and articular tissue remodelling: Role and mechanisms," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 101, pp. 140–145, May 2020.
- [84] M. Kurowska-Stolarska and S. Alivernini, "Review: Synovial tissue macrophages: friend or foe?," *RMD Open*, vol. 3, no. 2, Dec. 2017.
- [85] E. Sanchez-Lopez, R. Coras, A. Torres, N. E. Lane, and M. Guma, "Synovial inflammation in osteoarthritis progression," *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 0123456789, 2022.
- [86] R. G. C. Riis *et al.*, "Synovitis assessed on static and dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging and its association with pain in knee osteoarthritis: A cross-sectional study," *Eur. J. Radiol.*, vol. 85, no. 6, pp. 1099–1108, Jun. 2016.
- [87] F. W. Roemer *et al.*, "Anatomical distribution of synovitis in knee osteoarthritis and its association with joint effusion assessed on non-enhanced and contrast-enhanced MRI," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 18, no. 10, pp. 1269–1274, Oct. 2010.
- [88] E. B. P. Lopes, A. Filiberti, S. A. Husain, and M. B. Humphrey, "Immune Contributions to Osteoarthritis," *Curr. Osteoporos. Rep.*, vol. 15, no. 6, pp. 593–600, Dec. 2017.
- [89] A. Mathiessen and P. G. Conaghan, "Synovitis in osteoarthritis: Current understanding with therapeutic implications," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–9, 2017.
- [90] C. H. Chou *et al.*, "Synovial cell cross-talk with cartilage plays a major role in the pathogenesis of osteoarthritis," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020.
- [91] F. Zhang *et al.*, "Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry," *Nat. Immunol.*, vol. 20, no. 7, pp. 928–942, Jul. 2019.
- [92] F. Mizoguchi *et al.*, "Functionally distinct disease-associated fibroblast subsets in rheumatoid arthritis," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2018.
- [93] A. J. Knights *et al.*, "Synovial fibroblasts assume distinct functional identities and secrete R-spondin 2 in osteoarthritis," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 0, p. annrheumdis-2022-222773, Sep. 2022.
- [94] D. N. Greif *et al.*, "Infrapatellar Fat Pad/Synovium Complex in Early-Stage Knee Osteoarthritis: Potential New Target and Source of Therapeutic Mesenchymal

- Stem/Stromal Cells," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, Jul. 2020.
- [95] V. Macchi *et al.*, "The infrapatellar fat pad and the synovial membrane: an anatomofunctional unit," *J. Anat.*, vol. 233, no. 2, pp. 146–154, 2018.
- [96] F. Eymard and X. Chevalier, "Inflammation of the infrapatellar fat pad," *Jt. bone spine*, vol. 83, no. 4, pp. 389–393, Jul. 2016.
- [97] E. Kalaitzoglou, T. M. Griffin, and M. B. Humphrey, "Innate Immune Responses and Osteoarthritis," *Curr. Rheumatol. Rep.*, vol. 19, no. 8, Aug. 2017.
- [98] J. S. An *et al.*, "Inhibition of fibrotic changes in infrapatellar fat pad alleviates persistent pain and articular cartilage degeneration in monoiodoacetic acid-induced rat arthritis model," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 29, no. 3, pp. 380–388, Mar. 2021.
- [99] N. Basisty *et al.*, "A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development," *PLoS Biol.*, vol. 18, no. 1, p. e3000599, Jan. 2020.
- [100] A. Chuprin *et al.*, "Cell fusion induced by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence," *Genes Dev.*, vol. 27, no. 21, p. 2356, Nov. 2013.
- [101] H. Gal *et al.*, "Molecular pathways of senescence regulate placental structure and function," *EMBO J.*, vol. 38, no. 18, Sep. 2019.
- [102] D. Muñoz-Espín and M. Serrano, "Cellular senescence: from physiology to pathology," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 7, pp. 482–496, 2014.
- [103] M. Storer *et al.*, "Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning," *Cell*, vol. 155, no. 5, p. 1119, Nov. 2013.
- [104] D. J. Baker *et al.*, "Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders," *Nature*, vol. 479, no. 7372, pp. 232–236, Nov. 2011.
- [105] B. O. Diekman, J. A. Collins, and R. F. Loeser, "Does Joint Injury Make Young Joints Old?," *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, vol. 26, no. 21, pp. e455–e456, Nov. 2018.
- [106] M. J. Del Rey *et al.*, "Senescent synovial fibroblasts accumulate prematurely in rheumatoid arthritis tissues and display an enhanced inflammatory phenotype," *Immun. Ageing*, vol. 16, no. 1, Nov. 2019.
- [107] O. H. Jeon *et al.*, "Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment," *Nat. Med.*, vol. 352, no. 6286, pp. 712–716, 2017.
- [108] J. A. Martin, T. Brown, A. Heiner, and J. A. Buckwalter, "Post-traumatic osteoarthritis: The role of accelerated chondrocyte senescence," *Biorheology*, vol. 41, no. 3–4, pp. 479–491, Jan. 2004.
- [109] C. Amor *et al.*, "Senolytic CAR T cells reverse senescence-associated pathologies," *Nature*, vol. 583, no. 7814, p. 127, Jul. 2020.
- [110] O. H. Jeon *et al.*, "Senescence cell-associated extracellular vesicles serve as osteoarthritis disease and therapeutic markers," *JCI Insight*, vol. 4, no. 7, Apr. 2019.
- [111] M. G. Overhoff, J. C. Garbe, J. Koh, M. R. Stampfer, D. H. Beach, and C. L. Bishop, "Cellular senescence mediated by p16INK4A-coupled miRNA pathways," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 3, p. 1606, Feb. 2014.
- [112] O. H. Jeon *et al.*, "Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment," *Nat. Med.*, vol. 23, no. 6, pp. 775–781, Mar. 2017.
- [113] P. Rajendran *et al.*, "Autophagy and senescence: A new insight in selected human diseases," *J. Cell. Physiol.*, vol. 0, no. 0, Jun. 2019.
- [114] L. Galluzzi *et al.*, "Molecular definitions of autophagy and related processes," *EMBO J.*, vol. 36, no. 13, p. 1811, Jul. 2017.

- [115] L. Galluzzi, J. M. Bravo-San Pedro, B. Levine, D. R. Green, and G. Kroemer, "Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 16, no. 7, p. 487, Jul. 2017.
- [116] L. Galluzzi and D. R. Green, "Autophagy-Independent Functions of the Autophagy Machinery," *Cell*, vol. 177, no. 7, p. 1682, Jun. 2019.
- [117] C. Vinatier, E. Domínguez, J. Guicheux, and B. Caramés, "Role of the inflammation-autophagy-senescence integrative network in Osteoarthritis," *Front. Physiol.*, vol. 9, no. JUN, pp. 1–25, 2018.
- [118] B. Caramés, N. Taniguchi, S. Otsuki, F. J. Blanco, and M. Lotz, "Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis," *Arthritis Rheum.*, vol. 62, no. 3, pp. 791–801, Mar. 2010.
- [119] T. Matsuzaki *et al.*, "FoxO transcription factors influence cartilage maturation, homeostasis and osteoarthritis pathogenesis by modulating autophagy and proteoglycan 4," *Sci. Transl. Med.*, vol. 10, no. 428, Feb. 2018.
- [120] K. Takayama *et al.*, "Local intra-articular injection of rapamycin delays articular cartilage degeneration in a murine model of osteoarthritis," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–10, Nov. 2014.
- [121] N. T. Cheng, A. Guo, and Y. P. Cui, "Intra-articular injection of Torin 1 reduces degeneration of articular cartilage in a rabbit osteoarthritis model," *Bone Joint Res.*, vol. 5, no. 6, p. 218, Jun. 2016.
- [122] J. Bao, Z. Chen, L. Xu, L. Wu, and Y. Xiong, "Rapamycin protects chondrocytes against IL-18-induced apoptosis and ameliorates rat osteoarthritis," *Aging (Albany. NY)*, vol. 12, Mar. 2020.
- [123] J. Harris *et al.*, "Autophagy Controls IL-1 β Secretion by Targeting Pro-IL-1 β for Degradation," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 11, pp. 9587–9597, Mar. 2011.
- [124] F. Vasheghani *et al.*, "PPAR γ deficiency results in severe, accelerated osteoarthritis associated with aberrant mTOR signalling in the articular cartilage," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 74, no. 3, pp. 569–578, Mar. 2015.
- [125] R. Stienstra, Y. Haim, Y. Riahi, M. Netea, A. Rudich, and G. Leibowitz, "Autophagy in adipose tissue and the beta cell: Implications for obesity and diabetes," *Diabetologia*, vol. 57, no. 8, pp. 1505–1516, May 2014.
- [126] J. A. Collins, B. O. Diekman, and R. F. Loeser, "Targeting aging for disease modification in osteoarthritis," *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol. 30, no. 1, pp. 101–107, Jan. 2018.
- [127] M. Kuro-o *et al.*, "Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing," *Nature*, vol. 390, no. 6655, pp. 45–51, 1997.
- [128] H. Kurosu, "Suppression of aging in mice by the hormone klotho," *Science*, vol. 309, no. 2–3, p. 105, 2005.
- [129] Y. Xu and Z. Sun, "Molecular basis of klotho: From gene to function in aging," *Endocrine Reviews*, vol. 36, no. 2. Endocrine Society, pp. 174–193, 2015.
- [130] A. Romero *et al.*, "The angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis protects from endothelial cell senescence via klotho and Nrf2 activation," *Aging Cell*, vol. 0, no. 0, p. e12913, Mar. 2019.
- [131] F. Liu, S. Wu, H. Ren, and J. Gu, "Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation," *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 3, pp. 254–262, Mar. 2011.
- [132] Y. Guo *et al.*, "Klotho protects the heart from hyperglycemia-induced injury by inactivating ROS and NF- κ B-mediated inflammation both in vitro and in vivo," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1864, no. 1, pp. 238–251, Jan. 2018.

- [133] M. Fakhar, Najumuddin, M. Gul, and S. Rashid, "Antagonistic role of Klotho-derived peptides dynamics in the pancreatic cancer treatment through obstructing WNT-1 and Frizzled binding," *Biophys. Chem.*, vol. 240, pp. 107–117, Sep. 2018.
- [134] X. Tang *et al.*, "Klotho: A tumor suppressor and modulator of the Wnt/ β -catenin pathway in human hepatocellular carcinoma," *Lab. Investig.*, vol. 96, no. 2, pp. 197–205, Feb. 2016.
- [135] T. C. Camilli *et al.*, "Loss of Klotho during melanoma progression leads to increased filamin cleavage, increased Wnt5A expression, and enhanced melanoma cell motility," *Pigment Cell Melanoma Res.*, vol. 24, no. 1, pp. 175–186, Feb. 2011.
- [136] M. S. Saghiv, D. Ben Sira, E. Goldhammer, and M. Sagiv, "The effects of aerobic and anaerobic exercises on circulating soluble-Klotho and IGF-I in young and elderly adults and in CAD patients," *J. Circ. biomarkers*, vol. 6, Jan. 2017.
- [137] T. Rubinek *et al.*, "Klotho response to treatment with growth hormone and the role of IGF-I as a mediator," *Metabolism.*, vol. 65, no. 11, pp. 1597–1604, Nov. 2016.
- [138] Q. Yuan *et al.*, "A Klotho-derived peptide protects against kidney fibrosis by targeting TGF- β signaling," *Nat. Commun.*, vol. 13, no. 1, Dec. 2022.
- [139] S. Doi *et al.*, "Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 10, pp. 8655–8665, Mar. 2011.
- [140] K. Chen and Z. Sun, "Autophagy plays a critical role in Klotho gene deficiency-induced arterial stiffening and hypertension," *J. Mol. Med.*, Nov. 2019.
- [141] B. Xie *et al.*, "Restoration of klotho gene expression induces apoptosis and autophagy in gastric cancer cells: Tumor suppressive role of klotho in gastric cancer," *Cancer Cell Int.*, vol. 13, no. 1, p. 1, Feb. 2013.
- [142] H. Zhou, S. Pu, H. Zhou, and Y. Guo, "Klotho as Potential Autophagy Regulator and Therapeutic Target," *Front. Pharmacol.*, vol. 12, Oct. 2021.
- [143] Á. F. Fernández *et al.*, "Disruption of the beclin 1/Bcl-2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice," *Nature*, vol. 123, no. 24, pp. 4757–4763, 2018.
- [144] A. Tsezou, T. Furuichi, M. Satra, P. Makrythanasis, S. Ikegawa, and K. N. Malizos, "Association of KLOTHO gene polymorphisms with knee osteoarthritis in Greek population," *J. Orthop. Res.*, vol. 26, no. 11, pp. 1466–1470, 2008.
- [145] F. Zhang *et al.*, "Association between KLOTHO gene and hand osteoarthritis in a female Caucasian population.," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 15, no. 6, pp. 624–9, Jun. 2007.
- [146] Q. Yao, L. Wang, K. Ren, and Y. Gu, "Loss of Klotho contributes to cartilage damage by derepression of canonical Wnt/ β -catenin signaling in osteoarthritis mice," *Aging (Albany. NY).*, vol. 11, no. 24, pp. 12793–12809, 2019.
- [147] Y. Gu, K. Ren, C. Jiang, L. Wang, and Q. Yao, "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.*, vol. 11, no. 12, pp. 7338–7350, 2019.
- [148] P. Chuchana *et al.*, "Secreted α -Klotho maintains cartilage tissue homeostasis by repressing NOS2 and ZIP8-MMP13 catabolic axis," *Aging (Albany. NY).*, vol. 10, no. 6, pp. 1442–1453, 2018.
- [149] P. Martinez-Redondo *et al.*, " α KLOTHO and sTGF β R2 treatment counteract the osteoarthritic phenotype developed in a rat model," *Protein Cell*, vol. 11, no. 3, pp. 219–226, Mar. 2020.
- [150] A. Satoh *et al.*, "Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation

- of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH," *Cell Metab.*, vol. 18, no. 3, pp. 416–430, Sep. 2013.
- [151] Y. Kanfi *et al.*, "The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice," *Nature*, vol. 483, no. 7388, pp. 218–221, Mar. 2012.
- [152] C. Chen, M. Zhou, Y. Ge, and X. Wang, "SIRT1 and aging related signaling pathways," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 187, p. 111215, Apr. 2020.
- [153] T. L. A. Kawahara *et al.*, "SIRT6 Links Histone H3 Lysine 9 Deacetylation to NF- κ B-Dependent Gene Expression and Organismal Life Span," *Cell*, vol. 136, no. 1, pp. 62–74, Jan. 2009.
- [154] M. Almeida and R. M. Porter, "Sirtuins and FoxOs in Osteoporosis and Osteoarthritis," *Bone*, vol. 121, p. 284, Apr. 2019.
- [155] L. Rochette *et al.*, "Regenerative Capacity of Endogenous Factor: Growth Differentiation Factor 11; a New Approach of the Management of Age-Related Cardiovascular Events," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 12, Dec. 2018.
- [156] F. S. Loffredo *et al.*, "Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy," *Cell*, vol. 153, no. 4, pp. 828–839, May 2013.
- [157] L. Li *et al.*, "Positive Effects of a Young Systemic Environment and High Growth Differentiation Factor 11 Levels on Chondrocyte Proliferation and Cartilage Matrix Synthesis in Old Mice," *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*, vol. 72, no. 7, pp. 1123–1133, Jul. 2020.
- [158] Y. Yazici *et al.*, "A Phase 2b randomized trial of lorecivint, a novel intra-articular CLK2/DYRK1A inhibitor and Wnt pathway modulator for knee osteoarthritis," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 29, no. 5, pp. 654–666, May 2021.
- [159] R. F. Loeser, "Aging and osteoarthritis.," *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol. 23, no. 5, pp. 492–6, Sep. 2011.
- [160] J. Falconer *et al.*, "Review: Synovial Cell Metabolism and Chronic Inflammation in Rheumatoid Arthritis," *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*, vol. 70, no. 7, pp. 984–999, Jul. 2018.
- [161] R. Kolb, F. S. Sutterwala, and W. Zhang, "Obesity and cancer: inflammation bridges the two," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 29, pp. 77–89, Aug. 2016.
- [162] L. M. Coussens and Z. Werb, "Inflammation and cancer," *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 860–867, Dec. 2002.
- [163] J. Shen, Y. Abu-Amer, R. J. O'Keefe, and A. McAlinden, "Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis," *Connect. Tissue Res.*, vol. 58, no. 1, pp. 49–63, Jan. 2017.
- [164] T. M. Griffin and C. R. Scanzello, "Innate Inflammation and Synovial Macrophages in Osteoarthritis Pathophysiology," *Clin. Exp. Rheumatol.*, vol. 37, no. Suppl 120, p. 57, Sep. 2019.
- [165] S. Clockaerts *et al.*, "The infrapatellar fat pad should be considered as an active osteoarthritic joint tissue: a narrative review," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 18, no. 7, pp. 876–882, Jul. 2010.
- [166] Q. Wang *et al.*, "Dysregulated integrin α V β 3 and CD47 signaling promotes joint inflammation, cartilage breakdown, and progression of osteoarthritis," *JCI Insight*, vol. 4, no. 18, Sep. 2019.
- [167] X. Zhu *et al.*, "Inflammation, epigenetics, and metabolism converge to cell senescence and ageing: the regulation and intervention," *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 6, no. 1, Dec. 2021.
- [168] V. Deretic, "Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism," *Immunity*,

- vol. 54, no. 3, p. 437, Mar. 2021.
- [169] J. A. Bolduc, J. A. Collins, and R. F. Loeser, "Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 132, pp. 73–82, Feb. 2019.
- [170] C. J. Malemud, "Inhibition of MMPs and ADAM/ADAMTS," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 165, p. 33, Jul. 2019.
- [171] Y.-J. Guo, W.-W. Pan, S.-B. Liu, Z.-F. Shen, Y. Xu, and L.-L. Hu, "ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis," *Exp. Ther. Med.*, vol. 19, no. 3, p. 1997, Jan. 2020.
- [172] H. Z. Peng, Z. Yun, W. Wang, and B. A. Ma, "Dual specificity phosphatase 1 has a protective role in osteoarthritis fibroblast-like synoviocytes via inhibition of the MAPK signaling pathway," *Mol. Med. Rep.*, vol. 16, no. 6, pp. 8441–8447, Dec. 2017.
- [173] R. F. Loeser, E. A. Erickson, and D. L. Long, "Mitogen-Activated Protein Kinases as Therapeutic Targets in Osteoarthritis," *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol. 20, no. 5, p. 581, Sep. 2008.
- [174] K. B. Marcu, M. Otero, E. Olivetto, R. M. Borzi, and M. B. Goldring, "NF- κ B Signaling: Multiple angles to target OA," *Curr. Drug Targets*, vol. 11, no. 5, p. 599, Mar. 2010.
- [175] J. A. Roman-Blas and S. A. Jimenez, "NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 14, no. 9, pp. 839–848, Sep. 2006.
- [176] F. Berenbaum, "Signaling transduction: target in osteoarthritis," *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol. 16, no. 5, pp. 616–622, Sep. 2004.
- [177] M. Arra *et al.*, "LDHA-mediated ROS generation in chondrocytes is a potential therapeutic target for osteoarthritis," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–16, Dec. 2020.
- [178] M. Arra, G. Swarnkar, Y. Alippe, G. Mbalaviele, and Y. Abu-Amer, "I κ B- ζ signaling promotes chondrocyte inflammatory phenotype, senescence, and erosive joint pathology," *Bone Res. 2022 101*, vol. 10, no. 1, pp. 1–17, Feb. 2022.
- [179] S. R. Goldring and M. B. Goldring, "The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 427, no. 427 Suppl, 2004.
- [180] P. Cai *et al.*, "Comparison of rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) based on microarray profiles of human joint fibroblast-like synoviocytes," *Cell Biochem. Funct.*, vol. 37, no. 1, pp. 31–41, Jan. 2019.
- [181] A. L. G. Calich, D. S. Domiciano, and R. Fuller, "Osteoarthritis: Can anti-cytokine therapy play a role in treatment?," *Clin. Rheumatol.*, vol. 29, no. 5, pp. 451–455, May 2010.
- [182] W. P. Arend and J. -M Dayer, "Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis," *Arthritis Rheum.*, vol. 38, no. 2, pp. 151–160, 1995.
- [183] W. P. Arend, "Interleukin-1 receptor antagonist," *Adv. Immunol.*, vol. 54, no. C, pp. 167–227, Jan. 1993.
- [184] M. Noack and P. Miossec, "Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis," *Semin. Immunopathol.*, vol. 39, no. 4, pp. 365–383, Jun. 2017.
- [185] J. Fernandes *et al.*, "In Vivo Transfer of Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene in Osteoarthritic Rabbit Knee Joints: Prevention of Osteoarthritis Progression," *Am. J. Pathol.*, vol. 154, no. 4, pp. 1159–1169, Apr. 1999.
- [186] J. P. Caron *et al.*, "Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression," *Arthritis Rheum.*, vol. 39, no. 9, pp. 1535–1544, 1996.
- [187] R. S. Watson Levings *et al.*, "Self-complementary adeno-associated virus-mediated interleukin-1 receptor antagonist gene delivery for the treatment of osteoarthritis: Test

- of efficacy in an equine model," *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.*, vol. 29, no. 2, pp. 101–112, Jun. 2018.
- [188] L. R. Goodrich *et al.*, "Optimization of scAAVIL-1ra in vitro and in vivo to deliver high levels of therapeutic protein for treatment of osteoarthritis," *Mol. Ther. - Nucleic Acids*, vol. 2, no. 2, p. e70, 2013.
- [189] S. Žigon-Branc, M. Jeras, A. Blejec, and A. Barlič, "Applicability of human osteoarthritic chondrocytes for in vitro efficacy testing of anti-TNF α drugs," *Biologicals*, vol. 45, pp. 96–101, Jan. 2017.
- [190] D. M. Urech *et al.*, "Anti-inflammatory and cartilage-protecting effects of an intra-articularly injected anti-TNF{alpha} single-chain Fv antibody (ESBA105) designed for local therapeutic use," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 69, no. 2, pp. 443–449, Feb. 2010.
- [191] Y. Zhao *et al.*, "Cortistatin binds to TNF- α receptors and protects against osteoarthritis," *EBioMedicine*, vol. 41, pp. 556–570, Mar. 2019.
- [192] R. M. Fleischmann *et al.*, "A Phase II Trial of Lutikizumab, an Anti-Interleukin-1 α / β Dual Variable Domain Immunoglobulin, in Knee Osteoarthritis Patients With Synovitis," *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*, vol. 71, no. 7, pp. 1056–1069, Jul. 2019.
- [193] M. Kloppenburg *et al.*, "Phase IIa, placebo-controlled, randomised study of lutikizumab, an anti-interleukin-1 α and anti-interleukin-1 β dual variable domain immunoglobulin, in patients with erosive hand osteoarthritis," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 78, no. 3, pp. 413–420, Mar. 2019.
- [194] M. Kloppenburg *et al.*, "Etanercept in patients with inflammatory hand osteoarthritis (EHOA): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 77, no. 12, pp. 1757–1764, Dec. 2018.
- [195] M. C. de Andrés *et al.*, "Suppressors of cytokine signalling (SOCS) are reduced in osteoarthritis," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 407, no. 1, pp. 54–59, Apr. 2011.
- [196] T. El Jammal, M. Gerfaud-Valentin, P. Sève, and Y. Jamilloux, "Inhibition of JAK/STAT signaling in rheumatologic disorders: The expanding spectrum," *Jt. Bone Spine*, vol. 87, no. 2, pp. 119–129, Mar. 2020.
- [197] N. Kamiya, G. Kuroyanagi, O. Aruwajoye, and H. K. W. Kim, "IL6 receptor blockade preserves articular cartilage and increases bone volume following ischemic osteonecrosis in immature mice," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 27, no. 2, pp. 326–335, Feb. 2019.
- [198] P. Richette *et al.*, "Efficacy of tocilizumab in patients with hand osteoarthritis: double blind, randomised, placebo-controlled, multicentre trial," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 80, no. 3, pp. 349–355, Mar. 2021.
- [199] Y. Nakamura, M. Nawata, and S. Wakitani, "Expression profiles and functional analyses of Wnt-related genes in human joint disorders," *Am. J. Pathol.*, vol. 167, no. 1, pp. 97–105, 2005.
- [200] E. Bourhis *et al.*, "Reconstitution of a frizzled8.Wnt3a.LRP6 signaling complex reveals multiple Wnt and Dkk1 binding sites on LRP6," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 12, pp. 9172–9179, Mar. 2010.
- [201] S. Honsawek, A. Tanavalee, P. Yuktanandana, S. Ngarmukos, N. Saetan, and S. Tantavisut, "Dickkopf-1 (Dkk-1) in plasma and synovial fluid is inversely correlated with radiographic severity of knee osteoarthritis patients," *BMC Musculoskelet. Disord.*, vol. 11, p. 257, 2010.
- [202] A. B. Blom *et al.*, "Involvement of the Wnt signaling pathway in experimental and human osteoarthritis: prominent role of Wnt-induced signaling protein 1," *Arthritis*

- Rheum.*, vol. 60, no. 2, pp. 501–512, Feb. 2009.
- [203] G. Huang, S. Chubinskaya, W. Liao, and R. F. Loeser, “Wnt5a induces catabolic signaling and matrix metalloproteinase production in human articular chondrocytes,” *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 25, no. 9, pp. 1505–1515, Sep. 2017.
- [204] V. Deshmukh *et al.*, “Modulation of the Wnt pathway through inhibition of CLK2 and DYRK1A by lorecivint as a novel, potentially disease-modifying approach for knee osteoarthritis treatment,” *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 27, no. 9, pp. 1347–1360, Sep. 2019.
- [205] B. Ma and M. O. Hottiger, “Crosstalk between wnt/ β -catenin and NF- κ B signaling pathway during inflammation,” *Front. Immunol.*, vol. 7, no. SEP, p. 378, Sep. 2016.
- [206] Y. Yazici *et al.*, “Lorecivint, a Novel Intraarticular CDC-like Kinase 2 and Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinase 1A Inhibitor and Wnt Pathway Modulator for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Phase II Randomized Trial,” *Arthritis Rheumatol.*, vol. 72, no. 10, pp. 1694–1706, Oct. 2020.
- [207] R. B. Lee and J. P. G. Urban, “Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage,” *Biochem. J.*, vol. 321, pp. 95–102, 1997.
- [208] S. Kan, M. Duan, Y. Liu, C. Wang, and J. Xie, “Role of Mitochondria in Physiology of Chondrocytes and Diseases of Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis,” *Cartilage*, vol. 13, no. 2 Suppl, p. 1102S, Dec. 2021.
- [209] X. Yang *et al.*, “Pyruvate Kinase M2 Modulates the Glycolysis of Chondrocyte and Extracellular Matrix in Osteoarthritis,” *DNA Cell Biol.*, vol. 37, no. 3, pp. 271–277, Mar. 2018.
- [210] H. K. Heywood, M. M. Knight, and D. A. Lee, “Both superficial and deep zone articular chondrocyte subpopulations exhibit the Crabtree effect but have different basal oxygen consumption rates,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 223, no. 3, pp. 630–639, Jun. 2010.
- [211] J. R. Anderson *et al.*, “¹H NMR Metabolomics Identifies Underlying Inflammatory Pathology in Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis Synovial Joints,” *J. Proteome Res.*, vol. 17, no. 11, pp. 3780–3790, Nov. 2018.
- [212] H. Farah *et al.*, “Differential Metabotypes in Synovial Fibroblasts and Synovial Fluid in Hip Osteoarthritis Patients Support Inflammatory Responses,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 6, p. 3266, Mar. 2022.
- [213] K. L. Zhou, Z. H. Zhu, J. P. Zhou, J. J. Zhao, Y. Zhang, and B. Jiang, “Increased hexokinase-2 as a novel biomarker for the diagnosis and correlating with disease severity in rheumatoid arthritis,” *Medicine (Baltimore)*, vol. 100, no. 25, pp. e26504–e26504, Jun. 2021.
- [214] X. Yang *et al.*, “Pyruvate kinase M2 modulates the glycolysis of chondrocyte and extracellular matrix in osteoarthritis,” *DNA Cell Biol.*, vol. 37, no. 3, pp. 271–277, 2018.
- [215] H. M. Li *et al.*, “Inhibition of glycolysis by targeting lactate dehydrogenase A facilitates hyaluronan synthase 2 synthesis in synovial fibroblasts of temporomandibular joint osteoarthritis,” *Bone*, vol. 141, Dec. 2020.
- [216] S. A. A. Showiheen *et al.*, “Application of Metabolomics to Osteoarthritis: from Basic Science to the Clinical Approach,” *Curr. Rheumatol. Rep.*, vol. 21, no. 6, Jun. 2019.
- [217] Y. Ohashi *et al.*, “Metabolic reprogramming in chondrocytes to promote mitochondrial respiration reduces downstream features of osteoarthritis,” *Sci. Reports 2021 111*, vol. 11, no. 1, pp. 1–16, Jul. 2021.
- [218] S. C. Rosa, J. Gonçalves, F. Judas, A. Mobasher, C. Lopes, and A. F. Mendes, “Impaired glucose transporter-1 degradation and increased glucose transport and oxidative stress in response to high glucose in chondrocytes from osteoarthritic versus normal human

- cartilage," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 11, no. 3, pp. 1–11, Jun. 2009.
- [219] T. Asano *et al.*, "The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity.," *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 36, pp. 24632–24636, Dec. 1991.
- [220] A. Mobasher, G. Neama, S. Bell, S. Richardson, and S. D. Carter, "Human articular chondrocytes express three facilitative glucose transporter isoforms: GLUT1, GLUT3 and GLUT9," *Cell Biol. Int.*, vol. 26, no. 3, pp. 297–300, 2002.
- [221] C. Wang *et al.*, "Deletion of Glut1 in early postnatal cartilage reprograms chondrocytes toward enhanced glutamine oxidation," *Bone Res.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2021.
- [222] A. R. Shikhman, D. C. Brinson, J. Valbracht, and M. K. Lotz, "Cytokine regulation of facilitated glucose transport in human articular chondrocytes," *J. Immunol.*, vol. 167, no. 12, pp. 7001–7008, Dec. 2001.
- [223] A. R. Shikhman, D. C. Brinson, and M. K. Lotz, "Distinct pathways regulate facilitated glucose transport in human articular chondrocytes during anabolic and catabolic responses," *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, vol. 286, no. 6, pp. 980–985, Jun. 2004.
- [224] P. Lepetsos and A. G. Papavassiliou, "ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1862, no. 4, pp. 576–591, 2016.
- [225] K. Li *et al.*, "Impaired glucose metabolism underlies articular cartilage degeneration in osteoarthritis," *FASEB J.*, vol. 36, no. 6, p. e22377, Jun. 2022.
- [226] E. Zezina, O. Sercan-Alp, M. Herrmann, and N. Biesemann, "Glucose transporter 1 in rheumatoid arthritis and autoimmunity," *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, vol. 12, no. 4, p. e1483, Jul. 2020.
- [227] R. Garcia-Carbonell *et al.*, "Critical Role of Glucose Metabolism in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes," *Arthritis Rheumatol.*, vol. 68, no. 7, pp. 1614–1626, Jul. 2016.
- [228] Q. Li *et al.*, "Hyperglycemia-induced accumulation of advanced glycosylation end products in fibroblast-like synoviocytes promotes knee osteoarthritis," *Exp. Mol. Med.*, vol. 53, no. 11, p. 1735, Nov. 2021.
- [229] B. J. Nguyen *et al.*, "The prognostic and diagnostic value of FDG PET/CT for assessment of symptomatic osteoarthritis," *Nucl. Med. Commun.*, vol. 39, no. 7, p. 699, 2018.
- [230] Y. Umemoto, T. Oka, T. Inoue, and T. Saito, "Imaging of a rat osteoarthritis model using (18)F-fluoride positron emission tomography," *Ann. Nucl. Med.*, vol. 24, no. 9, pp. 663–669, 2010.
- [231] L. B. Tanner *et al.*, "Four Key Steps Control Glycolytic Flux in Mammalian Cells," *Cell Syst.*, vol. 7, no. 1, pp. 49–62.e8, Jul. 2018.
- [232] R. B. Robey and N. Hay, "Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt," *Oncogene*, vol. 25, no. 34, pp. 4683–4696, Aug. 2006.
- [233] J. Zuo *et al.*, "Glycolysis Rate-Limiting Enzymes: Novel Potential Regulators of Rheumatoid Arthritis Pathogenesis," *Front. Immunol.*, vol. 12, p. 4919, Nov. 2021.
- [234] M. F. Bustamante *et al.*, "HEXOKINASE 2 AS A NOVEL SELECTIVE METABOLIC TARGET FOR RHEUMATOID ARTHRITIS," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 77, no. 11, p. 1636, Nov. 2018.
- [235] L. B. Tanner *et al.*, "Four Key Steps Control Glycolytic Flux in Mammalian Cells," *Cell Syst.*, vol. 7, no. 1, pp. 49–62.e8, Jul. 2018.
- [236] C. Bao, S. Zhu, K. Song, and C. He, "HK2: a potential regulator of osteoarthritis via glycolytic and non-glycolytic pathways," *Cell Commun. Signal.*, vol. 20, no. 1, p. 132, 2022.

- [237] T. L. Dayton, T. Jacks, and M. G. Vander Heiden, "PKM2, cancer metabolism, and the road ahead," *EMBO Rep.*, vol. 17, no. 12, pp. 1721–1730, Dec. 2016.
- [238] B. Zhang *et al.*, "SQSTM1-dependent autophagic degradation of PKM2 inhibits the production of mature IL1B/IL-1 β and contributes to LIPUS-mediated anti-inflammatory effect," *Autophagy*, vol. 16, no. 7, p. 1262, Jul. 2020.
- [239] T. Shirai *et al.*, "The glycolytic enzyme PKM2 bridges metabolic and inflammatory dysfunction in coronary artery disease," *J. Exp. Med.*, vol. 213, no. 3, pp. 337–354, Mar. 2016.
- [240] B. Wang *et al.*, "PKM2 is involved in neuropathic pain by regulating ERK and STAT3 activation in rat spinal cord," *J. Headache Pain*, vol. 19, no. 1, Dec. 2018.
- [241] E. Verdin, "NAD⁺ in aging, metabolism, and neurodegeneration," *Science (80-.)*, vol. 350, no. 6265, pp. 1208–1213, Dec. 2015.
- [242] A. Garten, S. Schuster, M. Penke, T. Gorski, T. De Giorgis, and W. Kiess, "Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD metabolism," *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 11, no. 9, pp. 535–546, Sep. 2015.
- [243] C. D. Wiley *et al.*, "Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype," *Cell Metab.*, vol. 23, no. 2, pp. 303–314, Feb. 2016.
- [244] M. R. McReynolds *et al.*, "NAD⁺ flux is maintained in aged mice despite lower tissue concentrations," *Cell Syst.*, vol. 12, no. 12, pp. 1160-1172.e4, Dec. 2021.
- [245] K. Johnson *et al.*, "Mediation of spontaneous knee osteoarthritis by progressive chondrocyte ATP depletion in Hartley guinea pigs," *Arthritis Rheum.*, vol. 50, no. 4, pp. 1216–1225, Apr. 2004.
- [246] Y. Wang, X. Zhao, M. Lotz, R. Terkeltaub, and R. Liu-Bryan, "Mitochondrial biogenesis is impaired in osteoarthritis chondrocytes but reversible via peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α ," *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*, vol. 67, no. 8, pp. 2141–2153, Aug. 2015.
- [247] R. Terkeltaub, B. Yang, M. Lotz, and R. Liu-Bryan, "Chondrocyte AMP-activated Protein Kinase Activity Suppresses Matrix Degradation Responses to Inflammatory Cytokines IL-1 β and TNF α ," *Arthritis Rheum.*, vol. 63, no. 7, p. 1928, Jul. 2011.
- [248] F. Petursson, M. Husa, R. June, M. Lotz, R. Terkeltaub, and R. Liu-Bryan, "Linked decreases in liver kinase B1 and AMP-activated protein kinase activity modulate matrix catabolic responses to biomechanical injury in chondrocytes," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 15, no. 4, Jul. 2013.
- [249] X. Zhao, F. Petursson, B. Viollet, M. Lotz, R. Terkeltaub, and R. Liu-Bryan, "Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α and FoxO3A mediate chondroprotection by AMP-activated protein kinase," *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*, vol. 66, no. 11, pp. 3073–3082, Nov. 2014.
- [250] R. F. Loeser, C. S. Carlson, M. Del Carlo, and A. Cole, "Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1 β and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1," *Arthritis Rheum.*, vol. 46, no. 9, pp. 2349–2357, Sep. 2002.
- [251] B. Fermor, J. Brice Weinberg, D. S. Pisetsky, M. A. Misukonis, A. J. Banes, and F. Guilak, "The effects of static and intermittent compression on nitric oxide production in articular cartilage explants," *J. Orthop. Res.*, vol. 19, no. 4, pp. 729–737, 2001.
- [252] K. Johnson *et al.*, "MITOCHONDRIAL OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IS A DOWNSTREAM REGULATOR OF NITRIC OXIDE EFFECTS ON CHONDROCYTE MATRIX SYNTHESIS AND MINERALIZATION," *ARTHRITIS Rheum.*, vol. 43, no. 7, pp. 1560–1570,

2000.

- [253] B. S. Khakh and R. Alan North, "P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease," *Nature*, vol. 442, no. 7102, pp. 527–532, Aug. 2006.
- [254] D. Ferrari *et al.*, "The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release," *J. Immunol.*, vol. 176, no. 7, pp. 3877–3883, Apr. 2006.
- [255] P. Pelegrin and A. Surprenant, "Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor," *EMBO J.*, vol. 25, no. 21, p. 5071, Nov. 2006.
- [256] A. K. Carlson *et al.*, "Characterization of synovial fluid metabolomic phenotypes of cartilage morphological changes associated with osteoarthritis," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 27, no. 8, pp. 1174–1184, Aug. 2019.
- [257] A. Stincone *et al.*, "The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway," *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, vol. 90, no. 3, p. 927, Aug. 2015.
- [258] B. L. Tang, "Neuroprotection by glucose-6-phosphate dehydrogenase and the pentose phosphate pathway," *J. Cell. Biochem.*, vol. 120, no. 9, pp. 14285–14295, Sep. 2019.
- [259] J. Southan, E. McHugh, H. Walker, and H. M. Ismail, "Metabolic Signature of Articular Cartilage Following Mechanical Injury: An Integrated Transcriptomics and Metabolomics Analysis," *Front. Mol. Biosci.*, vol. 7, Dec. 2020.
- [260] B. Rocha *et al.*, "Integrative Metabolic Pathway Analysis Reveals Novel Therapeutic Targets in Osteoarthritis," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 19, no. 4, p. 574, 2020.
- [261] J. E. DeHaven, K. A. Robinson, B. A. Nelson, and M. G. Buse, "A Novel Variant of Glutamine:Fructose-6-Phosphate Amidotransferase-1 (GFAT1) mRNA Is Selectively Expressed in Striated Muscle," *Diabetes*, vol. 50, no. 11, pp. 2419–2424, Nov. 2001.
- [262] J. Riegger, J. Baumert, F. Zaucke, and R. E. Brenner, "The Hexosamine Biosynthetic Pathway as a Therapeutic Target after Cartilage Trauma: Modification of Chondrocyte Survival and Metabolism by Glucosamine Derivatives and PUGNac in an Ex Vivo Model," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 14, Jul. 2021.
- [263] T. Oki, K. Yamazaki, J. Kuromitsu, M. Okada, and I. Tanaka, "cDNA cloning and mapping of a novel subtype of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT2) in human and mouse," *Genomics*, vol. 57, no. 2, pp. 227–234, Apr. 1999.
- [264] J. N. Gouze *et al.*, "Adenovirus-mediated gene transfer of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase antagonizes the effects of interleukin-1 β on rat chondrocytes," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 12, no. 3, pp. 217–224, Mar. 2004.
- [265] N. M. Akella, L. Ciraku, and M. J. Reginato, "Fueling the fire: emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cancer," *BMC Biol.* 2019 171, vol. 17, no. 1, pp. 1–14, Jul. 2019.
- [266] D. Vigetti *et al.*, "Role of UDP-N-Acetylglucosamine (GlcNAc) and O-GlcNAcylation of Hyaluronan Synthase 2 in the Control of Chondroitin Sulfate and Hyaluronan Synthesis," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 42, p. 35544, Oct. 2012.
- [267] V. C. Hascall *et al.*, "The Dynamic Metabolism of Hyaluronan Regulates the Cytosolic Concentration of UDP-GlcNAc," *Matrix Biol.*, vol. 35, p. 14, 2014.
- [268] L. Tardio *et al.*, "O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) protein modification is increased in the cartilage of patients with knee osteoarthritis," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 22, no. 2, pp. 259–263, Feb. 2014.
- [269] C. Han *et al.*, "O-GlcNAcylation of SIRT1 enhances its deacetylase activity and promotes cytoprotection under stress," *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2017.

- [270] M. P. Housley *et al.*, "O-GlcNAc regulates FoxO activation in response to glucose," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 24, pp. 16283–16292, Jun. 2008.
- [271] H. B. Kim *et al.*, "O-linked N-acetylglucosamine glycosylation of p65 aggravated the inflammation in both fibroblast-like synoviocytes stimulated by tumor necrosis factor- α and mice with collagen induced arthritis," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 17, no. 1, Sep. 2015.
- [272] H. Nie *et al.*, "O-GlcNAcylation of PGK1 coordinates glycolysis and TCA cycle to promote tumor growth," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, Dec. 2020.
- [273] M. F. McCarty, J. H. O'Keefe, and J. J. DiNicolantonio, "Glucosamine for the Treatment of Osteoarthritis: The Time Has Come for Higher-Dose Trials," *J. Diet. Suppl.*, vol. 16, no. 2, pp. 179–192, Mar. 2019.
- [274] S. Marshall, O. Nadeau, and K. Yamasaki, "Dynamic Actions of Glucose and Glucosamine on Hexosamine Biosynthesis in Isolated Adipocytes: DIFFERENTIAL EFFECTS ON GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE, UDP-N-ACETYLGLUCOSAMINE, AND ATP LEVELS," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 34, pp. 35313–35319, Aug. 2004.
- [275] X. Chevalier *et al.*, "Intraarticular injection of anakinra in osteoarthritis of the knee: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study," *Arthritis Rheum.*, vol. 61, no. 3, pp. 344–352, Mar. 2009.
- [276] P. Dwivedi, V. Nayak, and M. Kowshik, "Role of gold nanoparticles as drug delivery vehicles for chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis," *Biotechnol. Prog.*, vol. 31, no. 5, pp. 1416–1422, Sep. 2015.
- [277] R. Goudarzi, S. Amini, A. R. Dehpour, and A. Partoazar, "Estimation of Anti-inflammatory and Analgesic Effects of Topical NANOCEN (Nanoliposomal Arthrocen) on Mice," *AAPS PharmSciTech*, vol. 20, no. 6, Aug. 2019.
- [278] X. Ji *et al.*, "Glucosamine sulphate-loaded distearoyl phosphocholine liposomes for osteoarthritis treatment: combination of sustained drug release and improved lubrication," *Biomater. Sci.*, vol. 7, no. 7, pp. 2716–2728, Jul. 2019.
- [279] F. Xiong *et al.*, "pH-responsive and hyaluronic acid-functionalized metal–organic frameworks for therapy of osteoarthritis," *J. Nanobiotechnology*, vol. 18, no. 1, p. 139, Sep. 2020.
- [280] L. Zerrillo *et al.*, "pH-responsive poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles containing near-infrared dye for visualization and hyaluronic acid for treatment of osteoarthritis," *J. Control. Release*, vol. 309, pp. 265–276, Sep. 2019.
- [281] Q. Lan *et al.*, "MMP-13 enzyme and pH responsive theranostic nanoplatform for osteoarthritis," *J. Nanobiotechnology*, vol. 18, no. 1, p. 117, Aug. 2020.
- [282] M. F. Chung, W. T. Chia, W. L. Wan, Y. J. Lin, and H. W. Sung, "Controlled Release of an Anti-inflammatory Drug Using an Ultrasensitive ROS-Responsive Gas-Generating Carrier for Localized Inflammation Inhibition," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 137, no. 39, pp. 12462–12465, Oct. 2015.
- [283] C. Shen *et al.*, "Reactive oxygen species (ROS)-responsive nanoprobe for bioimaging and targeting therapy of osteoarthritis," *J. Nanobiotechnology*, vol. 19, no. 1, Dec. 2021.
- [284] P. Jin, C. Wiraja, J. Zhao, J. Zhang, L. Zheng, and C. Xu, "Nitric Oxide Nanosensors for Predicting the Development of Osteoarthritis in Rat Model," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 30, pp. 25128–25137, Aug. 2017.
- [285] X. Fu *et al.*, "A natural polysaccharide mediated MOF-based Ce6 delivery system with improved biological properties for photodynamic therapy," *J. Mater. Chem. B*, vol. 8, no. 7, pp. 1481–1488, Feb. 2020.
- [286] D. Presti and J. E. Scott, "Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage

- caused by enzymatically produced hydroxyl (OH.) radicals is dependent on hyaluronan molecular mass," *Cell Biochem. Funct.*, vol. 12, no. 4, pp. 281–288, 1994.
- [287] S. M. Julovi, T. Yasuda, M. Shimizu, T. Hiramitsu, and T. Nakamura, "Inhibition of interleukin-1beta-stimulated production of matrix metalloproteinases by hyaluronan via CD44 in human articular cartilage," *Arthritis Rheum.*, vol. 50, no. 2, pp. 516–525, Feb. 2004.
- [288] J. R. E. Fraser, T. C. Laurent, and U. B. G. Laurent, "Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover," *J. Intern. Med.*, vol. 242, no. 1, pp. 27–33, 1997.
- [289] T. V Pereira *et al.*, "Viscosupplementation for knee osteoarthritis: systematic review and meta-analysis," *BMJ*, vol. 378, p. e069722, Jul. 2022.
- [290] N. Su, P. L. Gao, K. Wang, J. Y. Wang, Y. Zhong, and Y. Luo, "Fibrous scaffolds potentiate the paracrine function of mesenchymal stem cells: A new dimension in cell-material interaction.," *Biomaterials*, vol. 141, pp. 74–85, Jun. 2017.
- [291] H. Yang *et al.*, "Materials Stiffness-Dependent Redox Metabolic Reprogramming of Mesenchymal Stem Cells for Secretome-Based Therapeutic Angiogenesis," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 8, no. 20, Oct. 2019.
- [292] P. Khayambashi, J. Iyer, S. Pillai, A. Upadhyay, Y. Zhang, and S. D. Tran, "Hydrogel Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells and Their Derived Exosomes for Tissue Engineering," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 2, pp. 1–15, Jan. 2021.
- [293] A. Rey-Rico, J. K. Venkatesan, G. Schmitt, S. Speicher-Mentges, H. Madry, and M. Cucchiari, "Effective Remodelling of Human Osteoarthritic Cartilage by sox9 Gene Transfer and Overexpression upon Delivery of rAAV Vectors in Polymeric Micelles," *Mol. Pharm.*, vol. 15, no. 7, pp. 2816–2826, Jul. 2018.
- [294] C. R. Harrell, B. S. Markovic, C. Fellabaum, A. Arsenijevic, and V. Volarevic, "Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: Current knowledge and future perspectives," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 109, pp. 2318–2326, Jan. 2019.
- [295] I. Andia and N. Maffulli, "Platelet-rich plasma for managing pain and inflammation in osteoarthritis," *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 9, no. 12, pp. 721–730, Dec. 2013.
- [296] I. A. Jones, R. Togashi, M. L. Wilson, N. Heckmann, C. T. Vangsness, and Jr, "Intra-articular treatment options for knee osteoarthritis," *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 15, no. 2, pp. 77–90, Feb. 2019.
- [297] H. Madry, U. W. Grün, and G. Knutsen, "Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options," *Dtsch. Arztebl. Int.*, vol. 108, no. 40, pp. 669–677, Oct. 2011.
- [298] M. Brittberg, A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson, and L. Peterson, "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation," *N. Engl. J. Med.*, vol. 331, no. 14, pp. 889–895, Oct. 1994.
- [299] M. Mumme *et al.*, "Nasal chondrocyte-based engineered autologous cartilage tissue for repair of articular cartilage defects: an observational first-in-human trial," *Lancet (London, England)*, vol. 388, no. 10055, pp. 1985–1994, Oct. 2016.
- [300] H. Lee *et al.*, "TissueGene-C promotes an anti-inflammatory micro-environment in a rat monoiodoacetate model of osteoarthritis via polarization of M2 macrophages leading to pain relief and structural improvement," *Inflammopharmacology*, vol. 28, no. 5, p. 1237, Oct. 2020.
- [301] Y. Shi *et al.*, "Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases," *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 14, no. 8, pp. 493–507, Aug. 2018.
- [302] O. Levy *et al.*, "Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies," *Sci.*

- Adv.*, vol. 6, no. 30, Jul. 2020.
- [303] S. Saghahazrati, S. A. Ayatollahi, F. Kobarfard, and B. M. Zang, "The Synergistic Effect of Glucagon-Like Peptide-1 and Chamomile Oil on Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Insulin-Producing Cells," *Cell J.*, vol. 21, no. 4, pp. 371–378, 2020.
- [304] L. da Silva Meirelles, A. M. Fontes, D. T. Covas, and A. I. Caplan, "Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells," *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 20, no. 5–6, pp. 419–427, Oct. 2009.
- [305] A. I. Caplan and J. E. Dennis, "Mesenchymal stem cells as trophic mediators," *J. Cell. Biochem.*, vol. 98, no. 5, pp. 1076–1084, Aug. 2006.
- [306] C. Manferdini *et al.*, "Adipose stromal cells mediated switching of the pro-inflammatory profile of M1-like macrophages is facilitated by PGE2: in vitro evaluation," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 25, no. 7, pp. 1161–1171, Jul. 2017.
- [307] N. Song, M. Scholtemeijer, and K. Shah, "Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 41, no. 9, pp. 653–664, Sep. 2020.
- [308] M. Ruiz, K. Toupet, M. Maumus, P. Rozier, C. Jorgensen, and D. Noël, "TGFBI secreted by mesenchymal stromal cells ameliorates osteoarthritis and is detected in extracellular vesicles," *Biomaterials*, vol. 226, Jan. 2020.
- [309] Q. He *et al.*, "Mesenchymal stem cell-derived exosomes exert ameliorative effects in type 2 diabetes by improving hepatic glucose and lipid metabolism via enhancing autophagy," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 11, no. 1, Jun. 2020.
- [310] C. Zhu, W. Wu, and X. Qu, "Mesenchymal stem cells in osteoarthritis therapy: a review," *Am. J. Transl. Res.*, vol. 13, no. 2, p. 448, 2021.
- [311] T. H. Qazi, D. J. Mooney, G. N. Duda, and S. Geissler, "Biomaterials that promote cell-cell interactions enhance the paracrine function of MSCs," *Biomaterials*, vol. 140, pp. 103–114, Sep. 2017.
- [312] S. Xin, C. A. Gregory, and D. L. Alge, "Interplay between degradability and integrin signaling on mesenchymal stem cell function within poly(ethylene glycol) based microporous annealed particle hydrogels," *Acta Biomater.*, vol. 101, pp. 227–236, Jan. 2020.
- [313] J. Xue, D. Pisignano, and Y. Xia, "Maneuvering the Migration and Differentiation of Stem Cells with Electrospun Nanofibers," *Adv. Sci. (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Ger.)*, vol. 7, no. 15, Aug. 2020.
- [314] S. Y. Song *et al.*, "Interleukin-4 Gene Transfection and Spheroid Formation Potentiate Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stem Cells for Osteoarthritis," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 9, no. 5, p. 1901612, Mar. 2020.
- [315] J. Oh, Y. S. Son, W. H. Kim, O. K. Kwon, and B. J. Kang, "Mesenchymal stem cells genetically engineered to express platelet-derived growth factor and heme oxygenase-1 ameliorate osteoarthritis in a canine model," *J. Orthop. Surg. Res.*, vol. 16, no. 1, Dec. 2021.
- [316] R. F. Loeser, S. R. Goldring, C. R. Scanzello, and M. B. Goldring, "Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ," *Arthritis Rheum.*, vol. 64, no. 6, pp. 1697–1707, Jun. 2012.
- [317] T. Neogi *et al.*, "Association between radiographic features of knee osteoarthritis and pain: results from two cohort studies," *BMJ*, vol. 339, no. 7719, pp. 498–501, Aug. 2009.
- [318] R. D. Altman, T. Devji, M. Bhandari, A. Fierlinger, F. Niazi, and R. Christensen, "Clinical benefit of intra-articular saline as a comparator in clinical trials of knee osteoarthritis treatments: A systematic review and meta-analysis of randomized trials," *Semin.*

- Arthritis Rheum.*, vol. 46, no. 2, pp. 151–159, Oct. 2016.
- [319] X. M. Anguela and K. A. High, “Entering the Modern Era of Gene Therapy,” *Annu. Rev. Med.*, vol. 70, no. 1, pp. 273–288, Jan. 2019.
- [320] J. van Haasteren, J. Li, O. J. Scheideler, N. Murthy, and D. V. Schaffer, “The delivery challenge: fulfilling the promise of therapeutic genome editing,” *Nat. Biotechnol.* 2020 387, vol. 38, no. 7, pp. 845–855, Jun. 2020.
- [321] F. Mingozzi and K. A. High, “Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy,” *Blood*, vol. 122, no. 1, pp. 23–36, Jul. 2013.
- [322] B. Balakrishnan and E. David, “Biopolymers augment viral vectors based gene delivery,” *J. Biosci.*, vol. 44, no. 4, pp. 1–8, Sep. 2019.
- [323] A. Nyamay’Antu, M. Dumont, V. Kedingler, and P. Erbacher, “Non-Viral Vector Mediated Gene Delivery: the Outsider to Watch Out For in Gene Therapy,” *Cell Gene Ther. Insights*, vol. 5, no. S1, pp. 51–57, Feb. 2019.
- [324] D. V. Faller and D. Baltimore, “Liposome encapsulation of retrovirus allows efficient superinfection of resistant cell lines,” *J. Virol.*, vol. 49, no. 1, p. 269, Jan. 1984.
- [325] J. Maihöfer *et al.*, “Hydrogel-Guided, rAAV-Mediated IGF-I Overexpression Enables Long-Term Cartilage Repair and Protection against Perifocal Osteoarthritis in a Large-Animal Full-Thickness Chondral Defect Model at One Year In Vivo,” *Adv. Mater.*, vol. 33, no. 16, Apr. 2021.
- [326] J. Urich, M. Cucchiarini, and A. Rey-Rico, “Therapeutic Delivery of rAAV sox9 via Polymeric Micelles Counteracts the Effects of Osteoarthritis-Associated Inflammatory Cytokines in Human Articular Chondrocytes,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 6, p. 1238, Jun. 2020.
- [327] A. Rey-Rico *et al.*, “rAAV-mediated overexpression of TGF- β via vector delivery in polymeric micelles stimulates the biological and reparative activities of human articular chondrocytes in vitro and in a human osteochondral defect model,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 6985–6996, Sep. 2017.
- [328] H. Madry *et al.*, “Thermosensitive Hydrogel Based on PEO–PPO–PEO Poloxamers for a Controlled In Situ Release of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors for Effective Gene Therapy of Cartilage Defects,” *Adv. Mater.*, vol. 32, no. 2, p. 1906508, Jan. 2020.
- [329] S. J. Beer, J. M. Hilfinger, and B. L. Davidson, “Extended release of adenovirus from polymer microspheres: Potential use in gene therapy for brain tumors,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 27, no. 1, pp. 59–66, Aug. 1997.
- [330] A. Pandit, A. Breen, P. Dockery, and T. O’Brien, “Fibrin scaffold promotes adenoviral gene transfer and controlled vector delivery,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 89A, no. 4, pp. 876–884, Jun. 2009.
- [331] R. M. Boehler, S. Shin, A. G. Fast, R. M. Gower, and L. D. Shea, “A PLG/HAp composite scaffold for lentivirus delivery,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 21, p. 5431, Jul. 2013.
- [332] A. M. Thomas and L. D. Shea, “Polysaccharide-modified scaffolds for controlled lentivirus delivery in vitro and after spinal cord injury,” *J. Control. Release*, vol. 170, no. 3, pp. 421–429, Sep. 2013.
- [333] S. Lee, J. S. Kim, H. S. Chu, G. W. Kim, J. I. Won, and J. H. Jang, “Electrospun nanofibrous scaffolds for controlled release of adeno-associated viral vectors,” *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 11, pp. 3868–3876, Nov. 2011.
- [334] C. R. O’Riordan *et al.*, “PEGylation of Adenovirus with Retention of Infectivity and Protection from Neutralizing Antibody in Vitro and in Vivo,” <https://home.liebertpub.com/hum>, vol. 10, no. 8, pp. 1349–1358, Jul. 2004.

- [335] M. A. Croyle, N. Chirmule, Y. Zhang, and J. M. Wilson, "'Stealth' adenoviruses blunt cell-mediated and humoral immune responses against the virus and allow for significant gene expression upon readministration in the lung," *J. Virol.*, vol. 75, no. 10, pp. 4792–4801, May 2001.
- [336] P. H. Kim *et al.*, "Bio-reducible polymer-conjugated oncolytic adenovirus for hepatoma-specific therapy via systemic administration," *Biomaterials*, vol. 32, no. 35, pp. 9328–9342, Sep. 2011.
- [337] A. Rey-Rico *et al.*, "Effective and durable genetic modification of human mesenchymal stem cells via controlled release of rAAV vectors from self-assembling peptide hydrogels with a maintained differentiation potency," *Acta Biomater.*, vol. 18, pp. 118–127, May 2015.
- [338] H. Li *et al.*, "Immobilization of FLAG-Tagged Recombinant Adeno-Associated Virus 2 onto Tissue Engineering Scaffolds for the Improvement of Transgene Delivery in Cell Transplants," *PLoS One*, vol. 10, no. 6, p. e0129013, Jun. 2015.
- [339] J. W. Choi *et al.*, "Using a magnetic field to redirect an oncolytic adenovirus complexed with iron oxide augments gene therapy efficacy," *Biomaterials*, vol. 65, pp. 163–174, Jul. 2015.
- [340] K. I. Ogawara *et al.*, "Functional inhibition of NF- κ B signal transduction in α v β 3 integrin expressing endothelial cells by using RGD-PEG-modified adenovirus with a mutant I κ B gene," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 8, no. 1, p. R32, Jan. 2006.
- [341] O. Mykhaylyk *et al.*, "Silica-Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Modified for Gene Delivery: A Search for Optimum and Quantitative Criteria," *Pharm. Res.*, vol. 29, no. 5, pp. 1344–1365, May 2012.
- [342] Y. Wang *et al.*, "Is Viral Vector Gene Delivery More Effective Using Biomaterials?," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 10, no. 1, Jan. 2021.
- [343] V. P. Leifer, J. N. Katz, and E. Losina, "The burden of OA-health services and economics," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 30, no. 1, pp. 10–16, Jan. 2022.
- [344] W. M. Oo, C. Little, V. Duong, and D. J. Hunter, "The Development of Disease-Modifying Therapies for Osteoarthritis (DMOADs): The Evidence to Date," *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 15, pp. 2921–2945, 2021.
- [345] X. Chevalier and F. Eymard, "Anti-IL-1 for the treatment of OA: dead or alive?," *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 15, no. 4, pp. 191–192, Apr. 2019.
- [346] M. Kloppenburg *et al.*, "Etanercept in patients with inflammatory hand osteoarthritis (EHOA): A multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 77, no. 12, pp. 1757–1764, Dec. 2018.
- [347] N. Brunetti-Pierri and P. Ng, "Helper-Dependent Adenoviral Vectors," in *Adenoviral Vectors for Gene Therapy: Second Edition*, Elsevier Inc., 2016, pp. 423–450.
- [348] M. A. Croyle *et al.*, "PEGylated helper-dependent adenoviral vectors: highly efficient vectors with an enhanced safety profile," *Gene Ther.*, vol. 12, no. 7, pp. 579–587, Apr. 2005.
- [349] J. T. Bulcha, Y. Wang, H. Ma, P. W. L. Tai, and G. Gao, "Viral vector platforms within the gene therapy landscape," *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 6, no. 1, Dec. 2021.
- [350] C. J. Aalbers *et al.*, "Empty Capsids and Macrophage Inhibition/Depletion Increase rAAV Transgene Expression in Joints of Both Healthy and Arthritic Mice," *Hum. Gene Ther.*, vol. 28, no. 2, pp. 168–178, Jul. 2016.
- [351] J. Haughan, Z. Jiang, D. Stefanovski, K. L. Moss, K. F. Ortved, and M. A. Robinson, "Detection of intra-articular gene therapy in horses using quantitative real time PCR in

- synovial fluid and plasma," *Drug Test. Anal.*, p. dta.2785, Mar. 2020.
- [352] A. Rey-Rico *et al.*, "PEO-PPO-PEO Carriers for rAAV-Mediated Transduction of Human Articular Chondrocytes in Vitro and in a Human Osteochondral Defect Model," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, no. 32, pp. 20600–20613, Aug. 2016.
- [353] R. S. Watson *et al.*, "ScAAV-mediated gene transfer of interleukin-1-receptor antagonist to synovium and articular cartilage in large mammalian joints," *Gene Ther.*, vol. 20, no. 6, pp. 670–677, Jun. 2013.
- [354] C. R. Scanzello, "Role of low-grade inflammation in osteoarthritis," *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol. 29, no. 1, pp. 79–85, 2017.
- [355] Y. Wang, X. Zhao, M. Lotz, R. Terkeltaub, and R. Liu-Bryan, "Mitochondrial biogenesis is impaired in osteoarthritic chondrocytes but reversible via peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α ," *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*, vol. 67, no. 8, p. 2141, Aug. 2015.
- [356] N. L. Bergholt, H. Lysdahl, M. Lind, and C. B. Foldager, "A Standardized Method of Applying Toluidine Blue Metachromatic Staining for Assessment of Chondrogenesis," *Cartilage*, vol. 10, no. 3, pp. 370–374, Jul. 2019.
- [357] T. Hamada *et al.*, "SURFACE MARKERS AND GENE EXPRESSION TO CHARACTERIZE THE DIFFERENTIATION OF MONOLAYER EXPANDED HUMAN ARTICULAR CHONDROCYTES," *Nagoya J. Med. Sci.*, vol. 75, no. 1–2, p. 101, 2013.
- [358] P. Sengprasert, N. Leearamwat, S. Ngarmukos, P. Yuktananda, A. Tanavalee, and R. Reantragoon, "Upregulation of antigen presentation function and inflammation in chondrocytes by induction of proteoglycan aggrecan peptides (P16-31 and P263-280)," *Clin. Exp. Rheumatol.*, vol. 40, no. 3, pp. 596–607, Mar. 2022.
- [359] M. Kuhne *et al.*, "HLA-B27-restricted antigen presentation by human chondrocytes to CD8+ T cells: potential contribution to local immunopathologic processes in ankylosing spondylitis," *Arthritis Rheum.*, vol. 60, no. 6, pp. 1635–1646, Jun. 2009.
- [360] M. Neagu *et al.*, "Inflammation and metabolism in cancer cell—mitochondria key player," *Front. Oncol.*, vol. 9, no. MAY, p. 348, 2019.
- [361] M. Mathy-Hartert, L. Hogge, C. Sanchez, G. Deby-Dupont, J. M. Crielaard, and Y. Henrotin, "Interleukin-1 β and interleukin-6 disturb the antioxidant enzyme system in bovine chondrocytes: a possible explanation for oxidative stress generation," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 16, no. 7, pp. 756–763, Jul. 2008.
- [362] Y. Xiang *et al.*, "Expression of proteinase-activated receptors (PAR)-2 in articular chondrocytes is modulated by IL-1 β , TNF- α and TGF- β ," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 14, no. 11, pp. 1163–1173, Nov. 2006.
- [363] T. E. S. Kauppila, J. H. K. Kauppila, and N. G. Larsson, "Mammalian Mitochondria and Aging: An Update," *Cell Metab.*, vol. 25, no. 1, pp. 57–71, Jan. 2017.
- [364] J. Soul *et al.*, "Stratification of knee osteoarthritis: Two major patient subgroups identified by genome-wide expression analysis of articular cartilage," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 77, no. 3, pp. 423–430, Mar. 2018.
- [365] W. M. Oo and D. J. Hunter, "Disease modification in osteoarthritis: are we there yet?," *Clin. Exp. Rheumatol.*, vol. 37, no. 5, pp. 135–140, 2019.
- [366] A. Litwic, M. H. Edwards, E. M. Dennison, and C. Cooper, "Epidemiology and burden of osteoarthritis," *Br. Med. Bull.*, vol. 105, no. 1, pp. 185–199, Mar. 2013.
- [367] C. Zincarelli, S. Soltys, G. Rengo, and J. E. Rabinowitz, "Analysis of AAV Serotypes 1–9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection," *Mol. Ther.*, vol. 16, no. 6, pp. 1073–1080, Jun. 2008.

- [368] R. Calcedo, L. H. Vandenberghe, G. Gao, J. Lin, and J. M. Wilson, "Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses," *J. Infect. Dis.*, vol. 199, no. 3, pp. 381–390, Feb. 2009.
- [369] F. Mingozzi *et al.*, "Prevalence and pharmacological modulation of humoral immunity to AAV vectors in gene transfer to synovial tissue," *Gene Ther.*, vol. 20, no. 4, pp. 417–424, Apr. 2013.
- [370] F. Apparailly *et al.*, "Adeno-associated virus pseudotype 5 vector improves gene transfer in arthritic joints," *Hum. Gene Ther.*, vol. 16, no. 4, pp. 426–434, Apr. 2005.
- [371] J. Adriaansen *et al.*, "Enhanced gene transfer to arthritic joints using adeno-associated virus type 5: Implications for intra-articular gene therapy," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 64, no. 12, pp. 1677–1684, Dec. 2005.
- [372] T. Y. Abdul *et al.*, "Prevalence of AAV2.5 neutralizing antibodies in synovial fluid and serum of patients with osteoarthritis," *Gene Ther.* 2022, pp. 1–5, Mar. 2022.
- [373] D. Grimm *et al.*, "In Vitro and In Vivo Gene Therapy Vector Evolution via Multispecies Interbreeding and Retargeting of Adeno-Associated Viruses," *J. Virol.*, vol. 82, no. 12, pp. 5887–5911, Jun. 2008.
- [374] D. E. Bowles *et al.*, "Phase 1 Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy Using a Translational Optimized AAV Vector," *Mol. Ther.*, vol. 20, no. 2, pp. 443–455, Feb. 2012.
- [375] P. Radhakrishnan, H. Basma, D. Klinkebiel, J. Christman, and P. W. Cheng, "Cell Type-Specific Activation of the Cytomegalovirus Promoter by Dimethylsulfoxide and 5-Aza-2'-deoxycytidine," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 40, no. 9, p. 1944, 2008.
- [376] S. Bäck *et al.*, "Neuronal Activation Stimulates Cytomegalovirus Promoter-Driven Transgene Expression," *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, vol. 14, pp. 180–188, 2019.
- [377] M. Gosset, F. Berenbaum, S. Thirion, and C. Jacques, "Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes," *Nat. Protoc.* 2008 38, vol. 3, no. 8, pp. 1253–1260, Jul. 2008.
- [378] Y.-S. Tseng and M. Agbandje-McKenna, "Mapping the AAV Capsid Host Antibody Response toward the Development of Second Generation Gene Delivery Vectors," *Front. Immunol.*, vol. 5, no. JAN, p. 9, Jan. 2014.
- [379] M. S. Sands, "AAV-Mediated Liver-Directed Gene Therapy," *Methods Mol. Biol.*, vol. 807, p. 141, 2011.
- [380] A. Fouasson-Chailloux *et al.*, "Posttraumatic Osteoarthritis Damage in Mice: From Histological and Micro-Computed Tomodensitometric Changes to Gait Disturbance," *Cartilage*, vol. 13, no. 2 Suppl, p. 1478S, Dec. 2021.
- [381] A. K. Mehta, S. S. Majumdar, P. Alam, N. Gulati, and V. Brahmachari, "Epigenetic regulation of cytomegalovirus major immediate-early promoter activity in transgenic mice," *Gene*, vol. 428, no. 1–2, pp. 20–24, Jan. 2009.
- [382] Y. S. Yang *et al.*, "Bone-targeting AAV-mediated silencing of Schnurri-3 prevents bone loss in osteoporosis," *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–13, 2019.
- [383] D. S. Yoon *et al.*, "Cellular and Tissue Selectivity of AAV Serotypes for Gene Delivery to Chondrocytes and Cartilage," *Int. J. Med. Sci.*, vol. 18, no. 15, pp. 3353–3360, 2021.
- [384] Q. Chen *et al.*, "Comparative intra-articular gene transfer of seven adeno-associated virus serotypes reveals that AAV2 mediates the most efficient transduction to mouse arthritic chondrocytes," *PLoS One*, vol. 15, no. 12 December, Dec. 2020.
- [385] C. J. Aalbers *et al.*, "Preclinical Potency and Biodistribution Studies of an AAV 5 Vector Expressing Human Interferon- β (ART-I02) for Local Treatment of Patients with Rheumatoid Arthritis," *PLoS One*, vol. 10, no. 6, Jun. 2015.
- [386] P. Veron *et al.*, "Highly efficient transduction of human plasmacytoid dendritic cells

- without phenotypic and functional maturation," *J. Transl. Med.*, vol. 7, Jan. 2009.
- [387] C. Teschendorf, K. H. Warrington, D. W. Siemann, and N. Muzyczka, "Comparison of the EF-1 alpha and the CMV promoter for engineering stable tumor cell lines using recombinant adeno-associated virus," *Anticancer Res.*, vol. 22, no. 6A, pp. 3325–3330, Nov. 2002.
- [388] A. L. Gray *et al.*, "An Improved Adeno-Associated Virus Vector for Neurological Correction of the Mouse Model of Mucopolysaccharidosis IIIA," *Hum. Gene Ther.*, vol. 30, no. 9, pp. 1052–1066, Sep. 2019.
- [389] M. Ulrich-Vinther, M. R. Duch, K. Søballe, R. J. O'Keefe, E. M. Schwarz, and F. S. Pedersen, "In vivo gene delivery to articular chondrocytes mediated by an adeno-associated virus vector," *J. Orthop. Res.*, vol. 22, no. 4, pp. 726–734, 2004.
- [390] J. Yang *et al.*, "The negatively charged microenvironment of collagen hydrogels regulates the chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo," *J. Mater. Chem. B*, vol. 8, no. 21, pp. 4680–4693, Jun. 2020.
- [391] K. M. Stiles, E. Z. Frenk, S. M. Kaminsky, and R. G. Crystal, "Genetic Modification of the AAV5 Capsid with Lysine Residues Results in a Lung-Tropic Liver-Detargeted Gene Transfer Vector," *Hum. Gene Ther.*, vol. 33, no. 3–4, pp. 148–154, Feb. 2022.
- [392] C. S. F. Cheung, J. C. Lui, and J. Baron, "Identification of chondrocyte-binding peptides by phage display," *J. Orthop. Res.*, vol. 31, no. 7, pp. 1053–1058, Jul. 2013.
- [393] Y. Pi *et al.*, "Targeted delivery of non-viral vectors to cartilage in vivo using a chondrocyte-homing peptide identified by phage display," *Biomaterials*, vol. 32, no. 26, pp. 6324–6332, Sep. 2011.
- [394] Q. Hu, Q. Chen, X. Yan, B. Ding, D. Chen, and L. Cheng, "Chondrocyte affinity peptide modified PAMAM conjugate as a nanoplatfor for targeting and retention in cartilage," *Nanomedicine*, vol. 13, no. 7, pp. 749–767, Mar. 2018.
- [395] R. Rieser, T. Menzen, M. Biel, S. Michalak, and G. Winter, "Systematic Studies on Stabilization of AAV Vector Formulations by Lyophilization," *J. Pharm. Sci.*, vol. 111, no. 8, pp. 2288–2298, Aug. 2022.
- [396] J. M. K. Chan, G. Villareal, W. W. Jin, T. Stepan, H. Burstein, and S. M. Wahl, "Intraarticular gene transfer of TNFR:Fc suppresses experimental arthritis with reduced systemic distribution of the gene product," *Mol. Ther.*, vol. 6, no. 6, pp. 727–736, Dec. 2002.
- [397] K. Thompson *et al.*, "Recent advances in understanding the molecular genetic basis of mitochondrial disease," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 43, no. 1, p. 36, Jan. 2020.
- [398] A. R. Hanaford, Y. J. Cho, and H. Nakai, "AAV-vector based gene therapy for mitochondrial disease: progress and future perspectives," *Orphanet J. Rare Dis.*, vol. 17, no. 1, p. 217, Dec. 2022.
- [399] F. J. Blanco, A. M. Valdes, and I. Rego-Pérez, "Mitochondrial DNA variation and the pathogenesis of osteoarthritis phenotypes," *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 14, no. 6, pp. 327–340, Jun. 2018.
- [400] H. Yu *et al.*, "Next-generation sequencing of mitochondrial targeted AAV transfer of human ND4 in mice," *Mol. Vis.*, vol. 19, p. 1482, Jul. 2013.
- [401] P. Yu-Wai-Man *et al.*, "Bilateral visual improvement with unilateral gene therapy injection for Leber hereditary optic neuropathy," *Sci. Transl. Med.*, vol. 12, no. 573, Dec. 2020.

Titre : Du métabolisme énergétique des chondrocytes arthrosiques jusqu'au développement d'un outil de vectorisation

Mots clés : Arthrose, Inflammation, Métabolisme, Thérapie génique, AAV

Résumé : L'arthrose est la plus commune des maladies articulaires. Malgré plus de 500 millions de personnes atteintes dans le monde, et une incidence grandissante avec le vieillissement de la population, aucune thérapie curative n'est proposée à ce jour. Il est alors nécessaire d'une part, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et, d'autre part, de développer des outils de vectorisation efficaces et sûrs.

L'arthrose se caractérise par une atteinte de tous les tissus de l'articulation. La membrane synoviale participe largement à l'initiation de l'inflammation chronique de bas grade caractéristique de l'arthrose, et le cartilage, lui, subit et participe au maintien de cette inflammation qui mène à terme à sa dégradation. Bien que le rôle de l'inflammation est aujourd'hui largement reconnu, les récents échecs thérapeutiques traduisent d'un manque de compréhension des mécanismes induits par l'inflammation. Ainsi, ce projet visait à définir largement le rôle de 3 cytokines

pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α et IL-6) sur les chondrocytes en s'appuyant sur des analyses bio-informatiques. Cette approche a alors permis d'identifier le métabolisme énergétique comme un élément important de la réponse pro-inflammatoire des chondrocytes arthrosiques.

Parallèlement, ce projet a permis l'évaluation des virus adéno-associés (AAVs) comme vecteurs d'acides nucléiques au sein de l'articulation. La biodistribution de 8 sérotypes d'AAV, injectés dans la cavité articulaire de souris a ainsi été décrite. Enfin, deux promoteurs ubiquitaires forts ont été comparés.

Finalement, ce travail a permis de mettre en évidence le lien fort qu'il existait entre l'inflammation et les dérégulations métaboliques observées dans les chondrocytes au cours de l'arthrose mais aussi de participer au développement de l'utilisation des AAVs comme vecteur de choix pour l'articulation.