



**HAL**  
open science

# Mise au point d'un modèle de sénescence chondrocytaire et rôle de la O-GlcNAcylation dans l'arthrose

Mélina Georget

## ► To cite this version:

Mélina Georget. Mise au point d'un modèle de sénescence chondrocytaire et rôle de la O-GlcNAcylation dans l'arthrose. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2023. Français. NNT : 2023NANU1006 . tel-04146883

**HAL Id: tel-04146883**

**<https://theses.hal.science/tel-04146883>**

Submitted on 30 Jun 2023

**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 : « *Biologie Cellulaire, Biologie du Développement* »

Par

**« Méлина GEORGET »**

**« Mise au point d'un modèle de sénescence chondrocytaire et rôle de la O-GlcNAcylation dans l'arthrose »**

Thèse présentée et soutenue à « Nantes », le « 1<sup>er</sup> Février 2023 »

Unité de recherche : INSERM U1229 « Regenerative Medicine and Skeleton »

## Rapporteurs avant soutenance :

Patricia Albanese  
Caroline Cieniewski-Bernard

Professeur des universités, Université Paris EST Créteil  
Maitre de conférences des universités, Université de Lille

## Composition du Jury :

Président : Franck OURY  
Examineurs : Patricia Albanese  
Caroline Cieniewski-Bernard  
Franck OURY  
Xavier Houard

Directeur de recherche INSERM, Faculté de Médecine Necker, Paris  
Professeur des universités, Université Paris EST Créteil  
Maitre de conférences des universités, Université de Lille  
Directeur de recherche INSERM, Faculté de Médecine Necker, Paris  
Professeur des universités, Sorbonne Université, Paris

Dir. de thèse : Claire Vinatier  
Co-dir. de thèse : Gaël GRIMANDI  
Co-encadrant : Alban Fouasson-Chailloux

Maitre de conférences des universités, UFR Odontologie, Nantes université  
PUPH, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Nantes université  
MD-PHD, Hôpital Saint-Jacques - CHU de Nantes, Nantes université

Invité(s)

Benjamin Lauzier  
Jérôme Guicheux

Professeur des universités, Institut du thorax, Nantes université  
Directeur de recherche INSERM, UFR Odontologie, Nantes université



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier **Madame Claire Vinatier**, pour avoir accepté de me confier ce projet de recherche et sa supervision au cours de mes travaux de thèse en tant que directrice. Je tiens également à remercier mon co-directeur de thèse **Monsieur Gaël Grimandi** et mon co-encadrant **Monsieur Alban FOUASSON CHAILLOUX**.

Mes remerciements les plus sincères vont à : **Madame Caroline Cieniewski-Bernard** et **Madame Patricia Albanese** pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapportrices et pour le temps consacré à la lecture de mes travaux.

Je tiens également à remercier, **Monsieur Xavier Houard** et **Monsieur Franck Oury** pour leur participation dans le suivi de mon projet de thèse, tout d'abord en tant que membre de mon comité de suivi individuel de thèse et maintenant en tant qu'examineurs de ce travail.

Je remercie également **Monsieur Jérôme Guicheux**, pour son accueil au sein du laboratoire RMeS, et **Monsieur Benjamin Lauzier** pour l'aide qu'il m'a apporté dans l'initiation des travaux sur la O-GlcNAcylation.

Enfin, J'adresse mes plus sincères remerciements à l'ensemble des membres du laboratoire RMeS, pour leur sympathie, leurs conseils, leur amitié et leur bonne humeur, pendant ces années au laboratoire.



# Table des matières

Remerciements .....	3
Table des matières .....	5
Liste des publications et communications .....	11
Co-Encadrement.....	12
Liste des Figures .....	13
Listes des Tables .....	15
Liste des abréviations.....	17
Avant-propos.....	21
Partie I - Introduction bibliographique.....	23
I.    L'Arthrose.....	23
1.    Evaluation clinique et diagnostique.....	24
2.    Epidémiologie.....	25
3.    Etiologie.....	25
A.    L'âge .....	25
B.    Le genre.....	27
C.    Obésité et syndromes métaboliques .....	27
D.    La génétique .....	28
E.    Facteurs locaux articulaires.....	29
4.    Physiopathologie.....	30
A.    Le cartilage articulaire et les chondrocytes.....	30
a.    Composition, structure et propriétés biomécaniques du cartilage articulaire.....	30
b.    Les chondrocytes .....	33
c.    Mécanismes de dégradation du cartilage .....	34
B.    L'os sous-chondral et les ostéoblastes/ostéoclastes .....	36
C.    La membrane synoviale .....	38
5.    Prise en charge et traitement .....	42

A.	Thérapies non médicamenteuses .....	42
a.	L'activité physique .....	42
b.	La perte de poids .....	42
B.	Traitement médicamenteux.....	43
a.	Paracétamol et anti-inflammatoires non stéroïdiens .....	43
b.	Autres traitements pharmacologiques.....	43
c.	Traitements intra-articulaires.....	44
C.	Approches chirurgicales .....	45
a.	L'arthroscopie.....	45
b.	L'ostéotomie et la prothèse unicompartimentale .....	45
c.	L'arthroplastie .....	45
D.	Autres thérapies complémentaires et expérimentales .....	46
a.	Thérapies cellulaires .....	46
b.	Thérapie génique.....	47
c.	Les séno-thérapeutiques .....	47
II.	La sénescence cellulaire.....	49
1.	Mécanismes inducteurs de la sénescence .....	50
A.	La sénescence répliquative.....	51
B.	Sénescence prématurée et activation de la réponse aux dommages de l'ADN .....	52
2.	Caractéristiques et marqueurs de la sénescence .....	54
A.	L'arrêt du cycle cellulaire .....	55
B.	Résistance à l'apoptose.....	57
C.	Les altérations lysosomales.....	57
D.	L'hypertrophie cellulaire .....	58
E.	Altération de l'enveloppe nucléaire.....	58
F.	Les SAHF .....	59
G.	Les dommages à l'ADN.....	60

H.	Oxydation des macromolécules et altérations métaboliques .....	60
I.	Le SASP .....	62
3.	Sénescence et autophagie .....	63
4.	Effets bénéfiques de la sénescence cellulaire .....	65
A.	L'embryogénèse .....	65
B.	La réparation tissulaire.....	66
C.	La suppression des tumeurs.....	67
5.	Impacts néfastes de la sénescence .....	68
6.	Rôle de la sénescence dans l'arthrose .....	69
III.	La <i>O</i> -GlcNAcylation des protéines.....	73
1.	Généralités .....	73
2.	Régulation de la <i>O</i> -GlcNAcylation .....	73
A.	La voie de biosynthèse des hexosamines .....	74
a.	GFAT-1 et GFAT-2 .....	77
b.	La régulation de GFAT .....	77
B.	La <i>O</i> -GlcNAc transférase.....	78
C.	La <i>O</i> -GlcNAcase .....	80
D.	Régulation croisée entre OGT et OGA.....	81
3.	Modifications pharmacologiques de la <i>O</i> -GlcNAcylation .....	82
A.	Augmentation de la <i>O</i> -GlcNAcylation .....	82
a.	Augmentation du flux de l'HBP .....	82
b.	Inhibiteurs de OGA .....	83
B.	Diminution de la <i>O</i> -GlcNAcylation .....	84
a.	Inhibition de GFAT .....	84
b.	Inhibition d'OGT .....	85
4.	Discussion croisée entre la <i>O</i> -GlcNAcylation et la phosphorylation.....	86
5.	<i>O</i> -GlcNAcylation et vieillissement.....	88

6.	O-GlcNAcylation et Arthrose.....	89
A.	Rôle dans la différenciation chondrocytaire et le cartilage articulaire .....	90
B.	Impact sur les synoviocytes.....	91
C.	Rôle dans l'inflammation .....	91
	Objectifs de la thèse.....	93
	Partie II – Résultats expérimentaux .....	95
I.	Sénescence articulaire : développement d'un modèle de sénescence chondrocytaire et évaluation de la sénescence dans deux modèles d'arthrose murins <i>in vivo</i> .....	95
1.	Rationnel de l'étude.....	95
2.	Développement d'un modèle de sénescence chondrocytaire .....	97
A.	Article expérimental.....	97
B.	Résultats complémentaires.....	133
a.	Matériel et méthodes.....	133
b.	Résultats .....	135
C.	Discussion et perspectives .....	137
3.	Mise en évidence des marqueurs de sénescence <i>in vivo</i> .....	140
A.	Matériel et méthodes .....	140
a.	Animaux et aspects éthiques .....	140
b.	Induction chirurgicale de l'arthrose post-traumatique.....	140
c.	Etude histologique.....	141
d.	Etude immunohistochimie (IHC) .....	142
e.	Analyses statistiques .....	142
B.	Résultats.....	143
C.	Conclusion et perspectives.....	148
II.	Etude du rôle de la O-GlcNAcylation dans le développement de l'arthrose.....	150
1.	Rationnel de l'étude.....	150
A.	Article expérimental.....	152

B. Résultats complémentaires.....	187
a. Matériel et méthodes.....	187
b. Résultats .....	191
2. Conclusion et perspectives .....	196
Partie III - Conclusion générale.....	200
Bibliographie.....	202



# Liste des publications et communications

## Articles expérimentaux

### **“Development of a DNA damage-induced senescence model in chondrocytes”**

Mélina Georget, Anaïs Defois, Nina Bon, Sophie Allain, Cécile Boyer, Boris Halgand, Denis Waast, Gaël Grimandi, Alban Fouasson-Chailloux, Jérôme Guicheux, and Claire Vinatier

Soumis dans *Aging (Albany NY)*

### **“Osteoarthritic chondrocytes undergo a glycolysis-related metabolic switch upon exposure to IL-1 $\beta$ or TNF- $\alpha$ ”**

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 *Cell Systems*

## Communications affichées

### **“IN VITRO AND IN VIVO CHARACTERISATION OF SENESCENCE MARKERS IN OSTEOARTHRITIS”**

Georget M., Bon N., Vignes C., Lesoeur J., Boyer C., Defois A., Bodic B., Grimandi G., Guicheux J., Vinatier C.

***Osteoarthritis Research Society International (OARSI, En Distantiel, 2021)***

### **“IN VITRO AND IN VIVO CHARACTERISATION OF SENESCENCE MARKERS IN OSTEOARTHRITIS”**

Mélina Georget, Nina Bon, Caroline Vignes, Julie Lesoeur, Cécile Boyer, Anaïs Defois, Benoit Bodic, Gaël Grimandi, Jérôme Guicheux, Claire Vinatier.

***Les Journées scientifiques de l'école doctorale (JSED, Brest, 2021)***

### **“CHARACTERISATION OF SENESCENCE MARKERS IN VIVO IN AN AGE-RELATED OSTEOARTHRITIS MURINE MODEL AND IN VITRO IN AN IL-1 $\beta$ -INDUCED INFLAMMATORY OSTEOARTHRITIS MODEL AND AN ETOPOSIDE-INDUCED SENESCENCE MODEL”**

Georget M., Bon N., Vignes C., Lesoeur J., Boyer C., Defois A., Fouasson-Chailloux A., Grimandi G., Guicheux J., Vinatier C.

***Osteoarthritis Research Society International (OARSI, Berlin, 2022)***

## Communications orales

“CHARACTERISATION OF SENESENCE MARKERS IN AN AGE-RELATED OSTEOARTHRITIS MURINE MODEL AND IN VITRO IN AN IL-1 $\beta$ -INDUCED INFLAMMATORY OSTEOARTHRITIS MODEL AND AN ETOPOSIDE-INDUCED SENESENCE MODEL”.

Georget Mélina, Bon Nina, Vignes Caroline, Lesoeur Julie, Boyer Cécile, Defois Anais, Fouasson-Chailloux Alban, Grimandi Gael, Guicheux Jérôme et Vinatier Claire.

***Journées françaises de biologie des tissus minéralisés (JFBTM, la Baule, 2022)***

“Rôle de la sénescence dans l’arthrose”,

***Ma thèse en 180 seconde-Nantes, 3<sup>ème</sup> prix du jury, (MT180s, Nantes, 2022)***

## Co-Encadrement

- **Lucile Allien (2020-2021)**

Master 1 Sciences Biologiques : stage de 8 semaines.

Sujet : *Etude du rôle de la sénescence dans l’arthrose*

- **Sabine Rabreau (2021-2022 et 2022-2023)**

Master 1 Sciences Biologiques : stage de 8 semaines.

Sujet : *Etude du rôle de la O-GlcNAcylation sur la sénescence dans des chondrocytes humains*

Master 2 Biologie, biotechnologie et recherche thérapeutique, Nantes Université : stage de 6 mois, encadrement pour le 1<sup>er</sup> mois.

Sujet : *Impact de la O-GlcNAcylation dans un modèle in vitro d’inflammation chondrocytaire*

## Liste des Figures

<b>Figure 1 : Incidence de l'arthrose selon l'âge, le sexe, et sa localisation</b> (Hunter D. J. et Bierma-Zeinstra S., 2019 <sup>26</sup> ) .....	26
<b>Figure 2 : Organisation du cartilage articulaire</b> ( Créée avec BioRender.com) .....	32
<b>Figure 3 : Coupe histopathologique de la surface articulaire montrant un cartilage sain (c) et un cartilage arthrosique (d)</b> (Martel-Pelletier J. et al., 2016 <sup>6</sup> ) .....	35
<b>Figure 4 : Représentation schématique des dérégulations impactant l'os sous-chondrale aux stades précoces et tardifs de l'arthrose</b> (Li G. et al., 2013 <sup>125</sup> ) .....	36
<b>Figure 5 : Coupes histologique de membrane synoviale de patients arthrosiques à différents stades d'inflammation</b> (Riis R.G.C et al., 2017 <sup>145</sup> ) .....	39
<b>Figure 6 : Implication de la synoviale dans la physiopathologie de l'arthrose</b> (Sellam J. et Berenbaum F., 2010 <sup>153</sup> ). .....	40
<b>Figure 7 : Les différents types de sénescences</b> (Lozano-Torres B. et al., 2019 <sup>237</sup> ) .....	51
<b>Figure 8 : La voie de réponse aux dommages de l'ADN (DDR)</b> (Sulli G. et al., 2012 <sup>247</sup> ). .....	53
<b>Figure 9 : Caractéristiques générales et marqueurs de la sénescence cellulaire</b> (Inspirée de González-Gualdaz E. et al., 2021 <sup>253</sup> et créée avec BioRender.com).....	54
<b>Figure 10 : Voies moléculaires impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules sénescents</b> (Lozano-Torres B. et al., 2019 <sup>237</sup> ). .....	56
<b>Figure 11 : Le processus de macro-autophagie</b> (Hansen M. et al., 2018 <sup>345</sup> ).....	64
<b>Figure 12 : La voie de biosynthèse des hexosamines (HBP)</b> (Inspirée de Chatham J. C. et al., 2021 <sup>420</sup> et créée avec BioRender.com) .....	76
<b>Figure 13 : Structure schématique d'OGT et d'OGA</b> (Yang X. et Qian K., 2017 <sup>505</sup> ).....	79
<b>Figure 14 : L'homéostasie métabolique de la O-GlcNAcylation est essentielle pour la physiologie cellulaire normale</b> (Yang X. et K. Qian K., 2017 <sup>505</sup> ) .....	82
<b>Figure 15 : Composés pharmacologiques modulant la O-GlcNAcylation des protéines</b> (Créée avec BioRender.com).....	84
<b>Figure 16 : Dialogue entre O-GlcNAcylation et phosphorylation</b> (Zeidan Q. et Hart G.W., 2010 <sup>546</sup> .....	87
<b>Figure 17: Induction de la sénescence dans des HACs et des TC28a2 traités avec de l'étoposide 2 µM pendant 3 jours</b> .....	136
<b>Figure 18 : Expression de marqueurs de sénescence (p16<sup>INK4A</sup>, p21<sup>CIP-1</sup>, PAI-1 et CAV-1) au cours de l'arthrose liée à l'âge, sur des articulations de genou de souris mâles C57BL/6 d'âge croissant.</b> .....	143

<b>Figure 19 : Expression des marqueurs de sénescence (p16<sup>INK4A</sup>, PAI-1 et CAV-1) dans l'arthrose post-traumatique, sur les articulations du genou des souris mâles C57BL/6 .....</b>	<b>145</b>
<b>Figure 20 : Expression des marqueurs de sénescence (p16<sup>INK4A</sup>, p21<sup>CIP-1</sup>, PAI-1 et CAV-1) dans les ménisques de souris mâles C57BL/6 dans un modèle (A) d'arthrose liée à l'âge et (B) d'arthrose post-traumatique.....</b>	<b>146</b>
<b>Figure 21: Impact de l'augmentation de la O-GlcNAcylation sur l'expression d'inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes dans des HACs prétraités avec 1µM TG (bleu) ou 5mM GlcN (rouge) pendant 24h puis stimulés à l'IL-1β (hachures) .....</b>	<b>191</b>
<b>Figure 22: Impact de l'augmentation de la O-GlcNAcylation sur l'expression de gènes impliqués dans la sécrétion du SASP dans des HACs prétraités avec 1µM TG (bleu) ou 5mM GlcN (rouge) pendant 24h puis stimulés avec 20µM d'étoposide (hachures) pendant 24h. ....</b>	<b>193</b>
<b>Figure 23 : Impact de l'augmentation de la O-GlcNAcylation sur l'expression des enzymes clés impliquées dans la régulation de la O-GlcNAcylation dans des HACs prétraités avec 1µM TG (bleu) ou 5mM GlcN (rouge) pendant 24h puis stimulés avec 20µM d'étoposide (hachures) pendant 24h.....</b>	<b>193</b>
<b>Figure 24: Impact de l'augmentation de la O-GlcNAcylation sur l'expression d'inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes dans des HACs pré-traités avec 1µM TG (bleu) ou 5mM GlcN (rouge) pendant 24h puis stimulés avec 20µM d'étoposide 24h (hachures) pendant 24h.....</b>	<b>194</b>
<b>Figure 25 : Evaluation du niveau d'O-GlcNAcylation au cours de l'arthrose liée à l'âge, sur des articulations de genou de souris mâles C57BL/6 d'âge croissant .....</b>	<b>195</b>

## Listes des Tables

<b>Table 1: Liste des amorces de qPCR pour l'étude de la sénescence .....</b>	<b>135</b>
<b>Table 2: Score OARSI modifié .....</b>	<b>142</b>
<b>Table 3: Conditions expérimentales des IHC p16, p21, CAV-1 et PAI-1 .....</b>	<b>142</b>
<b>Table 4: Liste des amorces de qPCR pour l'étude de la O-GlcNAcylation.....</b>	<b>189</b>



## Liste des abréviations

3H-thymidine	Thymidine tritiée
53BP1	p53 binding protein 1
8-OH-Gua	8-hydroxyguanine
<b>A</b>	
ACAN	Agrécane
Acétyl-CoA	Acétyl-coenzyme A
ADAMTs	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
ADN	Acide désoxyribonucléique
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
Akt	Protein kinase B (PKB) ou RAC (Rho family)-alpha serine/threonine-protein kinase
AMPK	Kinase AMP dépendante
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATF4	Activating transcription factor 4
ATG	Autophagy related genes
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
<b>B</b>	
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
BRCA1	Breast cancer gene 1
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
<b>C</b>	
C/EBP-β	CCAAT/enhancer binding protein β
c-Myc	Cellular myelocytomatosis oncogene
CaMK	Kinases Ca <sup>2+</sup> /calmoduline-dépendantes
CAV-1	Cavéoline-1
CCF	Fragments de chromatine cytoplasmique
CCL2	C-c motif chemokine ligand 2
CD	Domaine catalytique
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKi	Cyclin-dependent kinase inhibitor protein
cGAS-STING	Cyclic GMP-AMP synthase (cgas)-stimulator of interferon genes (STING)
CHK1 et 2	Checkpoint kinase 1 et 2
COL2a1	Collagène de type II alpha 1
COMP	Protéine matricielle oligomérique du cartilage
CREB	Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CSM	Cellule stromale mésenchymateuse
<b>D</b>	
DAMPs	Damage-associated molecular pattern
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDR	DNA damage response

DioC6	Iodure de 3,3'-dihexyloxacarbocyanine
DON	6-diazo-5-oxo-L-norleucine
DSBs	Double-strand breaks
<b>E</b>	
E2F	Facteur de transcription de la famille E2F
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EGF	Epidermal growth factor
eNOS	Oxyde nitrique synthase endothéliale
EVA	Echelle visuelle analogique
EVs	Extracellular vesicles
<b>F</b>	
FBN2	Fibrilline de type 2
FLS	Fibroblast like synoviocytes
FOXO1 et 4	Forkhead box protéine 1, 4
Fruc-6P	Fructose 6-phosphate
<b>G</b>	
GAGs	Glycosaminoglycanes
GATA4	GATA binding protein 4
GFAT	Glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase
GFPT	Glutamine--fructose-6-phosphate transaminase
GLB1	Gène codant pour la $\beta$ -galactosidase
Glc	Glucose
GlcN	Glucosamine
GlcN-6P	Glucosamine-6-phosphate
Gluc-6P	Glucose 6-Phosphate
GLUT	Glucose transporter
GPI	Glucose-6-phosphate isomérase
GWAS	Genome-wide association studies
<b>H</b>	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
$\gamma$ H2AX	Histone H2AX phosphorylé sur la sérine 139
H3K9Me2/3	Histone H3 di- ou tri-méthylée sur la lysine 9
HACs	Chondrocytes articulaires primaires humains
HAT-like	Histones acétyltransférases-like
HBP	Voie de biosynthèse des hexosamines
HEX	Hexokinase
HMGA	Protéines à haute mobilité du groupe A
HP1	Protéine d'hétérochromatine 1
hTERT	Telomerase reverse transcriptase
<b>I</b>	
IFP	Infra-patellar fat pad ou tissus adipeux infra-patellaire
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP7	Insulin-like growth factor-binding protein 7
IL-6, IL-8...	Interleukine 6, Interleukine 8,...
IL-1Ra	Interleukin 1 receptor antagonist
IMC	Indice de masse corporel
IR	Rayonnements ionisants
IRM	Imagerie par résonance magnétique

IRS1	Substrat du récepteur à l'insuline 1
<b>J</b>	
JC-1	Iodure de 5,5',6,6'-tétrachloro-1,1',3,3'-tétraéthylbenzimi-dazolylcarbocyanine
<b>K</b>	
KDa	Kilodalton
<b>L</b>	
LC3B	Microtubule associated protein 1 light chain 3 beta
<b>M</b>	
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MEC	Matrice extracellulaire
mER-β	Récepteur murin aux œstrogènes-β
MGEA5	Antigène exprimé par le méningiome 5
MMPs	Métalloprotéinases matricielles
MPC	Matrice péri-cellulaire
MPIP1	M-phase inducer phosphatase 1
MPT	Modification Post-Traductionnelle
mTOR	Mammalian target of rapamycin
<b>N</b>	
NF1	Neurofibromin 1
NF-κB	Facteur nucléaire κB
NK	Natural killer
NLS	Nuclear localization sequence
NO	Oxyde nitrique
NSC	Cellules souches neurales
<b>O</b>	
O <sub>3</sub>	Ozone
OA	Osteoarthritis, arthrose en français
OARSI	Osteoarthritis Research Society International
OGA	O-GlcNAcase
O-GlcNAc	β-Nacétylglucosamine
OGT	O-GlcNAc Transférase
OIS	Oncogene induced senescence
<b>P</b>	
p16 <sup>INK4A</sup> , p16	Inhibiteur de kinase cycline-dépendante 2A (CDKN2A)
p21 <sup>CIP</sup> , p21	Inhibiteur de kinase cycline-dépendante 1A (CDKN1A)
p53	Ou TP53 pour tumor protein 53
p65	Facteur de transcription p65
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PG	Protéoglycane
PGE2	Prostaglandine E <sub>2</sub>
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI3P	Phosphatidylinositol 3-phosphate
PKA	cAMP-dépendante protéine kinase
PML	Promyelocytic leukemia protein
POT1	Protection of telomeres protein 1
PPAR <sub>γ</sub>	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes γ
PPO	Domaine de liaison aux phosphoinositides
pRB	Protéine du rétinoblastome

PRG4	Protéoglycane 4
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
<b>R</b>	
RAP1	TRF-2 interacting protein
RUNX-2	Facteur de transcription lié à Runt 2
<b>S</b>	
SA- $\beta$ -Gal	$\beta$ -galactosidase associée à la sénescence
SAHF	Senescence-associated heterochromatin foci
SASP	Senescence associated secretory phenotype
SBB	Sudan black blue
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
Ser	Sérine
SIPS	Stress-induce premature senescence
SIRT1	Sirtuine 1
SnC	Senescent cells ou Cellules sénescents
SOX-9	Facteur de transcription SRY-Box 9
SP1	Specificity protein 1
<b>T</b>	
TFR1 et 2	Telomeric repeat-binding factor-1 et 2
TG	Thiamet-G
TGF- $\beta$ 1	Transforming growth factor beta 1
Thr	Thréonine
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TIN2	TRF-1 interacting protein
TLK1	Serine/threonine-protein kinase tousled-like 1
TMRE	Ester éthylique de tétraméthylrhodamine
TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale alpha
TPP1	adrenocortical dysplasia protein homolog
TPRs	Répétition tétratricopeptide
<b>U</b>	
UDP	Uridine diphosphate
UDP-GlcNAc	Uridine diphosphate N-acetylglucosamine
ULK1	Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1
UTP	Uridine-5'-triphosphate
<b>V</b>	
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Récepteur au VEGF
<b>W</b>	
WB	Western blot
WOMAC	Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index
<b>X</b>	
X-Gal	5 -bromo-4-chloro-3-hydroxyindole-1
<b>Y</b>	
YAP	Yes-associated protein 1

## Avant-propos

Par son ampleur, l'allongement de la durée de vie humaine est le principal facteur ayant entraîné le vieillissement des populations. La proportion globale de personnes âgées de 60 ans et plus passera à 22 % en 2050 soit plus de 2 milliards de personnes dans le monde pour une population estimée à 10 milliards en 2050<sup>1</sup>.

Cependant, la durée de vie en bonne santé et sans maladie n'a pas augmenté au même rythme que la durée de vie. En effet, alors que l'espérance de vie mondiale a augmenté de cinq ans entre 2000 et 2015, l'espérance de vie en bonne santé a augmenté seulement de 4,6 ans<sup>2</sup> s'accompagnant de ce fait d'une augmentation des maladies dégénératives liées à l'âge telles que la neurodégénérescence, le diabète, les maladies cardiovasculaires, le cancer, l'ostéoporose et l'arthrose (OA)<sup>3</sup>. Le vieillissement est donc devenu la cause la plus répandue de maladie dans le monde. L'augmentation des maladies chroniques dégénératives chez les personnes âgées affecte leur qualité de vie, mais impacte également financièrement nos systèmes de santé. C'est pourquoi la prise en charge des pathologies liées à l'âge est devenue un enjeu sociétal et économique majeur dans les pays occidentaux.

La survenue de maladies liée au vieillissement a longtemps été perçue comme un phénomène normal et inéluctable. Cependant, certaines personnes âgées connaissent peu de problèmes de santé, un trait qui devrait être étendu à la population générale<sup>4,5</sup>. De ce fait de nombreuses équipes à travers le monde travaillent au rallongement de la durée de vie en bonne santé et/ou à la réduction du nombre d'années vécues avec un handicap.

L'une des caractéristiques principales du vieillissement est l'accumulation de cellules sénescents dans les tissus avec l'âge. Ainsi des approches thérapeutiques cliniques ciblant les cellules sénescents sont actuellement envisagées pour prévenir l'apparition des maladies liées à l'âge telles que l'OA. Parmi ces stratégies, une nouvelle classe de molécules les sénolytiques ayant pour but d'éliminer ou de moduler les sécrétions des cellules sénescents seront retrouvées.

Cependant, bien que les mécanismes impliqués dans la sénescence des fibroblastes soient relativement bien connus, la sénescence des chondrocytes l'est beaucoup moins et ce malgré le nombre croissant de publications suggérant l'efficacité de nouveaux traitements ciblant la sénescence dans les modèles pré-cliniques. S'ajoute à cela les premiers résultats cliniques mitigés obtenus avec les sénolytiques.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le premier axe de mon projet de thèse avec pour objectif la mise en place d'un modèle de chondrocytes sénescents. La mise en place du modèle de chondrocytes sénescents a été réalisée à partir de chondrocytes primaires et d'une lignée chondrocytaire humaine par des traitements à l'étoposide, molécule qui induit des dommages à l'ADN, ou par une exposition chronique à l'interleukine 1 beta (IL-1 $\beta$ ), cytokine pro-inflammatoire fréquemment utilisée *in vitro* pour mimer la composante inflammatoire et le déséquilibre entre les phénomènes anaboliques et cataboliques qui se mettent en place au cours de l'OA. En parallèle, nous avons également cherché à identifier et caractériser *in vivo* les cellules sénescents au sein des articulations par une étude histologique dans deux modèles murins d'OA.

Parallèlement, à l'augmentation de la sénescence de nombreuses pathologies liées au vieillissement présentent également une dérégulation des niveaux de O-GlcNAcylation. C'est également le cas pour l'OA où une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation a été observée dans les articulations de patients OA. L'étude de cette modification post-translationnelle, pourrait présenter une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'OA. Cependant, peu d'équipes de recherche se sont intéressées à son rôle dans la survenue de l'OA.

Le second axe de travail de ma thèse a ainsi été consacré à l'étude de l'effet de l'augmentation de la O-GlcNAcylation dans l'OA. Pour cela nous avons prétraité des chondrocytes primaires humain avec deux molécules connues pour augmenter le niveau de O-GlcNAcylation : le thiamet-G (TG) et la glucosamine (GlcN) avant d'appliquer nos traitements IL-1 $\beta$  et étoposide.

Nous avons également cherché à évaluer *in vivo* l'impact d'une augmentation du niveau O-GlcNAcylation via l'administration dans l'eau de boisson de glucosamine dans un modèle d'OA post-traumatiques murin.

Ainsi, mon manuscrit de thèse s'articule en trois parties. La première partie consistera en une revue de la littérature permettant de décrire l'arthrose, maladie d'intérêt de ce manuscrit, les caractéristiques et rôles de la sénescence cellulaire et pour finir la O-GlcNAcylation. La seconde partie présentera les résultats expérimentaux obtenus au cours de ma thèse. Enfin, une troisième partie clôturera ce manuscrit par une discussion reprenant les principales avancées et les perspectives de ces travaux.

# Partie I - Introduction bibliographique

---

## I. L'Arthrose

L'arthrose (OA) est une des affections rhumatismales la plus répandue et invalidante. Elle peut affecter toutes les articulations mobiles aussi appelées articulations synoviales mais touche plus particulièrement les genoux, les hanches, le rachis et les mains. Historiquement, l'OA était considérée comme une dégénérescence de l'articulation et plus particulièrement du cartilage, liée à l'usure et associée au vieillissement. Mais nous savons maintenant qu'il s'agit d'une maladie musculosquelettique qui touche tous les composants de l'articulation, tels que : l'os sous-chondrale, le cartilage, les ligaments et la membrane synoviale<sup>6</sup>. L'OA telle que définie par la Société internationale de recherche sur l'arthrose (Osteoarthritis Research Society International (OARSI)) débute vraisemblablement par « des micro et macro-lésions au niveau des articulations qui vont induire un stress cellulaire se traduisant par des réponses de réparations inadaptées avec notamment l'activation des voies pro-inflammatoires. Ces dérèglements à l'échelle moléculaire et cellulaire vont avoir un retentissement à l'échelle macroscopique au niveau des articulations avec la formation d'ostéophytes, la dégradation du cartilage, l'inflammation de la membrane synoviale et une perte de la fonction articulaire normale »<sup>7</sup>. Chez les personnes atteintes d'AO, cela pourra se traduire par des douleurs, des raideurs et une perte de mobilité pouvant avoir un retentissement sur la santé mentale, le sommeil, le travail et même la mortalité<sup>8</sup>.

Plus de 7 % de la population mondiale est touchée par l'OA (soit 528 millions de personnes)<sup>9</sup> et l'impact de l'OA est également sociétal en raison du coût de sa prise en charge. Le fardeau économique lié à la prise en charge de l'OA selon les systèmes de santé à travers le monde est estimé entre 1 et 2,5% du produit intérieur brut<sup>10</sup>, ce qui pour un pays comme la France représenterait 23 à 57 milliard d'euros pour l'année 2021. Cependant les coûts indirects de cette maladie, tels que les montants liés aux arrêts maladie, ou à la perte de travail sont également importants et souvent ignorés dans l'examen du fardeau de l'OA<sup>11,12</sup>. De plus, l'OA est la troisième maladie handicapante dont la croissance est la plus rapide au niveau mondiale après le diabète et les troubles psychiatriques<sup>13</sup>.

Actuellement, il n'existe pas de traitement permettant de ralentir, stopper ou d'inverser le cours du développement de l'OA. Sa prise en charge est donc essentiellement étiologique et vise à réduire les symptômes (douleurs et gênes fonctionnelles) éprouvés par les patients<sup>14</sup>.

## 1. Evaluation clinique et diagnostique

Afin d'établir le diagnostic clinique d'OA, le praticien procède à un entretien et un examen physique du patient. L'OA est généralement identifiée sur la base de critères radiographiques (OA radiographique) seuls ou bien en association avec la prise en compte de l'intensité des symptômes du patient (OA symptomatique)<sup>15</sup>. La technique de référence pour explorer les lésions arthrosiques est la radiographie associée au score de Kellgren-Lawrence<sup>16</sup>. Cet index classe la maladie selon cinq grades (0 à 4) basés sur la présence d'un pincement articulaire, d'ostéophytes et d'une sclérose (augmentation, localisée ou diffuse de la densité osseuse) de l'os sous-chondral. Cette méthode permet de définir l'OA radiographique et est utilisée en épidémiologie. Mais d'autres systèmes de notation existent<sup>17</sup> tels que celui proposé par OARSI<sup>18</sup>. Il s'agit d'un atlas radiographique qui répertorie des clichés de différentes articulations (main, genou, hanche) et leurs scores associés pour différents critères tels que la présence d'ostéophytes, de sclérose sous-chondrale et le rétrécissement de l'espace articulaire.

Il existe cependant une discordance entre la présence de symptômes, raison de consultation des patients, et les changements radiographiques observés. En effet, de nombreuses personnes atteintes d'OA radiographique (jusqu'à 50 %) n'ont pas de symptômes associés<sup>19</sup> et la question reste entière si ces individus doivent être considérés comme atteints d'OA<sup>20</sup>. Cette dissociation entre OA symptomatique et radiographique est encore mal connue, mais peut partiellement s'expliquer par le fait que la radiographie n'évalue qu'un aspect de la maladie et ne rends pas compte des changements structurels et nociceptifs qui se produisent dans l'OA.

Dans ce contexte, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) présente de nombreux avantages par rapport à la radiographie, car elle permet de visualiser l'ensemble des composants de l'articulation, que le tissu soit minéralisé ou non (cartilage, ménisques, ligaments, ...), en trois dimensions et à une haute résolution<sup>21</sup>. Par conséquent, cette technique est plus sensible que la radiographie conventionnelle pour la détection précoce des changements structurels liés à l'OA<sup>22,23</sup>.

La progression de l'OA est suivie à l'aide d'indices validés évaluant le retentissement de la maladie sur le patient. On peut citer l'échelle visuelle numérique d'évaluation de la douleur (EVA

: échelle visuelle analogique), l'indice algo-fonctionnel de Lequesne composé d'un questionnaire permettant à un professionnel de santé, d'évaluer les capacités fonctionnelles et la gêne des patients souffrant d'OA de la hanche notamment<sup>24</sup> ou le Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC)<sup>25</sup> pour l'évaluation de l'OA du genou.

## 2. Epidémiologie

La prévalence de l'OA est différente selon l'articulation. Le genou est l'articulation la plus touchée suivie par la main et la hanche<sup>26,27</sup> avec des prévalences respectives de 60,6%, 23,7% et 5,5% en 2019<sup>28</sup>.

Les différences de méthodes utilisées pour définir l'OA : OA radiographique, OA symptomatique qui associe OA radiographique et symptomatique ou symptomatique seule induit une grande variabilité des données épidémiologiques avec une prévalence accrue de la maladie lorsque celle-ci est détectée par radiographie<sup>20</sup>.

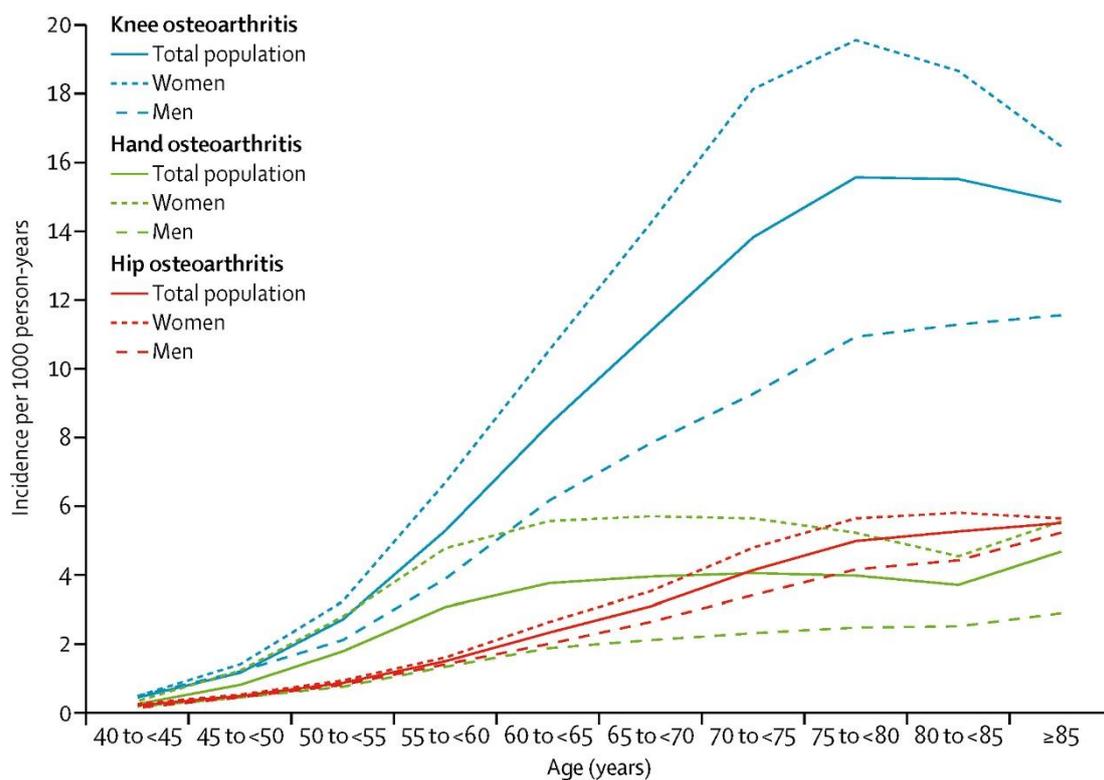
Cependant, quelles que soient les définitions utilisées pour collecter les données épidémiologiques, celles-ci s'accordent à montrer que la prévalence de l'OA augmente au niveau mondiale passant de 248 millions de cas en 1990 à 528 millions en 2019<sup>29,28</sup>. Cela s'explique en partie par une augmentation de la population présentant un ou plusieurs facteurs de risque de développer une OA. Parmi ces facteurs prédisposants on retrouve le vieillissement mais aussi l'obésité. Or d'ici à 2050, 22% de la population mondiale aura plus de 60 ans alors qu'en 2013 seul 11% de la population, soit 800 millions de personnes, avaient au moins 60 ans<sup>1</sup>. De façon similaire, l'obésité a doublé dans le monde depuis les années 1980, avec de nos jours environ un tiers de la population mondiale obèse ou en surpoids<sup>30</sup>.

## 3. Etiologie

L'étiologie de l'OA est complexe et résulte d'une combinaison variable de facteurs de risques. Ces facteurs sont associés à un risque accru de développer une OA et peuvent être séparés en deux catégories. Les premiers vont avoir un retentissement général sur l'individu (l'âge, le genre, l'obésité, les syndromes métaboliques et la génétique) et les seconds un impact plus ciblé sur l'articulation (dysplasies, désalignements articulaires, traumatismes).

### A. L'âge

Il s'agit du principal facteur de risque de l'OA avec une prévalence et une incidence qui s'accroissent fortement à partir de 55 ans quelle que soit l'articulation atteinte<sup>26</sup> (Figure 1). Cette augmentation de l'OA avec le vieillissement est probablement liée à une dérégulation de la



**Figure 1 : Incidence de l'arthrose selon l'âge, le sexe, et sa localisation (pour 1000 personnes-années).** Arthrose du genou (bleu), Arthrose de la main (vert) et Arthrose de la hanche (rouge). Ces données sont représentatives de la population générale de la Catalogne, Espagne. (Hunter D. J. et Bierma-Zeinstra S., 2019<sup>26</sup>)

balance biologique en faveur des phénomènes cataboliques au détriment des facteurs anaboliques au sein des tissus de l'articulation et s'accompagnant d'une inflammation systémique de bas grade communément appelé "inflamm-aging"<sup>31</sup>. Parmi les facteurs cataboliques vont être retrouvés une myriade de molécules pro-inflammatoires tels que l'interleukine 6 (IL-6) et l'interleukine 1 beta (IL-1 $\beta$ ). De nombreuses études ont montré une augmentation liée à l'âge des taux sanguins d'IL-6 associée à une diminution de la fonction physique et une fragilité accrue, de même l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  sont retrouvées en quantités plus importantes dans le liquide synovial des patients arthrosiques<sup>32</sup>. Les facteurs cataboliques vont également regrouper des enzymes telles que les métalloprotéinases matricielles (MMPs) et les agrécanases qui vont participer à la dégradation des composant majeurs du cartilage que sont le collagène de type 2 et les protéoglycanes (PG). Le vieillissement tout comme l'OA s'accompagne également d'une augmentation de la sénescence cellulaire<sup>33-35</sup>, qui va participer à l'atteinte arthrosique via la production d'un sécrétome associé à la sénescence ou SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype) constitué de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et de MMPs. Cette sénescence cellulaire (détaillée plus en amont dans la partie I.II) va également diminuer les capacités régénératrices des tissus en raison d'une perte de capacité des cellules sénescents à proliférer<sup>36</sup>.

## B. Le genre

Le second facteur le plus important est le genre. En effet, les femmes sont plus fréquemment touchées par l'OA avec une prévalence de 11,4 à 18,7 % contre 6,8 à 13,5 % pour les hommes selon les études<sup>37</sup>. Les femmes sont plus susceptibles de développer une OA périphérique (des mains, des pieds et des genoux) alors que les hommes sont plus touchés au niveau du rachis et de l'épaule<sup>38,39</sup>. Les douleurs ressenties par les femmes sont également plus vives et invalidantes que chez les hommes<sup>8,40</sup>. Cette différence entre les sexes tend à s'expliquer notamment par une diminution des hormones féminines lors de la ménopause chez la femme, bien que peu d'études se soient réellement intéressées à la question<sup>41</sup>. Pour autant le lien entre la douleur et les hormones sexuelles a été clairement démontré, les œstrogènes et la testostérone ayant été montrés capables de diminuer la douleur<sup>42,43</sup>. Plusieurs études ont montré que la concentration d'œstrogènes et d'estradiols est diminuée dans le sérum des patientes atteintes d'OA versus les non atteintes<sup>44,45</sup>. Une méta-analyse de la littérature conclue que certains polymorphismes des récepteurs aux œstrogènes sont associés à un risque accru de développer une OA chez certaines populations<sup>46</sup>. Cependant, le rôle des hormones féminines dans le développement et la progression de l'OA ne fait pas consensus.

## C. Obésité et syndromes métaboliques

L'obésité est définie par l'organisation mondiale de la santé par un indice de masse corporel (IMC) supérieur à 30kg/m<sup>2</sup>. C'est un facteur de risque bien décrit pour le développement et la progression de l'OA notamment des articulations dites porteuses telles que le genou ou la hanche qui soutiennent le poids du corps et dont la charge articulaire se trouve augmentée en cas d'obésité. Les patients obèses présentent des OA plus précoces et sévères et leur risque d'avoir recours à une arthroplastie du genou et de la hanche est 3 à 4 fois plus élevé. C'est pourquoi la première ligne de traitement dans la prise en charge de l'OA est axée sur l'exercice physique et la perte de poids. Une réduction du poids  $\geq 5\%$  permet une amélioration significative des symptômes et de la gêne fonctionnelle chez les patients atteints d'OA<sup>47</sup>. Cependant, l'obésité augmente également le risque d'OA périphérique<sup>48</sup> en lien probablement avec les altérations métaboliques et inflammatoires systémiques associées à cette maladie<sup>49</sup>. La principale caractéristique en lien avec l'obésité est une expansion du tissu adipeux, or ce tissu est considéré comme un organe endocrinien métaboliquement actif, qui régule les dépôts de graisse, l'homéostasie des nutriments et agit sur la libération d'adipokines (cytokines produites par le tissu adipeux)<sup>50</sup>. Les patients obèses présentent notamment une élévation du niveau de leptine dans le sang et également dans le liquide synovial. *In vivo* chez la souris<sup>51</sup> et *in vitro* sur des explants

de cartilage et également sur des chondrocytes primaires, la leptine augmente la production de MMPs et de cytokines pro-inflammatoires<sup>52-54</sup>, médiateurs impliqués dans la dégradation du collagène favorisant ainsi la progression de l'OA.

D'autres syndromes métaboliques sont associés à l'OA tels que le diabète de type 2<sup>55,56</sup> qui multiplie par deux le risque de développer de l'OA<sup>57</sup>, l'hypertension artérielle<sup>58,59</sup>, la dyslipidémie<sup>60</sup> caractérisée par un taux élevé de lipides dans le sang ou encore la maladie de Wilson. Cette dernière est caractérisée par une accumulation de cuivre dans les tissus, en particulier dans le foie et dans le système neurologique, et s'accompagne d'un risque accru d'OA précoce sans que les mécanismes sous-jacents ne soient connus<sup>61</sup>.

#### D. La génétique

L'OA est une maladie multifactorielle complexe qui présente une forte composante héréditaire<sup>62,63</sup>. Ces 5 dernières années, l'identification de loci associés au risque de développer une OA a considérablement progressé grâce à des études d'engorgures d'association à l'échelle du génome (GWAS)<sup>64-66</sup>. A ce jour, plus d'une centaine de variants ont été identifiés. Ceux-ci sont majoritairement impliqués dans le développement et la morphologie du squelette et la dégradation de l'articulation. Ils sont également trouvés en plus grand nombre en association avec le risque de développer une OA du genou ou de la hanche<sup>66</sup>. Parmi ceux-ci, on peut notamment évoquer les variants du gène codant pour la protéine matricielle oligomérique du cartilage (COMP)<sup>67</sup>, le gène du collagène de type II alpha 1 (*COL2A1*) ou la fibrilline de type 2 (*FBN2*)<sup>68</sup>. Ces gènes codent pour des composants structurels essentiels du cartilage et sont importants pour la formation des articulations et la croissance osseuse.

Une vaste majorité des variants de risque d'OA identifiés à ce jour se trouvent dans des régions non codantes du génome<sup>69</sup>. De ce fait, déterminer l'impact de ces variants et les gènes qu'ils modulent reste un défi majeur.

La régulation de gènes via des facteurs épigénétiques tels que la méthylation, semble jouer un rôle dans la régulation de gènes impliqués dans l'homéostasie cartilagineuse. On peut notamment citer le gène codant pour le facteur de transcription SRY-Box 9 (*SOX-9*)<sup>70</sup>, mais également des gènes codant pour des enzymes et protéines engagées dans la formation et la dégradation de la matrice cartilagineuse *COL2A1*<sup>71</sup>, agrécane (*ACAN*)<sup>72</sup>, MMP2 et MMP13.

## E. Facteurs locaux articulaires

Les articulations peuvent présenter des anomalies architecturales induisant une altération biomécanique et un surcroît de charge, les prédisposant à la survenue d'une OA.

Certaines de ces anomalies sont d'origine congénitale, telles que les dysplasies fémoro-petellaire<sup>73</sup> et de la hanche<sup>74</sup> qui sont considérées comme des facteurs de risques majeurs pour le développement de l'OA et exposent à la survenue d'OA précoce de l'articulation touchée<sup>75,76</sup>. Le mauvais alignement articulaire des membres inférieurs (axe hanche-genou-cheville) est également un facteur de risque important pour l'incidence de l'OA. Ainsi l'alignement du genou en varus est associé à un risque accru de gonarthrose fémoro-tibiale<sup>77</sup>.

Les traumatismes articulaires, constituent également un facteur de risque d'OA, et sont regroupés dans une catégorie à part entière appelée OA post-traumatique. La contribution du traumatisme en tant que facteur de risque de l'OA varie selon l'articulation. Pour la cheville, le traumatisme est estimé être le facteur incitatif du développement de l'OA dans 70 à 90 % des cas contre seulement 2 à 10 % pour l'OA de la hanche et du genou<sup>78,79</sup>.

Parmi les traumatismes articulaires, se retrouvent les contraintes mécaniques excessives induites par la pratique sportive de la course à pied, d'un sport à au niveau<sup>80,81</sup> ou par un travail qui sollicite les articulations de manière importante et répétée. C'est le cas notamment des emplois nécessitant de s'agenouiller et de s'accroupir de façon répétitive, comme les mineurs, et les charpentiers, deux métiers qui présentent une probabilité accrue de développer une gonarthrose<sup>82</sup>.

Un tonus musculaire réduit est également associé à un risque accru de développer une OA dite traumatique. Et effet des études récentes, suggèrent que la faiblesse musculaire est antérieure à l'apparition de l'OA du genou<sup>83,84</sup> et que la faiblesse des extenseurs du genou n'assurant plus un maintien optimal de l'articulation augmente significativement le risque de développer une OA symptomatique<sup>85</sup>.

## 4. Physiopathologie

L'OA touche essentiellement les articulations synoviales. Celles-ci comprennent plusieurs structures. Tout d'abord deux pièces osseuses situées en regard l'une de l'autre et dont les épiphyses sont recouvertes de cartilage articulaire (Figure 2). Certaines articulations telles que le genou présentent également des éléments intra-articulaires fibrocartilagineux comme les ménisques. Ceux-ci permettent d'améliorer la jonction entre les pièces osseuses et la stabilité de l'articulation mais aussi d'amortir et de répartir les contraintes mécaniques qui lui sont appliquées. Ces différentes pièces articulaires sont entourées d'une capsule articulaire tapissée par la membrane synoviale. L'espace clos ainsi formé est baigné par le liquide synovial produit par cette même membrane et définit la cavité articulaire.

Des ligaments latéraux et parfois centraux ainsi que des muscles attachés aux os grâce aux tendons participent à la stabilisation et à la mobilité de l'articulation.

Longtemps considérée comme une maladie affectant seulement le cartilage, cette vision de l'OA a évolué. Elle est maintenant considérée comme une maladie touchant l'ensemble de l'articulation. Elle se caractérise notamment par une dégradation progressive du cartilage, un remodelage anormal de l'os sous-chondral qui s'accompagne par la formation d'ostéophytes et une inflammation de la membrane synoviale ou synovite. Ces modifications de l'articulation au niveau macroscopique sont liées notamment à un déséquilibre de la balance entre anabolisme et catabolisme, accentuée par des modifications du phénotype des chondrocytes seul type cellulaire présent dans le cartilage et une inflammation de bas-grade.

### A. Le cartilage articulaire et les chondrocytes

#### a. Composition, structure et propriétés biomécaniques du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire aussi appelé cartilage « hyalin » du fait de son aspect lisse et translucide est un tissu conjonctif présent à la surface des épiphyses des os composant les articulations.

Son épaisseur est variable en fonction de l'articulation. Dans le compartiment fémoro-tibial, son épaisseur varie de 1,5 à 3 mm<sup>86,87</sup>. Le cartilage articulaire n'est ni innervé, ni vascularisé. Il est presque essentiellement constitué d'eau et d'électrolytes dissous (65 à 80 %), de collagènes principalement de type II (15 à 22 %) et de PG (4 à 7 %)<sup>88</sup>. D'autres classes de molécules sont également présentes telles que des lipides, des phospholipides, des protéines non collagéniques et des glycoprotéines<sup>89</sup>, mais en quantité moindre.

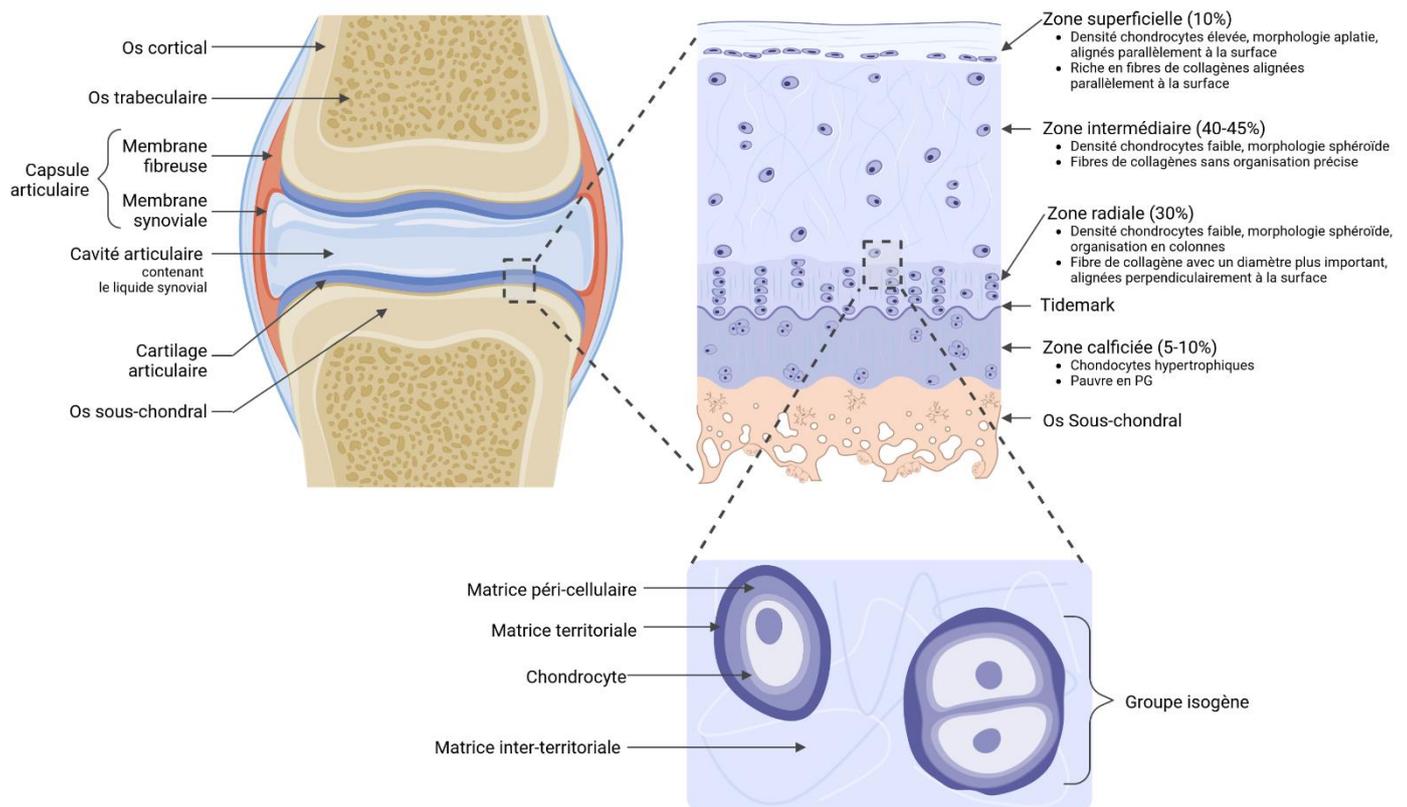
Les fibres de collagène forment un maillage plus ou moins dense selon la zone du cartilage qui va assurer sa rigidité et la rétention des PG et des glycosaminoglycanes (GAGs) associés. Les GAGs chargés négativement et donc très hydrophiles, vont avoir pour rôle de piéger l'eau chargée positivement au sein du cartilage<sup>90</sup>. La composition du cartilage hyalin lui permet de transmettre les forces de compressions et de cisaillements qui lui sont appliquées aux pièces osseuses et de réduire les frottements, auxquelles les articulations dites porteuses (hanches, genoux, chevilles) sont soumises.

Morphologiquement, le cartilage mature est organisé en 4 zones distinctes caractérisées par leur composition, leur structure et leur distribution cellulaire. Ces zones s'échelonnent de la surface du cartilage au contact du liquide synovial jusqu'en profondeur au contact de l'os sous-chondral<sup>91</sup> (Figure 2) :

- La zone superficielle représente environ 10 % de l'épaisseur total du cartilage. Cette zone arbore une forte densité cellulaire avec des chondrocytes à la morphologie aplatie et disposés parallèlement à la surface du cartilage ainsi que des progéniteurs chondrocytaires. La matrice extracellulaire (MEC) est riche en fibres de collagènes de type I,II,III, IX et XI alignées parallèlement à la surface articulaire mais présente une concentration plus faible de PG que dans les autres zones du cartilage<sup>92</sup>. Cette organisation assure une résistance accrue aux forces de cisaillement et de traction permettant de protéger les couches plus profondes. On y retrouve également une forte concentration de lubricine aussi connue sous le nom de protéoglycane 4 (PRG4)<sup>93</sup>, qui va faciliter le glissement des cartilages articulaires.
- La zone intermédiaire ou transitionnelle constitue 40 à 45 % de l'épaisseur du cartilage. La densité des chondrocytes y est plus faible que précédemment et leur morphologie majoritairement sphéroïde. La matrice cartilagineuse y est riche en PG. Les fibres de collagènes majoritairement de types II, IX et XI n'ont pas d'organisation bien définie comme précédemment.
- La zone profonde ou radiale représente environ 30 % de l'épaisseur du cartilage. Les fibres de collagènes présentent un diamètre plus important que dans les autres zones et s'organisent perpendiculairement à la surface du cartilage articulaire. Les chondrocytes sont moins nombreux et possèdent là encore une morphologie arrondie. Ils se répartissent

parallèlement aux fibres de collagènes et forment des colonnes. Cette zone est celle qui présente la plus forte concentration en PG.

- La zone calcifiée constitue 5 à 10 % de l'épaisseur du cartilage. Elle se trouve à l'interface entre le cartilage et l'os sous-chondrale. Cette zone pauvre en PG présente une concentration élevée en calcium et contient un faible nombre de cellules<sup>94</sup>. Ces chondrocytes ont un volume cellulaire plus important, expriment des marqueurs hypertrophiques et synthétisent notamment du collagène de type X. La délimitation entre le cartilage calcifié et la zone profonde est marquée par un repère histologiquement défini : la "tidemark" qui constitue une barrière physique empêchant l'invasion du cartilage par les vaisseaux sanguins présents dans l'os sous-chondral<sup>95</sup>.



**Figure 2 : Organisation du cartilage articulaire**  
(Créée avec BioRender.com)

## b. Les chondrocytes

Le cartilage hyalin est constitué d'un seul type cellulaire, les chondrocytes qui dérivent des cellules stromales mésenchymateuses<sup>96</sup>. Les chondrocytes assurent le renouvellement et le maintien de la MEC dans leur voisinage immédiat grâce à un équilibre des activités anaboliques et cataboliques<sup>97,98</sup>.

Ils répondent aux amplitudes physiologiques de compression avec une synthèse accrue des constituants de la MEC, tels que les PG, les collagènes et COMP<sup>99,100</sup>. A l'inverse, l'absence ou l'application de forces de compressions de faible amplitude inhibent la synthèse de la matrice<sup>99</sup>.

Ils constituent environ 2 % du volume total du cartilage articulaire<sup>101</sup> mais leur densité varie selon l'articulation, la zone du cartilage et également l'âge de l'individu<sup>102,103</sup>. En conditions physiologiques normales, les chondrocytes articulaires ne prolifèrent pas ou peu.

Le cartilage est un des rares tissus à fonctionner en hypoxie. Il présente un gradient hypoxique dont la teneur en oxygène varie de 10 % en surface à 1 % en profondeur<sup>104</sup>. De ce fait, les chondrocytes utilisent principalement la glycolyse anaérobie pour la production de leur énergie. Cependant, il a été montré que les chondrocytes des couches les plus superficielles pouvaient avoir un fonctionnement aérobie partiel par diffusion des gaz (O<sub>2</sub>) présents dans le liquide synovial. Le cartilage étant avasculaire, la nutrition des chondrocytes s'effectue également par diffusion et convection (due au mouvement du liquide) à partir du liquide synovial et dans une moindre mesure à partir de l'os sous-chondrale pour les zones calcifiées et profondes<sup>88</sup>. La diffusion est le principal mécanisme de transport des petits solutés comme le glucose, l'urée ou les peptides par exemple à travers le tissu cartilagineux<sup>105</sup>, tandis que la convection joue un rôle important dans le transport des solutés plus gros dont la taille est supérieure à 3kDa (facteurs de croissance (IGF1 (insulin-like growth factor-1)), petites protéines (TIMP1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1), dextran)<sup>105,106</sup>.

En plus des variations zonales de structure et de composition du cartilage décrites précédemment, le cartilage se décompose également en 3 régions distinctes basées sur leur voisinage avec les chondrocytes (Figure 2) : la région péri-cellulaire, territoriale et interterritoriale.

Les chondrocytes du cartilage articulaire sont complètement entourés d'une étroite région de tissu, appelée matrice péri-cellulaire (MPC). La MPC a une structure et une composition moléculaire définie et des propriétés physiques uniques qui la distingue fonctionnellement du reste de la MEC et qui soutiennent le chondrocyte. La MPC étant enrichie en PG, la déformation

des tissus et les modifications associées de la teneur en eau interstitielle entraînent des changements dynamiques dans l'environnement physicochimique et osmotique des chondrocytes<sup>107</sup> permettant de réguler la réponse des chondrocytes aux forces de compressions<sup>108,109</sup>. Un certain nombre de molécules matricielles, notamment le collagène de type VI, le perlécan, des agrécanes, le hyaluronane, des biglycanes et le collagène de type IX, se trouvent exclusivement à des concentrations plus élevées dans la MPC par rapport à la MEC environnante<sup>110</sup>. Les interactions entre ces constituants moléculaires contribuent à l'ultrastructure distincte de la MPC et à ses propriétés biomécaniques

La matrice territoriale est constituée de fibres de collagène entrecroisées formant ainsi un panier fibrillaire autour de la MPC définissant les contours de logettes connues sous le nom de chondrons<sup>111,112</sup> (Figure 2) et protégeant les chondrocytes des contraintes mécaniques<sup>113</sup>. Les chondrons mesurent environ 2 à 4 µm d'épaisseur. Dans le cartilage mature, les chondrocytes au sein des chondrons peuvent s'organiser en groupes isogènes, c'est-à-dire qu'ils sont issus de la division d'un même chondrocyte. Les groupes isogènes sont plus abondants dans la zone transitionnelle que dans les zones superficielle et profonde du cartilage articulaire.

La matrice interterritoriale forme l'essentiel du volume restant du cartilage et décrit plus en détails dans la partie traitant de la composition, structure et propriétés biomécaniques du cartilage articulaire (Partie I.I.4.A.a, p25-27).

### c. Mécanismes de dégradation du cartilage

L'OA notamment chez les sujets jeunes peut-être causée par une blessure articulaire antérieure ayant entraîné une charge mécanique anormale<sup>114</sup> (OA post-traumatique), alors que chez les sujets plus âgés, un certain nombre de facteurs liés au vieillissement peuvent contribuer au développement de l'OA. Avec la survenue de l'OA, la matrice cartilagineuse présente des changements de composition et de structure (Figure 3).

Au niveau macroscopique des fibrillations vont apparaître à la surface du cartilage. À mesure que le processus pathologique se poursuit, des fissures profondes associées à l'exfoliation des fragments de cartilage se produisent, conduisant finalement à la délamination et à l'exposition du cartilage calcifié et de l'os sous-jacents. Ces modifications s'accompagnent d'un épaissement de la zone de cartilage calcifié au détriment des zones profondes et intermédiaires. Ce processus est associé à la duplication de la tidemark. Des microfissures à la jonction ostéochondrale,

permettent l'invasion du cartilage par des éléments vasculaires et des nerfs sensitifs depuis l'os sous-chondral.

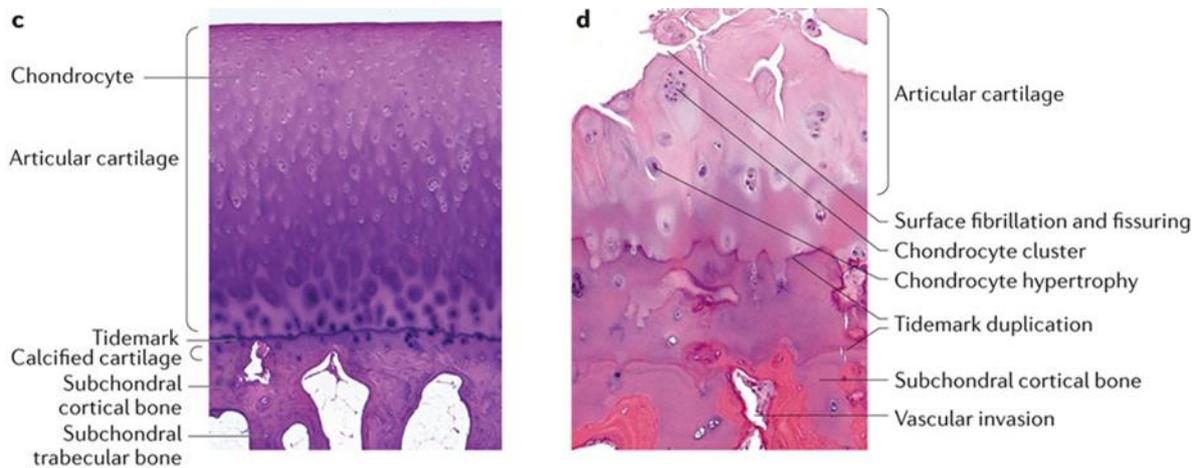


Figure 3 : Coupe histopathologique de la surface articulaire montrant un cartilage sain (c) et un cartilage arthrosique (d).  
 (Martel-Pelletier J. et al., 2016<sup>6</sup>)

Avec l'apparition de l'OA, les chondrocytes subissent de multiples changements, en termes de prolifération, de viabilité, mais aussi de phénotype. Ainsi lors des premiers stades de l'OA, les chondrocytes articulaires, qui possèdent une faible capacité proliférative vont présenter une réponse proliférative transitoire et une synthèse matricielle accrue (collagène de type II, agrécanes etc.) tentant d'initier la réparation du cartilage. Cette réponse de réparation est également caractérisée par une reprise du processus de différenciation, l'acquisition d'un phénotype hypertrophique qui s'accompagne de l'expression du facteur de transcription RUNX-2 (Facteur de transcription lié à Runt 2)<sup>115</sup> et la production aberrante de collagène de type X<sup>116</sup> et de protéases dégradant la matrice tels que les MMPs<sup>117,118</sup> et les protéines de la famille des ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs).

Les chondrocytes hypertrophiques expriment aussi des gènes liés à la différenciation ostéogénique et peuvent ainsi participer à la minéralisation de la MEC lui faisant perdre ses propriétés biomécaniques. Cette minéralisation anormale du cartilage participe au dédoublement de la tidemark. De plus, les chondrocytes hypertrophiques peuvent se trans-différencier en ostéoblastes, contribuant ainsi à la formation d'ostéophytes au cours de l'OA<sup>119,120</sup>.

La sénescence cellulaire<sup>121</sup> et la mise en place d'une inflammation<sup>122</sup> de bas grade se produisent parallèlement à l'hypertrophie des chondrocytes et concourent aux changements de leur phénotype. Les cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  (Facteur de nécrose tumorale alpha) participent à la destruction de la matrice du cartilage articulaire en induisant la sécrétion par les chondrocytes de MMPs, de molécules pro-inflammatoires : la prostaglandine E2

(PGE2) et l'oxyde nitrique (NO), mais aussi d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou l'IL-8 qui ont des effets paracrines et autocrines. De plus, l'IL-1 $\beta$  est également capable d'inhiber la production des composants de la MEC, y compris l'aggrécane<sup>123</sup> ou le collagène de type II<sup>124</sup>.

### B. L'os sous-chondral et les ostéoblastes/ostéoclastes

L'os sous chondral est en contact direct avec le cartilage via sa zone calcifiée. C'est un tissu minéralisé qui peut être décomposé en deux structures anatomiques distinctes<sup>125</sup> : la plaque osseuse sous-chondrale et l'os trabéculaire sous-chondral (Figure 4). La plaque osseuse sous-chondrale d'une épaisseur de 1 à 3 mm<sup>126</sup> est constituée d'os cortical, dense, relativement non poreux et peu vascularisé alors que l'os trabéculaire sous-chondral est constitué de travées osseuses abritant des vaisseaux sanguins, des nerfs sensitifs, de l'endothélium et de la moelle osseuse nécessaire à l'hématopoïèse<sup>127</sup>.

L'os sous chondral comme les autres os du corps est divisé en 2 phases avec d'une part une phase organique composée pour l'essentielle de collagène de type I, de PG et de GAGs offrant une certaine élasticité à l'os. Cette première phase va être minéralisée par des cristaux

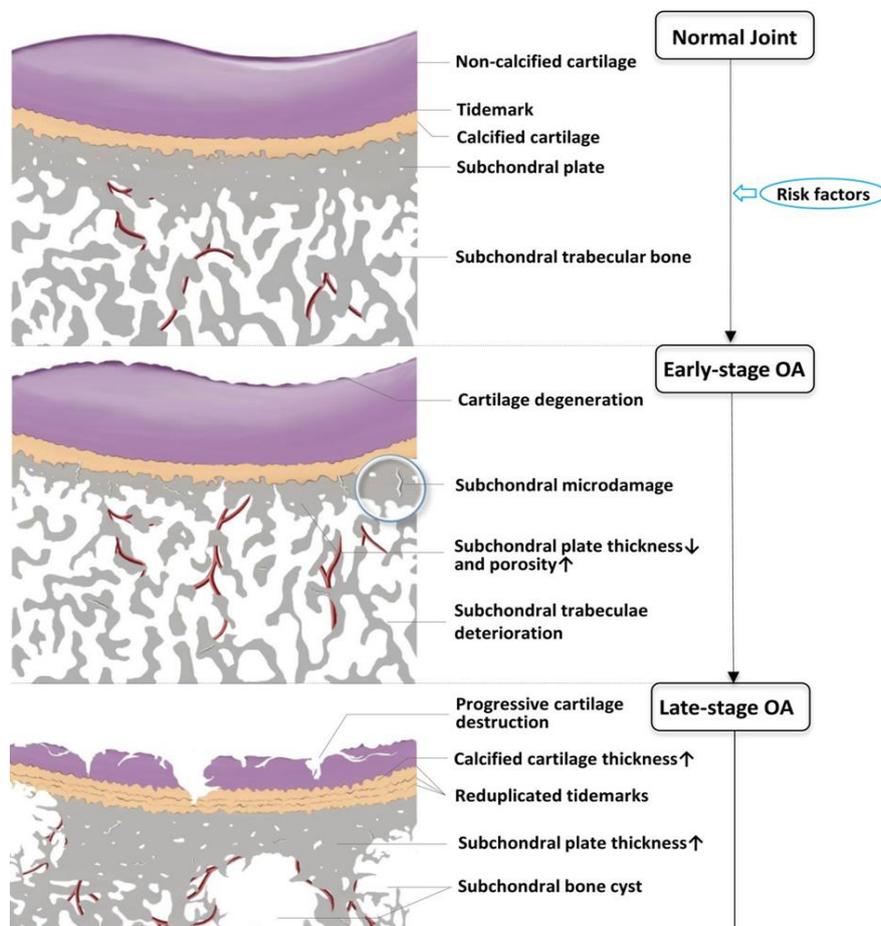


Figure 4 : Représentation schématique des dérégulations impactant l'os sous-chondrale aux stades précoces et tardifs de l'arthrose. (Li G. et al., 2013<sup>125</sup>)

d'hydroxyapatites qui vont assurer la rigidité de l'ensemble et constituent la phase inorganique des os. Le rôle de l'os sous-chondral est d'atténuer les forces générées par la locomotion. La plaque osseuse sous-chondrale compacte fournit un soutien ferme au cartilage articulaire tandis que l'os trabéculaire de par sa structure plus élastique assure l'absorption des chocs.

L'os sous-chondral, le cartilage calcifié, la tidemark et la zone profonde du cartilage forment la jonction ostéochondrale<sup>128</sup>. Cette jonction ostéochondrale a trois fonctions majeures. En premier lieu il s'agit de la zone de transition entre le cartilage articulaire élastique et l'os sous-chondral plus dur. Elle possède donc des propriétés mécaniques importantes. Ensuite, elle assure l'ancrage du cartilage articulaire à l'os sous-chondral via les arcades de collagène de type II qui la traversent et pénètrent dans l'os sous-chondral. Enfin c'est également un espace d'échange entre les chondrocytes du cartilage et les cellules osseuses (ostéoblastes, ostéoclastes et ostéocytes)<sup>129</sup>.

Le squelette est un organe métaboliquement actif qui subit un remodelage continu tout au long de la vie. Le remodelage osseux débute par la résorption de l'os minéralisé par les ostéoclastes. S'ensuit la formation d'une nouvelle matrice osseuse non minéralisée par les ostéoblastes, dont certains vont être piégés dans la matrice lors de sa minéralisation et se différencier en ostéocytes. Le remodelage osseux permet d'ajuster l'architecture osseuse en réponse aux contraintes mécaniques et assure également la réparation des micro-dommages de la matrice osseuse<sup>130</sup>. En condition non pathologique, le remodelage osseux permet de maintenir la qualité et la quantité osseuse et présente donc un bilan minéral neutre, à savoir que la quantité d'os formée équivaut à la quantité d'os éliminée par la résorption.

Les premiers stades de l'OA sont caractérisés par une augmentation du remodelage osseux qui s'accompagne d'une vascularisation accrue et d'une densité osseuse réduite<sup>131</sup>. Chez les patients atteints d'OA à un stade précoce, les modifications de l'os sous-chondral sont observées en amont de la perte de cartilage<sup>132</sup>. Avec la progression de l'OA, il y a un rétablissement bien décrit du processus d'ossification endochondrale, qui va se traduire par le dédoublement de la tidemark (Figure 4) comme évoqué précédemment, ainsi qu'une sclérose c'est-à-dire un épaissement de l'os cortical sous-chondral et la formation d'ostéophytes<sup>133</sup>. Les ostéophytes sont localisés sur les marges articulaires. Ce sont des excroissances fibro-cartilagineuses minéralisées qui constituent une caractéristique radiographique de l'OA. L'os trabéculaire sous-chondral va également être impacté et peut présenter les caractéristiques histopathologiques suivantes : des micro-fissures, des œdèmes/lésions de la moelle osseuse et des kystes osseux<sup>134</sup>. La correspondance des lésions de la moelle osseuse avec les régions de lésions osseuses et cartilagineuses soutient fortement

l'origine mécanique et traumatique des modifications observées de la moelle osseuse sous-chondrale.

Le cartilage et l'os sous-chondral échangent également des signaux. Des études *in vivo* ont montrées que les prostaglandines, les leucotriènes et divers facteurs de croissance libérés par les ostéoblastes lors du remodelage osseux sous-chondral peuvent atteindre le cartilage articulaire sous-jacent<sup>135,136</sup>. Il semble donc logique que les facteurs de stimulation inflammatoires, vasculaires et ostéoblastiques tels que des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF pour Vascular endothelial growth factor)<sup>137</sup>, ou RUNX-2<sup>138</sup> libérés par les chondrocytes arthrosiques puissent participer à la détérioration de l'os sous-chondral en favorisant le remodelage osseux.

### C. La membrane synoviale

La membrane synoviale est un tissu conjonctif spécialisé, mou, déformable qui tapisse l'espace interne de la cavité articulaire. Sa fonction première est la production du liquide synovial afin de faciliter le mouvement des pièces osseuses. Elle constitue également une barrière de filtration, d'échanges et joue un rôle dans l'immunité.

La membrane est constituée de 2 couches :

- La couche externe ou sub-intima en contact avec la capsule articulaire mesure jusqu'à 5 mm d'épaisseur. C'est un tissu conjonctif lâche riche en collagène de type I qui présente une micro-vascularisation et un réseau lymphatique développé. La sub-intima intègre également des fibres nerveuses. C'est un tissu peu cellulaire composé principalement de synoviocytes de type fibroblastiques (FLS pour fibroblast-like synoviocytes) et de macrophages<sup>139</sup>. Les macrophages de la membrane synoviale dérivent de la moelle osseuse via des monocytes circulants et expriment des marqueurs typiques des lignées macrophagiques (CD64, CD28, CSF1R (Colony stimulating factor 1 receptor), MerTK).
- La couche interne ou intima se trouve du côté de la cavité articulaire. D'une épaisseur de seulement 20 à 40 µm, elle est composée de une à trois couches de cellules<sup>140</sup>. A ce jour deux types cellulaires ont été identifiés en son sein, des cellules macrophagiques et des FLS. Ces derniers constituent la population cellulaire dominante dans la membrane synoviale saine.

La membrane synoviale est responsable de la production du liquide synovial qui baigne l'intérieur de la cavité articulaire. Il s'agit d'un dialysat de plasma sanguin additionné de molécules synthétisées par les FLS de l'intima. Il contient notamment de l'acide hyaluronique, des glycoprotéines mucineuses (comme la lubricine), des protéines et nutriments plasmatiques<sup>141</sup>. Mais peut également contenir des cellules tels que des leucocytes. C'est un liquide clair, légèrement jaunâtre et visqueux dont le pH oscille entre 7,4 et 7,7<sup>142</sup>. En condition inflammatoire, le nombre de leucocytes présent dans le liquide synovial augmente drastiquement, le rendant opaque. Son volume varie en fonction des articulations ; de quelques millilitres dans les petites articulations, il peut atteindre jusqu'à 5ml dans les grandes articulations, comme le genou. Bien qu'une articulation saine présente une faible concentration en oxygène (environ 8 %)<sup>142</sup> le liquide synovial joue un rôle crucial dans la nutrition et l'apport en oxygène des tissus non vascularisés de l'articulation tels que le cartilage articulaire ou les ménisques. Les macrophages présents dans la membrane synoviale participent probablement à l'homéostasie du liquide synovial via l'élimination et le renouvellement de ses constituants<sup>143</sup>.

De plus en plus de preuves indiquent que l'inflammation synoviale de bas grade ou synovite contribue à la progression de l'OA<sup>144</sup>.

Sur le plan clinique la synovite se présente sous la forme d'un gonflement de l'articulation accompagné de douleurs. L'IRM et l'échographie, deux méthodes de choix pour mettre en évidence l'inflammation de la membrane synoviale<sup>145</sup>, ont confirmé une prévalence élevée d'inflammation chez les patients arthrosiques<sup>146</sup>. La synovite est caractérisée histologiquement, par une hypertrophie et une hyperplasie de la membrane synoviale qui s'accompagne d'une

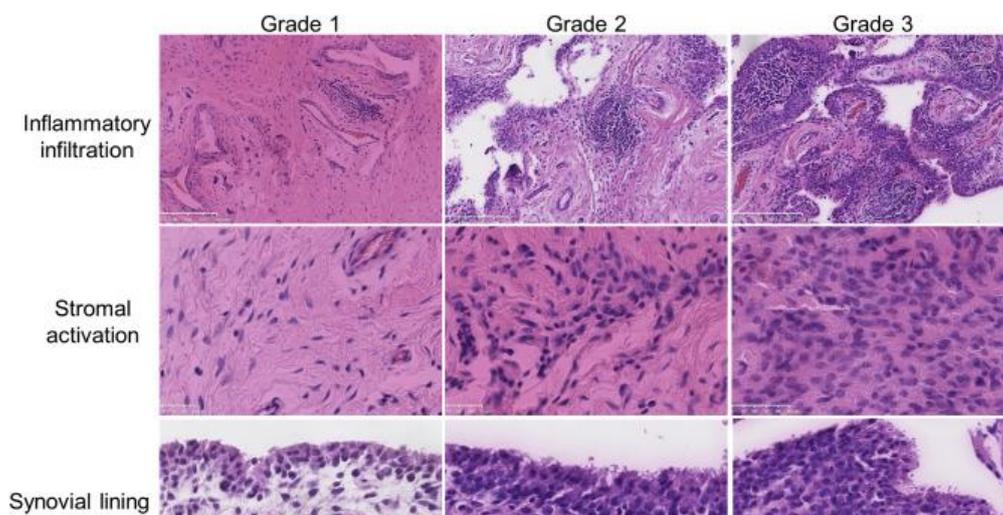
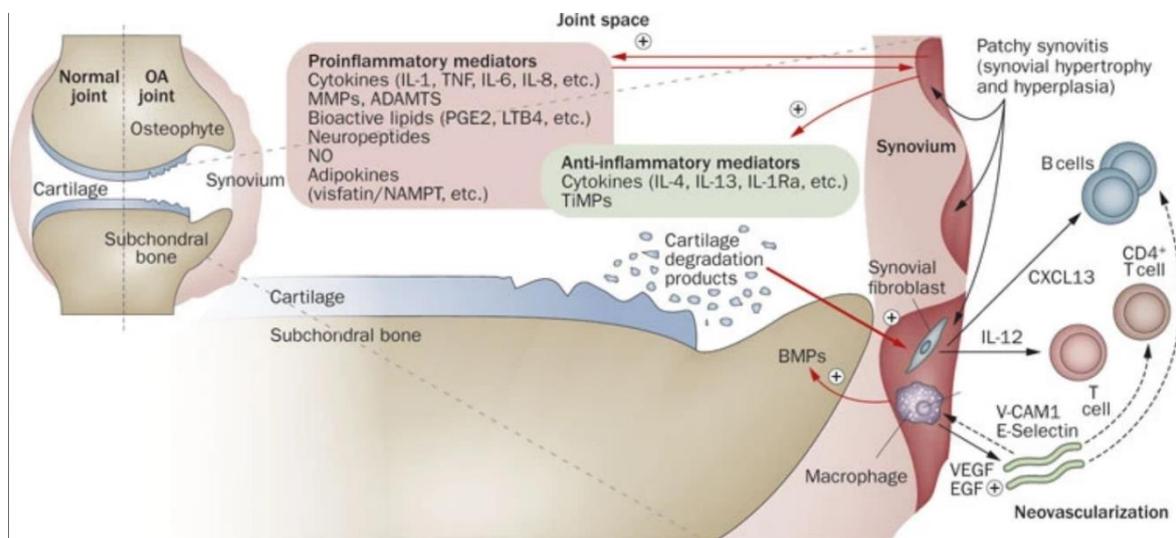


Figure 5 : Coupes histologique de membrane synoviale de patients arthrosiques à différents stades d'inflammation. (Riis R.G.C et al., 2017<sup>145</sup>)

augmentation de l'angiogenèse et d'un infiltrat leucocytaire diffus ou périvasculaire constitué principalement de macrophages et de lymphocytes T<sup>147</sup>.

Les causes initiant l'inflammation de la membrane synoviale au cours de l'OA restent controversées<sup>148</sup>. L'hypothèse la plus souvent évoquée est que des produits de dégradation de la MEC du cartilage (telles que le collagène et la fibronectine<sup>149</sup>) et des constituants des PG (par exemple, l'acide hyaluronique), mais aussi des alarmines et des motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs, Damage-associated molecular pattern) dont la concentration est augmentée dans le liquide synovial arthrosique vont stimuler la réponse inflammatoire de la synoviale<sup>150</sup>.

Les macrophages de la membrane synoviale et les FLS réagissent en produisant des médiateurs pro-inflammatoires (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE2, etc...)<sup>151</sup> qui participent au recrutement d'un infiltrat immunitaire responsable de l'hyperplasie de ce tissu et augmentent l'angiogenèse via la sécrétion de VEGF et EGF (Epidermal growth factor)<sup>152</sup>. Les médiateurs inflammatoires vont également favoriser la mise en place d'un cercle vicieux en supportant les changements phénotypiques des chondrocytes. En réponse, les cellules du cartilage vont accroître leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et d'enzymes protéolytiques (MMPs, ADAMTs) augmentant ainsi la dégradation du cartilage et donc la progression de l'OA<sup>153</sup>.



**Figure 6 : Implication de la synoviale dans la physiopathologie de l'arthrose.** (Sellam J. et Berenbaum F., 2010<sup>153</sup>)  
 Abréviations: ADAMTS, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs; BMP, bone morphogenetic protein; CCL2, CC-chemokine ligand 2; CXCL13, CXC-chemokine ligand 13; EGF, endothelial growth factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IL, interleukin; IL-1Ra, IL-1 receptor antagonist; LIF, leukemia inhibitory factor; LTB4, leukotriene B4; MMP, matrix metalloproteinase; NAMPT, nicotinamide phosphoribosyl transferase (also called visfatin); NO, nitric oxide; NGF, nerve growth factor; OA, osteoarthritis; PGE2, prostaglandin E2; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase; TNF, tumor necrosis factor; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Un nombre croissant d'équipes de recherche s'intéresse au rôle du tissu adipeux et plus particulièrement au tissu adipeux infra-patellaire (IFP, infra-patellar fat pad). Situé sous la rotule, l'IFP est en contact étroit avec la membrane synoviale avec qui il partage une vascularisation importante<sup>154</sup>. Les adipocytes constituent la majeure partie de sa population cellulaire ; mais des fibroblastes responsables de la production de la MEC et des cellules immunitaires (macrophages, mastocytes et lymphocytes) y sont aussi reconnaissables<sup>155</sup>. De plus en plus d'études soutiennent l'idée que l'IFP et la membrane synoviale pourraient être considérés comme une unité morpho-fonctionnelle<sup>154</sup>.

Soutenant ce concept, il a été rapporté que l'IFP de patients OA présente une expression plus élevée du VEGF et que celui-ci était positivement associé au degré de vascularisation de la synoviale, renforçant l'idée d'une interaction fonctionnelle entre l'IFP et la synoviale<sup>156</sup>.

En raison des propriétés métaboliques du tissu adipeux, l'IFP peut affecter le fonctionnement de la membrane synoviale et participer au développement de l'OA. En plus d'agir comme source d'énergie, le tissu adipeux peut impacter d'autres tissus en sécrétant de nombreuses cytokines (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) et adipokines (adiponectine, leptine)<sup>157</sup>. Dans une étude récente, chez des patients atteints de gonarthrose et ayant subi une reconstruction du ligament croisé antérieur, l'IFP était plus enflammé, vascularisé, fibrosé et sécrétait plus d'adipokines pro-inflammatoires que l'IFP du groupe témoin<sup>158</sup>.

## 5. Prise en charge et traitement

En l'absence de traitement curatif, la prise en charge de l'OA est symptomatique. Elle vise avant tout à réduire les symptômes des patients à savoir la douleur et la gêne fonctionnelle afin d'améliorer leur qualité de vie. La prise en charge se décline en 3 volets détaillés ci-dessous qui peuvent être combinés selon les besoins du patient.

### A. Thérapies non médicamenteuses

Les thérapies non médicamenteuses ont pour objectif d'améliorer la qualité de vie des malades. Ces approches reposent avant tout sur la prescription d'activité physique, l'éducation du patient et la perte de poids pour les personnes en surpoids ou obèses et visent à réduire les facteurs de risques modifiables associés à l'OA. Ces stratégies non médicamenteuses doivent constituer la première ligne de traitement notamment dans la prise en charge de l'OA du genou ou de la hanche d'après les directives internationales pour la prise en charge de l'OA<sup>27,159</sup>.

#### a. L'activité physique

Il est bien établi que l'activité physique et la thérapie par l'exercice permettent d'atténuer les symptômes tels que la douleur, d'améliorer la motricité et le confort de vie global chez les personnes atteintes d'OA du genou<sup>27,159</sup>. La prescription d'activité physique se montre même supérieur à diverses approches pharmacologiques ou chirurgicales de l'OA<sup>160</sup>. L'éducation des patients joue cependant un rôle essentiel dans l'adhérence aux protocoles d'exercices et donc dans l'amélioration des symptômes. En effet, l'activité physique et la thérapie par l'exercice sont nettement sous-utilisés par les personnes atteintes de gonarthrose notamment. Cela est dû à une mésinformation des patients, à la peur du mouvement, au manque de temps pour insérer la routine d'exercices dans la vie quotidienne et à l'aggravation de la douleur par le traitement précoce<sup>161-163</sup>.

#### b. La perte de poids

La perte de poids modérée est l'exemple classique d'une approche non pharmacologique qui peut porter ses fruits. Elle passe notamment par une modification du régime alimentaire. Comme vu précédemment l'obésité ou le surpoids font partie des principaux facteurs de risque de l'OA<sup>49,164</sup>. Une réduction d'environ 5kg du poids, diminue de 50 % le risque de développer une OA du genou chez les femmes ayant un IMC supérieur à 25 kg/m<sup>2</sup><sup>165</sup>.

Chez Les patients en surpoids avec une OA identifiée, une perte de poids supérieur ou égale à environ 8% permet d'obtenir une amélioration clinique importante de la fonction physique<sup>166</sup>.

Enfin, la combinaison d'un régime et d'exercices physiques améliore nettement la fonction physique chez ces patients<sup>47</sup>.

## B. Traitement médicamenteux

En l'absence de traitements permettant de ralentir, stopper ou d'inverser le cours du développement de l'OA, les traitements médicamenteux proposés aux patients en complément des thérapies non médicamenteuses ont pour but de soulager les symptômes douloureux et d'améliorer la qualité de vie des patients.

### a. Paracétamol et anti-inflammatoires non stéroïdiens

Le paracétamol est bien souvent recommandé en première intention pour soulager la douleur dans le traitement de l'OA. Il peut être pris à la dose de 1 gramme, quatre fois par jour. Cependant, des études récentes indiquent que son efficacité reste limitée<sup>167,168</sup>.

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont également recommandés pour la prise en charge de la douleur en raison d'événements indésirables minimes à légers<sup>27,169</sup>. Ils agissent en bloquant la formation des prostaglandines, substances responsables de l'inflammation. Ils ont des propriétés antalgiques (contre la douleur) et à doses plus élevées, anti-inflammatoires. Ils peuvent être administrés par voie générale (voie orale, rectale ou injectable) ou locale (sous forme de gels, de crèmes ou d'emplâtres). L'OARSI recommande notamment l'utilisation des formes topiques pour les malades présentant des comorbidités gastro-intestinales ou cardiovasculaires et les patients fragiles<sup>169</sup> afin de réduire le risque d'effets indésirables liés à l'exposition systémique aux AINS.

### b. Autres traitements pharmacologiques

Les opioïdes peuvent être considérés en cas d'échec des solutions médicamenteuses précédemment citées. Cependant, ils possèdent un profil de toxicité important entraînant de nombreux effets secondaires indésirables (nausées, vomissements, vertiges, constipation, somnolence, fatigue, maux de têtes, mais aussi dépendance, tolérance et risque d'overdose)<sup>170,171</sup>. De ce fait, les patients nécessitent un suivi plus important, ce qui peut expliquer que les opioïdes soient utilisés de manière variable selon les pays.

Environ 21 % des malades souffrant d'OA symptomatique souffrent de dépression concomitante<sup>172</sup>. La duloxétine est un inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la norépinéphrine qui montre des bénéfices modérés sur la douleur, la fonction et la qualité de vie chez les patients atteints de gonarthrose<sup>173</sup>. Cependant, cette molécule est associée à de

nombreux effets indésirables tels que des troubles gastro-intestinaux, des dysfonctionnements sexuels et des troubles du sommeil<sup>174</sup> et n'est que rarement cité dans les recommandations de prise en charge de l'OA<sup>6</sup>.

Les nutraceutiques constituent une famille de molécules hétérogènes qui présente généralement des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes ou analgésiques<sup>175,176</sup>. Parmi elles, deux composés ont particulièrement été étudiés ; il s'agit de la glucosamine et la chondroïtine sulfate. Ces deux molécules entrent dans la composition des GAGs et possèdent des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes, mais ne sont plus recommandés en raison d'un manque de certitude quant à leurs bénéfices cliniques<sup>177,178</sup>. Cependant, des études et des essais cliniques plus récents ont montré qu'elles présentent également des propriétés analgésiques<sup>179</sup> et la capacité de ralentir la progression de l'atteinte structurelle de l'articulation<sup>180,181</sup>. La controverse demeure donc quant à l'efficacité de ces molécules dans l'OA.

### c. Traitements intra-articulaires

Les traitements intra-articulaires présentent de nombreux avantages par rapport aux traitements systémiques. Ils vont permettre une biodisponibilité plus importante des substances administrées localement tout en réduisant la quantité de principe actif nécessaire et l'exposition systémique diminuant ainsi les effets indésirables et leur coût.

**La visco-supplémentation** a pour but de restaurer les propriétés viscoélastiques du liquide synovial via l'injection d'acide hyaluronique et ainsi d'améliorer les propriétés mécaniques de l'articulation. La demi-vie de l'acide hyaluronique n'est que d'environ 26h<sup>182</sup>, pourtant les études rapportent des effets sur la douleur et la raideur des articulations jusqu'à plusieurs mois après l'injection<sup>183</sup>. Bien que la visco-supplémentation soit encore largement proposée par les professionnels de santé<sup>184</sup> de plus en plus d'organisations professionnelles s'interrogent sur sa pertinence et son efficacité<sup>185</sup>. Une méta-analyse récente de la littérature montre que bien que la visco-supplémentation entraîne une petite réduction de la douleur chez les patients OA, cette différence reste inférieure au seuil clinique. De plus la visco-supplémentation augmente les risques d'évènements indésirables graves<sup>186</sup>.

**Les corticostéroïdes intra-articulaires** sont particulièrement recommandés chez les patients atteints de gonarthroses ou de coxarthroses<sup>187</sup>. Ils ont des effets similaires à la visco-supplémentation mais à plus court terme sur la douleur et la gêne fonctionnelle. Cependant une étude récente a montré que les injections répétées de corticostéroïdes augmentent le risque de perte de cartilage<sup>188</sup>

### C. Approches chirurgicales

Le recours à la chirurgie constitue la dernière ligne de prise en charge de l'OA et ne doit être proposée qu'en cas d'échec des approches précédemment décrites. L'approche chirurgicale choisie devra être adaptée aux symptômes du patient ainsi qu'à son âge.

#### a. L'arthroscopie

L'arthroscopie est une opération de chirurgie mini-invasive. Elle est couramment utilisée afin de valider le diagnostic d'OA et également d'évaluer l'étendue des lésions articulaires. Elle permet également de traiter des ruptures du ligament croisé, des fractures, la réparation ou résection du cartilage et/ou des ménisques abimés mais aussi d'effectuer un lavage articulaire afin d'éliminer les débris de cartilage<sup>26,189</sup>. Cependant, l'intérêt thérapeutique de l'arthroscopie est controversé avec plusieurs études ayant montré une faible amélioration de la douleur et de la gêne fonctionnelle chez les patients. Cette intervention chirurgicale augmente également les risques d'avoir recours à une pose de prothèse dans l'année qui suit l'arthroscopie<sup>190,191</sup>.

#### b. L'ostéotomie et la prothèse unicompartmentale

Lorsque l'atteinte articulaire touche presque essentiellement un seul compartiment de l'articulation ou qu'elle résulte d'une déformation anatomique de type valgus ou varus interne, deux interventions sont possibles. La première, la pose de prothèse unicompartmentale peut-être proposée chez des patients sans antécédents de rupture du ligament croisé antérieur et sans déviation du membre inférieur<sup>192</sup>. Alors que la seconde, l'ostéotomie, est-elle indiquée chez les malades présentant une déviation du membre inférieur<sup>193</sup>.

Ces deux opérations majoritairement réalisées au niveau du tibia ont pour but de redistribuer les forces d'appuis vers le compartiment articulaire non affecté par l'OA. Elles sont particulièrement recommandées chez les patients jeunes afin de retarder la pose d'une prothèse totale qui survient généralement dans les 6 à 10 ans à la suite de cette première opération.

#### c. L'arthroplastie

L'arthroplastie ou pose de prothèse totale est particulièrement efficace pour les articulations volumineuses telles que la hanche et le genou chez les patients souffrant d'OA avancée chez qui les autres approches thérapeutiques n'ont pas amélioré les symptômes<sup>189</sup>. Les prothèses permettent de retrouver une mobilité de flexion presque complète et une vie quotidienne normale. Cependant, du fait de la durée de vie limitée des prothèses elles ne sont pas recommandées chez des patients jeunes (âge < 60 ans)<sup>194,195</sup>. Cependant, l'arthroplastie n'est pas

sans risque et dans un petit nombre de cas est associé à des effets indésirables graves (chutes, thromboses veineuses, infections au site opératoire)<sup>196</sup>. Il est également important de noter que chez 1 patient sur 5 la pose d'une prothèse totale de genou ne permet pas une amélioration des symptômes et de la qualité de vie<sup>197</sup>.

#### D. Autres thérapies complémentaires et expérimentales

En l'absence de traitements étiologiques disponibles dans la prise en charge de l'OA de nombreuses approches thérapeutiques innovantes sont en cours de développement et d'évaluation avec pour objectif d'améliorer la prise en charge de la douleur mais également d'arrêter ou réduire la progression de la dégénérescence articulaire.

##### a. Thérapies cellulaires

Un intérêt grandissant est porté sur la thérapie cellulaire dans le domaine de l'OA afin d'influencer la réparation du cartilage. Initialement l'implantation de chondrocytes autologues a été proposée comme traitement des lésions partielles du cartilage<sup>198</sup>. Bien que prometteuse<sup>199</sup>, cette approche présente plusieurs limitations majeures : le prélèvement du cartilage du patient afin d'obtenir les chondrocytes est une procédure invasive, les chondrocytes prolifèrent lentement en culture, et se différencient. De plus, cette approche se limite à des défauts cartilagineux de petites tailles et doivent être entourés de cartilage sain. Enfin, les chondrocytes implantés peuvent subir une différenciation ou une apoptose non désirée dans le microenvironnement inflammatoire des articulations arthrosiques, ce qui peut affecter l'efficacité d'implantation de chondrocytes autologues<sup>200,201</sup>.

À l'heure actuelle, les cellules souches/stromales mésenchymateuses (CSM) sont connues pour être les produits de thérapie cellulaire les plus étudiés dans le cadre de la thérapie cellulaire de l'OA en raison de leur capacité à se différencier en chondrocytes et de leurs propriétés immunomodulatrices<sup>202,203</sup>. Elles peuvent être facilement isolées à partir de différents tissus tels que la moelle osseuse, le tissu adipeux et le liquide synovial par exemple. Suite à l'injection de CSM, les essais cliniques montrent un effet analgésique et une meilleure fonction articulaire<sup>204</sup>. Cependant, les bénéfices cliniques sont généralement de courte durée (quelques mois) et ne sont que rarement associés à un remodelage du tissu cartilagineux.

## b. Thérapie génique

Dans le cadre de l'OA, la thérapie génique est utilisée pour permettre la surexpression à long terme de facteurs thérapeutiques tels que des facteurs de croissance ou de transcription soit pour supprimer l'expression de gènes qui soutiennent la progression de l'OA dans l'espace articulaire<sup>205</sup>.

Le transfert de gène peut-être réalisé via l'utilisation de vecteur viraux ou non viraux afin de délivrer une séquences d'ADN codant pour un gène d'intérêt soit par injection directement chez le patient en intraveineuse ou en intra articulaire; ou bien en modifiant *ex vivo* des cellules du patient avant leur injection dans à l'articulation<sup>206</sup>. Étant donné que l'OA affecte particulièrement le cartilage articulaire, ce tissu est la cible principale de toutes ces approches.

Différents systèmes de transferts existent, mais ceux utilisant des vecteurs viraux sont considérés comme plus efficaces. Les vecteurs viraux les plus couramment utilisés sont : les adénovirus, les virus de l'herpès simplex, les rétrovirus et les lentivirus. Plusieurs essais cliniques ont utilisés la transduction *ex vivo* de chondrocytes ou FLS avec des vecteurs viraux codant pour l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) ou TGF- $\beta$ 1 (Transforming growth factor beta 1) avant d'injecter ces cellules transformées dans l'espace articulaire<sup>207</sup>. En 2018, Kim et al. ont rapporté lors d'un essai de phase III (NCT02072070) que l'efficacité des chondrocytes allogéniques humains exprimant le facteur de croissance transformant TGF- $\beta$ 1 dans le traitement de la gonarthrose humaine était associée à une nette amélioration de la fonction et de la douleur chez les patients atteints d'OA du genou<sup>208</sup>. Cependant en l'absence de significativité statistique des études supplémentaires sont nécessaires avant que cette technique ne puisse être approuvée dans le traitement de l'OA.

## c. Les sénno-thérapeutiques

La sénescence cellulaire a été décrite comme l'un des principaux moteurs du vieillissement et l'accumulation de cellules sénescents dans les tissus est impliquée dans la pathogenèse et la progression de nombreuses maladies liées à l'âge<sup>209,210</sup>. Les cellules sénescents s'accumulent dans les tissus articulaires en réponse à une blessure<sup>211</sup> et au cours du vieillissement<sup>33</sup>, participant ainsi au développement de l'OA et à sa progression.

De nombreuses équipes de recherche étudient donc le potentiel thérapeutique du ciblage des cellules sénescents à l'aide de médicaments dits sénno-thérapeutiques. Ils constituent une nouvelle famille de médicaments divisée en deux classes ; les sénolytiques dont le rôle est d'éliminer sélectivement les cellules sénescents et les sénomorphiques dont l'objectif est de moduler les effets néfastes du SASP des cellules sénescents<sup>212-214</sup>.

La preuve de l'efficacité des sénolytiques pour l'atténuation des maladies liées à l'âge a été démontrée dans des modèles murins de progeria<sup>215</sup> et de maladies chroniques telles que l'athérosclérose<sup>216</sup>, le diabète<sup>217,218</sup>, l'OA<sup>211,219</sup> et associée à une augmentation concomitante de l'espérance de vie<sup>215,220</sup>, ce qui a permis leur transition rapide aux essais cliniques.

La majorité des sénolytiques identifiés à ce jour favorisent l'apoptose des cellules sénescents en ciblant des enzymes clés impliquées dans les mécanismes de survie et anti-apoptotique, telles que p53, p21, les protéines de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), Akt, PI3K (Phosphoinositide 3-kinase), FOXO4 (Forkhead box protéine 4)<sup>214</sup>.

Bien que prometteur dans les modèles précliniques le seul essai clinique mené jusqu'à présent avec le sénolytique UBX0101 dans le traitement de la gonarthrose (NCT04229225, NCT04349956, NCT04129944, NCT03513016) a présenté des résultats non concluants.

Cependant, de nombreux essais cliniques sont en cours ou prévus afin d'évaluer d'autres molécules pour le traitement de l'OA telles que la fisétine seule (NCT04210986, NCT04815902, NCT05482672) ou en association avec la quercétine (NCT05276895)<sup>221</sup>.

## II. La sénescence cellulaire

Le mot sénescence tire son nom du latin *senescere*, vieillir. A l'origine, la sénescence est utilisée pour décrire le déclin naturel des tissus et d'un organisme associé au vieillissement. Mais en 1961 la découverte de la sénescence cellulaire par Hayflick et Moorhead<sup>222</sup> va redéfinir les contours de ce mot avec une sénescence qui n'est plus seulement liée au vieillissement global d'un organisme, mais également un processus cellulaire complexe avec des répercussions au niveau systémique. Ils sont en effet les premiers à démontrer que les cellules ne sont pas immortelles, mais au contraire possèdent une capacité de prolifération limitée appelée la limite de Hayflick.

Ces dernières années, la sénescence cellulaire est devenue le centre de l'attention dans de multiples domaines de la recherche biomédicale<sup>223</sup>. En effet, suite à la découverte de la sénescence répliquative, d'autres équipes ont montré que la sénescence peut également se mettre en place prématurément en réponse à un stress cellulaire endogène ou exogène<sup>224</sup>. Ce stress aurait dû conduire la cellule à se réparer ou à entrer en apoptose, mais grâce à différents mécanismes de survie, la cellule ne meurt pas et reste métaboliquement active. M. Scudellari dans son article paru dans Nature en 2017 qualifie ces cellules sénescents de "cellules zombie"<sup>225</sup>.

La sénescence cellulaire est caractérisée par une perte irréversible de la capacité des cellules à proliférer, accompagnée d'une hypertrophie cellulaire et d'un sécrétome associé à la sénescence, le SASP<sup>226</sup>. Cette sénescence cellulaire peut être bénéfique lorsqu'elle favorise le remodelage tissulaire au cours du développement embryonnaire ou après une blessure, mais peut également contribuer au déclin de la fonction régénératrice des tissus, à l'inflammation, à la tumorigénèse et au développement de maladies telles que l'OA<sup>227</sup> en lien avec le vieillissement.

Par conséquent, l'identification, la caractérisation et l'élimination des cellules sénescents ont attiré l'attention dans le domaine de la recherche sur le vieillissement et sont devenues une nouvelle cible thérapeutique pour les maladies dégénératives liées à l'âge. L'intérêt s'est également porté sur le développement de traitements tels que les sénolytiques et les sénomorphiques ayant pour but respectif d'éliminer les cellules sénescents ou de moduler leurs sécrétions<sup>212</sup>.

## 1. Mécanismes inducteurs de la sénescence

Peu de choses sont connues sur la façon dont les cellules deviennent sénescentes *in vivo*. Néanmoins, grâce aux modèles cellulaires et aux modèles murins notamment, nous savons que la sénescence peut être déclenchée par divers stimuli intrinsèques et extrinsèques. Le raccourcissement des télomères principalement lié à l'âge, des modifications de la structure des télomères, des signaux mitogéniques, l'activation d'oncogènes<sup>228</sup>, le stress oxydatif<sup>229,230</sup> et génotoxique<sup>231</sup>, des modifications épigénétiques, la désorganisation de la chromatine<sup>232</sup>, une perturbation de l'autophagie<sup>233</sup>, des dysfonctionnements mitochondriaux, l'inflammation, l'irradiation ou des agents chimio-thérapeutiques<sup>234,235</sup> ont tous été montrés comme signaux pouvant induire la sénescence<sup>236</sup>.

Ces différents types de signaux de stress ont été catégorisés en différentes familles<sup>237</sup> telles que (Figure 7) :

- La **sénescence répllicative** dépendante des télomères,
- La **sénescence physiologique**, qui présente un rôle bénéfique dans le développement, la cicatrisation et la prévention des tumeurs (décrite plus en détails dans la partie II.II.4.),
- La **sénescence prématurée induite par un stress** (SIPS, stress induce premature senescence). Ce type de sénescence est indépendant de la longueur des télomères et peut-être induit par un oncogène (OIS, oncogene induce senescence), des dommages à l'ADN non résolus, des processus épigénétiques, des dysfonctionnements mitochondriaux ou par des composés chimiques.

Quel que soit le signal à l'origine de l'induction de la sénescence, des mécanismes communs se mettent en place, faisant notamment intervenir la voie de réponse aux dommages de l'ADN (DDR pour DNA damage response) et aboutissent à l'arrêt du cycle cellulaire et au phénotype sénescents via une reprogrammation métabolique afin d'une part de maintenir les cellules sénescents dans un état d'arrêt de croissance viable et d'autre part d'exprimer les gènes et les protéines nécessaires à la sécrétion du SASP.

Ici, nous décriront plus en détails la sénescence répllicative et prématurément induite par l'activation de la DDR.

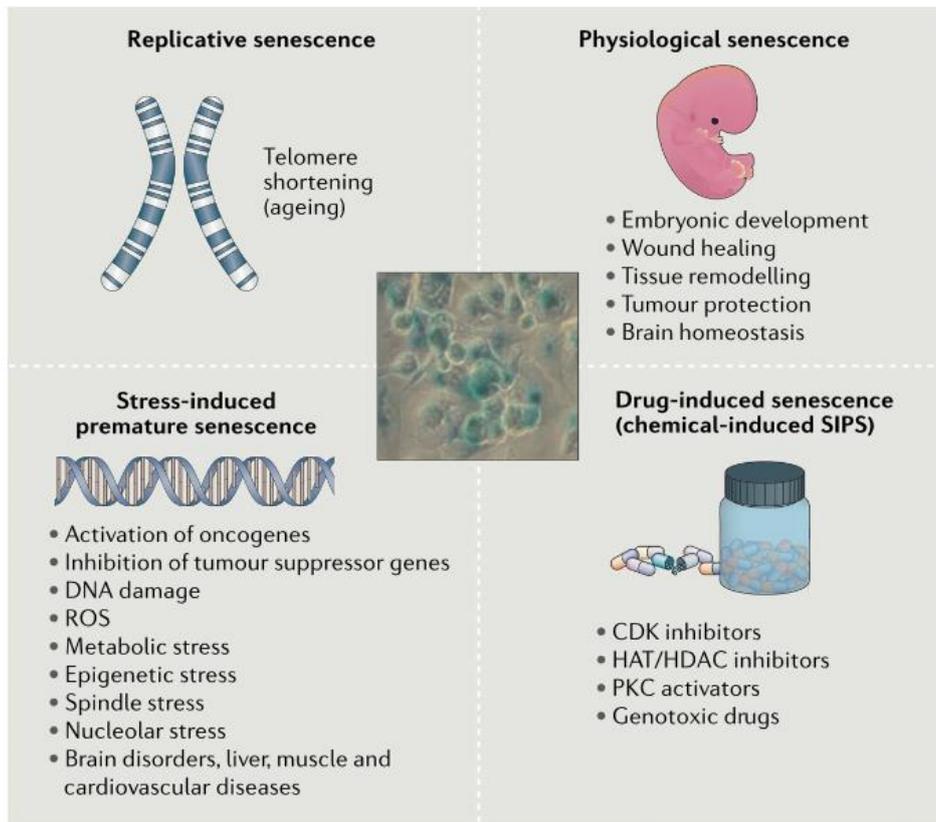


Figure 7 : Les différents types de sénescences (Lozano-Torres B. et al., 2019<sup>237</sup>)

### A. La sénescence répliquative

La sénescence répliquative est le premier type de sénescence à avoir été mis en évidence par Hayflick et Moorhead en 1961<sup>222</sup>. *In vitro*, les cellules possèdent une capacité de division restreinte nommée la limite de Hayflick. En effet, après environ 50 divisions, les cellules perdent leur capacité proliférative et peuvent entrer en sénescence. Par la suite, Olovnikov<sup>238</sup> en 1971 et Watson<sup>239</sup> en 1972 décrivent indépendamment le rôle des télomères dans la sénescence répliquative.

Les télomères protègent les extrémités des chromosomes. Ce sont des motifs nucléotidiques répétitifs de séquence 5'-TTAGGG-3' d'environ 10 à 15 kb chez l'Homme, liés à un complexe protéique le complexe shelterin. Ce complexe est composé de 6 protéines : POT1 (protection of telomeres-1), TFR1 et TRF2 (telomeric repeat-binding factor 1 et 2), RAP1 (TRF-2 interacting protein), TIN2 (TRF-1 interacting protein) et TPP1 (adrenocortical dysplasia protein homolog) qui protègent les télomères et modulent leurs fonctions biologiques<sup>240</sup>. Or, dans les cellules somatiques de mammifère l'absence de mécanisme de maintien des télomères tels que la présence de télomérase, entraîne la perte de 50 à 200 pb d'ADN non répliqué à l'extrémité 3' à chaque division cellulaire<sup>241</sup>.

Lorsque les télomères atteignent une longueur critique, ils deviennent incapables de lier suffisamment de protéines du shelterin et sont détectés comme des extrémités d'ADN libre déclenchant ainsi une DDR très similaire à celle déclenchée par les coupures d'ADN double brin (double-strand DNA breaks, DSBs)<sup>242</sup>.

De manière intéressante l'expression ectopique de la sous-unité catalytique de l'holoenzyme télomérase (hTERT (Telomerase reverse transcriptase)) responsable de l'allongement des télomères prévient la sénescence et favorise la prolifération cellulaire<sup>243,244</sup>. De même, les cellules tumorales expriment souvent la télomérase<sup>245</sup> ou allongent leurs télomères par un mécanisme appelé allongement alternatif des télomères<sup>246</sup>. En conséquence, les télomères des cellules cancéreuses humaines sont maintenus à une longueur qui permet une prolifération continue<sup>242</sup>.

#### B. Sénescence prématurée et activation de la réponse aux dommages de l'ADN

La sénescence peut également être induite en l'absence de toute perte ou dysfonctionnement détectable des télomères, par une variété de stimuli dont la caractéristique commune est l'induction de dommages à l'ADN principalement sous la forme de DSBs qui activent la DDR (Figure 8)<sup>247</sup>. Ce type de sénescence a été qualifiée de prématurée, car elle survient avant que l'érosion critique des télomères n'intervienne.

La DDR joue le rôle de point de contrôle et bloque la progression du cycle cellulaire afin d'empêcher le transfert d'informations génétiques altérées aux cellules filles.

Les DSBs sont détectés par des complexes spécialisés qui recrutent et activent la protéine kinase ATM (ataxia telangiectasia mutated) sur le site de lésion de l'ADN. Dans le cas de cassures d'ADN simple brin c'est l'ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) qui sera recrutée<sup>248</sup>.

L'enrôlement de ces kinases sur le site de lésion participe à la phosphorylation de l'histone H2AX. La forme  $\gamma$ H2AX (Histone H2AX phosphorylée sur la sérine 139) facilite en retour le recrutement de complexes ATM supplémentaires dans une boucle de rétroaction positive, augmentant l'activité locale de l'ATM ainsi que l'accumulation de la protéine  $\gamma$ H2AX. D'autres facteurs vont également s'accumuler sur les sites de dommages à l'ADN notamment MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint 1) et 53BP1 (p53-binding protein 1). L'accumulation de ces différentes protéines marque les sites individuels de dommages à l'ADN et contribuent à l'application des points de contrôle et à l'arrêt du cycle cellulaire, jusqu'à ce que les dommages aient été réparés<sup>249</sup>.

L'ATM phosphoryle également les protéines CHK1 (Checkpoint kinase 1) et CHK2, qui, à leur tour, propagent davantage le signal de dommages à l'ADN en phosphorylant de nombreuses protéines

telles que BRCA1 (Breast cancer gene 1), PML (Promyelocytic leukemia protein), p53, MPIP1 (M-phase inducer phosphatase 1) et TLK1 (Serine/threonine-protein kinase tousled-like 1) impliquées dans la réparation de l'ADN, et la progression du cycle cellulaire<sup>247</sup>.

La signalisation DDR persistante conduit finalement à l'activation de p53 et à l'expression accrue de de nombreux gènes, y compris p21<sup>CIP1</sup> (que nous simplifierons par p21 pour la suite de ce manuscrit) un médiateur essentiel de l'arrêt du cycle cellulaire associé à la sénescence. La persistance observée des foyers DDR dans les cellules sénescents soutient l'idée que des DSBs non réparés participent à la survenue de la sénescence<sup>250,251</sup>. L'inhibition des kinases de signalisation de la DDR (ATM, ATR, CHK1 et CHK2) permet aux cellules sénescents de réintégrer le cycle cellulaire<sup>252</sup>.

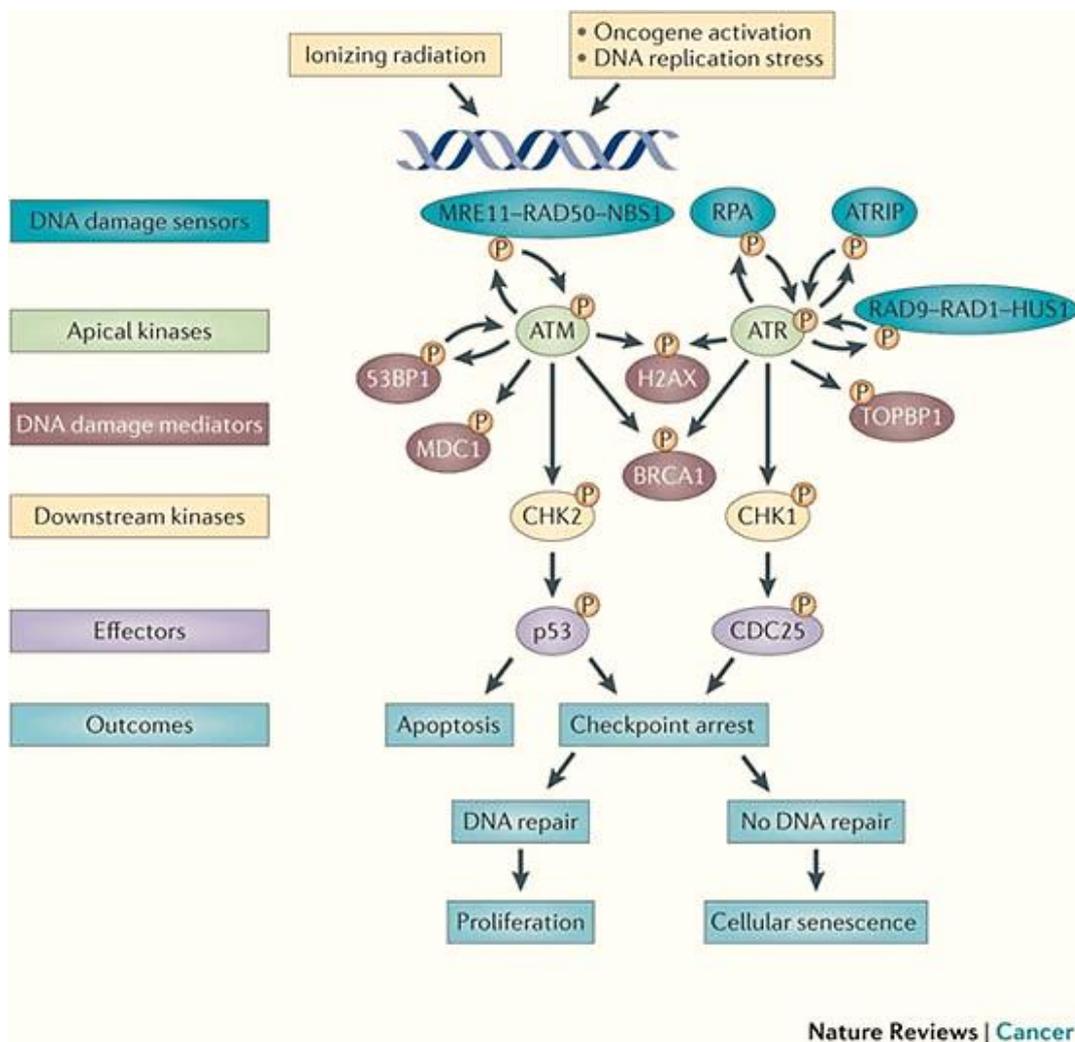
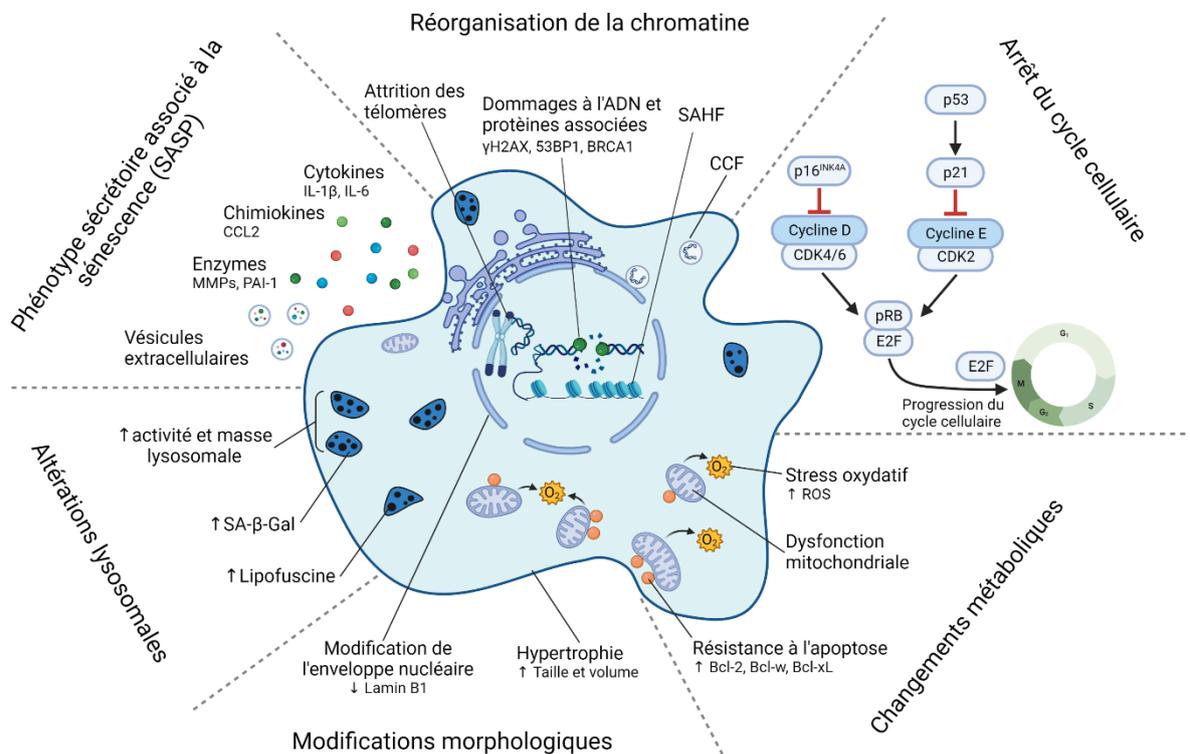


Figure 8 : La voie de réponse aux dommages de l'ADN (DDR). (Sulli G. et al., 2012<sup>247</sup>).

## 2. Caractéristiques et marqueurs de la sénescence

Les chercheurs s'accordent à dire qu'il n'existe pas de biomarqueur unique ou spécifique de la sénescence cellulaire. Par conséquent, une combinaison de marqueurs doit être utilisée pour identifier les cellules sénescents<sup>253</sup> (Figure 9) et les distinguer des cellules non proliférantes quiescentes ou différenciées<sup>223</sup>.

Selon le type cellulaire et le mode d'induction de la sénescence les biomarqueurs exprimés par les cellules sont très hétérogènes. Pour autant, des équipes de recherche travaillent à l'identification de marqueurs communs de la sénescence<sup>254</sup> via l'établissement d'atlas de marqueurs du SASP<sup>255</sup> ou l'identification d'une signature commune du SASP entre différents inducteurs de sénescence<sup>256</sup>.



**Figure 9 : Caractéristiques générales et marqueurs de la sénescence cellulaire**  
(Inspirée de González-Gualda E. et al., 2021<sup>253</sup> et créée avec BioRender.com)

## A. L'arrêt du cycle cellulaire

Une caractéristique commune des cellules sénescents est un arrêt irréversible du cycle cellulaire qui se met en place suite à un stimulus délétère ou une prolifération aberrante<sup>226</sup>.

La phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb) est essentielle à l'entrée de la cellule dans le cycle cellulaire. Lorsqu'elle n'est pas phosphorylée, pRb se lie à la chromatine et empêche les facteurs de transcription de la famille E2F d'induire l'expression de gènes essentiels à la prolifération (Figure 10)<sup>237</sup>. Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases : la phase S (pour synthèse) durant laquelle les cellules vont répliquer leur ADN, la phase M (pour mitose) au cours de laquelle les cellules vont partager leurs chromosomes entre les deux cellules filles. Ces deux étapes sont séparées par les phases G1 et G2 (pour gap en anglais) temps durant lesquels la cellule se prépare pour l'étape suivante. Lorsqu'une cellule ne se divise pas, on dit qu'elle est quiescente. On parle alors de phase G0 pour définir cet état non prolifératif. La sénescence cellulaire diffère de la quiescence en cela qu'elle intervient durant la phase G1 et éventuellement G2 du cycle cellulaire par opposition à la quiescence qui survient en G0<sup>257</sup>. De surcroît, les cellules quiescentes sont capables de réintégrer le cycle cellulaire et de proliférer en cas de stimulation par des facteurs de croissances ou des signaux mitogéniques alors que les cellules sénescents en sont incapables<sup>223,258</sup>.

Chaque étape du cycle se trouve sous le contrôle des kinases cycline-dépendantes (CDK, cyclin dependant kinase) qui sont activées grâce à leur liaison aux cyclines. Ces complexes CDK/cycline vont participer à la phosphorylation de pRb, libérant ainsi E2F et favorisant la progression du cycle cellulaire.

Les principaux médiateurs impliqués dans le maintien de l'arrêt de la prolifération cellulaire associée à la sénescence sont les inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes 1 et 2A (CDKi) communément appelés p21 et p16<sup>INK4a</sup> (que nous simplifierons par p16 pour la suite de ce manuscrit) qui bloquent la formation des complexes CDK-cycline impliqués dans les points de contrôle du cycle cellulaire. La CDKi p21 inhibe la formation des complexes cyclines CDK1, CDK2 et CDK4/CDK6, tandis que p16, inhibe spécifiquement le complexe cyclines D-CDK4/6. Le type de signal inducteur de la sénescence déterminera quelle voie suppressive de tumeurs p53/p21 et/ou p16 sera activée en association avec une expression accrue de leurs protéines associées.

De manière intéressante, de nombreux cancers humains et murins présentent une inactivation ou une mutation négative dominante des gènes codant pour p53 et p16 prédisposant à l'apparition de tumeurs malignes<sup>259,260</sup>.

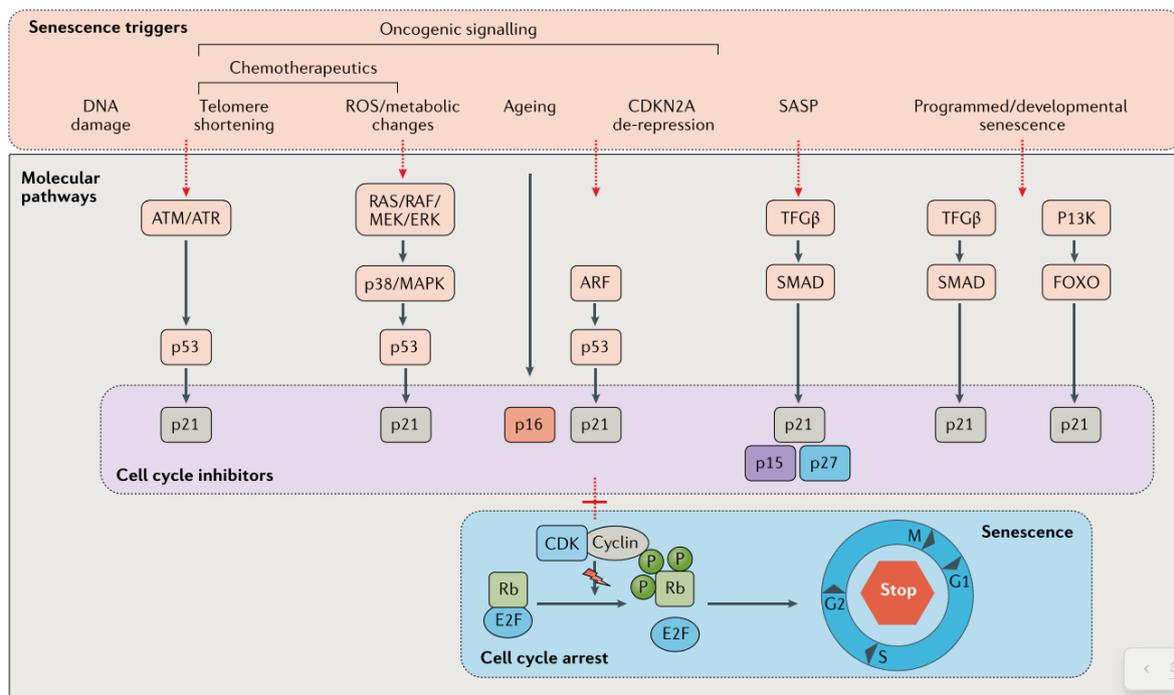


Figure 10 : Voies moléculaires impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules sénescents. (Lozano-Torres B. et al., 2019<sup>237</sup>).

Les niveaux d'expression des gènes p21 et p16 et de leurs protéines associées sont utilisés pour identifier les cellules sénescents *in vivo* et *in vitro*. Cependant, toutes les cellules sénescents n'expriment pas p16 et inversement une élévation aberrante de p16 peut-être observée dans un certain nombre de cancers<sup>261</sup>.

Un autre marqueur évident pour les cellules sénescents est l'absence de réplication de l'ADN qui peut être mise en évidence par l'absence d'incorporation d'analogues nucléosidiques tels que le 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), la thymidine tritiée (3H-thymidine) ou encore le 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) ou bien par l'absence d'immuno-marquage de protéines impliquées dans la prolifération, tels que PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) et Ki-67 en comparaison de cellules prolifératives.

Cependant, ces marqueurs basés sur l'incorporation d'analogues nucléosidiques ne permettent pas de faire la distinction entre les cellules sénescents et les cellules post-mitotiques quiescentes ou différenciées.

## B. Résistance à l'apoptose

Les cellules sénescents activent différentes voies de survie et de ce fait présentent une résistance accrue à l'apoptose<sup>262</sup>. Les membres de la famille BCL-2 jouent un rôle clé dans la régulation de la mort cellulaire programmée en contrôlant les signaux intracellulaires pro et anti-apoptotique. Plusieurs études ont montré, dans les cellules sénescents, une régulation positive des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-w et Bcl-xL probablement associée à l'activation chronique du facteur de transcription CREB (cAMP responsive element-binding protein), qui empêche l'inhibition de l'expression des gènes de la famille BCL-2<sup>263</sup>.

Cette résistance à l'apoptose des cellules sénescents est une caractéristique partagée par certaines cellules cancéreuses. Cette propriété a conduit à la réaffectation de certains médicaments anticancéreux initialement conçus pour tuer les cellules tumorales (navitoclax, dasatinib, ruxolitinib), afin de cibler les cellules sénescents en vue de leur élimination. Ces médicaments ont donné lieu à la création d'une nouvelle classe de molécules anti-cellules sénescents évoquée précédemment, les sénolytiques<sup>212-214</sup>.

## C. Les altérations lysosomales

Les lysosomes sont des organelles cytoplasmiques qui contiennent des enzymes activent à pH acide responsables du catabolisme cellulaire. Ils peuvent dégrader des composant/cargos extracellulaire (hétérophagie) ou bien intracellulaire (autophagie) et permettent ainsi l'élimination et le recyclage de protéines, lipides, sucres et également d'organites entiers tels que les mitochondries<sup>264</sup> dans le cas de la mitophagie. Les altérations lysosomales sont notamment connus pour être impliqués dans le cancer, la neurodégénérescence et les maladies liées à l'âge et également retrouvées dans les cellules sénescents<sup>265</sup>.

L'un des premier biomarqueur décrit et le plus largement utilisé pour la détection des cellules sénescents est l'augmentation de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA- $\beta$ -Gal)<sup>266,267</sup>. La  $\beta$ -galactosidase est une hydrolase retrouvée dans les lysosomes qui catalyse l'hydrolyse des  $\beta$ -galactosides en monosaccharides à un pH acide de 4,5 dans des cellules normales, mais à un pH suboptimal de 6 dans les cellules sénescents. Ce marqueur est détectable grâce à l'utilisation de substrats tels que le 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole-1 (X-Gal), qui une fois clivé se dimérise pour former un précipité bleu. Ce marqueur donne aussi une indication sur l'augmentation de la masse lysosomale<sup>268</sup> *in vitro* mais également *in vivo*. Dans le cartilage articulaire, le nombre de chondrocytes SA- $\beta$ -Gal positifs a été montré comme plus élevé chez les souris âgées que chez les jeunes souris<sup>269</sup>.

Cependant, quelques précautions doivent être observées lors de l'utilisation de la SA- $\beta$ -Gal comme marqueur des cellules sénescentes. Tout d'abord, celle-ci peut s'accumuler dans les cellules privées de sérum ou en sur-confluence *in vitro*<sup>270</sup>. De même, une dérégulation de l'autophagie peut impacter l'activité enzymatique des lysosomes et se traduire par une coloration SA- $\beta$ -Gal accrue sans lien avec la sénescence<sup>271,272</sup>. A l'inverse, l'inactivation du gène GLB1 codant pour la  $\beta$ -galactosidase, empêche la coloration SA- $\beta$ -Gal mais n'inhibe pas la sénescence<sup>268</sup>. L'utilisation de la SA- $\beta$ -Gal seule n'est donc pas suffisante pour attester du statut sénescent d'une cellule.

D'autres marqueurs tels que la lipofuscine tend à s'accumuler dans les cellules sénescentes et avec l'âge<sup>273</sup>. La lipofuscine est un pigment cellulaire brun composé de débris de molécules oxydées qui s'accumulent dans le lysosome des cellules post-mitotique<sup>274</sup>. Le colorant histochimique Sudan-Black-B (SBB) est bien connu pour réagir spécifiquement avec la lipofuscine. Grâce à cette spécificité, une équipe de recherche a développé un outil permettant de mettre en évidence la lipofuscine en associant le SBB à la biotine pour permettre sa détection *in vitro* et *in vivo*<sup>275</sup>. Cependant, ce marqueur reste peu utilisé.

#### D. L'hypertrophie cellulaire

Les cellules sénescentes sont également caractérisées par un phénotype hypertrophique. C'est-à-dire qu'elles présentent une augmentation de leur taille, de leur volume et une morphologie plus étalée que les cellules saines, s'accompagnant d'un accroissement du rapport cytoplasme/noyau. Elles arborent également un noyau plus grand, voire plusieurs noyaux<sup>276</sup>. Comme vu précédemment, les cellules sénescentes présentent une augmentation de leur masse lysosomale qui pourrait être liée au fait que les cellules sénescentes bien qu'ayant perdu leur capacité proliférative continuent à recevoir des signaux mitogènes qui les poussent à se développer<sup>277,278</sup>.

#### E. Altération de l'enveloppe nucléaire

La lamina est un réseau fibrillaire sous-jacent à la membrane nucléaire interne, composé de quatre lamines nucléaires (lamine B1, B2, A, C) et de protéines associées, qui servent à maintenir la stabilité nucléaire et l'organisation de la chromatine<sup>279</sup>. Comme vu précédemment, une caractéristique commune des cellules sénescentes est la perte de la lamine B1<sup>280-282</sup>. Cependant les expressions des lamines A, B2 et C ne semblent pas affectées<sup>283,284</sup>. La déstabilisation de l'intégrité nucléaire causée par la réduction de la lamine B1 entraîne donc des changements de condensation de l'hétérochromatine influençant l'expression génique, l'augmentation de la perméabilité de l'enveloppe nucléaire et la formation de fragments de chromatine cytoplasmique

(CCF)<sup>285</sup>. Ces CCF sont observés dans les cellules d'origines humaines et murines sénescences induites par; des dommages à l'ADN, l'activation d'oncogènes, l'épuisement réplicatif et les rayonnements ionisants (IR)<sup>286-288</sup> et sont probablement générés via un processus de bourgeonnement du noyau dans le cytoplasme<sup>289,286-288</sup>. L'accumulation d'ADN dans le cytoplasme sert de signal de danger et active la voie de détection de l'ADN cytosolique de l'immunité innée GMP-AMP synthase cyclique (cGAS)-STING, conduisant à des réponses pro-inflammatoires et participe à la mise en place du SASP<sup>286,287,290-292</sup>.

#### F. Les SAHF

Dans certaines cellules, la sénescence peut s'accompagner de la formation de foyers d'hétérochromatines associés à la sénescence ou SAHF (Senescence-associated heterochromatin foci). L'hétérochromatine est une structure formée par la condensation très dense de la chromatine. Les gènes présents dans cette zone ne sont alors plus accessibles pour les facteurs de transcriptions et ne peuvent plus être exprimés. L'observation de ces structures peut se faire par des colorations de l'ADN tels que le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)<sup>293</sup>. Elles sont également caractérisées par un enrichissement de protéines comprenant : le variant d'histone macroH2A<sup>294</sup>, un variant d'histone connu pour contribuer à l'inactivation du chromosome X<sup>295</sup>; les protéines à hautes mobilités du groupe A (HMGA), qui se coordonnent avec p16 pour induire la formation et le maintien des SAHF<sup>296</sup>; et l'histone H3 di- ou tri-méthylée sur la lysine 9 (H3K9Me2/3) et la protéine d'hétérochromatine 1 (HP1) associée<sup>297,298</sup>, deux marqueurs communs de l'hétérochromatine<sup>299</sup>. Ces SAHF participent à la répression de gènes en lien avec la prolifération tels que E2F et ses gènes cibles dans les cellules sénescences<sup>297</sup>. Récemment, des preuves suggèrent que les SAHF participent à la survie des cellules sénescences en limitant les signaux de dommages à l'ADN empêchant ainsi les cellules d'entrer en apoptose. Cependant, les SAHF ne sont pas retrouvés dans toutes les cellules sénescences<sup>293,300-302</sup> et semblent être préférentiellement observés lors de l'activation d'oncogènes tels que H-RasV12<sup>301</sup>.

La sénescence s'accompagne également de changements au niveau de l'enveloppe nucléaire. En effet, la lamine B1, un composant clé de la lame nucléaire est régulièrement régulé à la baisse dans les cellules sénescences et peut également servir de marqueur de la sénescence<sup>283,303,304</sup>. La lamine est impliquée dans la stabilité nucléaire, la structure de la chromatine, l'expression des gènes et favorise la formation de SAHF pendant la sénescence<sup>280</sup>.

## G. Les dommages à l'ADN

En cas de dommages à l'ADN, les cellules activent la DDR. S'ils ne sont pas réparés, les dommages à l'ADN peuvent entraîner diverses mutations et déstabiliser la transcription et la traduction<sup>305</sup>. Les DSBs sont de puissants activateurs de la DDR et peuvent entraîner une sénescence cellulaire lorsqu'ils ne sont pas résolus<sup>250</sup>. De ce fait, les cellules sénescents sont souvent caractérisées par l'activation d'une réponse chronique de la DDR. Quel que soit le mode d'induction de la sénescence, répllicative ou bien prématurément induite par le stress (SIPS) ils ont en commun d'activer la DDR<sup>226</sup>. Cette réponse est caractérisée par le recrutement et la liaison de la kinase ATM (abréviation de ataxia telangiectasia mutated) au site lésé<sup>306</sup>. Cette kinase va ensuite permettre le recrutement et l'activation de protéines telles que  $\gamma$ H2AX, 53BP1 et de BRCA1, toutes impliquées dans la réparation des dommages de l'ADN autour des DSBs. Ces foyers appelés foci en anglais marquent les sites individuels de dommages à l'ADN et contribuent à l'application des points de contrôle et à l'arrêt du cycle cellulaire, jusqu'à ce que les dommages aient été réparés. Ces foci sont largement utilisés afin de détecter les dommages à l'ADN<sup>307,308</sup>. La persistance de la DDR induit la phosphorylation de p53 par l'ATM au niveau de plusieurs résidus sérine, ce qui améliore la capacité de p53 à induire la transcription de nombreux gènes tels que p21 qui comme vu précédemment est un médiateur essentiel de l'arrêt du cycle cellulaire associé à la sénescence<sup>309</sup>.

## H. Oxydation des macromolécules et altérations métaboliques

Le stress oxydatif fait référence au déséquilibre dû à un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou d'oxydants vis-à-vis de la capacité de la cellule à les éliminer de manière efficace.

Les ROS désignent une classe de molécules qui regroupe notamment l'anion superoxyde  $O_2^-$ , le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , ou encore de l'ozone  $O_3$ . La majorité des ROS cellulaires sont générées de manière endogène par la respiration mitochondriale aérobie<sup>310</sup>. Mais d'autres stimuli environnementaux, tels que les facteurs de croissance, les cytokines inflammatoires et les rayonnements ionisants, peuvent également induire leur production.

Il est crucial pour la cellule de réguler étroitement le niveau de ROS intracellulaire. En effet, lorsque les ROS submergent le système antioxydant cellulaire, que ce soit par une augmentation des niveaux de ROS ou une diminution de la capacité antioxydante cellulaire, un stress oxydatif se produit<sup>311</sup>.

Ce déséquilibre est notamment dû à une réduction de l'efficacité de la chaîne respiratoire mitochondriale, augmentant ainsi la fuite d'électrons, réduisant la génération d'ATP<sup>312</sup> par la

phosphorylation oxydative et s'accompagnant d'une surproduction de ROS. Cette dernière, va renforcer la détérioration des mitochondries et peut engendrer des altérations cellulaires globales avec l'induction de dommages oxydatifs sur diverses macromolécules, telles que les protéines, les lipides mais aussi l'ADN avec pour conséquence l'activation de la DDR.

Des travaux ont montré que le taux de 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua), l'un des types les plus abondants de dommages oxydatifs de l'ADN, est significativement plus élevé chez le rat âgé par rapport à ceux plus jeunes<sup>313,314</sup>. Il existe également dans le cerveau humain avec l'âge une accumulation progressive de dommages oxydatifs de l'ADN qui pourraient contribuer à une augmentation de l'incidence des maladies neurodégénératives<sup>315,316</sup>. De plus, l'utilisation de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est fréquemment rapportée comme un inducteur de sénescence *in vitro*<sup>317,318</sup>.

Les mitochondries des cellules sénescents sont moins fonctionnelles, montrant un potentiel membranaire diminué, une fuite de protons accrue, des taux de fusion et de fission réduits, une masse mitochondriale augmentée et une abondance des métabolites du cycle de l'acide tricarboxylique (Cycle de Krebs)<sup>229,319</sup>. Bien que les mitochondries soient plus nombreuses, il semble que leur capacité à produire de l'ATP soit compromise<sup>320,321</sup>.

Afin de mettre en évidence les changements mitochondriaux survenant au cours du vieillissement, la production de ROS et le potentiel de membrane mitochondriale sont généralement testés. Pour détecter les ROS, plusieurs sondes fluorescentes sont disponibles dans le commerce, dont les réactifs H<sub>2</sub>-DCFDA et CellROX. Le Mito-SOX Red a été régulièrement utilisé pour déterminer les niveaux de ROS mitochondriaux<sup>322</sup>. Il peut être oxydé par les mitochondries et donne un produit d'oxydation fluorescent. Cependant, une concentration élevée de Mito-SOX peut altérer la fonction mitochondriale, entraînant également la localisation cytosolique de la sonde, compromettant sa spécificité mitochondriale<sup>323</sup>.

Le potentiel de membrane mitochondriale est le moteur de la synthèse de l'ATP. Il reflète la qualité des mitochondries puisque sa dépolarisation altère la fonction mitochondriale. L'utilisation de plusieurs colorants fluorescents courants, notamment l'ester éthylique de tétraméthylrhodamine (TMRE), l'iodure de 5,5',6,6'-tétrachloro-1,1',3,3'-tétraéthylbenzimidazolylcarbocyanine (JC-1), la rhodamine 123 et l'iodure de 3,3'-dihexyloxycarbocyanine (DioC6), facilite la mesure du potentiel de la membrane mitochondriale<sup>324</sup>.

## I. Le SASP

Les cellules sénescents sont caractérisées par leur capacité à sécréter dans leur environnement une myriade de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dont les plus représentatives sont : l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, la CCL2 (C-C Motif Chemokine Ligand 2)), mais aussi des protéases (MMPs, TIMPs, PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor 1)), et des facteurs de croissance (IGF, EGF, VEGF, SDF-1 (Stromal cell-derived factor 1))<sup>255,256</sup>.

Ce SASP est de constitution très hétérogène et varie grandement d'un type cellulaire à l'autre ou selon le mode d'induction de la sénescence, rendant l'identification de composés communs difficile. Mais comme évoqué précédemment, des équipes de recherche travaillent à l'identification de marqueurs communs du SASP<sup>254-256</sup>.

Le SASP est en grande partie responsable des effets physiopathologiques de la sénescence. Il présente généralement une composante inflammatoire importante, or l'inflammation chronique est un facteur de risque majeur pour de nombreuses maladies liées à l'âge<sup>325,326</sup>. Par conséquent, le terme « inflammaging » a été utilisé pour décrire l'inflammation chronique qui est un attribut commun des tissus âgés et pourrait être au moins partiellement due à l'accumulation de cellules sénescents dans les tissus avec l'âge<sup>327-329</sup>. De plus, les cellules sénescents, via le SASP, participent au renforcement et à la propagation de la sénescence de manière autocrine et paracrine et peuvent induire une sénescence secondaire des cellules environnantes<sup>330,331</sup>.

Cependant, chez les organismes jeunes, la sénescence et le SASP peuvent présenter des effets positifs liés à la suppression tumorale<sup>332,333</sup>, la limitation de la fibrose<sup>334</sup>, la favorisation de la cicatrisation<sup>335,336</sup> et de la régénération tissulaire<sup>336</sup>.

La régulation du SASP va principalement être médiée par des facteurs de transcription parmi lesquels le facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), C/EBP- $\beta$  (CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$ ), et GATA4 (GATA Binding Protein 4)<sup>337-339</sup>. Mais des modifications épigénétiques, ou encore la voie de signalisation mTOR (Mammalian target of rapamycin) dans les cellules sénescents sont également impliquées et sont détaillées plus en avant dans la revue suivante : « The senescence-associated secretory phenotype and its regulation », S. Lopes-Paciencia et al., Cytokine.,2019<sup>335</sup>.

Les cellules sénescents sécrètent également des vésicules extracellulaires (EVs pour extracellular vesicles). Les EVs sont de petites vésicules entourées d'une membrane constituée d'une bicouche lipidique. Elles sont libérées par la plupart des types cellulaires et ont été détectées dans pratiquement tous les fluides corporels.

Ces vésicules sont capables de transporter des cargaisons complexes d'acides nucléiques, de protéines et de lipides qui peuvent être sélectivement absorbés par les cellules voisines ou distantes qu'elles rencontrent. Ainsi, les EVs représentent un mode de communication intercellulaire, qui peut jouer un rôle majeur dans de nombreux processus cellulaires, tels que la réponse immunitaire, la transduction du signal, et la présentation antigénique<sup>255</sup>.

Récemment, de nombreuses études ont démontré que les EVs sont sécrétées à des niveaux plus élevés par les cellules sénescents que par les cellules en prolifération. De plus, les Evs sécrétées par les cellules sénescents présentent une capacité à favoriser la pro-tumorigènes. Dans l'OA, les EVs de chondrocytes sénescents altèrent la sécrétion de la MEC par des chondrocytes non OA<sup>340</sup>.

### 3. Sénescence et autophagie

L'autophagie est un mécanisme cellulaire impliqué dans la dégradation par la cellule de ses propres protéines et organelles lysosomales endommagées et qui joue un rôle majeur en cas de stress cellulaire ou de manque de nutriments. Ce mécanisme est utilisé par les cellules eucaryotes pour contrôler la qualité des organites et également maintenir l'homéostasie des nutriments. Il existe différents types d'autophagie tels que la micro-autophagie, l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes et la macro-autophagie qui diffèrent par leurs fonctions physiologiques et le mode de livraison des cargos au lysosome. La forme la plus étudiée est la macro-autophagie, plus classiquement appelée autophagie<sup>341</sup> et qui sera celle décrite dans les paragraphes suivants.

L'autophagie est régulée par une famille de gènes codants pour les protéines ATG (autophagy related genes). Actuellement, plus d'une trentaine de gènes codants pour des ATG ont été identifiés chez la levure et, de manière significative, bon nombre de ces gènes sont conservés dans le règne végétal et animal, soulignant l'importance du processus autophagique<sup>342</sup>.

L'autophagie débute par l'activation du complexe ULK1 (Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1), et la phosphorylation par ce complexe de ATG9, et des complexes PI3P (Phosphatidylinositol 3-phosphate) et PI3K-III, qui vont participer à la formation et l'élongation de la membrane du phagophore (structure à double membrane) par une série de réactions enzymatiques impliquant les protéines ATG. La fermeture du phagophore aboutie à la formation de l'autophagosome séquestrant les molécules, organelles, etc... vouées à la dégradation. L'autophagosome va ensuite fusionner avec un lysosome pour former un auto-lysosome. Lors de cette étape le lysosome

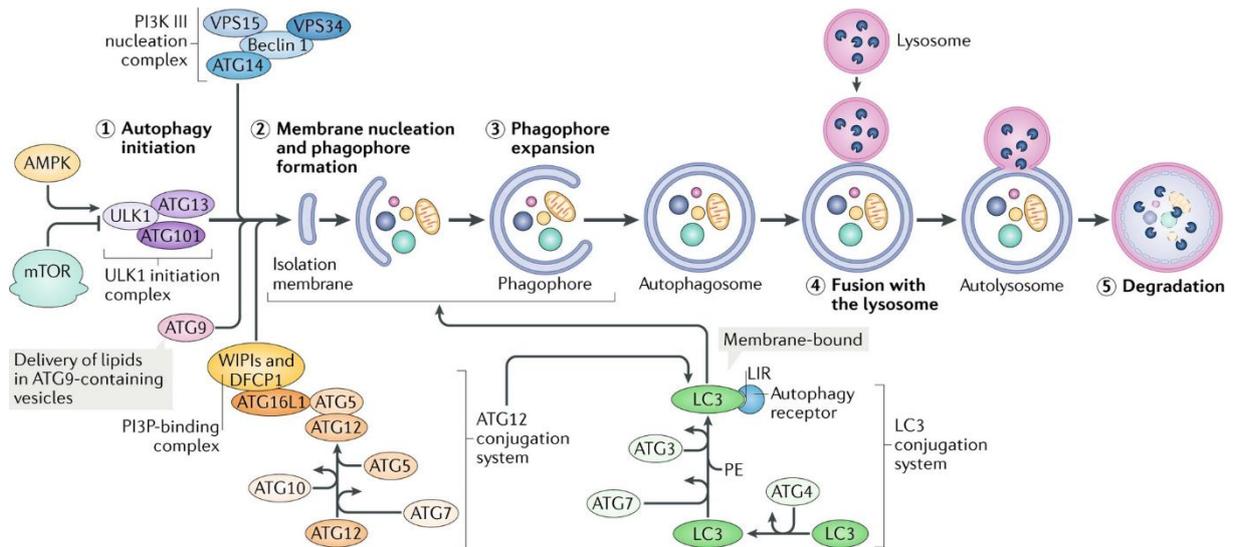


Figure 11 : Le processus de macro-autophagie. (Hansen M. et al., 2018<sup>345</sup>)

apporte les hydrolases nécessaires à la dégradation du cargo précédemment séquestré par l'autophagosome. Le contenu digéré sera ensuite relargué via des perméases pour être réutilisé<sup>343</sup> (Figure 11).

Les principaux régulateurs en amont de ce processus en plusieurs étapes comprennent mTOR et la Kinase AMP dépendante (AMPK)<sup>344</sup>. Ces deux kinases sont impliquées dans la régulation de la croissance cellulaire, la synthèse des protéines, des lipides et des nucléotides<sup>345</sup>.

Les fonctions de l'autophagie vont au-delà du maintien de l'homéostasie. Ce processus cellulaire est également essentiel dans la défense contre les agents pathogènes, la réponse cellulaire au stress, et la mise en place de la sénescence. De ce fait, elle joue un rôle crucial au cours du développement mais également dans le vieillissement et le développement de maladies associées<sup>346</sup>.

Un nombre croissant de preuves suggèrent que l'activité autophagique diminue avec l'âge dans divers organismes<sup>347</sup>. Des études chez *C. elegans*, la souris et des cellules humaines ont démontré une réduction liée à l'âge de la fonction protéolytique lysosomale altérant ainsi le flux autophagique et contribuant au développement de maladies liées à l'âge<sup>347,348</sup> telles que l'OA<sup>349,350</sup>. La preuve de concept du rôle bénéfique de l'autophagie lors du vieillissement a été faite via l'activation de l'autophagie<sup>351</sup>. En effet, l'activation de l'autophagie par la restriction calorique, l'utilisation de composés mimétiques de la restriction calorique comme la spermine<sup>352</sup> ou bien la levée de l'inhibition de mTOR via l'administration de rapamycine ont permis un allongement de la durée de vie dans différents modèles animaux<sup>351</sup>.

Cependant, le rôle de l'autophagie en lien avec la sénescence reste controversé. Plusieurs études suggèrent que l'autophagie pourrait être considérée comme un mécanisme supprimant la sénescence, en favorisant la dégradation des organites endommagés et autres composants cellulaires. Chez les souris âgées, l'activité autophagique des cellules souches musculaires diminue parallèlement à leur capacité de régénération et s'accompagne d'une accumulation de cellules sénescents. Or, l'augmentation de l'autophagie dans les cellules souches musculaire prévient leur sénescence et restaure leur capacité de régénération<sup>233</sup>. L'activation de la phagocytose mitochondriale via l'inhibition de mTOR protégerait également contre la sénescence induite par le stress oxydatif et restaurerait les fonctions mitochondriales et lysosomales<sup>353</sup>.

A l'inverse, d'autres études ont rapporté que l'autophagie favoriserait la sénescence. C'est notamment le cas lors de l'OIS qui s'accompagne d'une activation de l'autophagie participant à la production du SASP<sup>354,355</sup>. Plus récemment, il a été montré que la protéine LC3B (microtubule associated protein 1 light chain 3 beta), contribue à la dégradation de la lamine B1 dans les cellules sénescents<sup>287,289</sup>. Il a également été montré que l'autophagie dans les cellules sénescents leur permet de contrôler l'accumulation de macromolécules toxiques, et que son ciblage pharmacologique conduisait à l'élimination des cellules sénescents<sup>235</sup>.

#### 4. Effets bénéfiques de la sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire présente un rôle bénéfique dans différents processus physiologiques comme la régulation du développement embryonnaire, la cicatrisation et la résolution de la fibrose ainsi que la suppression des tumeurs.

##### A. L'embryogénèse

Au cours du développement embryonnaire, la sénescence cellulaire joue un rôle bénéfique chez les mammifères. Dans ce cadre, les cellules sénescents semblent contribuer au remodelage tissulaire, à la morphogénèse par l'élimination des structures transitoires et à la régulation de l'abondance relative des différentes populations cellulaires<sup>258</sup>.

La présence de cellules arborant des marqueurs et des caractéristiques de la sénescence dans les embryons en développement a été décrite chez la souris<sup>356,357</sup>, l'homme<sup>356</sup> mais également chez des espèces de la famille des Phasianidae (le poulet<sup>357,358</sup> et la caille<sup>359</sup>) et des amphibiens (le Xénope<sup>360</sup> et l'axolotl<sup>360,361</sup>). De plus, des cellules sénescents ont été décrites dans les tissus extra-embryonnaires du placenta chez la souris et l'homme, où la fusion des cellules maternelles et fœtales conduit à la sénescence des syncytiotrophoblastes résultants<sup>362</sup>. Les

syncytiotrophoblastes constituent la barrière placentaire entre le sang maternel et fœtal tout en permettant les échanges de nutriments, et de gaz entre la mère et le fœtus.

Les cellules sénescents ont été identifiées via l'expression de multiples marqueurs, dont la SA- $\beta$ -Gal, la CDKi p21 et la production de SASP, mais également en fonction de leur arrêt prolifératif et de leur capacité d'élimination par les macrophages. Afin d'illustrer le rôle de la sénescence cellulaire au cours de l'embryogenèse, différentes équipes ont montrées que, bien que les animaux déficients en p21 soient, pour la plupart, normaux sur le plan du développement, ils présentent de légers défauts de structuration dans les membres<sup>356,357</sup>. De plus, l'interférence avec le programme de sénescence par un traitement sénolytique, conduit à des défauts de structuration<sup>356-358,360</sup>. Fait intéressant, ces cellules ne semblent pas arborer de dommage à l'ADN et se sont révélées négatives pour d'autres marqueurs de sénescence, notamment p53 et p16<sup>INK4A</sup>, suggérant que la sénescence embryonnaire pourrait représenter un type de sénescence différent.

Enfin, l'apparition des cellules sénescents au cours de l'embryogenèse semble intervenir selon des schémas précis dans le temps et dans l'espace. Les cellules sénescents apparaissant pendant des fenêtres temporelles spécifiques, avant de disparaître par la suite, démontrant que l'induction, la présence et l'élimination de ces cellules est un processus cellulaire étroitement contrôlé et organisé.

## B. La réparation tissulaire

En réponse à une lésion tissulaire ou à une blessure, la sénescence cellulaire contribuerait au maintien de la structure et de la fonction des tissus en limitant la prolifération des cellules endommagées, en favorisant la réparation ainsi que le remodelage tissulaire et le recrutement de cellules immunitaires via le SASP afin d'assurer l'élimination des cellules sénescents une fois le processus de réparation terminé<sup>258</sup>. Ainsi, les cellules sénescents via la sécrétion de chimiokines dans le SASP ont la capacité d'attirer différentes populations de cellules immunitaires, notamment des cellules NK (natural killer), des neutrophiles, des cellules dendritiques, les monocytes/macrophages, les cellules B et les cellules T<sup>363-365</sup>. Parmi ces types cellulaires, les cellules NK, les lymphocytes T et les macrophages peuvent interagir physiquement avec les cellules sénescents<sup>301,365</sup>.

Lors d'une blessure, la synthèse de MEC facilite le processus de réparation mais, si elle est excessive, peut entraîner une fibrose, ce qui altère par la suite la qualité du tissu. Il a été démontré que la sénescence joue un rôle dans la cicatrisation des plaies en limitant la progression de la

fibrose dans un certain nombre de tissus, tels que le foie<sup>334</sup>, la peau<sup>366</sup>, les poumons<sup>367</sup> et le coeur<sup>368</sup>. Cette implication de la sénescence cellulaire dans la réparation tissulaire est retrouvée dans un grand nombre d'espèces. Chez le poisson zèbre, l'altération de la sénescence empêche la régénération des nageoires après une amputation<sup>369,370</sup> et chez les salamandres, les cellules sénescents ont été associées à la régénération des membres<sup>336</sup>. Ces observations suggèrent que la sénescence cellulaire est un programme qui a évolué pour limiter la réponse aux dommages tissulaires. Fait intéressant, chez les souris déficientes pour les gènes p53 et p16<sup>INK4A</sup>, qui présentent donc une absence presque complète de cellules sénescence, la lésion tissulaire s'accompagne d'une fibrose accrue. De manière similaire, l'élimination prématurée des cellules sénescents dans un modèle murin entraîne une altération de la cicatrisation des plaies, démontrant que les cellules sénescents sont nécessaires pour une cicatrisation optimale<sup>371</sup>.

Cependant, dans des modèles murins de fibrose pulmonaire idiopathique induite, les cellules sénescents s'accumulent et contribuent au trouble fibrotique, alors que leur élimination améliore la condition<sup>367</sup>. Par conséquent, il est probable que l'apparition des cellules sénescents soit bénéfique pour contrôler la régénération tissulaire et la réponse fibrotique précoce à la suite d'une blessure. Toutefois, cette réponse doit être contrôlée dans le temps, auquel cas l'accumulation de cellules sénescents peut avoir un impact négatif sur la réparation des tissus. Sa persistance peut générer une inflammation chronique et contribuer aux maladies liées au vieillissement<sup>249</sup>.

### C. La suppression des tumeurs

La capacité antiproliférative de la sénescence place clairement ce processus comme un mécanisme suppresseur de tumeur. Bien que l'activation d'oncogènes soit un mécanisme critique pour l'initiation et le développement de cancers en stimulant la prolifération cellulaire, elle induit également un stress génétique qui peut provoquer un arrêt de croissance irréversible dans les cellules en cultures et les tissus tumoraux<sup>372</sup>.

La mutation et la surexpression de l'oncogène RAS dans des fibroblastes pulmonaires primaires humains en culture<sup>373</sup> et *in vivo* dans des cellules épithéliales mammaires<sup>374</sup> activent les voies suppressives de tumeur p53/p21 et/ou p16 et l'arrêt de la prolifération cellulaire.

La sénescence induite par RAS entraîne une phase initiale d'hyper-prolifération. Cependant, cette poussée de prolifération n'est que transitoire et est rapidement suivie d'un ralentissement de la prolifération et de l'établissement éventuel d'une sénescence cellulaire. Cette réponse biphasique

a également été observée suite à l'expression d'autres oncogènes, tels que BRAF (B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase), E2F1 et c-MYC (Cellular myelocytomatosis oncogene) ou par l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, notamment PTEN (Phosphatase And Tensin Homolog) et NF1 (Neurofibromin 1)<sup>375</sup>.

L'OIS est associée à l'activation de la DDR. En effet, l'activation aberrante des voies de transduction du signal et des régulateurs positifs du cycle cellulaire peut conduire à l'accumulation de dommages à l'ADN et à l'engagement de la DDR<sup>228</sup>.

Il existe des exemples de cellules sénescents *in vivo* qui peuvent résider pendant des années dans l'organisme, comme les mélanocytes sénescents des grains de beauté ou des naevus<sup>376</sup>. Il existe également des exemples de cellules sénescents qui sont rapidement éliminées par les cellules phagocytaires, comme dans le cas des cellules tumorales sénescents dans les carcinomes du foie<sup>332</sup>.

Le SASP semble aussi jouer un rôle majeur dans la communication des cellules sénescents avec leur microenvironnement. En effet, dans les cellules humaines, l'IL-6, l'IL-8 et l'IGFBP7 (Insulin-like growth factor-binding protein 7) renforcent la sénescence provoquée par les oncogènes RAS et BRAF<sup>333,377,378</sup>. Le SASP peut également provoquer des réponses suppressives de tumeurs, ce qui pourrait être bénéfique pour éliminer les cellules sénescents et limiter la croissance tumorale<sup>379</sup>.

## 5. Impacts néfastes de la sénescence

Bien que la sénescence transitoire présente des effets bénéfiques notamment chez les individus jeunes, avec l'âge, des cellules sénescents s'accumulent dans la plupart des tissus où elles semblent persister. Cependant, on ne sait pas si cette augmentation est due à une production accrue et/ou à une clairance réduite par le système immunitaire de ces cellules<sup>380,381</sup>.

Plus important encore, des expériences dans une grande variété de modèle et d'espèces impliquent fortement les cellules sénescents dans un nombre important de pathologies liées à l'âge, allant de la neurodégénérescence au cancer et à la fragilité liée à l'âge<sup>382</sup>.

Les effets néfastes des cellules sénescents sont en grande partie attribués au SASP qui, comme évoqué précédemment, est riche en molécules pro-inflammatoires. Avec l'âge, les individus présentent un niveau élevé de facteurs inflammatoires circulants<sup>328</sup>. Or l'inflammation chronique liée à l'âge appelée inflamm-aging est un contributeur important à un large éventail de maladies liées à l'âge<sup>329</sup>. L'augmentation des taux sanguins d'IL-6, d'IL-1Ra, de TNF, facteurs qui sont

retrouvés dans le SASP, corrèle avec l'apparition de nombreuses maladies chroniques chez les personnes âgées<sup>383</sup>.

L'injection de cellules sénescents chez des souris jeunes a permis de mettre en évidence le lien entre sénescence et maladies liées au vieillissement avec pour conséquence des dysfonctionnements physiques et une réduction de l'espérance de vie<sup>220</sup>. A l'inverse l'élimination des cellules sénescents chez des souris âgées<sup>34,35,220,384</sup> via différentes approches conduit à une augmentation de la durée de vie et retarde l'apparition de maladies liées à l'âge.

En plus de sécréter le SASP, les cellules sénescents contribueraient à limiter la régénération tissulaire en participant au déclin du potentiel prolifératif des cellules souches. Par exemple, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) affichent un taux de succès de transplantation diminué lorsqu'elles sont isolées de patients âgés<sup>385</sup> en corrélation avec un nombre accru de CSH sénescents<sup>386</sup>. De plus l'exposition des CSH au SASP dérivé de cellules stromales sénescents affecte leur capacité de régénération<sup>387</sup>. Ces résultats suggèrent également que la sénescence peut affecter la régénération des tissus de manière paracrine<sup>387</sup>.

Cette diminution du potentiel prolifératif est également observée dans les cellules souches neurales (NSC) avec une capacité de neurogenèse décroissante avec l'âge corrélié à une expression accrue des marqueurs de sénescence dans les régions où résident les NSC<sup>388</sup>.

De la même façon, les cellules souches mésenchymateuses<sup>389</sup> et les cellules issues de leur différenciation en chondrocytes<sup>390</sup>, adipocytes<sup>391</sup>, et les ostéoclastes<sup>392</sup>, affichent également une capacité réduite à s'auto-renouveler avec l'âge, corrélié à des niveaux accrus de marqueurs de sénescence.

De plus, le raccourcissement des télomères, observé au cours du vieillissement, est en corrélation avec des dysfonctionnements métaboliques et cardiaques<sup>393-395</sup>.

## 6. Rôle de la sénescence dans l'arthrose

Bien que l'OA touche l'articulation dans son ensemble, les chondrocytes restent considérés comme des acteurs clés de la pathologie de l'OA et sont connus pour présenter au cours de la maladie une perturbation de l'équilibre normal entre la synthèse et la dégradation de la MEC.

Lors de la survenue de l'OA, il a été montré que des cellules sénescents s'accumulent dans les tissus articulaires suite à une blessure<sup>211</sup> et au cours du vieillissement<sup>33</sup>. Les chondrocytes des articulations arthrosiques expriment une variété de marqueurs associés à la sénescence.

Ainsi, des chondrocytes positifs pour la SA- $\beta$ -Gal ont été observés à proximité des lésions arthrosiques, mais pas dans le cartilage intact des mêmes patients et de donneurs sains<sup>396,397</sup>. Les cellules du cartilage expriment fortement le gène et la protéine p16<sup>INK4A</sup> lors de l'OA *in vivo* et *in vitro*<sup>398</sup>. Cependant, plus récemment il a été montré dans un modèle murin que la perte de p16<sup>INK4A</sup> n'était pas suffisante pour empêcher le développement de l'OA traumatique ou liée à l'âge<sup>269</sup>.

De manière intéressante, l'expression du collagène de type II est négativement corrélée à l'expression de p21<sup>399</sup> et plusieurs équipes rapportent une expression accrue de cette CDKi dans le cartilage humain arthrosique. De plus, l'inactivation du gène p21 dans des chondrocytes *in vitro* favorise la synthèse de GAGs<sup>400,401</sup> et la réparation du cartilage<sup>402</sup>.

Les chondrocytes arthrosiques présentent également une production accrue de protéases incluant les MMP-1 et -13<sup>403</sup>. Leur implication dans la dégradation de la matrice cartilagineuse, a en partie été apportée sur la base d'une expression exogène ou d'une déficience dans des études murines<sup>404,405</sup>.

Cependant, les preuves de l'implication directe des cellules sénescentes dans les lésions du cartilage ont été apportées par l'équipe de Xu et al. Dans une étude récente, ils ont injecté des cellules sénescentes ou non sénescentes au niveau des articulations du genou dans un modèle murin. Les auteurs ont montré que la transplantation de cellules sénescentes provoquait des caractéristiques pathologiques évocatrices de l'OA<sup>406</sup>. Plus précisément, les articulations injectées avec les cellules sénescentes présentaient de graves lésions du cartilage articulaire au niveau des plateaux tibiaux latéraux et médiaux, ainsi que des condyles fémoraux. Cela suggérerait que le ciblage des cellules sénescentes pourrait être une modalité thérapeutique intéressante pour le traitement de l'OA. Néanmoins, les mécanismes liant la sénescence des chondrocytes et leur contribution à la dégradation du cartilage, ne sont pas encore entièrement compris, d'autres études mécanistiques sont donc nécessaires.

Toutefois, de nombreuses altérations métaboliques surviennent dans les chondrocytes au cours de l'OA. On retrouve notamment un dysfonctionnement mitochondrial associé à la génération accrue de ROS et une augmentation de l'hétérochromatine associée à la sénescence<sup>390</sup>. Les chondrocytes, les ostéocytes et les fibroblastes synoviaux peuvent sécréter des molécules pro-inflammatoires communes avec le SASP<sup>269,407,408</sup> incluant notamment des cytokines telles que l'IL-6, IL-8, l'IL-17, l'IL-1 $\beta$  et le TNF. Ces facteurs induisent des changements liés à l'OA, y compris l'inflammation, la croissance osseuse et la dégradation de la MEC<sup>255,409</sup>. Martin et Buckwalter ont décrit l'érosion des télomères dans les chondrocytes OA<sup>33</sup>. Cependant, dans le cartilage articulaire

normal, le taux de mitose des chondrocytes est très faible<sup>410</sup>. Cette capacité proliférative limitée dans le cartilage normal suggérerait que d'autres facteurs de stress, tels que le stress oxydatif<sup>411</sup> et une charge mécanique anormale<sup>412</sup> peuvent contribuer au raccourcissement des télomères lors de l'OA. La sénescence prématurée des chondrocytes pourrait alors être une conséquence à la fois de facteurs intrinsèques (capacité répliquative limitée *in situ*) et extrinsèques (induits par le stress) provoquant la détérioration liée à l'âge des chondrocytes. D'autre part, comme la prolifération des chondrocytes est augmentée au niveau des lésions dans le cartilage arthrosique<sup>403</sup>, cela pourrait aider à expliquer l'érosion des télomères observée dans la maladie.

Enfin, d'autres tissus de l'articulation sont également impactés, ainsi la proportion de cellules positives pour p16 augmente en corrélation avec l'âge dans la membrane synoviale. De plus, l'exposition des synoviocytes au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou au TNF- $\alpha$  augmente leur sénescence ainsi que l'expression génique et protéique de molécules du SASP tels que l'IL6, IL-8, CCL2 et MMP3<sup>407</sup>.



### III. La *O*-GlcNAcylation des protéines

#### 1. Généralités

La *O*-N-Acétyleglucosaminylation ou plus simplement la *O*-GlcNAcylation a été mise en évidence en 1984 par Torres et Hart<sup>413</sup>. Il s'agit d'une modification post-traductionnelle (MPT) réversible qui intervient presque exclusivement sur les protéines des compartiments cytoplasmiques, nucléaires mitochondriaux mais également sur du cytosquelette et du réticulum endoplasmique<sup>414,415</sup> des cellules, à la différence des glycosylations dites classiques qui ont lieu surtout sur la partie externes des protéines membranaires ou sécrétées<sup>416</sup>.

La *O*-GlcNAcylation consiste en l'ajout d'un monosaccharide unique le  $\beta$ -Nacétyleglucosamine (*O*-GlcNAc) sur les résidus serine et thréonine des protéines. Cette MPT est sous le contrôle de seulement 2 enzymes, la *O*-GlcNAc transférase (OGT) et la *O*-GlcNAcase (OGA). OGT va greffer le résidu GlcNAc à partir du sucre donneur uridine 5'-diphospho-N-acétyleglucosamine (UDP-GlcNAc), lui-même produit par la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP pour hexosamine biosynthesis pathway). OGA est quant à elle chargée de le retirer.

La synthèse de l'UDP-GlcNAc intègre une multitude de voies métaboliques telles que le métabolisme des acides gras, du glucose, de l'azote et des nucléotides (Figure 12) et rend la *O*-GlcNAcylation sensible aux nutriments et au stress<sup>417</sup>. Cette sensibilité permet une rétroaction sur les niveaux d'énergie cellulaire globaux pouvant induire des variations drastiques et rapides du niveau d'*O*-GlcNAcylation cellulaire en réponse au stress tel que le choc thermique<sup>417</sup>, l'hypoxie<sup>418</sup> et la privation de nutriments<sup>419</sup> par exemple.

Depuis sa découverte, avec plus de 5000 protéines cibles identifiées comme étant *O*-GlcNAcylées, le rôle de la *O*-GlcNAcylation a été démontré dans de nombreuses fonctions cellulaires à travers notamment la *O*-GlcNAcylation de facteurs de transcription, d'enzymes et de molécules de signalisation<sup>420</sup>. De plus, la dérégulation de la *O*-GlcNAcylation a été impliquée dans un grand éventail de processus physiopathologiques, tels que le diabète, le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives<sup>420</sup>.

#### 2. Régulation de la *O*-GlcNAcylation

Alors que la phosphorylation, une autre MPT, est médiée par une myriade de phosphatases et de kinases (respectivement 150 et 1000 approximativement) la *O*-GlcNAcylation des protéines est contrôlée par seulement deux enzymes, OGT qui va *O*-GlcNAcyler les protéines et OGA qui va retirer le motif *O*-GlcNAc. A ces deux enzymes, vient s'ajouter la Glutamine fructose-6-phosphate

amidotransférase (GFAT) enzyme limitante de la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP) (Figure 12).

#### A. La voie de biosynthèse des hexosamines

Le premier niveau de régulation de la *O*-GlcNAcylation va se faire au niveau de la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP). Cette voie métabolique est responsable de la production de l'Uridine diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) nécessaire à la *O*-GlcNAcylation des protéines (Figure 12). Le produit final de cette voie, l'UDP-GlcNAc peut être utilisé soit dans la synthèse des glycoprotéines et des PG, principaux constituants de la matrice cartilagineuse, soit servir de substrat à OGT pour la *O*-GlcNAcylation des protéines<sup>421</sup>.

Le glucose extracellulaire nécessaire à la synthèse de l'UDP-GlcNAc est importé dans la cellule grâce à des transporteurs transmembranaires spécifiques du glucose les GLUT (Glucose transporter en anglais). Il existe différents GLUT qui vont avoir des localisations et des propriétés différentes. Les isoformes GLUT1, GLUT3, GLUT5, GLUT6, GLUT8, GLUT9, GLUT10, GLUT11 et GLUT12 ont été identifiées comme étant exprimées dans le cartilage humain<sup>422-424</sup>. Cependant, le transporteur GLUT1 semble avoir un rôle prédominant dans les chondrocytes puisque que sa délétion altère leur prolifération et leur synthèse de la matrice cartilagineuse<sup>425</sup>.

Il a été initialement décrit que 2 à 5% du glucose entrant dans les cellules était métabolisé via la HBP<sup>420</sup>. Cependant, cette estimation provient de mesures indirectes du flux de glucose entrant dans la voie HBP dans des adipocytes en culture, réalisées dans une seule étude<sup>426</sup> publiée en 1991. A ce jour, il existe très peu de publications qui ont directement mesuré le flux de glucose via la HBP. Mais des études plus récentes, dans ces cellules en culture apportent des évaluations différentes et contradictoires avec des estimations soit plus faibles soit plus élevées<sup>427,428</sup>.

La seule étude ayant mesuré simultanément le flux de glucose via l'HBP et la glycolyse dans un organe a été réalisée par Olson et al<sup>429</sup>. Grâce à l'utilisation de substrats (glucose et glucosamine) marqués à l'isotope C<sup>13</sup> dans des cœurs battants isolés perfusés, ils ont mesuré que le flux de glucose entrant dans la HBP et ont trouvé que celui-ci représente 0,003 à 0,006% du flux glycolytique.

Des analyses complémentaires sont donc nécessaires pour évaluer la part du glucose utilisé par la HBP d'autant que selon le type cellulaire, son environnement et son métabolisme énergétique, la part du glucose entrant dans la HBP peut varier considérablement.

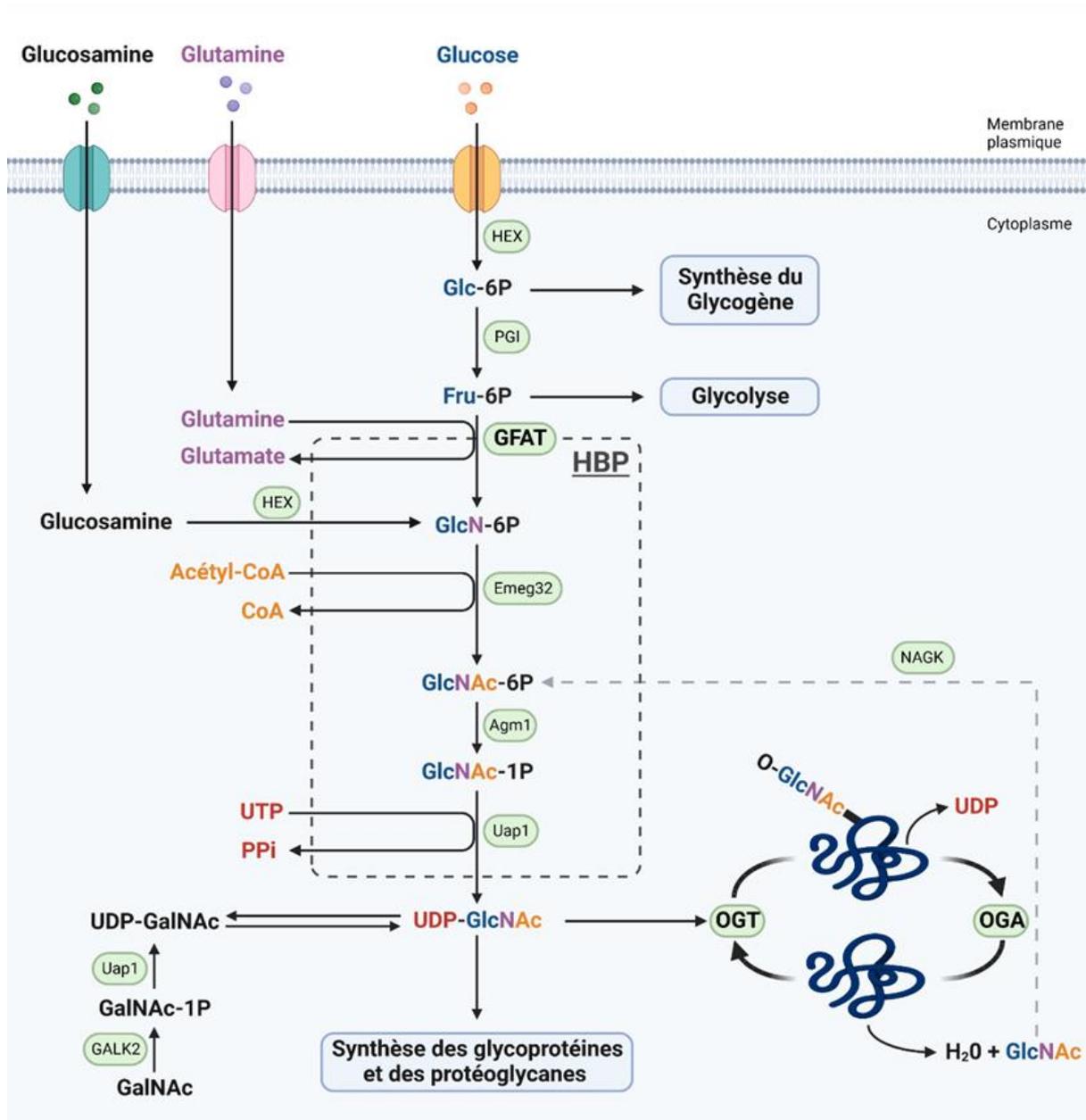
Le glucose va ensuite être rapidement phosphorylé en glucose-6-phosphate (Glc-6P) par l'hexokinase (HEX) qui lui-même sera ensuite transformé en fructose-6-phosphate (Fruc-6P) par la glucose-6-phosphate isomérase (GPI) lors des premières réactions de la glycolyse. La vaste majorité du Fruc-6P alimentera la glycolyse, permettant ainsi la production d'énergie sous forme d'ATP, et la portion restante l'HBP<sup>420,430</sup>.

La première étape à proprement parler de l'HBP débute avec la synthèse de glucosamine-6-phosphate (GlcN-6P) par la Glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase (GFAT) à partir du Fruc-6P, provenant de la transformation du glucose lors des premières étapes de la glycolyse, et de la glutamine en tant que donneuse du groupement amine. GFAT joue un rôle majeur dans la régulation de la voie HBP. En effet, il s'agit de l'enzyme limitante de la voie qui contrôle le flux de GlcN-6P entrant dans la voie et donc la production de l'UDP-GlcNAc.

Un certain nombre d'étapes enzymatiques ultérieures à partir de la GlcN-6P aboutiront à la formation de l'UDP-GlcNAc, le produit majeur de la voie de l'HBP (Figure 12)<sup>5,430</sup>.

L'HBP est considéré comme un senseur du métabolisme, en effet la synthèse de l'UDP-GlcNAc fait intervenir de nombreuses voies métaboliques telles que le métabolisme du glucose (glucose), des acides aminés (Glutamine), des acides gras (Acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA)) et des acides nucléiques (Uridine-5'-triphosphate (UTP)). Cette multitude de voies métaboliques intervenant dans la HBP contribue à considérer la O-GlcNAcylation comme un carrefour métabolique.

Il est intéressant de noter que l'UDP-GlcNAc, synthétisé par la HBP est utilisé dans la synthèse des glycoprotéines et des PG, principaux constituants de la matrice cartilagineuse. Et que la glucosamine (GlcN), qui a été largement étudiée comme traitement potentiel de l'OA<sup>431</sup> depuis les années 90, est capable *in vitro* d'être internalisée par les GLUTs et phosphorylée par l'hexokinase, produisant de la GlcN-6P, contournant ainsi la réaction limitante catalysée par GFAT conduisant à une augmentation du niveau de O-GlcNAcylation<sup>432</sup>.



**Figure 12 : La voie de biosynthèse des hexosamines (HBP).**  
 (Inspirée de Chatham J. C. et al., 2021<sup>420</sup> et créée avec BioRender.com)

Le glucose, une fois dans la cellule va rapidement être phosphorylé en glucose-6-phosphate (Glc-6P) par une hexokinase (HEX), puis converti en fructose-6-phosphate (Fru-6P) par la glucose-6-phosphate isomérase (PGI). Le Fru-6P en présence de glutamine va ensuite être métabolisé en glucosamine-6-phosphate (GlcN-6P) par la glutamine--fructose-6-phosphate transaminase (GFAT) avant d'être transformé en N-acétylglucosamine 6-phosphate (GlcNAc-6P) par la glucosamine-6-phosphate N-acétyltransferase 1 (GNPNAT1 chez l'homme et Emeg32 chez la souris) grâce à l'utilisation de l'acétyl-CoA. La Phosphoacétylglucosamine mutase (Agm1) permet ensuite la conversion du GlcNAc-6P en N-acétylglucosamine 1-phosphate (GlcNAc-1P). La dernière étape de l'HBP est assurée par l'UDP-N-acétylglucosamine pyrophosphorylase (Uap1) qui nécessite l'utilisation de l'uridine-triphosphate (UTP) pour synthétiser l'uridine-diphosphate-N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc). Il existe 2 voies de récupération : la première via la N-acétylglucosamine kinase (NAGK) permet la conversion du GlcNAc en GlcNAc-6P. La seconde implique la conversion par la N-acétylgalactosamine kinase (GALK2) de la N-acétyl-galactosamine (GalNAc) en N-acétylgalactosamine 1-phosphate (GalNAc-1P) et UDP-N-acétylgalactosamine (UDP-GalNAc), avec conversion ultérieure par une épimérase en UDP-GlcNAc. Enfin la glucosamine peut être directement convertie en GlcN-6P par une HEX contournant ainsi l'enzyme limitante GFAT.

### a. GFAT-1 et GFAT-2

Chez les mammifères, GFAT dont le nom officiel est glutamine-fructose-6-phosphate transaminase (GFPT) est une enzyme de 77kDa constituée de deux domaines : un domaine synthase qui catalyse l'amination et l'isomérisation du fructose-6P et de la glucosamine-6P et un domaine glutaminidase qui catalyse l'hydrolyse de la glutamine en glutamate et ammoniac<sup>433</sup>. Chez les procaryotes la forme active de l'enzyme se présente sous la forme d'un dimère de deux sous-unités identiques d'un poids moléculaire total d'environ 140kDa, tandis que l'enzyme eucaryote possède une structure tétramérique et un poids moléculaire compris entre 320 et 340 kDa<sup>434</sup>.

Chez l'Homme et la souris, il existe trois isoformes de GFAT : GFAT1, GFAT1Alt<sup>435</sup> (ou GFAT1-L) et GFAT2<sup>436</sup> codées par 2 gènes situés sur deux chromosomes différents, GFAT1 et GFAT1Alt sur le chromosome 2 et GFAT2 sur le chromosome 5 chez l'homme et les chromosomes 6 et 11 chez la souris respectivement. Il est intéressant de noter une homologie de 97% entre l'homme et la souris ; cette homologie atteint même 100% au niveau des domaines catalytiques de l'enzyme.

Bien que les gènes codants pour *gfpt1* et *gfpt2* présentent 79% d'homologie, chaque isoforme a une distribution tissulaire propre. GFAT1, la forme la plus étudiée est exprimée de manière ubiquitaire mais est plus abondante dans le placenta, le pancréas et les testicules. GFAT1Alt générée par épissage alternatif du gène *gfpt1* présente une expression restreinte au muscle strié<sup>435</sup> alors que GFAT2 est principalement retrouvée au niveau du système nerveux central<sup>436</sup>. Jusqu'ici dans les chondrocytes seul GFAT-1 a été mise en évidence<sup>437</sup>.

### b. La régulation de GFAT

GFAT étant l'enzyme qui conditionne la synthèse de l'UDP-GlcNAc nécessaire à la *O*-GlcNAcylation des protéines, il s'agit donc d'une enzyme critique qui doit être finement régulée.

Le premier niveau de régulation de GFAT se fait au niveau transcriptomique. A ce jour, plusieurs facteurs de transcription ont été identifiés, comme régulant la transcription du gène codant pour GFAT tel que le facteur de transcription specificity protein 1 (Sp1)<sup>438</sup> et l'activating transcription factor 4 (ATF4). Ce dernier est capable d'induire une augmentation du flux de l'HBP et du niveau de *O*-GlcNAcylation cellulaire via une production accrue de GFAT1 en réponse à un stress induit par une privation en glucose ou en acide aminé<sup>439-441</sup>.

Le second niveau de régulation de GFAT va avoir lieu à l'échelle de son activité qui est hautement dépendante de la disponibilité de ses substrats (glutamine et glucose)<sup>426</sup>. De plus, les produits de synthèse de la voie HBP, que sont la glucosamine-6P<sup>442</sup> et à distance l'UDP-GlcNAc<sup>443</sup> sont capable d'exercer un rétrocontrôle négatif sur l'activité enzymatique de GFAT tout comme l'insuline<sup>426</sup>. Bien que l'activité de GFAT soit modulée par de forte concentration en glucose, ni son expression génique, ni son expression protéique n'ont été décrites comme étant impactées par le glucose<sup>444,445</sup>.

La phosphorylation semble également être impliquée dans la régulation de l'activité de GFAT avec à ce jour plus de 20 sites identifiés, mais l'impact de ces modifications post-traductionnelles est loin d'être élucidé avec des effets contradictoires rapportés. Par exemple, GFAT1 peut être phosphorylée sur la sérine 205 par la protéine kinase cAMP-dépendante (PKA), cependant l'impact de cette modification diffère dans la littérature puisque ayant été montrée soit comme augmentant l'activité de l'enzyme<sup>446,447</sup> soit la diminuant<sup>448</sup>. GFAT1 peut également être phosphorylée au niveau de la sérine 243 par l'AMPK. Cette phosphorylation diminue l'activité de GFAT1, réduisant le niveau global de O-GlcNAcylation *in vitro* dans des cellules endothéliales<sup>449</sup>.

Pour finir, il a été montré que la demi-vie de GFAT est relativement courte et que la synthèse continue de son ARNm est nécessaire pour maintenir les niveaux de GFAT<sup>426</sup>, ce qui permet une régulation rapide de l'abondance de l'enzyme en fonction des besoins cellulaires en UDP-GlcNAc.

## B. La O-GlcNAc transférase

La O-linked N-acetylglucosamine transférase plus simplement appelée O-GlcNAc transférase ou OGT, est l'enzyme qui réalise la O-GlcNAcylation des protéines à partir de l'UDP-GlcNAc produit par la voie HBP. Son activité a été mise en évidence en 1990 par G. Hart et son équipe principalement dans les compartiments cytoplasmiques et nucléaires<sup>450</sup>. Son gène est porté par le chromosome X chez l'homme et la souris<sup>451</sup> et est hautement conservé au sein du règne animal<sup>452</sup>.

Le gène *ogt* est exprimé de manière ubiquitaire, mais un épissage alternatif permet de générer 3 isoformes de l'enzyme qui ont des localisations différentes au sein de la cellule et diffèrent principalement par le nombre de répétition tétratricopeptide (TPRs)<sup>453</sup> (Figure 13). Les domaines TPR sont constitués d'environ 34 acides aminés basés autour de résidus consensus très fortement conservés et jouant un rôle dans les interactions protéine-protéine. Ils pourraient notamment être impliqués dans la spécificité de OGT avec ses substrats<sup>454</sup>.

Les deux premières formes d'OGT, la forme total ou nucléocytoplasmique (ncOGT) (110kDa) et la forme courte ou short (sOGT) (78kDa)<sup>452</sup> sont principalement présentes dans le cytoplasme et le noyau des cellules et possèdent respectivement 13,5 et 4 TPRs. La troisième forme présente une séquence terminale d'adressage à la mitochondrie (mOGT) et 9 TPRs (90kDa). De ce fait elle est donc présente au niveau mitochondrial et semble être impliquée dans la O-GlcNAcylation des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale<sup>455</sup>. Tardio et al. ont montré que ces 3 isoformes sont présentes dans le cartilage humain<sup>456</sup>.

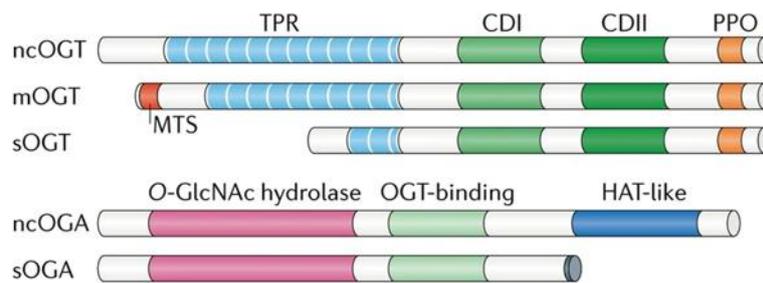


Figure 13 : Structure schématique d'OGT et d'OGA (Yang X. et Qian K., 2017<sup>505</sup>)

L'OGT est constituée de 3 régions fonctionnelles distinctes (Figure 13) : en N-terminal, se trouve les motifs TPR et en C-terminal le domaine catalytique (CD) divisé en 2 sous-domaines CD I et CD II séparés par un domaine intermédiaire (Int-D) de fonction inconnue. Le CDI est vraisemblablement responsable de l'activité catalytique de l'OGT et le CDII de la liaison à l'UDP-GlcNAc<sup>457</sup>. Les domaines N-terminal et C-terminal sont liés ensemble grâce un domaine de liaison NLS pour « nuclear localization sequence ». Enfin, il a été suggéré que les différentes forme d'OGT présentent également un domaine de liaison aux phosphoinositides (PPO). Ainsi, les phosphoinositides pourraient moduler directement l'activité de OGT<sup>458</sup>, cependant cette activité de liaison n'a pas été confirmée par des travaux plus récents<sup>459</sup>.

Initialement, la forme active de OGT purifiée à partir de foie de rat a été mise en évidence comme se présentant sous la forme d'un hétérotrimère composé de deux sous-unités catalytiques de 110 kDa et d'une sous-unité de 78 kDa<sup>460</sup>. Mais des études plus récentes sont venues réfuter cette observation en montrant que la structure cristalline de OGT suggérait une dimérisation autour d'une interface formée au niveau du TPR 6-7<sup>461</sup>. Cette observation structurale a été étayée par une analyse par cryo-EM et cristallographie<sup>462</sup>.

Il n'existe pas de modèle murin de KO embryonnaire pour OGT, son inactivation étant associée à un phénotype létal<sup>451,463,464</sup>. Au-delà du développement embryonnaire, OGT est également essentielle à l'âge adulte chez la souris. En effet, dans un modèle de souris KO total inductible

d'OGT, l'injection de tamoxifène s'est révélée létale 4 semaines post-injection ce qui suggère que la *O*-GlcNAcylation est également essentielle à la survie des souris adultes<sup>465</sup>. Chez l'humain, des mutations d'OGT sont associées à la déficience intellectuelle liée au chromosome X<sup>466-471</sup>.

Tout comme GFAT, OGT est régulée à plusieurs niveaux. Lors de la *O*-GlcNAcylation des protéines de l'uridine diphosphate (UDP) va être libéré par OGT. Cet UDP va être capable d'inhiber l'activité enzymatique de OGT<sup>472</sup>. D'autre part, une augmentation du niveau d'*O*-GlcNAcylation cellulaire induit une diminution de l'expression d'OGT et inversement une augmentation de l'expression de OGA<sup>473,474</sup>.

L'activité de OGT peut également être régulée par différentes modifications post-traductionnelles. A ce jour, environ 20 sites de phosphorylation ont été identifiés sur OGT<sup>420</sup>, ainsi que plusieurs sites potentiels d'*O*-GlcNAcylation<sup>475,476</sup> et d'acétylation<sup>477</sup>. Cependant, le rôle de ces sites reste largement inexploré. Par exemple, l'insuline induit la phosphorylation de OGT *in vitro* et sa translocation du noyau au cytoplasme, qui dans ce contexte augmente l'activité de OGT<sup>478</sup>. De manière similaire, OGT a été montré comme pouvant être phosphorylé par différentes protéine kinases Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dépendantes (CaMK), CaMKIV dans des cellules neuroblastomiques<sup>479</sup> et CaMKII dans des hépatocytes<sup>480</sup> avec à chaque fois une activation de OGT et une augmentation de la *O*-GlcNAcylation.

### C. La *O*-GlcNAcase

La *O*-GlcNAcase (OGA) est l'unique enzyme responsable de l'élimination du groupement *O*-GlcNAc et a été initialement identifiée et nommée antigène exprimé par le méningiome 5 (MGEA5)<sup>481</sup>. Son activité a été mise en évidence en 1994 par Dong et Hart<sup>482</sup> dans les compartiments cytosoliques et nucléaires. Son gène, cloné pour la première fois en 2001<sup>483</sup>, est porté par le chromosome 10 chez l'Homme<sup>481</sup> et le 19 chez la souris.

Son expression est ubiquitaire mais a été montrée comme plus importante dans le cerveau, le placenta et le pancréas<sup>483,484</sup>. Il existe 2 isoformes de cette enzyme; une forme longue de 103 kDa localisée au niveau nucléocytoplasmique (ncOGA), et une forme tronquée par épissage alternatif de 76 kDa (sOGA) qui se retrouve dans le noyau<sup>484</sup> et dans les gouttelettes lipidiques<sup>485</sup>.

La forme longue de OGA (ncOGA), est divisée en 3 domaines : en N-terminal se trouve un domaine glycoside hydrolase responsable de l'élimination de la modification *O*-GlcNAc, au centre se trouve un domaine traqueur et en C-terminal un domaine qui présente une forte homologie de séquence aux histones acétyltransférases (HAT-like), dont la forme courte est dépourvue mais conserve une

certaine activité OGA<sup>486</sup>. L'activité histone acétyltransférase du domaine HAT-like de OGA reste discutée. En effet, initialement montré comme actif<sup>487,488</sup>, des études ultérieures n'ont pas réussi à reproduire ces observations<sup>489-491</sup>.

OGA est hautement conservée chez les espèces eucaryotes supérieures, avec notamment plus de 97,8% d'homologie entre l'Homme et la souris<sup>484</sup>.

En 2017, 3 équipes ont réussi à élucider la structure d'OGA chez l'humain par différentes approches et ont montré qu'OGA forme un homodimère grâce à l'interaction des domaines stalk des deux monomères<sup>492-494</sup>.

Tout comme OGT, les souris OGA KO, présentent un phénotype létal avec une létalité périnatale presque complète<sup>495,496</sup>. Les fibroblastes embryonnaires de souris OGA -/- présentent des anomalies génomiques, ainsi qu'une perturbation du cycle cellulaire qui pourrait contribuer au processus de vieillissement et affecter le développement de maladies chroniques liées à l'âge<sup>495</sup>. Preuve de son importance dans le développement de la mouche à l'Homme, le gène codant pour OGA appartient à la famille des gènes homéotiques NK<sup>497,498</sup>. Les gènes homéotiques présentent une séquence de 180 nucléotides appelée homéobox qui code pour un domaine protéique particulier de fixation à l'ADN, l'homéodomaine. Ces homéodomains participent notamment à la régulation de l'expression des gènes impliqués dans le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire.

Tardio et al. ont montré que les 2 isoformes de OGA sont présentes dans le cartilage articulaire humain<sup>456</sup>.

#### D. Régulation croisée entre OGT et OGA

En plus d'être régulées indépendamment, OGT et OGA modulent mutuellement leurs expressions et éventuellement leurs activités afin de maintenir un niveau d'O-GlcNAcylation cellulaire stable<sup>474</sup>. Ainsi OGT et OGA peuvent être O-GlcNAcylés<sup>475,476,499</sup>.

Différentes études rapportent également que l'expression d'OGT et d'OGA sont sensibles aux changements du niveau de O-GlcNAcylation cellulaire. Par exemple, l'élévation des niveaux de O-GlcNAcylation via l'inhibition pharmacologique d'OGA entraîne une diminution de l'expression de la protéine OGT et une augmentation de l'expression de la protéine OGA dans différents types cellulaires<sup>474,500</sup>. De manière similaire, des fibroblastes embryonnaires de souris knock-out pour OGA présentent une diminution de OGT<sup>501</sup>. Une étude suggère que OGA peut agir comme un coactivateur du facteur de transcription C/EBP- $\beta$  afin d'augmenter la transcription du gène codant

pour OGT<sup>500</sup>. D'autres études ont également rapporté que de faibles niveaux de O-GlcNAcylation contribuent à une transcription accrue d'OGT<sup>502</sup> et que l'absence ou l'inhibition de OGT réduit l'expression de OGA<sup>503</sup>. De manière intéressante, l'augmentation de l'activité de OGT induit en parallèle une augmentation de l'activité de OGA et inversement<sup>504</sup>.

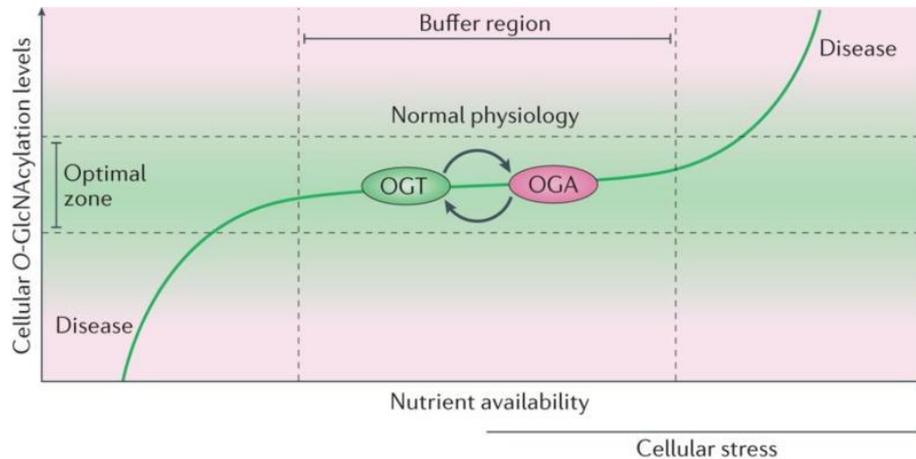


Figure 14: L'homéostasie métabolique de la O-GlcNAcylation est essentielle pour la physiologie cellulaire normale. (Yang X. et K. Qian K., 2017<sup>505</sup>)

Toutes ces données conduisent au concept qu'il existe un niveau optimal de O-GlcNAcylation nécessaire au maintien d'une fonction cellulaire physiologique et qu'en cas de O-GlcNAcylation trop élevée ou trop basse, il en résulte un dysfonctionnement cellulaire<sup>505</sup> (Figure 14). Un déséquilibre dans l'homéostasie de la O-GlcNAcylation contribue notamment au développement de maladies telles que le cancer<sup>506,507</sup>, le diabète<sup>507</sup> ou la maladie d'Alzheimer<sup>508,509</sup>.

### 3. Modifications pharmacologiques de la O-GlcNAcylation

L'inactivation embryonnaire des gènes codants pour OGT et OGA est mortelle dans les modèles d'animaux supérieurs tels que la souris, ce qui entrave l'étude des fonctions biologiques de la O-GlcNAcylation par ce biais. Depuis la découverte de la O-GlcNAcylation des protéines et des enzymes responsables de sa régulation, le développement d'outils pharmacologiques permettant d'inhiber sélectivement OGT et OGA pour moduler l'abondance de la O-GlcNAcylation est donc un enjeu majeur pour l'étude du rôle de cette modification.

#### A. Augmentation de la O-GlcNAcylation

##### a. Augmentation du flux de l'HBP

Afin d'augmenter le niveau de O-GlcNAcylation, une première stratégie est l'accroissement de la biodisponibilité du substrat de l'HBP, le glucose<sup>510</sup>. La seconde est de contourner GFAT l'enzyme limitante pour la synthèse de l'UDP-GlcNAc en utilisant la GlcN<sup>511-513</sup>. Bien que ces 2 stratégies soient capables d'augmenter les niveaux de O-GlcNAcylation des protéines, leurs effets restent

limités puisqu'ils n'augmentent que d'un facteur 2 ou 3 ces niveaux et que ces 2 molécules ne sont pas spécifiques de la *O*-GlcNAcylation et peuvent donc impacter d'autres systèmes cellulaires.

#### b. Inhibiteurs de OGA

Afin de s'affranchir de ces effets non spécifiques, le développement d'inhibiteurs spécifiques d'OGA présente un d'intérêt majeur, à la fois pour les études fonctionnelles de la *O*-GlcNAcylation mais également pour des applications potentielles en thérapie, par exemple dans les maladies neurodégénératives<sup>514</sup>.

- Le PUGNAc (O-(2-acétamido-2-déoxy-D-glucopyranosylidène)amino-N-phénylcarbamate) est un des premiers inhibiteurs d'OGA et de ce fait certainement un des plus utilisés<sup>515</sup>. Mais initialement synthétisé par Vasella et son équipe en tant qu'inhibiteur puissant de la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase<sup>516</sup> le PUGNAc souffre de problèmes de sélectivité vis-à-vis d'autres hexosaminidases (HEX), (OGA/HEX=1)<sup>486</sup>, augmentant le risque d'effets hors cible et limitant son utilité dans les études cellulaires fonctionnelles. Par conséquent, il est recommandé d'utiliser des inhibiteurs d'OGA plus sélectifs que le PUGNAc pour étudier la *O*-GlcNAcylation.
- Le GlcNAcstatin est inhibiteur sélectif pour OGA qui a été développé grâce à l'étude de la structure cristalline formée lors de l'interaction du PUGNAc avec OGA<sup>517</sup>. En plus de présenter une bonne diffusion intracellulaire, le GlcNAcstatin possède une bonne capacité d'inhibition ( $IC_{50} = 4 \text{ nM}$ ), et une sélectivité extrêmement élevée (100 000 fois) pour hOGA par rapport aux Hex A/B, induisant une hyper *O*-GlcNAcylation dans les cellules.
- Le NButGT (1,2-dideoxy-2'-propyl- $\alpha$ -D-glucopyranoso-[2,1-d]- $\Delta$  2'-thiazoline) dérive du PUGNAc et permet une occupation du site actif de l'OGA plus optimale et ainsi une plus grande spécificité pour cette hexosaminidase vis-à-vis des Hex A/B (OGA/HEX=600)<sup>518</sup>. Cet inhibiteur est très efficace, avec une concentration inhibitrice médiane ( $IC_{50} = 8 \text{ }\mu\text{M}$ ).
- Le Thiamet-G : Une subtile modification du NButGT via l'introduction une amine à la chaîne alkyle, a permis de générer le thiamet-G (3aR,5R,6S,7R,7aR)-2-(ethylamino)-3a,6,7,7a-tetrahydro-5-(hydroxyméthyl)-5H Pyrano[3,2d]thiazole-6,7-diol), un excellent inhibiteur de OGA ( $IC_{50} = 30 \text{ nM}$ ) avec une grande sélectivité (OGA/HEX = 35 000)<sup>519</sup>. La modification apportée au thiamet-G lui a également conféré une plus grande stabilité en solution et une perméabilité cellulaire accrue, qui lui permet de traverser la barrière hémato-encéphalique.

De ce fait, cette molécule semble être de plus en plus utilisée en recherche pour inhiber OGA *in vitro* et *in vivo*<sup>519</sup>. Le thiamet-G a notamment été utilisé pour augmenter les niveaux de *O*-GlcNAc dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer, entravant l'agrégation des protéines et réduisant la neurodégénérescence<sup>520-522</sup>. Il a également été utilisé pour étudier le rôle de la *O*-GlcNAcylation sur la différenciation chondrogénique *in vitro* et *in vivo*<sup>523</sup>. Cependant son coût élevé limite son utilisation pour des études *in vivo* de longue durée.

D'autres inhibiteurs d'OGA sont en cours de développement et d'évaluation, tels que le thiamMe-G, le VV347 et MK-8719. Plus de détails sur ces nouveaux composés peuvent être trouvés dans les revues suivantes : Elbatrawy et al; ChemMedChem; 2020<sup>524</sup> et Arielis et al; Chem. Eur. J; 2020<sup>525</sup>.

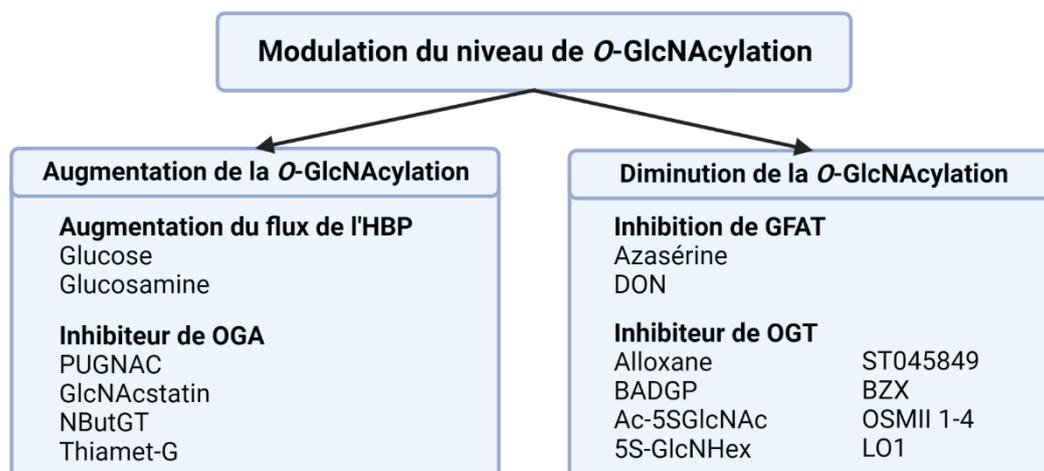


Figure 15 : Composés pharmacologiques modulant la *O*-GlcNAcylation des protéines.  
(Créée avec BioRender.com)

## B. Diminution de la *O*-GlcNAcylation

### a. Inhibition de GFAT

L'azaserine ou *O*-Diazoacetyl-L-serine est le premier inhibiteur de GFAT synthétisé dès les années 1950. Le second est la 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON). Ces 2 molécules ont initialement été utilisées pour leurs propriétés anti-cancéreuses<sup>526</sup> avant que leur capacité d'inhibition de GFAT ne soit établie<sup>426</sup>. Ces molécules sont des analogues de la glutamine avec qui elles rentrent en compétition pour le site catalytique de GFAT. De ce fait, elles sont susceptibles d'inhiber d'autres voies dépendantes de la glutamine et manquent donc de spécificité. Cependant, en l'absence d'inhibiteurs ciblant spécifiquement GFAT, ces 2 molécules continuent d'être utilisées.

## b. Inhibition d'OGT

Il n'existe pour le moment pas d'inhibiteur idéal d'OGT permettant de moduler spécifiquement son activité. De plus, de nombreuses molécules développées présentent des problèmes de diffusion intracellulaire. Cependant, les connaissances sur la structure du site actif d'OGT promettent des avancées dans la synthèse d'inhibiteurs présentant une haute affinité et une haute spécificité envers OGT ainsi qu'une capacité accrue à pénétrer dans les cellules.

- Substrat et UDP-GlcNac analogues :

La première molécule à avoir été utilisée pour inhiber OGT est l'alloxane, un analogue de l'uracile<sup>527</sup>. Bien qu'utilisée *in vivo* et *in vitro*, car elle présente une bonne perméabilité cellulaire, elle manque de spécificité pour OGT ( $IC_{50}=100\mu M$ ) et présente un temps de demi-vie court à pH physiologique responsable de la génération de ROS délétère pour les cellules<sup>528,529</sup>. La seconde molécule à avoir été utilisée pour inhiber l'OGT est le BADGP (benzyl-2-acetamido-2-deoxy-  $\alpha$ -D-galactopyranoside)<sup>530,531</sup>. Tout comme l'alloxane le BADGP présente une bonne perméabilité cellulaire, mais manque également de spécificité pour OGT. Il va donc agir non seulement sur la O-GlcNAcylation des protéines mais également sur l'activité de nombreuses autres enzymes.

Afin d'améliorer la spécificité des inhibiteurs de OGT, des équipes de recherche se sont inspirées de la structure de l'UDP-GlcNac, inhibiteur naturel d'OGT ( $IC_{50}=1,8\mu M$ ) afin de générer des analogues de l'UDP-GlcNac présentant une plus grande spécificité pour celui-ci. C'est ainsi qu'a été développé l'Ac-5SGlcNac. Une fois internalisé par les cellules, il va être converti en UDP-5SGlcNac ( $IC_{50}=5\mu M$ ) via la voie de récupération du GlcNac. Cet inhibiteur n'est pas toxique pour les cellules, mais présente une faible solubilité en solution aqueuse, empêchant son utilisation *in vivo*. Afin de palier à ce problème, cette molécule a été optimisée grâce à l'incorporation d'un groupement hydrophobe pour générer le 5S-GlcNHex ( $IC_{50} = 5\mu M$ ). Tout comme l'Ac-5SGlcNac celui-ci est métaboliquement converti UDP-5S-GlcNac mais peut être administré *in vivo* ou il présente une activité inhibitrice d'OGT<sup>532</sup>. Malgré leur forte affinité pour OGT, ces 2 molécules détournent l'HBP afin d'être sous leur forme active réduisant ainsi le pool d'UDP-GlcNac natif dans les cellules<sup>533</sup>. Cela pourrait avoir pour conséquence d'inhiber d'autres glycosyltransférases et ainsi affecter différents processus cellulaires.

- Composés identifiés par criblage à haut débit :

Grace au développement du criblage à haut débit (HTS, high-throughput screening) qui permet de détecter les composés qui entrent en compétition avec la liaison de l'UDP-GlcNac à l'OGT et au

développement de nouveaux outils tels que la chimie clic, de nombreuses molécules ont pu être identifiées comme potentiel inhibiteur pour OGT.

C'est ainsi que les deux molécules suivantes ont été identifiées par Gross et al<sup>534</sup> : ST045849 (3-(2-adamantanylethyl)-2-[(4-chlorophenyl)azamethylene]-4-oxo-1,3-thiazaperhydroine-6-carboxylic acid) et le BZX (benzoxazolinones). De ces deux molécules, c'est le BZX qui présente la plus forte capacité d'inhibition de OGT (IC<sub>50</sub>=10μM). *In vitro*, le BZX présente une bonne perméabilité cellulaire, mais il doit être utilisé à forte dose ce qui proscrit son utilisation *in vivo* et est hautement toxique pour les cellules<sup>535</sup>. Son mode d'action est unique car il se fixe de manière permanente au niveau du site catalytique de OGT.

L'équipe de S. Walker a également utilisé la technique HTS, pour identifier l'OSMI-1<sup>536</sup>. Cette molécule perméable est capable de diminuer faiblement le niveau de *O*-GlcNAcylation dans plusieurs types cellulaires cependant elle est hautement toxique, avec une diminution de la viabilité cellulaire d'environ 50 % après traitement<sup>536</sup>. A partir de l'OSMI-1, l'équipe de S. Walker a généré les composés OSMI-2, OSMI-3 et OSMI-4. L'OSMI 4 est à ce jour l'inhibiteur d'OGT le plus spécifique développé, avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'ordre du μM dans des cellules isolées *in vitro*<sup>537</sup>.

Une des dernières molécules à avoir été identifiée est le L01 par Liu et al<sup>532</sup>. Le L01 est capable d'inhiber la *O*-GlcNAcylation *in vitro* dans les cellules et *in vivo* dans un modèle de poisson zèbre (IC<sub>50</sub>=21,8 μM) et présente une faible toxicité ainsi qu'une bonne perméabilité intra-cellulaire.

#### 4. Discussion croisée entre la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation

La *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation sont intimement liées. En effet, ces 2 MPT possèdent des caractéristiques communes : ce sont toutes deux des modifications dynamiques, réversibles et qui interviennent sur les résidus serines et thréonines des protéines afin de réguler leur activité, leur localisation cellulaire ainsi que leurs interactions<sup>538</sup>. De plus, ces deux modifications post-traductionnelles sont sensibles à l'état nutritionnel de la cellule<sup>539</sup>.

Au-delà de ces caractéristiques communes, la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation peuvent interagir ensemble dans la régulation des protéines. Le premier type d'interaction entre ces deux MPT est celle de réciprocité ou aussi connu sous le nom d'hypothèse "Ying Yang"<sup>540</sup> (Figure 16, A). C'est-à-dire que la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation sont en compétition pour le même résidu et s'excluent mutuellement. De nombreuses protéines voient ainsi leurs activités régulées et sont réciproquement modifiées, selon leur environnement. Parmi celles-ci, on retrouve par exemple la protéine oncogène c-Myc<sup>541</sup> qui peut être phosphorylée ou *O*-GlcNAcylée sur la Thr58, le récepteur murin aux œstrogènes-β (mER-β) en Ser16<sup>542</sup>, plusieurs sites sur l'ARN polymérase

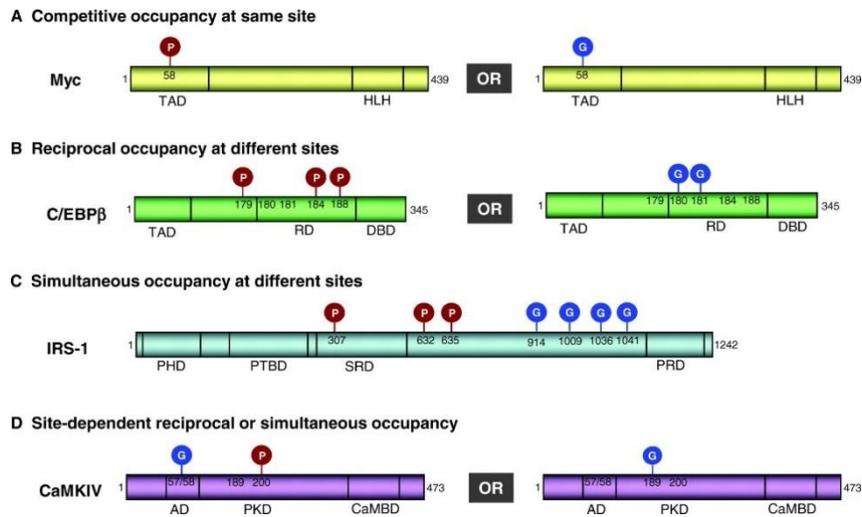


Figure 16 : Dialogue entre O-GlcNAcylation et phosphorylation (Zeidan Q. et Hart G.W., 2010<sup>546</sup>)

Il<sup>543,544</sup>, ou encore l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) sur la Ser1177<sup>545</sup> et bien d'autres (Figure 16, A).

La communication entre ces deux MPT peut également avoir lieu sur des sites différents (adjacents ou distants) qui peuvent se réguler mutuellement pour générer une vaste gamme de réponses biologiques chez les protéines cibles (Figure 16, B-D). Cette diversité moléculaire hautement dynamique facilite l'adaptation de la cellule aux changements constants de son environnement.

Dans ces configurations, la O-GlcNAcylation peut favoriser ou inhiber l'ajout de phosphorylation ultérieures<sup>546</sup>. C'est notamment le cas pour le gène suppresseur de tumeur p53 ( ou TP53 pour "tumor protein 53" ), pour lequel la O-GlcNAcylation de la Ser149 empêche la phosphorylation de la Thr155 réduisant ainsi son ubiquitinylation et par la suite sa dégradation par le protéasome<sup>547</sup>. Cette régulation sur des sites adjacents a également été observée pour la protéine C/EBP-β, qui lorsqu'elle est O-GlcNAcyllée sur les Ser180-181 empêche la phosphorylation des sites adjacents Thr179, Ser184 et Thr188 réduisant ainsi sa capacité de liaison à l'ADN<sup>548</sup> (Figure 16, B). Il existe aussi des protéines où la O-GlcNAcylation empêche la phosphorylation sur un site à distance, telles la CamKIV où la phosphorylation sur la Thr200 diminue la O-GlcNAcylation à distance des Ser137 et 189 et inversement si la phosphorylation de la Thr200 est diminuée la O-GlcNAcylation de CamKIV est augmentée<sup>549</sup>.

Cependant, il est également possible que ces deux MPT soient présentes simultanément sur une même protéine sur des sites proches ou adjacents ou bien même à distance, comme c'est le cas pour la protéine substrat du récepteur à l'insuline 1 (IRS1) (Figure 16, C) qui peut être O-

GlcNAcylée sur les résidus 914, 1009, 1036 et 1041 et phosphorylée sur les résidus 307, 632, 635 et 1045<sup>550</sup>.

Comme nous l'avons vu précédemment, les activités de GFAT<sup>446-449</sup>, OGT<sup>420,479,480</sup> et OGA sont également régulées par la phosphorylation. Il en est de même pour les Kinases et phosphotransférases qui peuvent être contrôlées par la *O*-GlcNAcylation. Cette régulation mutuelle des enzymes responsables de la *O*-GlcNAcylation et de la phosphorylation met bien en évidence la relation complexe entre ces deux MPT.

Bien que les interactions entre la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation soient les plus étudiées, il est important de noter que la *O*-GlcNAcylation peut intervenir sur des protéines portant d'autres types de PTM tels que des acétylations et des ubiquitinations. Comme expliqué précédemment, la *O*-GlcNAcylation de p53 prévient son ubiquitinylation<sup>547</sup>. De manière similaire la *O*-GlcNAcylation de NF-κB est capable de moduler son acétylation<sup>551</sup>.

## 5. *O*-GlcNAcylation et vieillissement

De nombreux auteurs ont démontré que la *O*-GlcNAcylation anormale des protéines joue un rôle essentiel à la fois dans le développement et dans la progression de diverses maladies liées à l'âge telles que le diabète, les maladies cardio-vasculaires, les maladies neurodégénératives, le cancer et l'OA<sup>420,552</sup>. Le vieillissement est un processus physiologique complexe consistant en un déclin progressif de certaines fonctions, de la coordination, de la perte de l'homéostasie et de l'intégrité physiologique<sup>553</sup>. Comme vu précédemment, le vieillissement est défini par neuf caractéristiques : l'instabilité génomique, l'attrition des télomères, l'altération épigénétique, la perte de protéostase, le dysfonctionnement métabolique, le dysfonctionnement mitochondrial, la sénescence cellulaire, l'épuisement des cellules souches et l'altération des communications<sup>554</sup>.

Or la *O*-GlcNAcylation, joue un rôle important dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la transcription, l'activation de la signalisation cellulaire, le métabolisme, la fonction mitochondriale ainsi que la survie cellulaire et l'autophagie<sup>420,552</sup> et semble donc pouvoir impacter les 9 caractéristiques du vieillissement évoquées ci-dessus.

Cependant, l'absence de consensus sur les variations du niveau d'*O*-GlcNAcylation au cours du vieillissement et dans la fonction des organes souligne la nécessité de nouvelles études pour améliorer la compréhension de l'impact des niveaux de *O*-GlcNAcylation sur le développement cellulaire, la survie et les impacts potentiels sur les pathologies liées au vieillissement. Plusieurs

études se sont intéressées aux variations du niveau de *O*-GlcNAcylation lors du développement postnatal pécoce<sup>555</sup> mais également avec l'âge, chez le rat<sup>556</sup> et la souris<sup>495</sup>

Ainsi, lors des phases précoces du développement les niveaux cardiaques, cérébraux et hépatiques d'*O*-GlcNAcylation, des enzymes de la HBP et des métabolites apparentés, sont régulés de manière tissulaire et temporelle. De la naissance à 12 semaines, le niveau d'*O*-GlcNAcylation des protéines diminue progressivement dans le cœur alors qu'il augmente dans le foie et le cœur<sup>555</sup>. Avec l'âge (4-5 mois vs 20-24 mois), il a été montré dans différents tissus (cerveau, poumon, cœur, ...) que le niveau relatif de *O*-GlcNAcylation évalué par WB est augmenté. Paradoxalement, cette augmentation s'accompagne globalement d'une diminution de l'expression de OGT et OGA<sup>495</sup>.

Pour autant, le lien exact entre les variations du niveau de *O*-GlcNAcylation, la régulation des expressions de OGT et OGA avec l'âge et leurs impacts n'ont été que peu explorés. Cela peut s'expliquer par le fait que l'inactivation embryonnaire des gènes codants pour OGT<sup>451,463,464</sup> et OGA<sup>494,496</sup> est létale dans les modèles d'animaux supérieurs tels que la souris, ce qui entrave l'étude des fonctions biologiques de la *O*-GlcNAcylation par ce biais.

Toutefois, chez plusieurs modèles d'invertébrés l'inactivation de OGT et OGA n'est pas létale et permet d'explorer leur rôle dans le développement et le vieillissement. C'est notamment le cas chez le nématode *Caenorhabditis elegans*<sup>557,558</sup>. Dans ce modèle, plusieurs équipes ont rapporté que la perte d'expression de OGT se traduit par une quasi absence de *O*-GlcNAcylation des protéines, ce qui réduit leur espérance de vie<sup>498,559</sup>. Inversement, une augmentation de l'espérance de vie par rapport à la souche sauvage ainsi qu'une augmentation du niveau de *O*-GlcNAcylation a été montrée suite à l'inactivation de OGA<sup>559</sup>. Pour autant ces modèles knock-out pour OGT et OGA présentent un développement normal et sont fertiles<sup>559</sup>. De manière similaire, l'activité accrue de la voie HBP via un gain de fonction de GFAT1 prolonge la durée de vie et réduit le développement de pathologies dans plusieurs modèles de maladies protéotoxiques chez *C. elegans*<sup>560-562</sup>.

## 6. *O*-GlcNAcylation et Arthrose

Bien que la *O*-GlcNAcylation soit impliquée dans de nombreuses voies de signalisation et fonctions cellulaires, telles que la transcription, le métabolisme, la fonction mitochondriale, la survie cellulaire, la sénescence et l'autophagie, et son rôle étudié dans une grande variété de maladies

telles que l'obésité, le diabète, la maladie d'Alzheimer, le cancer et l'ischémie<sup>420</sup>, peu d'équipes de recherche se sont intéressées à son rôle dans l'OA.

Ainsi, en 2014, Tardio et al. sont les premiers à montrer une accumulation de protéines *O*-GlcNAcylées associée à une redistribution des isoformes de OGT et OGA en faveur des formes courtes dans le cartilage de patients arthrosiques<sup>456</sup>. En accord avec ces résultats, il a également été montré une augmentation du niveau de *O*-GlcNAcylation dans le cartilage vertébral de patients atteints de discopathie dégénérative<sup>563-565</sup>.

Au-delà de ce lien direct entre *O*-GlcNAcylation et OA d'autres preuves de l'implication de l'*O*-GlcNAcylation dans les tissus articulaires et l'inflammation existent.

#### A. Rôle dans la différenciation chondrocytaire et le cartilage articulaire

Tout d'abord, la *O*-GlcNAcylation semble être impliquée dans la différenciation chondrocytaire. Ainsi, le niveau de *O*-GlcNAcylation des protéines est augmenté au cours de la différenciation chondrogénique des chondrocytes murins (ATDC5) et s'accompagne d'une augmentation du niveau de *O*-GlcNAcylation des cellules qui devance une augmentation de l'abondance des enzymes OGT et OGA. Le DON (inhibiteur de GFAT) permet de bloquer cette augmentation<sup>523</sup>.

La *O*-GlcNAcylation paraît également jouer un rôle dans la différenciation ostéogénique et chondrogénique des cellules souches du cartilage des plateaux vertébraux. Dans ce type cellulaire, la *O*-GlcNAcylation a un impact sur l'activité de SOX-9 et RUNX-2, influençant ainsi l'expression génique du collagène de type II (COL2A1) et de ACAN responsables du maintien du phénotype des chondrocytes<sup>563</sup>. *In vivo*, l'augmentation du niveau de *O*-GlcNAcylation via l'administration de thiamet-G, a entraîné une augmentation de la hauteur de la plaque endochondrale chez la souris, renforçant l'idée que la *O*-GlcNAcylation est susceptible de jouer un rôle majeur dans la chondrogenèse et la formation du cartilage<sup>523</sup>.

Parmi les protéines connues pour être *O*-GlcNAcylées, PPAR $\gamma$ <sup>566</sup>, SIRT1, FOXO1<sup>567</sup> et YAP<sup>568</sup> sont décrites pour jouer un rôle dans l'homéostasie du cartilage ou dans l'OA. Il est intéressant de noter que le facteur de transcription Atf4, capable de réguler la transcription de GFAT et donc indirectement la synthèse de l'UDP-GlcNAc via l'HBP, est également impliqué dans la régulation de la prolifération et la différenciation des chondrocytes. En effet, Atf4 est exprimé dans les chondrocytes prolifératifs et pré-hypertrophiques de la plaque de croissance<sup>569</sup>.

Enfin, comme souligné précédemment, l'UDP-GlcNAc nécessaire à la *O*-GlcNAcylation peut également servir à la biosynthèse des GAGs tels que le kératane sulfate, le chondroïtine sulfate et l'acide hyaluronique qui sont des composants importants du cartilage articulaire<sup>570</sup>

#### B. Impact sur les synoviocytes

Au-delà des chondrocytes qui constituent le cartilage, la *O*-GlcNAcylation semble également jouer un rôle sur les synoviocytes de la membrane synoviale. Dans un modèle d'arthrite, Kim et al. ont notamment évalué l'impact de l'augmentation du niveau de *O*-GlcNAcylation dans des synoviocytes *in vitro*. Les auteurs ont montré que la *O*-GlcNAcylation de p65 augmente les processus inflammatoires dans les synoviocytes stimulés par le TNF- $\alpha$  via une augmentation de son activité de transcription<sup>571</sup>. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Umar et al. En effet, bien qu'ils aient montré que les niveaux de *O*-GlcNAcylation étaient plus élevés dans les tissus synoviaux et les fibroblastes synoviaux dérivés de patients atteints de polyarthrite en comparaison avec des patients non malades, *in vitro*, le prétraitement avec du thiamet-G de fibroblastes synoviaux dérivés de patients atteints de polyarthrite, a nettement augmenté le niveau de *O*-GlcNAcylation cellulaire et simultanément inhibé la production d'IL-6 et d'IL-8 induite par l'IL-1 $\beta$  de manière dose-dépendante<sup>572</sup>.

#### C. Rôle dans l'inflammation

La glucosamine (GlcN) est un monosaccharide naturel, qui peut contribuer à la synthèse de l'UDP-GlcNAc et alimenter l'HBP en contournant GFAT a été largement étudiée pour son potentiel thérapeutique pour le traitement de l'OA<sup>573,574</sup>. Bien que l'action de la GlcN sur la *O*-GlcNAcylation n'est pas été investiguée dans ces études, il est intéressant de se pencher plus amont sur les effets qui ont été rapportés avec cette molécule dans l'OA.

Bien que l'OA ne soit pas considérée comme une maladie inflammatoire à proprement parler telle que la polyarthrite rhumatoïde, elle est tout de même caractérisée par une inflammation chronique à bas bruit<sup>567</sup>. Or la GlcN est décrite comme un agent anti-inflammatoire<sup>175</sup>. Dans différents modèles d'OA précliniques chez le rongeur, l'administration de glucosamine est capable de réduire la concentration de différentes cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, IL-6 et le TNF- $\alpha$  dans le sérum<sup>575,576</sup>. De manière similaire l'administration de GlcN par voie orale chez l'homme montre une réduction globale du niveau d'inflammation systémique<sup>577,578</sup>.

Or, dans des modèles précliniques où le niveau d'*O*-GlcNAcylation a été mesuré, l'administration de GlcN s'accompagne d'une augmentation du niveau de *O*-GlcNAcylation et d'une diminution de

l'inflammation<sup>511-513</sup>. C'est notamment le cas dans un modèle murin de septicémie caractérisé par une inflammation systémique, où l'administration de GlcN et également de thiamet-G a permis de réduire l'inflammation avec une diminution des concentrations d'IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 et de NO dans le sérum des animaux<sup>513</sup>. La GlcN présente également des propriétés anti-oxydantes. Plusieurs équipes ont démontré sur des chondrocytes une diminution du stress oxydant en présence de GlcN suite à une stimulation à l'L-1 $\beta$  caractérisée par une diminution de l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), de la production d'ions superoxydes, et de l'abondance des superoxydes dismutases<sup>579-581</sup>.

## Objectifs de la thèse

Dans le cadre défini lors de la partie introductive de ce manuscrit, les objectifs de mon travail ont été divisés en 2 parties :

1) La première en lien avec la sénescence a consisté à mieux caractériser la sénescence articulaire. Tout d'abord via la mise en place d'un modèle de sénescence chondrocytaire *in vitro* puis d'évaluer l'abondance des cellules sénescents *in vivo* dans deux modèles murins d'OA, post-traumatique et liée à l'âge.

- Pour mettre au point le modèle de chondrocyte sénescents, j'ai évalué *in vitro* la capacité de l'IL-1 $\beta$  et de l'étoposide à induire la sénescence dans des chondrocytes articulaires humains.

**Article 1: Development of a DNA damage-induced senescence model in chondrocytes. Article original, soumis dans *Aging (Albany NY)***

- En parallèle, j'ai développé des protocoles d'IHC pour p21, p16, CAV-1 et PAI-1 afin d'évaluer le nombre de cellules sénescents au sein du cartilage articulaire et des ménisques dans des modèle murins d'OA liés à l'âge ou post-traumatiques. Afin de valider l'atteinte arthrosique, nous avons également procéder à une coloration histologique et appliqué un système de notation afin d'évaluer la gravité de l'OA dans nos 2 modèles.

2) La seconde partie de ce travail, a eu pour objectif d'évaluer l'impact de l'élévation de la O-GlcNAcylation des protéines et son rôle dans différents modèles d'OA *in vitro* et *in vivo* mais également dans les modèles de sénescences développés dans la première partie de mon travail.

- Ainsi nous avons évaluer l'impact de la O-GlcNAcylation *in vitro* dans un modèle mimant le contexte arthrosique et *in vivo* chez la souris dans un modèle d'OA post-traumatique.

**Article 2: Impact of increased O-GlcNAcylation level in experimental osteoarthritis. Article original, en préparation.**



## Partie II – Résultats expérimentaux

---

### I. Sénescence articulaire : développement d'un modèle de sénescence chondrocytaire et évaluation de la sénescence dans deux modèles d'arthrose murins *in vivo*

#### 1. Rationnel de l'étude

Parmi les nombreux facteurs de risque de l'OA, dont l'obésité, le sexe féminin, les antécédents de lésions articulaires traumatiques et la prédisposition génétique, le vieillissement est le principal facteur de l'OA<sup>582</sup>. Ainsi, avec le vieillissement global de la population, l'OA représente un fardeau croissant pour la société et l'économie<sup>10</sup>.

La sénescence cellulaire constitue l'un des principaux facteurs du vieillissement<sup>209</sup> et a été impliquée dans la pathogenèse de nombreuses maladies liées à l'âge<sup>583</sup>. Récemment, la sénescence cellulaire est apparue comme une nouvelle cible pour traiter l'OA<sup>211</sup>. Jeon et al. ont montré que des SnC s'accumulent dans les tissus articulaires lors de l'OA en réponse à une blessure dans des modèles murins, participant ainsi au développement et à la progression de l'OA<sup>211</sup>. Les SnC présentent un arrêt de croissance irréversible accompagné d'une augmentation de l'expression des inhibiteurs des kinases cycline-dépendante (CDKi) tels que p16 et p21, d'une accumulation de dommages à l'ADN et de la sécrétion de diverses molécules bioactives connues sous le nom de phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP). Compte tenu du rôle de la sénescence cellulaire dans les maladies liées à l'âge, y compris l'OA, le potentiel thérapeutique des composés sénolytiques (médicaments qui induisent la mort des SnC) et sénomorphes (médicaments qui modulent le SASP) a été envisagé avec un intérêt croissant<sup>212</sup>. Dans le cas de l'OA, bien qu'il ait été démontré qu'il réduisait la gravité de la maladie dans le modèle murin<sup>211,219</sup>, le sénolytique UBX0101 n'a pas réussi à confirmer son efficacité clinique chez l'homme. Pourtant, les sénolytiques semblent intéressants pour d'autres maladies liées à l'âge. La recherche de composés sénolytiques ou sénomorphes est donc un domaine d'investigation en plein essor, notamment dans les maladies incurables et liées à l'âge. Cependant, dans l'OA, cette course à l'identification de nouveaux composés modifiant la sénescence est considérablement ralentie par un manque de compréhension complète des processus biologiques reliant l'accumulation de

cellules sénescents dans l'articulation et la pathologie de l'OA. Dans ce contexte, nos travaux avaient pour objectif de participer à une meilleure compréhension de la sénescence dans le contexte articulaire.

Par conséquent, la première partie de ce travail a eu pour objectif de générer des modèles de sénescence des chondrocytes *in vitro*. Ces travaux ont fait l'objet d'un article qui a été soumis dans le journal Aging (Albany NY).

En parallèle nous avons souhaité améliorer la caractérisation des cellules sénescents (nombres, localisation) *in vivo* dans le cartilage et les ménisques dans des modèles murins d'OA liés à l'âge et post-traumatique. Pour cela nous avons développé des IHC pour différents marqueurs associés à la sénescence.

## 2. Développement d'un modèle de sénescence chondrocytaire

### A. Article expérimental

# Development of a DNA damage-induced senescence model in osteoarthritic chondrocytes.

Mélina Georget, Anaïs Defois, Nina Bon, Sophie Allain, Cécile Boyer, Boris Halgand, Denis Waast,

Gaël Grimandi, Alban Fouasson-Chailloux, Jérôme Guicheux, and Claire Vinatier

Soumis dans Aging (Albany NY)



**Title:** Development of a DNA damage-induced senescence model in osteoarthritic chondrocytes.

**Authors:** Mélina Georget<sup>a</sup>, Anaïs Defois<sup>a</sup>, Nina Bon<sup>a</sup>, Sophie Allain<sup>a</sup>, Cécile Boyer<sup>a</sup>, Boris Halgand<sup>a</sup>,

Denis Waast<sup>a</sup>, Gaël Grimandi<sup>a</sup>, Alban Fouasson-Chailloux<sup>a</sup>, Jérôme Guicheux<sup>a</sup> and Claire Vinatier<sup>a</sup>

### **Affiliations**

<sup>a</sup>Nantes Université, Oniris, CHU Nantes, Inserm, Regenerative Medicine and Skeleton RMeS, UMR

1229 F-44000 Nantes, France

### **Corresponding author:**

Claire Vinatier, PhD, HDR

Inserm, UMR 1229, RMeS, Regenerative Medicine and, Skeleton,

1, place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes, France, France

E-mail address: [claire.vinatier@univ-nantes.fr](mailto:claire.vinatier@univ-nantes.fr)

**Keywords:** Senescence, Osteoarthritis, Etoposide, IL-1 $\beta$ , Chondrocytes

## **Abstract**

Senescent cells (SnCs) have been described to accumulate in osteoarthritis (OA) joint tissues in response to injury, thereby participating in OA development and progression. However, clinical therapeutic approaches targeting SnCs using senolysis although promising in preclinical OA models, have not yet prove their efficacy in patients with gonarthrosis. This pitfall may be due to the lack of knowledge of the mechanisms underlying chondrocyte senescence. Therefore, our study aimed to generate models of chondrocyte senescence.

This study used etoposide, to induce DNA damage-related senescence or chronic exposure to IL-1 $\beta$  to entail inflammation-related senescence in human OA chondrocytes. Several hallmarks of cellular senescence, such as cell cycle arrest, expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, DNA damages, and senescence-associated secretory profile were evaluated.

Chronic exposure to IL-1 $\beta$  induces only partial expression of senescence markers and does not allow us to conclude on its ability to induce senescence in chondrocytes. On the other hand, etoposide treatment reliably induces DNA damage-related senescence in human articular chondrocytes evidenced by loss of proliferative capacity, DNA damage accumulation, and SASP production.

Etoposide-induced senescence model may help investigate the initiation of cellular senescence in chondrocytes, and provide a useful model to develop therapeutic approaches to target senescence in OA.

## **Introduction**

Osteoarthritis (OA) is a debilitating disease affecting over 500 million people worldwide [1]. This disease impacts all joint tissues and is characterized by progressive cartilage degradation, synovitis, abnormal subchondral bone remodeling, and osteophyte formation [2]. These OA features lead to decreased joint function and mobility, pain, and impaired quality of life for patients [2]. Unfortunately, no disease-modifying drugs are available, and current treatments are limited to pain management and joint prosthetic replacement at the disease end-stage [3].

Among the many risk factors for OA, including obesity, female gender, history of traumatic joint injury, and genetic predisposition, aging is the primary driver of OA [4]. Thus with the global aging of the population, OA is placing a growing burden on society and the economy [5].

Cellular senescence has been described as one of the major drivers of aging [6] and has been implicated in the pathogenesis of many age-related diseases [7]. Recently, cellular senescence has emerged as a new target to treat OA [8]. Indeed, senescent cells (SnCs) are described to accumulate in joint tissues in response to injury and during aging, thereby participating in its development and progression [8–10]. SnCs exhibit irreversible growth arrest accompanied by increased expression of cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKi) such as p16, and p21, accumulation of DNA damages, and secretion of diverse bioactive molecules known as the senescence-associated secretory phenotype (SASP). This characteristic secretome includes pro-inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-6, IL-8, and matrix-degrading enzymes such as metalloproteinases (MMPs) among others [11], and promotes tissue degradation [12] and senescence propagation [13]. Because a specific marker for cellular senescence has yet to be identified, a combination of markers should be used to identify SnCs [14]. Considering the role of cellular senescence in age-related diseases including OA, the therapeutic potential of senolytic (drugs that induced SnCs death) and senomorphic (drugs that modulate the SASP) compounds have been contemplated with growing interest [15]. In OA, while it has been shown to reduce the severity of the disease in the murine model [8,16], the senolytic

UBX0101 failed to demonstrate clinical efficacy in humans. Yet, senolytics appear of interest in other diseases as clinical trials evaluating different senolytics such as the combination of Quercetin and Dasatinib for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis [17] and diabetic kidney disease [18], highlighted the safety of senolytics and presented encouraging results. Hence the search for senolytic or senomorphic compounds is thus a booming field of research notably in incurable and age-related diseases. However, in OA this race for identifying new senescence-modifying compounds is dramatically slowed by the lack of a complete understanding of the biological processes connecting the accumulation of SnCs in the joint and the OA pathology. Senescent cells have been described in all joint tissues, including the synovial membrane and articular cartilage. While the fundamental processes of senescence have been extensively studied in fibroblasts, this knowledge may not be fully transferable to chondrocytes senescence, which are highly specialized post-mitotic cells. Thus, disposing of robust chondrocyte senescence in vitro models could help to improve our knowledge of the biological mechanisms underlying chondrocyte senescence and enhance the development of OA senotherapies.

In vitro, cellular senescence can be initiated by a range of intrinsic and extrinsic signals such as, replicative stress, DNA damage, oncogenic signaling, oxidative stress, inflammation, irradiation, and/or chemotherapeutic agents, as examples [11]. Recently, IL-1 $\beta$ , a cytokine used in vitro to mimic the OA-associated inflammatory environment [19] has also been used to induce inflammation-related chondrocyte senescence [20–22]. In this IL-1 $\beta$ -induced chondrocytes senescence model, while senescence is a slow process to set up [23], markers of senescence were only studied over a short period (1-2 days), calling for longer-term studies to validate those previous results. Considering the variety of inductive signals potentially driving senescence, it appears reasonable to strengthen the senescence investigation by studying several models. In this context, our study aims to develop robust models of chondrocyte senescence by investigating the ability of etoposide and IL-1 $\beta$  treatments to produce a reliable chondrocyte senescent model.



## **Results**

An overview of the experimental design is given in [Fig. 1]. Chondrocytes isolated from the femoral condyles of OA patients (HACs) undergoing total knee replacement surgery were treated with increasing concentrations of etoposide (5, 10, and 20 $\mu$ M) or IL-1 $\beta$  (1 and 10 ng/mL).

### ***Etoposide but not IL-1 $\beta$ inhibits cell proliferation***

To first analyze whether etoposide and IL-1 $\beta$  induce a chondrocytes growth arrest, the proliferation of chondrocytes treated either with etoposide or IL-1 $\beta$  was evaluated. Our results indicated that chondrocytes treated with etoposide displayed a significantly reduced number of living chondrocytes as early as day 2 compared with the control condition [Fig. 2A]. Moreover, only the treatment at 20 $\mu$ M induced stable proliferation arrest for up to 8 days and was therefore chosen for the rest of the experiments. Quantification of DNA showing significantly reduced DNA concentration at day 8 confirmed these results [Fig. 2B]. On the contrary, IL-1 $\beta$  treatment [Fig. 2C] whatever the dose used (1 or 10 ng/mL) failed to halt cell proliferation, as indicated by similar cell viability and DNA concentration between control and IL-1 $\beta$  treated HACs [Fig. 2 C; D]. Comparable results were obtained with the chondrocytes line TC28A2 with 20 $\mu$ M etoposide treatment [Fig. S1A]. These data suggest that treatment with 20 $\mu$ M etoposide for 24h impaired cell-cycle progression. Conversely, IL-1 $\beta$  did not significantly impact cell proliferation.

### ***Etoposide induces the expression of CDKi.***

Since the stable growth arrest of SnCs is linked to the engagement of CDKi, we investigated whether etoposide or IL-1 $\beta$  can induce the expression of several CDKi at the transcriptional and protein level [Fig. 3A-D]. HACs treated with etoposide displayed as early as day 1, a significant increase in the expression of two CDKi, p21 (6.27-fold change) and p15 (1.72-fold change) compared to non-treated cells [Fig. 3A]. Their expressions remained significantly elevated throughout the experiment until day 8 [Fig. 3B]. A significant increase in p27 (1.26-fold change) was also observed on day 8. Surprisingly, p16 expression was significantly diminished (0.66-fold change) following etoposide treatment on day

1 [Fig. 3A], but remained comparable to the control condition on day 8 [Fig. 3B]. The elevated expression of p21, a downstream target of p53, suggested that the p53-p21 axis was involved, but p53 gene expression remained unchanged [Fig. 3A, B]. However, at the protein level, the p53 phosphorylated activated and total forms were increased (2.98-fold and 3.35-fold respectively) after 24h of etoposide treatment and stayed up-regulated until the end of the experiment (3.37-fold and 2.39-fold respectively) [Fig. 3C, D]. In line with the transcriptomic results, the p21 protein level was also significantly increased at both time points [Fig. 3C, D]. Similarly, in the TC28A2 chondrocytes line, 20 $\mu$ M etoposide treatment enhanced p21 expression on days 1 and 8 [Fig. S1B]

Surprisingly, in IL-1 $\beta$ -treated HACs [Fig. 3E-H] despite the lack of impact of IL-1 $\beta$  treatment on cell proliferation, p15 expression is significantly up-regulated from day 1 (5.52-fold) and remained so until day 8 (3.12-fold) [Fig. 3E, F]. However, on day 8 p21 and p27 expressions are down-regulated 0.69-fold and 0.59-fold respectively [Fig. 3F]. At the protein level [Fig. 3G, H], the phosphorylated form of p53 was undetectable, and its total form was significantly reduced in treated HACs versus HACs control at day 8. In line with the decrease in p21 gene expression on day 8, its protein level was significantly reduced.

#### ***Etoposide promotes cellular senescence by inducing DNA damage accumulation***

Since etoposide is a topoisomerase II inhibitor known to induce DNA damages, we analyzed the percentage of HACs positive for the DNA damage markers  $\gamma$ H2AX [Fig. 4]. At day 2, all conditions either etoposide or IL-1 $\beta$  treatments had a lower percentage of  $\gamma$ H2AX positive cells (respectively 13.8% and 12.62%) compared with the control condition (27.15%) [Fig. 4A, B]. But on day 8, the proportion of  $\gamma$ H2AX positive cells was drastically decreased in control and IL-1 $\beta$  conditions, except in etoposide-treated HACs, which maintained a higher level of  $\gamma$ H2AX positive cells [Fig. 4C, D]. Quantification of EdU-positive cells by immunofluorescence showed that Edu incorporation was significantly reduced in etoposide and IL-1 $\beta$  conditions at day 2 compared with the control, indicating a reduced cell proliferation [Fig. 4A, B]. On day 8, IL-1 $\beta$ -treated HACs exhibited a level of Edu-

positive cells equivalent to the control condition, whereas etoposide-treated HACs showed a lower level. SnCs are also characterized by hypertrophy and enlarged nucleus [24], therefore we also measured nuclei sizes across our conditions. On day 2, no difference in nucleus size was observed between the conditions. But at day 8, etoposide-treated HACs tend to display enlarged nuclei ( $203.67 \mu\text{m} \pm 2.65 \text{ SD}$ ) compared to control cells ( $180 \mu\text{m} \pm 10.07 \text{ SD}$ ) [Fig. 4D]. Of note, a higher dose of IL-1 $\beta$  (10 ng/mL), displays similar results as the 1ng/mL [Fig S2]. Thus, these data reinforce that treatment with 20  $\mu\text{M}$  etoposide for 24h can induce cellular senescence in HACs.

### ***Inflammation and SASP markers in HACs***

As the secretion of SASP is one of the four hallmarks of SnCs defined by the International Cell Senescence Association (ICSA), we next assessed the gene expression of several SASP markers following our treatments with etoposide or IL-1 $\beta$ . Among the various SASP components, we investigated the expression of the matrix metalloproteinase-3 (MMP3), MMP13, and the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), three enzymes implicated in cartilage degradation and fibrosis, and the cyclooxygenase-2 (COX-2) and the inducible nitric oxide synthase (iNOS) two enzymes respectively involved in the synthesis and production of prostaglandins and nitric oxide; two factors known to promote and supports inflammation [Fig. 5].

Etoposide treatment at day 1 induced significant but weak up-regulation in mRNA expression level of MMP3 (1.32-fold change) and COX-2 (1.20-fold change), and a slight tendency to increase PAI-1 (1.44-fold change) mRNA expression [Fig. 5A]. At day 8, only COX-2 is significantly increased by etoposide treatment, whereas MMP3, PAI-1, and iNOS showed only a trend of increase [Fig. 5B]. On the contrary, MMP13 expression was either not modified on day 1, or significantly decreased on day 8 following etoposide treatment. Similar results were also obtained in the TC28a2 cell line [Fig. S1, C]. In line with the observations at the gene expression level, etoposide treatment significantly increased the quantity of PAI-1 enzyme on day 8 (Fig.5D), whereas MMP3, MMP13, IL-6, and IL-8 in the supernatants were stable on day 1 and 8 (Fig.5C-D).

At day 1, IL-1 $\beta$ , as expected, significantly up-regulated the expression of MMP3 (106.07-fold change), and COX-2 (105.19-fold change), whereas only a trend toward increased expression of MMP13 (114.29-fold change), and iNOS (7207.7-fold change) was observed [Fig. 5E]. Only PAI-1 gene expression was unaffected. Overall at day 8, the gene expression of the previous markers remained similar to day 1, except for iNOS which increased significantly [Fig. 5F]. IL-1 $\beta$  enhanced the secretion of all markers including IL-6 and IL-8 as early as day 1 except for PAI-1 which tends to be reduced (Fig. 5 G-H). Interestingly, PAI-1 showed opposite profiles between the etoposide and IL-1 $\beta$  treatments, evidencing that despite sharing several markers, senescence and inflammation had different gene expression profiles for secretory molecules with variations in their intensity and kinetics.

## **Discussion**

With the emergence of senescence-targeted therapeutic strategies for OA, the mechanisms involved in chondrocyte senescence are being increasingly studied. However, there is currently a lack of human chondrocyte senescence models to study or screen potential treatments targeting chondrocyte senescence. In this study, we investigated two types of senescence inducers, etoposide, and IL-1 $\beta$  on chondrocytes to develop a robust model of chondrocyte senescence. Since OA chondrocytes are hypo-replicative cells and display a high level of DNA damage which could contribute to chondrocyte senescence[25,26], we aimed to generate a model of DNA damage-induced senescence in chondrocytes. To this end, etoposide, a topoisomerase II inhibitor known to induce senescence through the induction of double-strand breaks and the activation of the DNA damage response in other cell types[27,28] was investigated as chondrocytes senescence inducer. Furthermore, given the interconnection of chronic low-grade inflammation and senescence [29], we also investigated whether a chronic exposure to IL-1 $\beta$  could induce inflammation-related senescence in chondrocytes.

This study demonstrates that etoposide treatment of HACs reliably induces a DNA damage-related senescence. On the contrary, chronic treatment of IL-1 $\beta$  induces only partial expression of senescence markers and does not allow us to conclude on its ability to induce chondrocytes senescence. Indeed, in the absence of a universal and specific senescence marker, it may be challenging to differentiate senescence from other biological processes, especially between SASP and inflammation, whose markers overlap. In this regard, it is essential to characterize multiple biomarkers[11] to fully identify SnCs.

Our results indicate that, in our conditions, IL-1 $\beta$  does not trigger a permanent growth arrest. Since cell cycle arrest is one of the four interdependent hallmarks of senescence with SASP, macromolecular damage, and deregulated metabolism, this result questions the ability of IL-1 $\beta$  to induce cellular senescence, contrary to what has been assumed in various studies using IL-1 $\beta$

treatment [20–22]. Conversely, our etoposide model displays inhibition of proliferation even 8 days after the end of the treatment. Moreover, differences in the CDKi engaged following etoposide and IL-1 $\beta$  treatments are observed. Indeed, contrary to IL-1 $\beta$ , etoposide activates the p53/p21<sup>CIP1</sup> pathway in chondrocytes, consistent with the DNA damage-related senescence induced by etoposide and reported in other cell types [28,30].

Unexpectedly, the expression of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B, also known as p15<sup>INK4b</sup> and encoded by CDKN2B is up-regulated following both etoposide and IL-1 $\beta$  treatments. p15<sup>INK4b</sup> is also a member of the CDKi family, which forms a complex with CDK4 or CDK6, and prevents the activation of the CDK by cyclin D [31]. However, while p15<sup>INK4b</sup> is well-known for its role in cell cycle progression, it does not seem to impact cell growth in our experiments since IL-1 $\beta$ -treated cells exhibit a similar proliferation profile to the control condition. p15<sup>INK4B</sup> is downstream Raf-Mek-Erk and the PI3K/AKT/FOXO3 pathways [11] and wields other functions such as regulation of smooth muscle cells apoptosis [32,33] or regulation of hematopoietic cell fate [34]. In our experiments, its expression could be linked to apoptosis resistance due to cellular stress induced by both treatments, but this hypothesis should be investigated in future works.

In our etoposide-induced senescent chondrocytes model, some senescent features take time to occur and are only visible 8 days after the transient etoposide stimulation. Indeed, etoposide induces both accumulations of  $\gamma$ H2AX foci, a reduced Edu incorporation, and nuclei enlargement only at day 8. The accumulation of  $\gamma$ H2AX foci is a typical feature of the persistent double-strand break DNA damage in cellular senescence.

Interestingly, in our IL-1 $\beta$  condition, these senescent features are not found even after 8 days. Given that an increase in the number of  $\gamma$ H2AX positive cells in response to IL-1 $\beta$  has been reported [35,36] this lack of increased  $\gamma$ H2AX accumulation may be surprising. However, even with a higher dose of IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) similar to the dose used in the literature, we did not observe an increase in  $\gamma$ H2AX-

positive cells. Whether that could be related to differences in the cell model used remains to be further investigated.

Thirdly, we examined the gene expression of several SASP components. Among the described SASP markers, we selected five SASP factors-related genes, MMP3, MMP13, COX-2, iNOS, and PAI-1. As expected, IL-1 $\beta$  induced the expression of MMP3, MMP13, COX-2, and iNOS, which have historically been associated with inflammation in chondrocytes [37] and not solely with SASP. Our etoposide-induced senescent model also displayed elevated expression of MMP3, COX-2, and iNOS but of a lower magnitude than the inflammation response triggered by IL-1 $\beta$ . The lower level of expression of inflammation markers would be more consistent with the inflammaging concept [38], where chronic, low-grade inflammation promotes aging and is a major risk factor for age-related conditions such as Alzheimer's disease, atherosclerosis, macular degeneration and OA [39,40], and also as promoting senescence.

Interestingly, results from our study showed that senescent chondrocytes tend not to over-express MMP13. This is in line with other research teams' results [41,42], where senescence was induced with irradiation alone or combined with mitogenic stimulation using TGF- $\beta$  and bFGF on cartilage explants. The authors speculate that this may be because each senescent marker highlights a different subset of SnCs. But intriguingly, this observation remains consistent across all our studies, despite the use of different stimuli to induce senescence.

It is also worth noting that conversely to the IL-1 $\beta$  inflammation model where the expression of PAI-1 (SERPINE1) is decreased in line with previous observations in human articular cartilage [43], PAI-1 expression is upregulated in our etoposide-induced senescence model. PAI-1 is part of the serine-protease inhibitors and the principal physiological inhibitor of the plasminogen activators, urokinase (uPA), and tissue plasminogen activator (tPA) [44]. PAI-1 activity is known to increase with age, leading to reduced fibrinolytic activity. This reduced fibrinolytic activity participates in matrix tissue homeostasis disruption, promoting a profibrotic environment, and loss of tissue elasticity [44]. The

link between PAI-1 and senescence is well established in several models of senescence [45–47] and PAI-1 is considered a key marker of cellular senescence that contributes to the progression of various age-related diseases in humans such as emphysema, arterial thrombosis, arteriosclerosis, and hypertension [48,49]. PAI-1 has been identified as a fundamental component of the SASP, using a range of senescence induction stimuli such as replication, oxidative stress, chemotherapeutic agents, and irradiation in several human cell types [50]. The expression of PAI-1 has also been found to be significantly increased in human synovial tissues from OA patients [51,52]. We, therefore, propose that PAI-1 could serve as a marker of chondrocyte senescent SASP. As the SASP likely contributes to promote senescence in neighboring cells it could be relevant to develop inhibitors to dampen PAI-1 activity to slow cellular senescence spreading as well as prevent aging-related diseases including OA.

To complete our investigation on the reliability of the etoposide-induced DNA damage-related senescence in chondrocytes, we have demonstrated that etoposide is also able to induce senescence in the human chondrocytes cell line TC28a2. The use of the TC28a2 cell line offers the advantage of circumventing several limitations associated with the utilization of primary articular chondrocytes such as sample harvesting and preparation, the limited number of chondrocytes extracted per sample, and the inter-individual variability. The TC28a2 could thus enable the use of high throughput screening techniques to identify new senolytic and senomorphic compounds to target SnCs as a potential treatment for OA.

In conclusion, etoposide treatment was able to induce senescence in two types of human articular chondrocytes, HACs, and the TC28A2 cell line. In this model, senescence is evidenced by loss of proliferative capacity, DNA damage accumulation, and SASP production. This etoposide-induced senescence model may help investigate the initiation of cellular senescence in chondrocytes since a better comprehension of senescence induction and phenotype will help to develop therapeutic approaches to target senescence in OA.

## **Method**

### Isolation and amplification of primary human articular chondrocytes (HACs):

Primary human OA articular chondrocytes (HACs) were isolated from the femoral condyles of OA patients undergoing total knee arthroplasty. All samples were harvested from patients after their informed consent according to the Declaration of Helsinki. This study was carried out following the recommendation of the Committee for Person Protection of Pays de La Loire and approved by the French Ministry of Higher Education and Research (registration number: DC-2017-2987).

Upon reception, human articular cartilage was cut into small slices and digested at 37 °C with 0.2% type II collagenase for 30 min. Finally, slices were digested overnight at 37°C in 0.03% collagenase in DMEM (DMEM-Glutamax, 61965-026, Gibco) containing 10% fetal calf serum (FCS, S1810-500, Dominique Dutscher) and 1% penicillin/streptomycin (PS, 1000 U/mL, 15140122, Thermo Fisher Scientific) (complete medium). Cell suspensions were then filtered through a cell strainer with 70 µm pores and cells plated at  $6.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> (passage 0 (P0)) density. HACs were cultured in a complete medium. The cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and the culture medium was changed every 2-3 days. For all the experiments, the HACs were used at P1.

### Culture of TC28A2 chondrocytes

The TC28A2 chondrocytes (SCC042, Sigma Aldrich) were seeded at a density of 15 000 cells/cm<sup>2</sup> in a complete medium renewed every 2-3 days and cultured in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were subcultured when they reached 80-90% confluences. For the experiments, TC28A2 chondrocytes were used between passages 5 and 9.

### Chondrocytes treatments

The experimental layout is provided in Figure. 1. At Day-1 (D-1) chondrocytes were plated at a density of 15 000 cells/cm<sup>2</sup> in complete medium in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> and allowed to adhere for 24h. At D0, cells were treated either with 1 or 10 ng/mL of IL-1 $\beta$  (IL038, Millipore) for up to 8 days (red), and medium with IL-1 $\beta$  was replaced every 3 days, or with etoposide (E1383, Sigma-Aldrich), at 5, 10 or 20 $\mu$ M for 24h (blue) and the medium replaced by fresh complete medium without etoposide for the rest of the experiment, as previously described [23]. Subsequent analyses were performed on day 1, 2 and day 8 post-treatment as illustrated in figure 1.

#### Cell proliferation assay and Pico green analysis

At each indicated time, chondrocytes were trypsinized and the number of living cells was counted using Trypan Blue exclusion dye. Total DNA content was quantified with Pico-green (Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Reagent, Invitrogen™, P11496) according to the manufacturer's instructions.

#### RNA extraction and Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

RNA was extracted using a NucleoSpin® RNA XS kit (74092, Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions. RNA yield was measured using NanoDrop™ 1000 Spectrophotometers (Thermo Scientific™). Reverse transcription was performed using the Verso cDNA Synthesis Kit (AB1453B, Thermo Scientific™). Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed using specific primers (Table 1) with SYBR™ Select Master Mix (4472908, Applied Biosystems™) on the CFX96 Touch Real-time PCR Detection System (Bio-Rad). GUS-B and PPIA were used as reference genes and results were expressed as relative expression levels using the Pfaffl method [53].

#### Western blot

Whole-cell lysates were collected and lysed in ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1 mM Nonidet P-40, 0.5 mM Sodium deoxycholate, 20 mM EDTA) supplemented with protease

and phosphatase inhibitor mixture (Sigma Aldrich, P8340 and P044). Protein concentration was measured with the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™, 23225). 20 µg of proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) on a 4-15% polyacrylamide Criterion™ TGX Stain-Free™ gel (Bio-rad) and transferred into polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Trans-Blot Turbo Midi 0.2 µm PVDF Transfer Packs BioRad) using a Trans-Blot Turbo System (BioRad). Membranes were blocked in 5% non-fat dry milk or p53, P-p53, and actin or 3% BSA for p21 in tris-buffered saline 1% tween (TBS-T). The membranes were immunoblotted with the following antibodies: anti-p53 (Cell Signaling Technology, sc126, 1/1000), anti-P-p53 (Cell Signaling Technology, 9284, 1/1000), anti-p21 (Abcam, ab109520, 1/5000); and anti-Actin (Sigma Aldrich, A2228, 1/5000) overnight at 4°C in TBS-T 5% non-fat dry milk.

Blots were incubated with HRP conjugated secondary antibodies (Cell Signaling Technology, 7074S, 1/2 000 or 7076 CST, 1/80 000 in TBS-T 5% non-fat dry milk), and signals detected with SuperSignal™ West Femto (Thermo Scientific™, 34094) or SuperSignal™ West Dura (Thermo Scientific™, 34075). The images of the blots were analyzed with Image Lab software (Bio-Rad Laboratories, version 6.1.0) and normalized versus actin.

#### Supernatant analysis

Culture supernatants were collected on days 1 and 8 and stored at -80°C until analysis. In parallel, the DNA content of each condition was quantified with Pico-green analysis as previously described. The concentrations of IL-6, IL-8, MMP3, MM13, and PAI-1 in the supernatant were measured simultaneously using a multiplex cytokine assay. The human Luminex discovery assay (LXSAHM, Bio-Techne Ltd.) was used according to the manufacturer's, and Do measurements were performed using Bio-Plex™200 System (Bio-Rad Laboratories) plate reader. The concentration obtained for each cytokine and enzyme was normalized versus the DNA content of the matching condition.

### Immunofluorescence assays

For EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) staining, HACs were seeded on glass coverslips placed in MW24. At the end of days 1 and 7, Edu (Click-iT™ EdU Cell Proliferation Kit for Imaging, Alexa Fluor™ 488 dye, Invitrogen™) was added to culture media at a final concentration of 10 μM and incubated overnight at 37°C. HACs were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) at RT for 15 min and rinsed 3 times in phosphate-buffered saline (PBS) 1X and stored in PBS 1X, 1% PFA at 4°C until the end of the experiment. The cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 20 min and rinsed twice in PBS 1X, 3% BSA. Click-iT® reaction cocktail was prepared according to the manufacturer's instructions and applied for 30 min at room temperature (RT), protected from light. The cells were then washed once with PBS 1X, 3% BSA. Subsequently, for phosphorylated histone H2AX on serine 139 (γH2AX) staining, cells were incubated with 5% normal goat serum and 0.3% triton in PBS for 1h at RT. The blockage solution was then removed and HACs were incubated with γH2AX antibody (Cell Signalling Technology, 9718, 1/400) at 4°C overnight. The next day, cells were washed 3 times in PBS and incubated with Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG (ThermoFisher Scientific, A21244, 1/500) for 1h at RT and with Hoechst 2ug/mL for 20 min. Coverslips were mounted with ProLong™ Gold Antifade Mountant (Invitrogen™, P36930). Images were acquired with a confocal microscope (Nikon A1R-s Confocal Microscope) and quantifications were performed using the Image J software, to measure cell positivity for γH2AX and EdU and cell surface area; at least 100 cells per condition were analyzed.

### Statistical analyses

Statistical analyses and plotting were performed using GraphPad 8 Prism Software. For all experiments, outliers were identified using the Grubbs test with  $\alpha = 0.05$  and were excluded from subsequent analysis. For in vitro experiments, distribution was assessed using the Shapiro-Wilk normality test. If data passed the normality test, they were subsequently analyzed by paired t-test or Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons. Otherwise, we use the Wilcoxon matched-pairs test. P values equal or less than 0.05 were considered significant, \* $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

## **Authors contributions**

MG, JG, and CV conceived the study, designed, and supervised the experiment. MG, NB, AD, CB, SA, BH, and DW performed the experiment, analyzed data, and/or provide samples. MG and CV drafted the article and AD, NB, CB, AFC, GG and JG contributed to the critical revision of the article. CV and JG provide financial support. All authors have read and approved the final manuscript.

## **Acknowledgments:**

We acknowledge the IBISA MicroPICell facility (Biogenouest), a member of the national infrastructure France-Bioimaging supported by the French national research agency (ANR-10-INBS-04).

## **Conflict of interest:**

The authors declare that they have no competing interests.

## **Funding source:**

The authors are grateful to the Agence Nationale de la Recherche (ANR) for funding the projects JCJC KLOTHOA (ANR-18-CE14-0024-01; CV), the Foundation for Research in Rheumatology for funding the project FOREUM-EULAR SEN-OA (CV, JG, MG), the region of the Pays de la Loire RFI BIOREGATE for funding the projects GENOA (CV, AD), and INSERM for funding the cross-disciplinary program AGEMED 2.0 (JG, CV) for their financial support.

## **References**

1. Leifer VP, Katz JN, Losina E. The burden of OA-health services and economics. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2022; 30: 10–6.
2. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring MB, Goldring SR, Jones G, Teichtahl AJ, Pelletier J-P. Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers*. Nature Publishing Group; 2016; 2: 1–18.
3. Kolasinski SL, Neogi T, Hochberg MC, Oatis C, Guyatt G, Block J, Callahan L, Copenhaver C, Dodge C, Felson D, Gellar K, Harvey WF, Hawker G, et al. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Rheumatol*. 2020; 72: 220–33.

4. Garstang SV, Stitik TP. Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *Am J Phys Med Rehabil.* 2006; 85: S2-11; quiz S12-14.
5. Hunter DJ, Schofield D, Callander E. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* Nature Publishing Group; 2014; 10: 437–41.
6. Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med.* 2015; 21: 1424–35.
7. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Nature Publishing Group; 2014; 15: 482–96.
8. Jeon OH, Kim C, Laberge R-M, Demaria M, Rathod S, Vasserot AP, Chung JW, Kim DH, Poon Y, David N, Baker DJ, Deursen JM van, Campisi J, et al. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nature Medicine.* 2017; 23: 775–81.
9. Xu M, Bradley EW, Weivoda MM, Hwang SM, Pirtskhalava T, Decklever T, Curran GL, Ogradnik M, Jurk D, Johnson KO, Lowe V, Tchkonja T, Westendorf JJ, et al. Transplanted Senescent Cells Induce an Osteoarthritis-Like Condition in Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2017; 72: 780–5.
10. Diekmann BO, Sessions GA, Collins JA, Knecht AK, Strum SL, Mitin NK, Carlson CS, Loeser RF, Sharpless NE. Expression of p16INK 4a is a biomarker of chondrocyte aging but does not cause osteoarthritis. *Aging Cell* [Internet]. 2018 [cited 2019 Oct 29]; 17. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6052464/>
11. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology.* 2018; 28: 436–53.
12. Coryell PR, Diekmann BO, Loeser RF. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology.* Nature Publishing Group; 2021; 17: 47–57.
13. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, Athineos D, Kang T-W, Lasitschka F, Andrulis M, Pascual G, Morris KJ, Khan S, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol.* 2013; 15: 978–90.
14. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, Campisi J, Collado M, Evangelou K, Ferbeyre G, Gil J, Hara E, Krizhanovskiy V, et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell.* 2019; 179: 813–27.
15. Martel J, Ojcius DM, Wu C-Y, Peng H-H, Voisin L, Perfettini J-L, Ko Y-F, Young JD. Emerging use of senolytics and senomorphics against aging and chronic diseases. *Medicinal Research Reviews.* 2020; 40: 2114–31.
16. Yang H, Chen C, Chen H, Duan X, Li J, Zhou Y, Zeng W, Yang L. Navitoclax (ABT263) reduces inflammation and promotes chondrogenic phenotype by clearing senescent osteoarthritic chondrocytes in osteoarthritis. *Aging.* 2020; 12: 12750–70.
17. Justice JN, Nambiar AM, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Pascual R, Hashmi SK, Prata L, Masternak MM, Kritchevsky SB, Musi N, Kirkland JL. Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine.* 2019; 40: 554–63.

18. Hickson LJ, Langhi Prata LGP, Bobart SA, Evans TK, Giorgadze N, Hashmi SK, Herrmann SM, Jensen MD, Jia Q, Jordan KL, Kellogg TA, Khosla S, Koerber DM, et al. Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *EBioMedicine*. 2019; 47: 446–56.
19. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier J-P, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. Nature Publishing Group; 2011; 7: 33–42.
20. Dai S-M, Shan Z-Z, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Yudoh K. Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2006; 54: 818–31.
21. Chai B, Zheng Z-H, Liao X, Li K-Y, Liang J-S, Huang Y-X, Tong C-J, Ou D-J, Lu J. The protective role of omentin-1 in IL-1 $\beta$ -induced chondrocyte senescence. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2020; 48: 8–14.
22. Lü G, Li L, Wang B, Kuang L. LINC00623/miR-101/HRAS axis modulates IL-1 $\beta$ -mediated ECM degradation, apoptosis and senescence of osteoarthritis chondrocytes. *Aging (Albany NY)*. 2020; 12: 3218–37.
23. Petrova NV, Velichko AK, Razin SV, Kantidze OL. Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell*. 2016; 15: 999–1017.
24. Heckenbach I, Mkrtchyan GV, Ezra MB, Bakula D, Madsen JS, Nielsen MH, Oró D, Osborne B, Covarrubias AJ, Idda ML, Gorospe M, Mortensen L, Verdin E, et al. Nuclear morphology is a deep learning biomarker of cellular senescence. *Nat Aging*. Nature Publishing Group; 2022; 2: 742–55.
25. Chen AF, Davies CM, De Lin M, Fermor B. Oxidative DNA damage in osteoarthritic porcine articular cartilage. *Journal of Cellular Physiology*. 2008; 217: 828–33.
26. Rose J, Söder S, Skhirtladze C, Schmitz N, Gebhard PM, Sesselmann S, Aigner T. DNA damage, discoordinated gene expression and cellular senescence in osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2012; 20: 1020–8.
27. Biran A, Zada L, Abou Karam P, Vadai E, Roitman L, Ovadya Y, Porat Z, Krizhanovsky V. Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell*. 2017; 16: 661–71.
28. Teng Y-N, Chang H-C, Chao Y-Y, Cheng H-L, Lien W-C, Wang C-Y. Etoposide Triggers Cellular Senescence by Inducing Multiple Centrosomes and Primary Cilia in Adrenocortical Tumor Cells. *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2021; 10: 1466.
29. Vinatier C, Domínguez E, Guicheux J, Caramés B. Role of the Inflammation-Autophagy-Senescence Integrative Network in Osteoarthritis. *Frontiers in Physiology* [Internet]. 2018 [cited 2022 Oct 12]; 9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.00706>
30. You K, Parikh P, Khandalavala K, Wicher SA, Manlove L, Yang B, Roesler A, Roos BB, Teske JJ, Britt RD, Pabelick CM, Prakash YS. Moderate hyperoxia induces senescence in developing human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2019; 317: L525–36.

31. Chang C-N, Feng M-J, Chen Y-L, Yuan R-H, Jeng Y-M. p15(PAF) is an Rb/E2F-regulated S-phase protein essential for DNA synthesis and cell cycle progression. *PLoS One*. 2013; 8: e61196.
32. Grond-Ginsbach C, Pjontek R, Aksay SS, Hyhlik-Dürr A, Böckler D, Gross-Weissmann M-L. Spontaneous arterial dissection: phenotype and molecular pathogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67: 1799–815.
33. Leeper NJ, Raiesdana A, Kojima Y, Kundu RK, Cheng H, Maegdefessel L, Toh R, Ahn G-O, Ali ZA, Anderson DR, Miller CL, Roberts SC, Spin JM, et al. Loss of CDKN2B promotes p53-dependent smooth muscle cell apoptosis and aneurysm formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33: e1–10.
34. Wolff L, Bies J. p15Ink4b Functions in Determining Hematopoietic Cell Fates: Implications for its Role as a Tumor Suppressor. *Blood Cells Mol Dis*. 2013; 50: 227–31.
35. Platas J, Guillén MI, Caz MDP del, Gomar F, Castejón MA, Mirabet V, Alcaraz MJ. Paracrine effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells in inflammatory stress-induced senescence features of osteoarthritic chondrocytes. *Aging*. 2016; 8: 1703–17.
36. Si H, Yang T, Li L, Tian M, Zhou L, Li D, Huang Q, Kang P, Yang J, Zhou Z, Cheng J, Shen B. miR-140 Attenuates the Progression of Early-Stage Osteoarthritis by Retarding Chondrocyte Senescence. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2020; 19: 15–30.
37. Jenei-Lanzl Z, Meurer A, Zaucke F. Interleukin-1 $\beta$  signaling in osteoarthritis – chondrocytes in focus. *Cellular Signalling*. 2019; 53: 212–23.
38. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013; 153: 1194–217.
39. Franceschi C, Campisi J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *The Journals of Gerontology: Series A*. 2014; 69: S4–9.
40. Greene MA, Loeser RF. Aging-related inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2015; 23: 1966–71.
41. Sessions GA, Copp ME, Liu J-Y, Sinkler MA, D’Costa S, Diekman BO. Controlled induction and targeted elimination of p16INK4a-expressing chondrocytes in cartilage explant culture. *FASEB J*. 2019; 33: 12364–73.
42. Copp ME, Flanders MC, Gagliardi R, Gilbertie JM, Sessions GA, Chubinskaya S, Loeser RF, Schnabel LV, Diekman BO. The combination of mitogenic stimulation and DNA damage induces chondrocyte senescence. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2021; 29: 402–12.
43. Campbell IK, Last K, Novak U, Lund LR, Hamilton JA. Recombinant human interleukin-1 inhibits plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) production by human articular cartilage and chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1991; 174: 251–7.
44. Sillen M, Declerck PJ. A Narrative Review on Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Its (Patho)Physiological Role: To Target or Not to Target? *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2021; 22: 2721.

45. Jiang C, Liu G, Luckhardt T, Antony V, Zhou Y, Carter AB, Thannickal VJ, Liu R-M. Serpine 1 induces alveolar type II cell senescence through activating p53-p21-Rb pathway in fibrotic lung disease. *Aging Cell*. 2017; 16: 1114–24.
46. Samarakoon R, Higgins SP, Higgins CE, Higgins PJ. The TGF- $\beta$ 1/p53/PAI-1 Signaling Axis in Vascular Senescence: Role of Caveolin-1. *Biomolecules* [Internet]. 2019 [cited 2019 Sep 13]; 9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6723262/>
47. Sun T, Ghosh AK, Eren M, Miyata T, Vaughan DE. PAI-1 contributes to homocysteine-induced cellular senescence. *Cell Signal*. 2019; 64: 109394.
48. Eren M, Boe AE, Klyachko EA, Vaughan DE. Role of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Senescence and Aging. *Semin Thromb Hemost*. 2014; 40: 645–51.
49. Vaughan DE, Rai R, Khan SS, Eren M, Ghosh AK. PAI-1 is a Marker and a Mediator of Senescence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017; 37: 1446–52.
50. Özcan S, Alessio N, Acar MBB, Mert E, Omerli F, Peluso G, Galderisi U. Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. *Aging*. 2016; 8: 1316–27.
51. Busso N, Péclat V, So A, Sappino A-P. Plasminogen activation in synovial tissues: differences between normal, osteoarthritis, and rheumatoid arthritis joints. *Annals of the Rheumatic Diseases*. BMJ Publishing Group Ltd; 1997; 56: 550–7.
52. Cerinic MM, Generini S, Partsch G, Pignone A, Dini G, Konttinen YT, Del Rosso M. Synoviocytes from osteoarthritis and rheumatoid arthritis produce plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 and display u-PA receptors on their surface. *Life Sciences*. 1998; 63: 441–53.
53. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001; 29: e45.

**Figure 1. Experimental design.** To investigate senescence in chondrocytes, primary human articular chondrocytes (HACs) were stimulated with etoposide for 24h (blue) or with IL-1 $\beta$  for 8 days (red) with treatment renewal at days 3 and 6. Senescence features were assessed at days 1 and 8 in both conditions by qPCR, WB, and immunofluorescence at days 2 and 8. *Figure created with BioRender.com.*

**Figure 2. Impact of Etoposide and IL-1 $\beta$  treatments on HACs viability.** HACs were treated with etoposide (blue) at 5, 10 or 20 $\mu$ M (**A, B**) for 24h and then cultured in normal media or with IL-1 $\beta$  (red) at 1 and 10 ng/mL (**C, D**) for the length of the experiment. (**A, C**) The number of viable cells was assessed by trypan blue exclusion dye. (**B, D**) DNA quantification in Etoposide and IL-1 $\beta$  treated HACs at day 1 and day 8. Data are shown as mean  $\pm$  SD, (n=3). P-values were calculated by the 2way ANOVA test, \*p $\leq$ 0.05; \*\*p $<$ 0.01; \*\*\*p $<$ 0.001; \*\*\*\*p $<$ 0.0001.

**Figure 3. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in Etoposide, and IL-1 $\beta$  treated HACs.** HACs were treated with etoposide (blue) at 20 $\mu$ M for 24h or IL-1 $\beta$  (red) at 1ng/mL for the length of the experiment and the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors evaluated by RT-qPCR (**A-B; E-F**) and WB (**C-D; G-H**) at day 1 (**A, C, E, G**) and day 8 (**B, D, F, H**). Data are shown as mean  $\pm$  SD, (n $\geq$ 3). P-values were calculated by t-test, \*p $\leq$ 0.05; \*\*p $<$ 0.01; \*\*\*p $<$ 0.001.

**Figure 4. Verification of senescence induction in Etoposide, and IL-1 $\beta$  treated HACs.** HACs were treated with Etoposide 20 $\mu$ M (blue) for 24h or IL-1 $\beta$  (red) at 1ng/mL for the length of the experiment. (**A, C**)  $\gamma$ H2AX immunofluorescence was used to identify DNA damage, EdU to identify proliferative cells and Hoechst staining to visualize the nucleus at day 2 (**A**) and day 8 (**C**); scale bar = 50 $\mu$ m. (**B, D**) The images were analyzed by quantification of positive cells for  $\gamma$ H2AX and EdU normalized versus the total number of cells obtained with the Hoechst staining at each time (**B** = day 2 and **D** = day 8) as well as cell quantification of the nucleus surface stained with Hoechst. Data are shown as mean  $\pm$  SD, (n=3). P-values were calculated by t-test, \*\*p $<$ 0.01.

**Figure 5. SASP markers in Etoposide and IL-1 $\beta$  treated HACs.** (A-D) HACs were treated with Etoposide (blue) at 20 $\mu$ M for 24h or (E-H) IL-1 $\beta$  (red) at 1ng/mL for the length of the experiment. The expressions of SASP markers were evaluated by RT-qPCR at day 1 (A, E) and day 8 (B, F), and SASP components were quantified by Luminex assay in the culture medium at day 1 (C, G) and 8 (D, H). Data are shown as mean  $\pm$  SD, (n $\geq$ 3). P-values were calculated by t-test, \*p $\leq$ 0.05; \*\*p $<$ 0.01.

**Supplementary Figure 1. Impact of Etoposide on the TC28a2 chondrocyte cell line.** TC28a2 were treated with etoposide (blue) at 20 $\mu$ M for 24h and then cultured in normal media for the length of the experiment. (A) The number of viable cells was assessed by trypan blue exclusion dye. Data are shown as mean  $\pm$  SD, (n=3). P-values were calculated by the 2way ANOVA test. \*\*\*p $<$ 0,001. (B, C) The expressions of cyclin-dependent kinase inhibitors (B) and SASP markers (C) were evaluated by RT-qPCR at the indicated times. Data are shown as mean  $\pm$  SD, (n $\geq$ 3). P-values were calculated by t-test, \*p $\leq$ 0.05; \*\*\*p $<$ 0.001.

**Supplementary Figure 2. Comparison of the impact of two doses of IL-1 $\beta$  (1 and 10ng/mL).** HACs were treated with IL-1 $\beta$  at 1 and 10ng/mL for the length of the experiment. (A, C)  $\gamma$ H2AX immunofluorescence was used to identify DNA damage, EdU to identify proliferative cells and Hoechst staining to visualize the nucleus at day 2 (A) and day 8 (C); scale bar = 50 $\mu$ m. (B, D) The images were analyzed by quantification of positive cells for  $\gamma$ H2AX and EdU normalized versus the total number of cells obtained with the Hoechst staining at each time (B = day 2 and D = day 8) as well as cell quantification of the nucleus surface stained with Hoechst. Data are shown as mean  $\pm$  SD, (n=3). P-values were calculated by t-test, \*p $\leq$ 0.05; \*\*p $<$ 0.01.

Gene	Forward	Reverse
<b>CDKN1A - p21</b>	5'- GCAGACCAGCATGACAGATTC -3'	5'- GCGGATTAGGGCTTCCTCTT -3'
<b>CDKN2A - p16</b>	5'- AAGGTCCTCAGACATCCCC -3'	5'- CCCTGTAGGACCTTCGGTGAC -3'
<b>CDKN2B - p15</b>	5'- GCGGGGACTAGTGGAGAAG -3'	5'- CTCCGAAACGGTTGACTC -3'
<b>p53</b>	5'- CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG -3'	5'- TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC -3'
<b>CDKN1B - p27</b>	5'- ATAAGGAAGCGACCTGCAACCG -3'	5'- TTCTTGGGCGTCTGCTCCACAG -3'
<b>MMP3</b>	5'- CACTCACAGACCTGACTCGGTT -3'	5'- AGCAGGATCACAGTTGGCTGG -3' -3'
<b>MMP13</b>	5'- CCAGTCTCCGAGGAGAAACA -3'	5'- AAAAACAGCTCCGCATCAAC -3'
<b>PAI-1</b>	5'- CTCATCAGCCACTGGAAAGGCA -3'	5'- GACTCGTGAAGTCAGCCTGAAAC -3'
<b>COX-2</b>	5'- CTTCACGCATCAGTTTTTCAAG -3'	5'- TCACCGTAAATATGATTTAAGTCCAC -3'
<b>iNOS</b>	5'- GCTCAAATCTCGGCAGAATC -3'	5'- GCCATCCTCACAGGAGAGTT -3'
<b>Gus-b</b>	5'- CGCCTGCCTATCTGTATTC -3'	5'- TCCCCACAGGGAGTGTGTAG -3'
<b>PPIA</b>	5'- ATGCTGGACCCAACACAAT -3'	5'- TCTTTCACTTTGCCAACACC -3'

*Table 1: List of PCR primers*

Figure 1

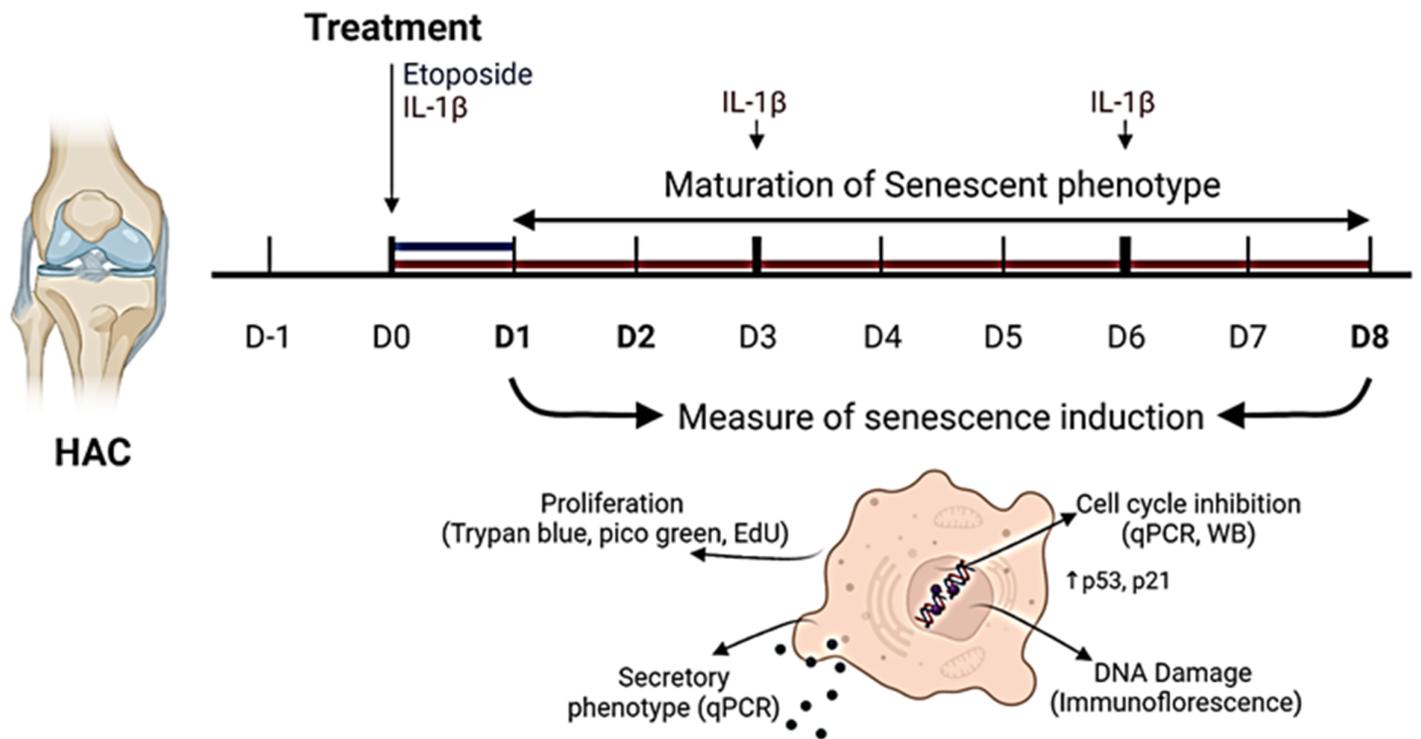


Figure 2

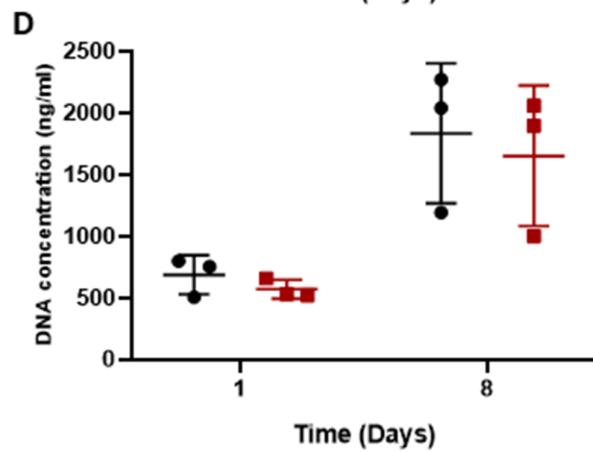
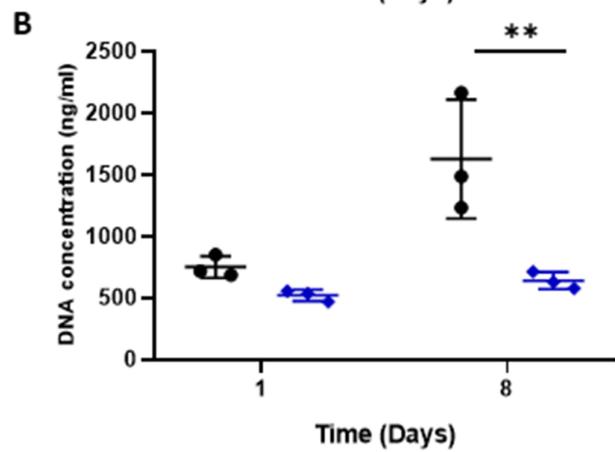
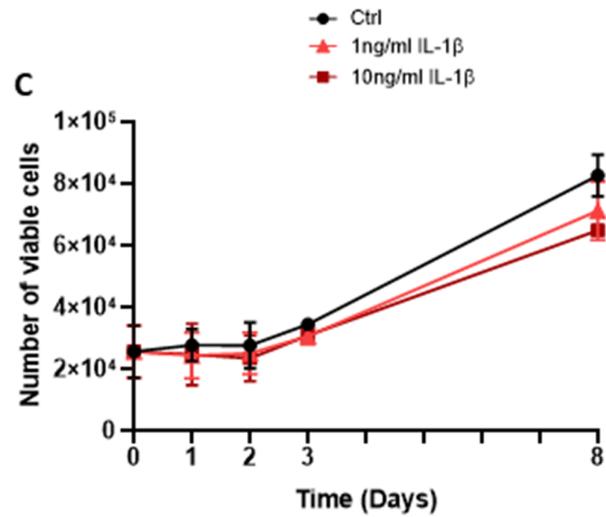
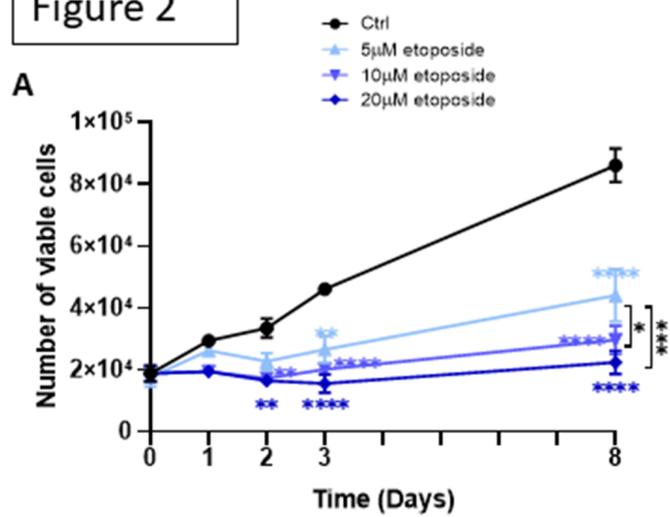


Figure 3

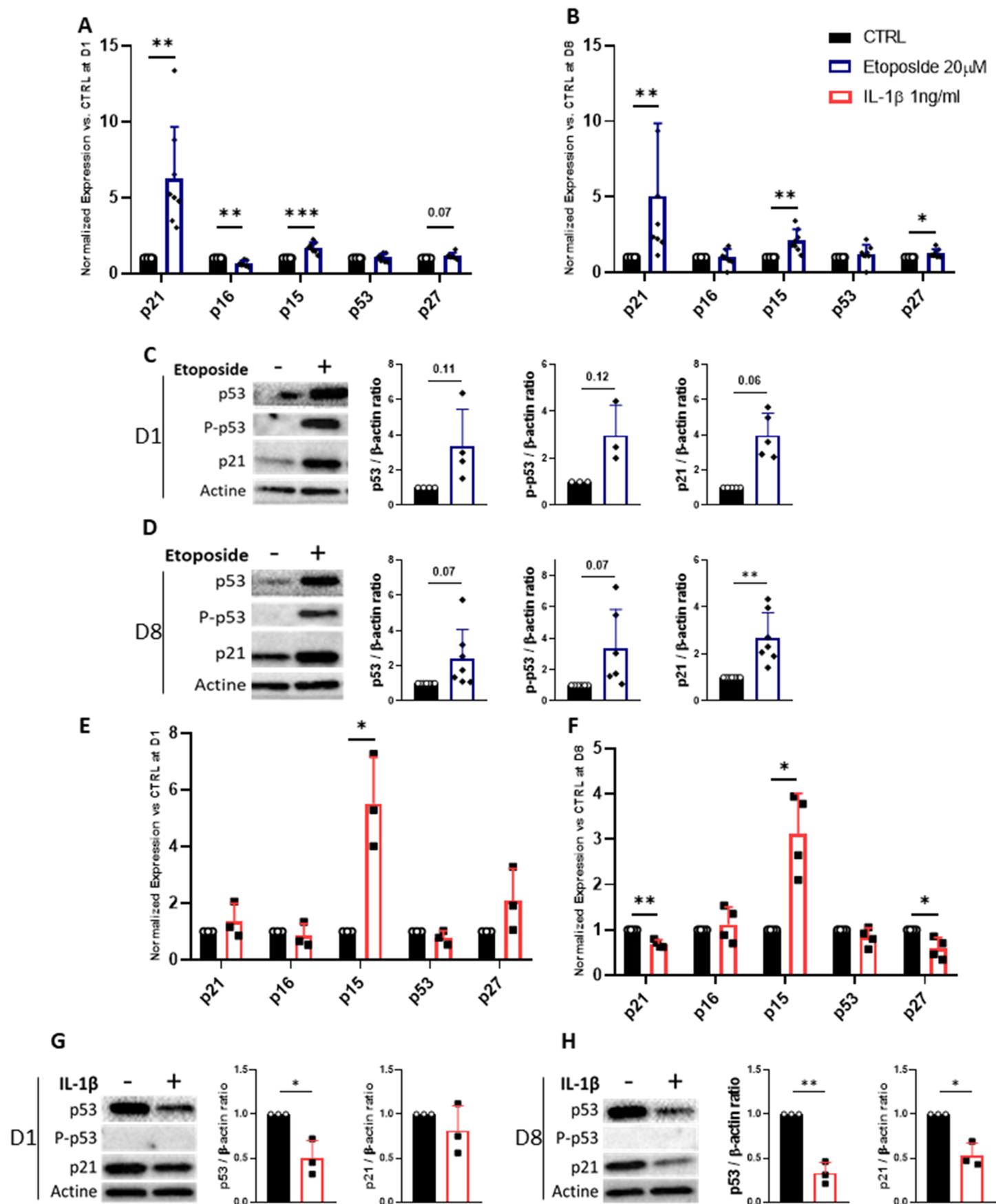


Figure 4

■ CTRL    □ IL-1 $\beta$  1ng/ml    □ Etoposide 20 $\mu$ M

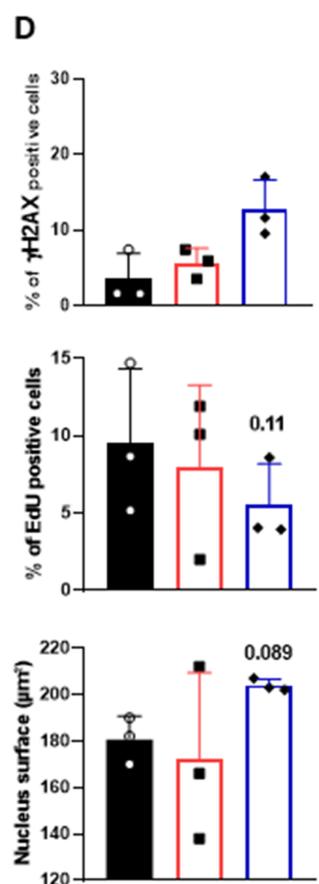
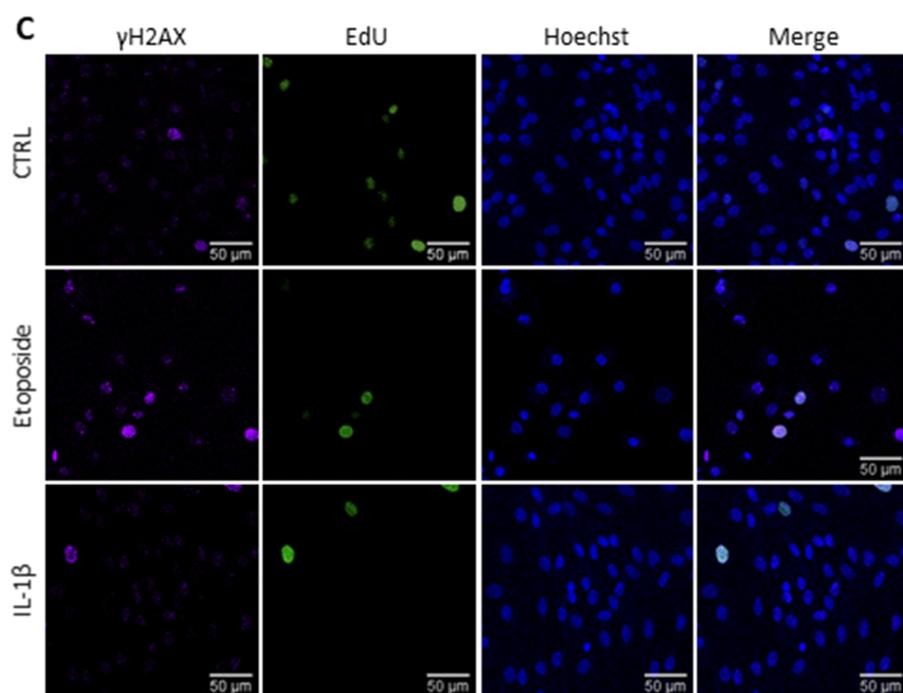
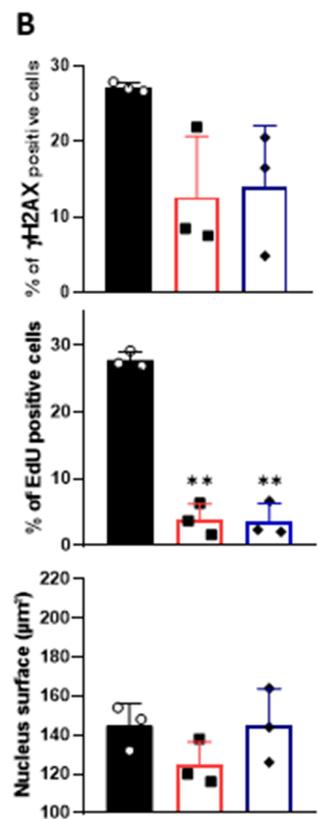
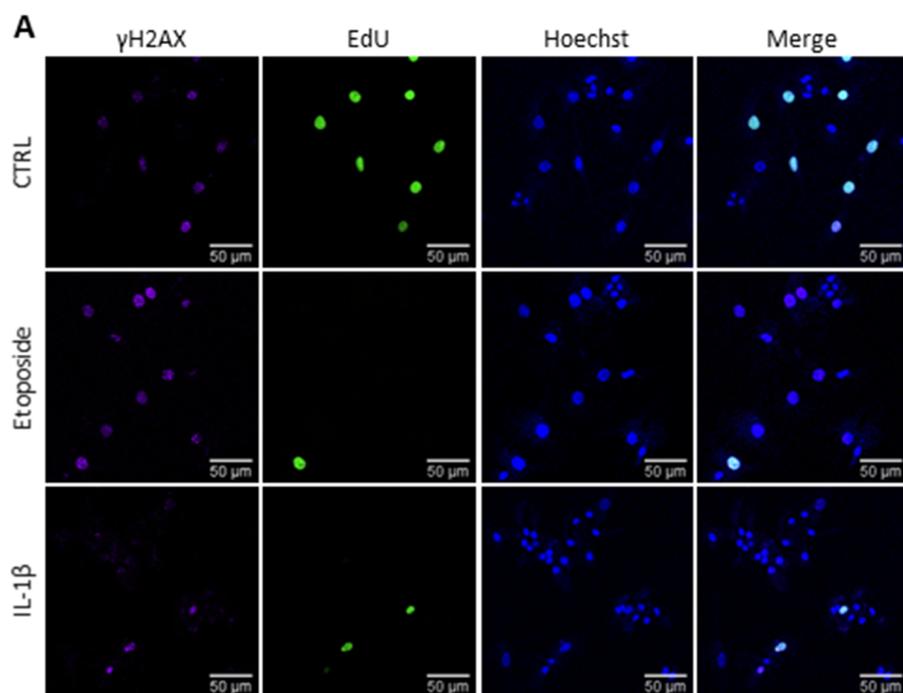
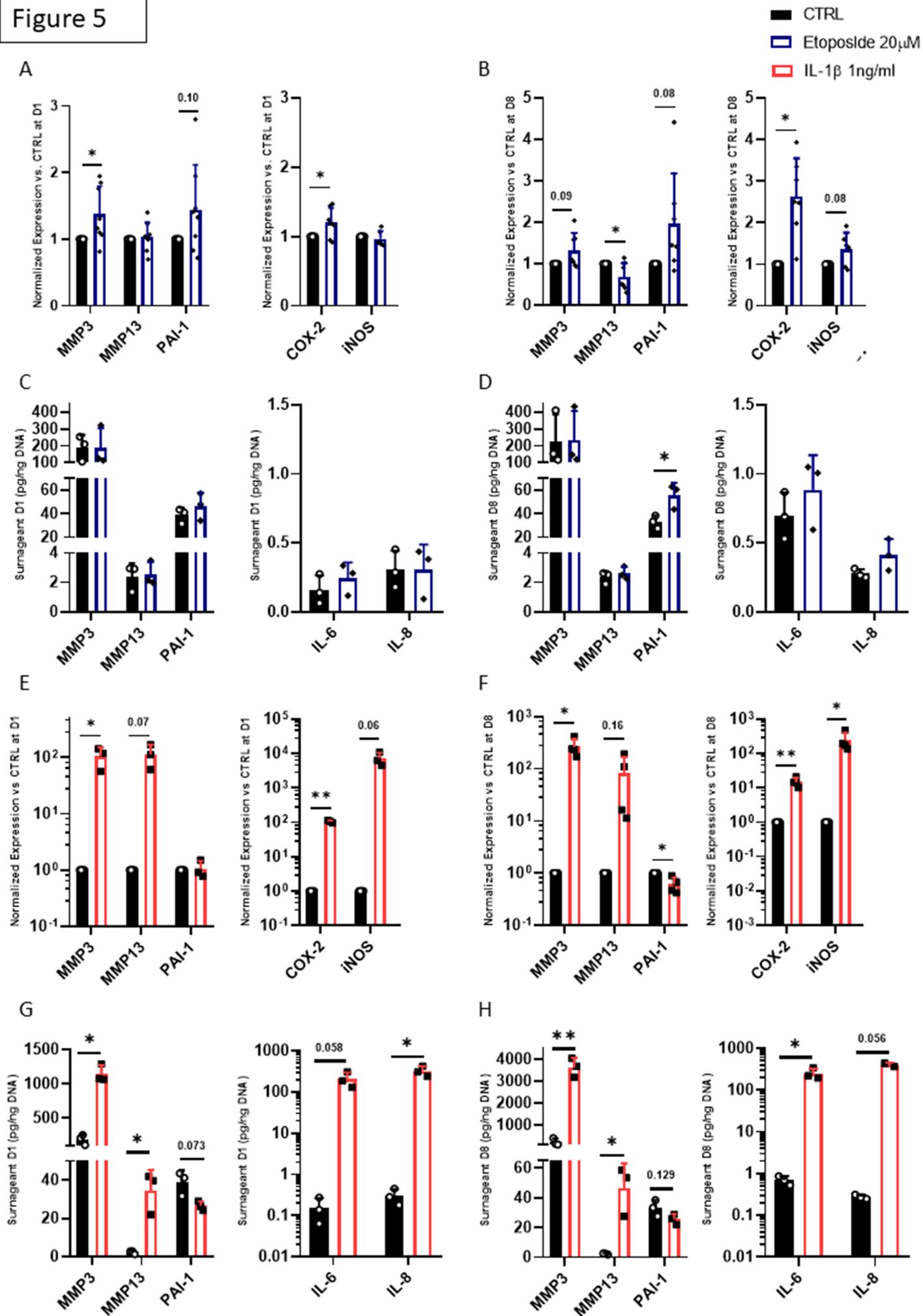
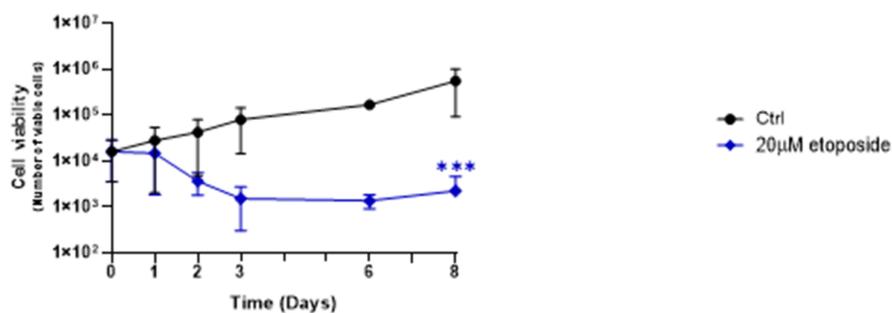


Figure 5

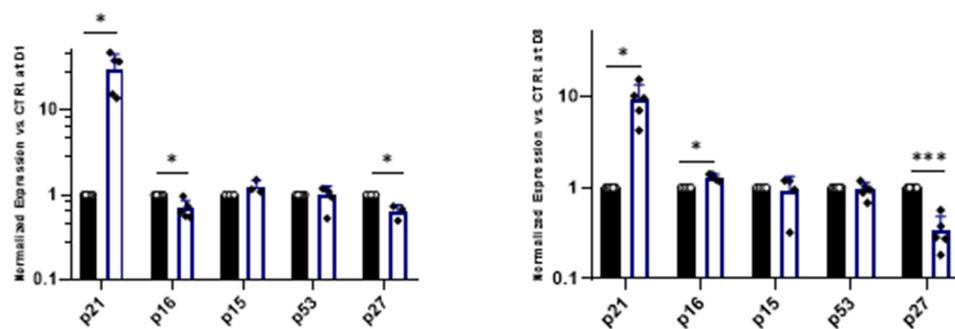


# Supplementary Figure 1

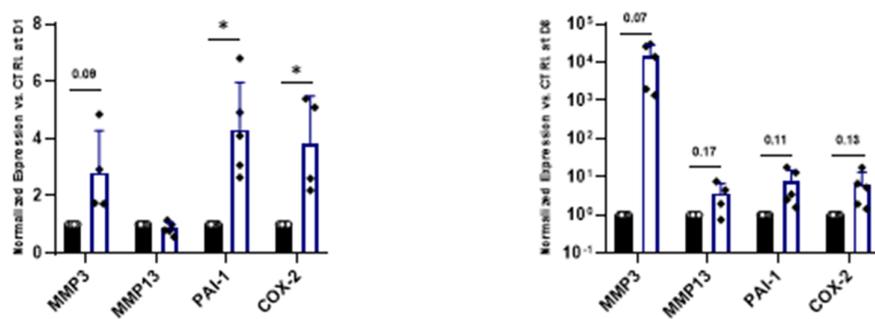
**A**



**B**

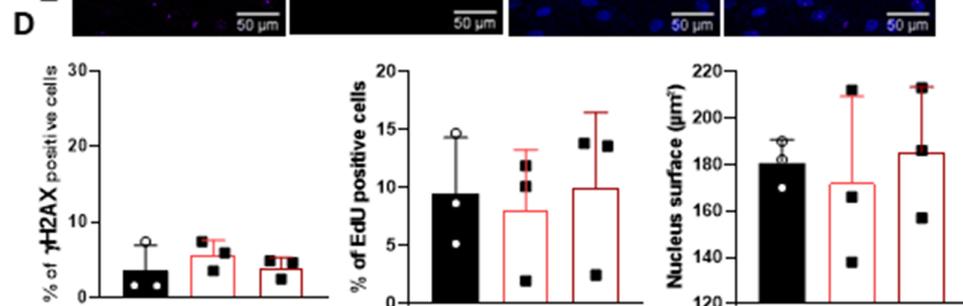
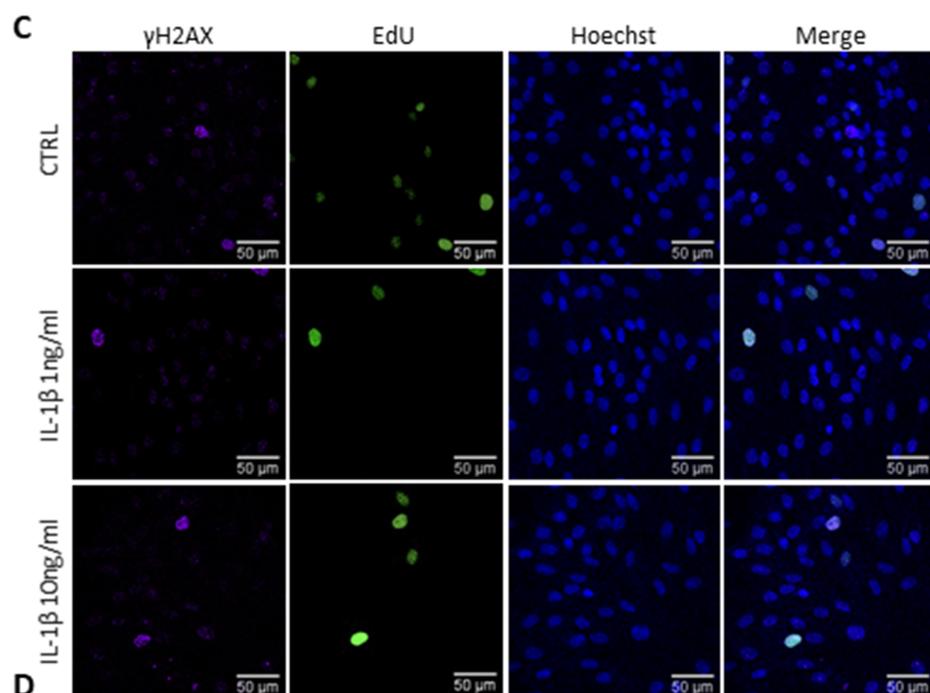
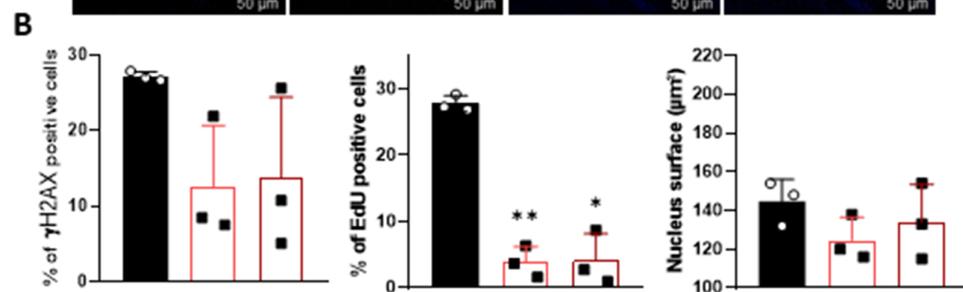
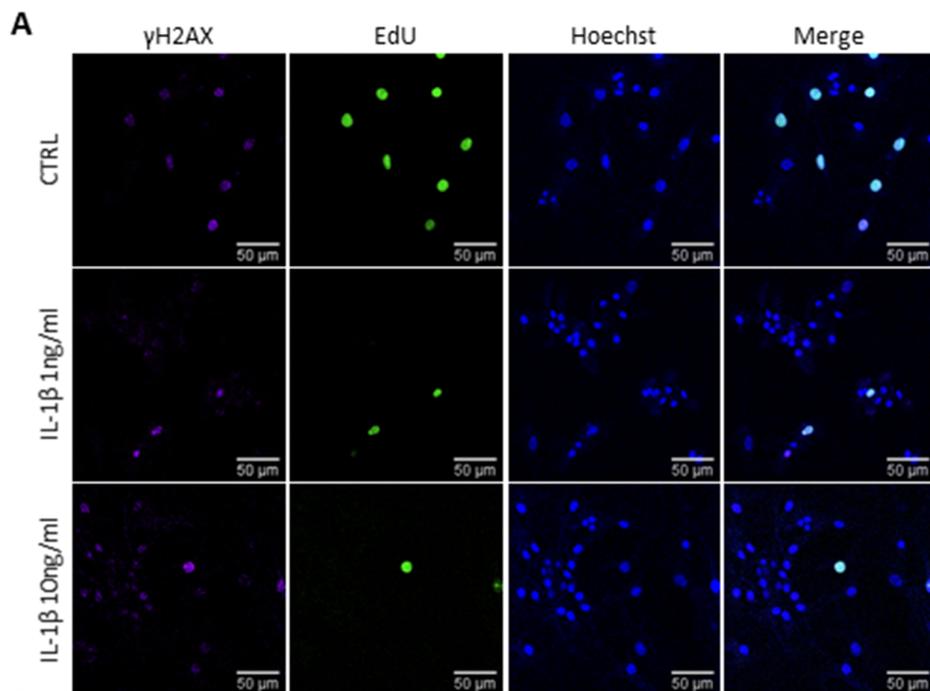


**C**



# Supplementary Figure 2

■ CTRL  
□ IL-1 $\beta$  1ng/ml  
□ IL-1 $\beta$  10ng/ml



**Dr Claire VINATIER**  
claire.vinatier@univ-nantes.fr  
**Assistant professor Nantes Université**

Nantes, 13 December 2022

Editor-in-Chief,  
Aging

Dear Editor,

On behalf of my colleagues, I am pleased to submit an original research article entitled “Development of a DNA damage-induced senescence model in osteoarthritic chondrocytes.” by Georget et al. for publication in Aging.

The contribution of each author is distributed as follows: MG, JG, and CV conceived the study, designed, and supervised the experiment. MG, NB, AD, CB, SA, BH, and DW performed the experiment, analyzed data, and/or provide samples. MG and CV drafted the article and AD, NB, CB, AFC, GG and JG contributed to the critical revision of the article. CV and JG provide financial support. All authors have read and approved the final manuscript.

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) through the projects KLOTHOA (ANR-18-CE14-0024-01), by the Foundation for Research in Rheumatology through the project FOREUM-EULAR SEN-OA, the region of the Pays de la Loire RFI BIOREGATE through the projects GENOA, and INSERM through the cross-disciplinary program AGEMED 2.0

We believe our manuscript is of interest to the readers of Aging and hope you will find it acceptable for publication.

Sincerely

Dr Claire Vinatier PhD, HDR



## B. Résultats complémentaires

En complément du travail présenté dans l'article original « Development of a DNA damage-induced senescence model in osteoarthritic chondrocytes », nous nous sommes interrogés sur l'impact d'autres modalités de traitement avec l'étoposide dans nos deux types chondrocytaires précédemment utilisés à savoir les chondrocytes articulaires primaires humains (HACs) et la lignée chondrocytaire humaine TC28a2. En effet, dans la littérature, des traitements avec des doses plus faibles d'étoposide allant de 0,5 à 6  $\mu\text{M}$  mais sur des temps plus longs jusqu'à 72h, dans des lignées épithéliales pulmonaire<sup>584</sup> et rénale<sup>585</sup> sont décrits pour induire la sénescence.

C'est pourquoi, nous avons également évalué l'impact d'une dose de 2  $\mu\text{M}$  d'étoposide pendant 72h sur les HACs et les TC28A2, sur la prolifération cellulaire et l'expression de gènes de plusieurs CDKi et également d'enzymes associées au SASP.

### a. Matériel et méthodes

#### **Isolement et amplification de chondrocytes articulaires primaires humains (HACs)**

Les chondrocytes articulaires primaires humains (HACs) ont été isolés des condyles fémoraux de patients arthrosiques subissant une arthroplastie totale du genou. Tous les échantillons ont été prélevés sur les patients après leur consentement éclairé conformément à la Déclaration d'Helsinki. Cette étude a été réalisée en accord avec les recommandations du Comité de Protection des Personnes des Pays de La Loire et agréée par le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (numéro d'enregistrement : DC-2017-2987). Dès réception des cartilages articulaires humains, des copeaux sont réalisés puis digérés à 37°C avec 0,2% de collagénase de type II pendant 30 min. Ensuite, les copeaux sont digérés pendant une nuit à 37 C dans une solution de collagénase à 0,03% dans du DMEM (DMEM-Glutamax, 61965-026, Gibco) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (FCS, S1810-500, Dominique Dutscher) et 1% de pénicilline/streptomycine (PS, 1000 U/ml, 15140122, Thermo Fisher Scientific) (milieu complet). La suspension cellulaire obtenue est ensuite filtrée à travers un tamis cellulaire de 70  $\mu\text{m}$  et les cellulesensemencées à une densité de  $6 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> (P0). Les HACs ont été cultivées en milieu complet. Les cellules ont été maintenues à 37°C en atmosphère humide, avec 5% de CO<sub>2</sub> et le milieu de culture changé tous les 2 à 3 jours.

#### **Culture des chondrocytes TC28A2**

Les TC28A2 (SCC042, Sigma Aldrich) ont étéensemencés à une densité de 15 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu complet renouvelé tous les 2 à 3 jours et cultivés en atmosphère humide avec 5%

de CO<sub>2</sub>. Lorsque les cellules atteignent 80 à 90% de confluence, elles sont sous-cultivées. Pour les expériences, les chondrocytes TC28A2 ont été utilisés entre les passages 5 et 9.

### Traitement des chondrocytes

Le schéma expérimental est présenté sur la Figure 17, A. 24h avant le début de l'expérimentation (D-1), les chondrocytes sont ensemencés à une densité de 15 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu complet dans une atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>. A D0, les cellules sont traitées par l'étoposide (E1383, Sigma-Aldrich), à 2µM pendant 72h (bleu). Au jour 3 (D3), le milieu est remplacé par du milieu complet frais sans étoposide pour le reste de l'expérience et le milieu renouvelé tous les 2 à 3 jours. Les analyses ultérieures sont effectuées au jour 10 (D10) soit 7 jours après l'arrêt du traitement, comme illustré dans la Figure 17, A.

### Essai de prolifération cellulaire

Aux temps indiqués, les chondrocytes ont été décollés par un traitement trypsine/EDTA (Gibco, 25300-054) et le nombre de cellules vivantes compté en utilisant le colorant d'exclusion au bleu de Trypan.

### Extraction d'ARN et réaction quantitative en chaîne par polymérase (qPCR)

Les ARN ont été extraits à l'aide d'un kit NucleoSpin® RNA XS (74092, Macherey-Nagel, Hoerd, France) conformément aux instructions du fabricant. Le rendement en ARN a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific™). La transcription inverse a été réalisée à l'aide du kit de synthèse d'ADNc Verso (AB1453B, Thermo Scientific™). La réaction en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel a été réalisée à l'aide d'amorces spécifiques (Table 1) avec le SYBR™ Select Master Mix (4472908, Applied Biosystems™) en utilisant le système de détection PCR en temps réel CFX96 Touch (Bio-Rad). GUS-B et PPIA ont été utilisés comme gènes de référence et les résultats exprimés sous la forme de niveau d'expression relatif en utilisant la méthode Pfaffl<sup>586</sup>.

Géne	Amorces Sens	Amorce Anti-sens
<b>CDKN1A - p21</b>	5'- GCAGACCAGCATGACAGATTTTC -3'	5'- GCGGATTAGGGCTTCCTCTT -3'
<b>CDKN2A - p16</b>	5'- AAGGTCCCTCAGACATCCCC -3'	5'- CCCTGTAGGACCTTCGGTGAC -3'
<b>CDKN2B - p15</b>	5'- GCGGGGACTAGTGGAGAAG -3'	5'- CTCCCGAAACGGTTGACTC -3'
<b>p53</b>	5'- CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG -3'	5'- TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC -3'
<b>MMP3</b>	5'- CACTCACAGACCTGACTCGGTT -3'	5'- AGCAGGATCACAGTTGGCTGG -3' -3'
<b>MMP13</b>	5'- CCAGTCTCCGAGGAGAAACA -3'	5'- AAAAACAGCTCCGCATCAAC -3'

<b>PAI-1</b>	5'- CTCATCAGCCACTGGAAAGGCA -3'	5'- GACTCGTGAAGTCAGCCTGAAAC -3'
<b>COX-2</b>	5'- CTTACGCATCAGTTTTTCAAG -3'	5'- TCACCGTAAATATGATTTAAGTCCAC -3'
<b>Gus-b</b>	5'- CGCCCTGCCTATCTGTATTC -3'	5'- TCCCCACAGGGAGTGTGTAG -3'
<b>PPIA</b>	5'- ATGCTGGACCCAACACAAAT -3'	5'- TCTTTCACCTTGCCAAACACC -3'

*Table 1: Liste des amorces de qPCR pour l'étude de la sénescence*

## Analyses statistiques

Les analyses statistiques et les graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8. Pour toutes les expériences, les valeurs aberrantes ont été identifiées à l'aide du test de Grubbs avec  $\alpha = 0,05$  et ont été exclues de l'analyse ultérieure. La distribution des données a été évaluée à l'aide du test de normalité de Shapiro-Wilk. Si les données passent le test de normalité, elles sont ensuite analysées par un test-t apparié ou une ANOVA deux voies avec comparaisons multiples de Tukey. Sinon, elles sont analysées grâce au test de Wilcoxon. Les valeurs de P-values inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

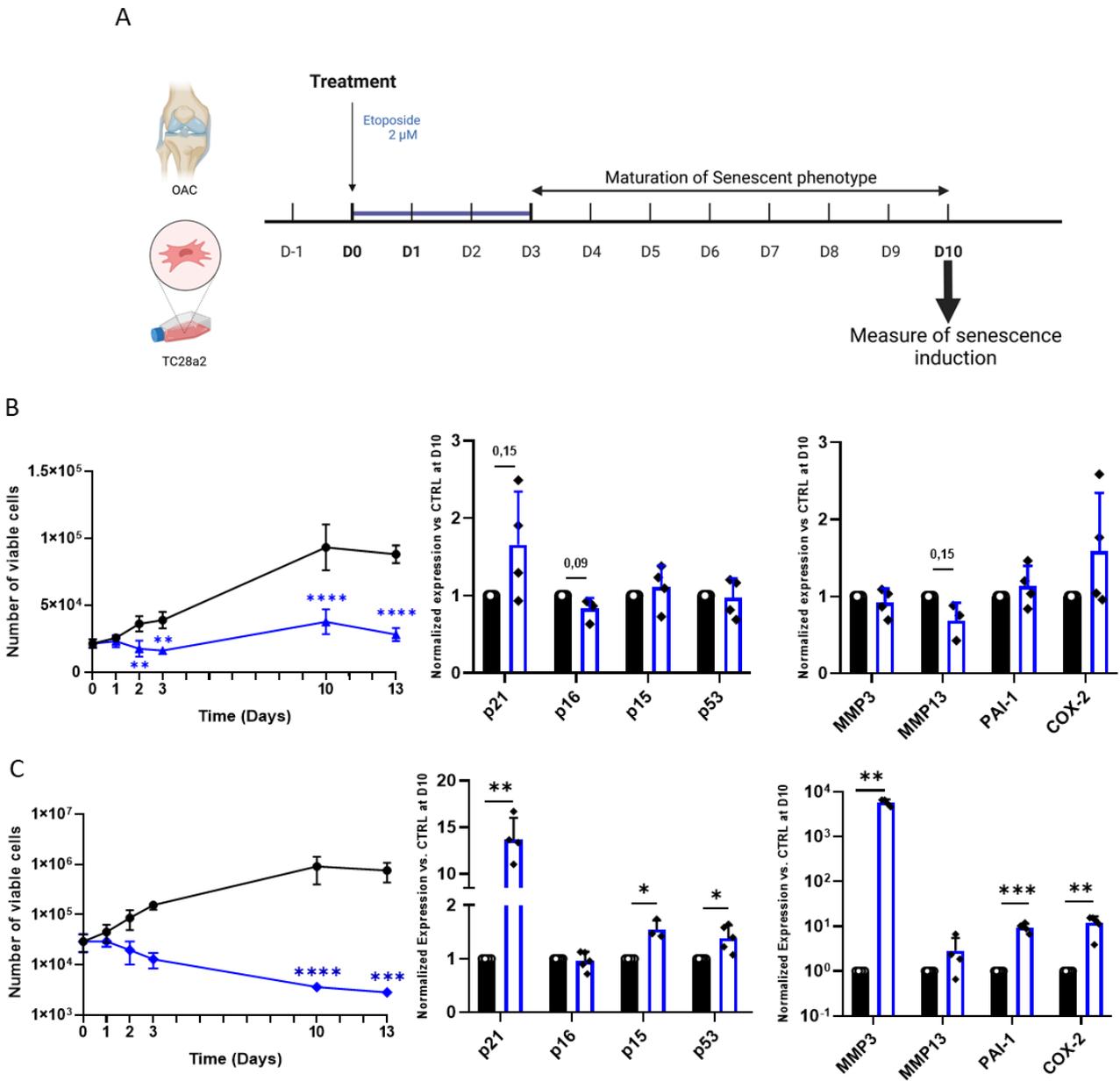
### b. Résultats

#### Impact d'un traitement à 2 $\mu\text{M}$ d'étoposide pendant 3 jours dans des HACs et des TC28a2

Comme dans l'article précédent, nous avons tout d'abord analysé l'impact du traitement à l'étoposide pendant 72h sur la prolifération des chondrocytes jusqu'au jour 13. Nos résultats indiquent dans les HACs traités à l'étoposide, une réduction significative du nombre de chondrocytes viables dès le jour 2 par rapport à la condition témoin [Fig. 17B]. Ce nombre reste stable jusqu'au jour 13. Les TC28a2 présentent une diminution significative du nombre de chondrocytes viables au jour 10 [Fig. 17C] qui se maintient jusqu'au jour 13.

Nous avons ensuite évalué l'expression de plusieurs CDKi au niveau transcriptionnel au jour 10 soit 7 jours après l'arrêt du traitement dans les HACs et les TC28a2. Dans les HACs, seule l'expression de p21 tend à être augmentée (variation de 1,66 fois) tandis que l'expression de p16 est diminuée (variation de 0,83 fois). Dans les TC28a2, les expressions de p21, p15 et p53 sont significativement augmentées de 13,68 fois, 1,54 fois et de 1,38 fois respectivement. Concernant l'expression d'enzymes sécrétées ou impliquées dans la production de facteurs sécrétés dans le SASP, aucune augmentation significative de l'expression de MMP3, PAI-1 et COX-2 n'est constatée dans les HACs. En revanche, une tendance à la diminution est observée pour l'expression de MMP13 (variation de 0,69 fois) dans la condition traitée à l'étoposide. Dans les TC28a2 au contraire, les

expressions de MMP3, PAI-1 et COX-2 sont significativement augmentées de 5799 fois, 9,47 fois et 11,97 fois respectivement.



**Figure 17: Induction de la sénescence dans des HACs et des TC28a2 traités avec de l'étoposide 2  $\mu$ M pendant 3 jours.** Les HACs ont été traités avec de l'étoposide à 2  $\mu$ M pendant 3 jours et l'induction de la sénescence a été évaluée par RT-qPCR au jour 10. (A) Aperçu du design expérimental. (Figure créée avec BioRender.com). Le nombre de cellules viables a été évalué par comptage au bleu de trypan et l'expressions des inhibiteurs des kinases cycline-dépendantes, et du SASP ont été évaluées par RT-qPCR dans les HACs (B) et TC28a2 (C). Les données sont présentées sous la forme de moyenne  $\pm$  SD, ( $n \geq 3$ ). Les valeurs de P ont été calculées par ANOVA deux voies avec comparaisons multiples de Tukey pour la viabilité et par un test-t apparié pour les qPCR, \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### C. Discussion et perspectives

Cette première partie de la thèse portant sur la mise en place de modèles de sénescence chondrocytaire a permis d'évaluer, deux types d'inducteur de sénescence.

Le premier inducteur que nous avons utilisé est l'IL-1 $\beta$ , une cytokine couramment utilisée *in vitro* pour mimer l'environnement inflammatoire associée à l'OA et plus récemment considérée comme un inducteur de la sénescence liée à l'inflammation et au SASP dans les chondrocytes<sup>587-589</sup>. En effet, l'IL-1 $\beta$  est retrouvée dans le SASP des cellules sénescents or le SASP a été montré comme capable de propager la sénescence<sup>330,331</sup>. Cependant, dans les modèles de sénescence de chondrocytes induits par l'IL-1 $\beta$  rapportés dans la littérature, les marqueurs associés à la sénescence ont été étudiés sur des temps courts de l'ordre de 24 à 48h alors que la sénescence est un processus lent et irréversible qui demande du temps pour se mettre en place<sup>231</sup>. Nous avons donc souhaité approfondir ce mode d'induction de la sénescence via l'IL-1 $\beta$  en exposant de manière chronique des chondrocytes humains à cette cytokine.

Le second inducteur utilisé est l'étoposide. Étant donné que les chondrocytes OA sont des cellules hypo-répliquatives et présentent un niveau élevé de dommages à l'ADN qui pourrait contribuer à la sénescence des chondrocytes<sup>590,591</sup>, nous avons cherché à générer un modèle de sénescence induite par les dommages à l'ADN. L'étoposide, en formant un complexe ternaire avec l'ADN et la topoisomérase II va avoir pour effet de bloquer son action, d'induire des dommages à l'ADN<sup>592</sup> et de favoriser l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN tout en bloquant la progression du cycle cellulaire dans d'autres types de cellules<sup>231,593,594</sup>.

En l'absence d'un marqueur universel de la sénescence, nous nous sommes attachés à évaluer différentes caractéristiques de la sénescence cellulaire décrites dans la première partie de ce manuscrit dans nos deux modèles. Pour cela, nous avons étudié la prolifération cellulaire, l'expression au niveau transcriptomique et protéique de plusieurs CDKi impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, la présence de dommage à l'ADN et pour finir l'expression génique et la sécrétion de molécules du SASP.

Les résultats de cette étude montrent que l'exposition chronique de chondrocytes primaires humains à l'IL-1 $\beta$  n'induit qu'une expression partielle des marqueurs de sénescence, puisque nous n'observons pas d'arrêt de la prolifération et ne nous permet donc pas de conclure sur sa capacité à induire la sénescence des chondrocytes. A l'inverse, le traitement à l'étoposide des chondrocytes

induit de manière fiable une sénescence liée aux dommages à l'ADN. Dans ce modèle, la sénescence est mise en évidence par la perte de capacité proliférative, l'accumulation de dommages à l'ADN et la sécrétion du SASP. Ce modèle de sénescence induite par l'étoposide peut aider à étudier l'initiation de la sénescence cellulaire dans les chondrocytes, car une meilleure compréhension de l'induction de la sénescence et du phénotype aidera à développer des approches thérapeutiques pour cibler la sénescence dans l'OA. De plus, les résultats additionnels présentés dans ce manuscrit montrent qu'il est possible d'utiliser d'autres modalités de traitement avec l'étoposide pour induire la sénescence avec une dose plus faible d'étoposide, mais sur un temps plus long dans les HACs et les TC28a2.

Il est intéressant de noter que l'exposition des TC28A2 à l'étoposide semble induire une expression plus importante des marqueurs de la sénescence dans ce type cellulaire vis-à-vis des HACs (par exemple au jour 8, l'expression de p21 est augmentée d'environ par 5 dans les HACs contre 10 dans les TC28a2). Cette sensibilité plus importante des TC28a2 peut s'expliquer par une capacité de prolifération accrue et donc la présence de signaux mitotiques plus élevée que dans les HACs, les rendant plus sensibles à l'induction de la sénescence par l'étoposide. Cette observation est en accord avec de récents résultats qui montrent que l'induction de la sénescence via une irradiation associée à une stimulation mitogénique grâce aux facteurs de croissance TGF- $\beta$ 1 et bFGF accroît la sénescence des chondrocytes<sup>595</sup>.

Plusieurs limites sont également à souligner dans notre étude :

Tout d'abord, nous n'avons pas inclus de contrôle avec des cellules quiescentes. Les cellules quiescentes sont caractérisées par une sortie réversible du cycle cellulaire. Afin de maintenir cet état, les cellules quiescentes activent des voies de signalisation qui se chevauchent avec la sénescence, notamment p16 et p53/p21. Bien que les cellules dans nos conditions contrôles prolifèrent, il serait pertinent à l'avenir d'ajouter une condition avec des cellules quiescentes.

Dans le cadre de nos expérimentations nous avons utilisé des chondrocytes primaires humains issus du cartilage de patients arthrosiques. De ce fait, nous ne pouvons négliger qu'un certain nombre de ces cellules soient déjà sénescents. Plusieurs équipes de recherches, fortes de ce constat, ont développées des approches afin de séparer les cellules sénescents. En l'absence de marqueurs de surface ou de marqueurs universels de la sénescence elles proposent l'utilisation

de caractéristiques telles que la taille<sup>596</sup> ou l'autofluorescence<sup>597,598</sup> des cellules afin de générer des fractions cellulaires enrichies ou au contraire appauvries en cellules sénescentes.

Enfin dans notre modèle, l'expression des marqueurs du SASP est modeste. Une étude récente montre que la stimulation de cellules endothéliales sénescentes par des stimuli pro-inflammatoires tels que les lipopolysaccharides, l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  stimule une induction très forte d'une variété de médiateurs inflammatoires par rapport à des cellules non sénescentes<sup>599</sup>. De ce fait, il pourrait être intéressant de poursuivre notre étude en associant notre modèle de sénescence induit par l'étoposide à une faible stimulation par un facteur pro-inflammatoire tel que l'IL-1 $\beta$  afin de récapituler plus fidèlement l'environnement d'une articulation arthrosique.

### 3. Mise en évidence des marqueurs de sénescence *in vivo*

En parallèle du développement de notre modèle de sénescence chondrocytaire, nous nous sommes également attachés à identifier les cellules sénescents *in vivo* dans le cartilage et les ménisques des articulations murines afin d'améliorer nos connaissances sur la localisation et l'abondance des cellules sénescents au sein des articulations.

Pour cela, nous avons travaillé à la mise en place de protocoles d'IHC pour mettre en évidence certains marqueurs des cellules sénescents (Snc) les protéines p16, p21 deux CDKi impliquées dans la régulation du cycle cellulaire dont l'expression est augmentée au cours de la sénescence cellulaire, la cavéoline-1 (CAV-1) une protéine nécessaire à la formation des cavéoles qui s'accumule dans ces dernières lors de la sénescence replicative ou induite par un stress (exposition au peroxyde d'hydrogène ou aux UV) dans les fibroblastes<sup>600</sup> notamment et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1) dont l'expression est augmentée dans le SASP<sup>255,256</sup>. Une fois nos protocoles validés, nous avons quantifié le nombre total de cellules présentes et le nombre de cellules positives pour chacun des marqueurs dans le cartilage et les ménisques tout d'abord dans un modèle murin d'OA spontanée liée à l'âge (Figure 18 ; 20) et dans un modèle murin d'OA post-traumatique (Figure 19-20).

#### A. Matériel et méthodes

##### a. Animaux et aspects éthiques

Les expérimentations animales ont été réalisées conformément aux directives européennes pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire (2010/63/UE) et approuvées par le comité d'éthique local (CEEA.PdL.06) et le Ministère français de la recherche (autorisation n° 2021070817561382 / APAFIS #32378). Des efforts concertés et particuliers ont été déployés pour minimiser les souffrances psychologiques et physiques ainsi que pour réduire le nombre d'animaux utilisés. Toutes les souris ont été hébergées selon un cycle lumière/obscurité de 12 heures avec un accès illimité à un régime alimentaire standard et à de l'eau. Trente-trois souris mâles C57BL/6 d'âge croissant (1, 6, 12, 18 et 24 mois) ont été utilisées pour évaluer l'expression des marqueurs Snc au cours de l'OA liée à l'âge. Pour évaluer l'expression des marqueurs Snc au cours de l'OA post-traumatique, vingt souris mâles C57BL/6 âgées de 10 semaines ont été utilisées.

##### b. Induction chirurgicale de l'arthrose post-traumatique

Vingt souris mâles C57BL/6 âgées de 10 semaines (Janvier Labs, Saint-Berthevin, France) ont été réparties aléatoirement et équitablement en deux groupes : DMM (déstabilisation du ménisque médial) et SHAM pour les temps 6 semaines et 12 semaines post- chirurgie. Après 1 semaine

d'acclimatation, une chirurgie DMM a été réalisée sur l'articulation du genou droit des souris (n = 10) comme décrit précédemment<sup>601,602</sup>. Pour les interventions SHAM (n=10), une arthrotomie sans section du ligament ménisco-tibial médial a été réalisée. Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale à 6 semaines (n = 5 pour chaque groupe) et à 12 semaines (n = 5) après la chirurgie DMM. Les articulations du genou ont été prélevées et fixées pendant 24 heures dans une solution de paraformaldéhyde à 4 %, puis placées dans de l'éthanol à 70° jusqu'à leur décalcification.

### c. Etude histologique

Les articulations du genou ont été décalcifiées dans une solution d'EDTA 0,5 M (pH 7,4) à 4°C pendant trois semaines, déshydratées avec une solution d'éthanol graduée de 70° à 100° et incluses dans de la paraffine. Des sections de paraffine en série de 5 µm ont été colorées avec une coloration safranine O / Fast green à l'aide d'un automate, Varistain Gemini S (Thermo Scientific, USA). La gravité de l'OA a été évaluée à l'aide d'un système de notation adapté du système de notation de l'OARSI tel que décrit dans la Table 2 ci-dessous. La notation a été effectuée indépendamment par 3 trois lecteurs différents formés, sur au moins 2 ou 3 niveaux par souris et les scores moyens ont été utilisés pour les analyses statistiques.

Mort des chondrocytes	Aucune	0
	≤ 10 %	1
	≤ 25 %	2
	≤ 50 %	3
	≤ 75 %	4
	≤ 100 %	5
Hypertrophie	Absente	0
	Présente	1
Clusters	Aucun	0
	En zone superficielle	1
	En zone intermédiaire	2
	Structures complexes	3
	Formation de kystes	4
Perte de coloration safranine-O	Pas de perte de coloration	0
	Zone superficielle du cartilage non calcifié	1
	Zone médiane du cartilage non calcifié	2
	Cartilage non calcifié et coloration intense autour des clusters	3
	Coloration Absente mais intense autour des clusters	4
	Coloration Absente	5
Surface	Intacte	0
	Fibrillation ou abrasion superficielle	1
	Fibrillation profonde	2
	Fissures verticales	3
	Délamination / excavation	4
Os	Aucun changement	0

	Dénudation	4
	Micro-fracture	5
	Remodelage	6
Total		25

Table 2: Score OARSI modifié

#### d. Etude immunohistochimie (IHC)

Pour l'IHC, les coupes ont été déparaffinées, réhydratées et soumises à un démasquage aux conditions indiquées ci-dessous (Table 3). Pour p16, une étape supplémentaire de blocage avec un kit souris anti-souris (ScyTek Laboratories, MTM015) a été nécessaire pour éliminer le bruit de fond causée par les immunoglobulines endogènes. Les coupes ont ensuite été incubées pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires (Table 3) dilués dans du diluant Dako (Agilent Dako, S3022) et avec des anticorps secondaires biotinylés pendant 1 h à température ambiante. Ensuite, les coupes ont été incubées avec de la streptavidine conjuguée au peroxyde de raifort au 1/400 (Dako, p0397) et la liaison des anticorps a été visualisée à l'aide de diaminobenzidine (DAB). Les noyaux ont été contre-colorés avec de l'hématoxyline. Pour le contrôle négatif, les sections ont été traitées en utilisant des protocoles identiques, mais en omettant l'anticorps primaire. La coloration des tissus a été visualisée à l'aide du scanner de lames Nanozoomer 2.0 Hamamatsu (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japon). Le nombre de cellules totales et de cellules positives pour les marquages ont été comptés à l'aide du logiciel QuPath.

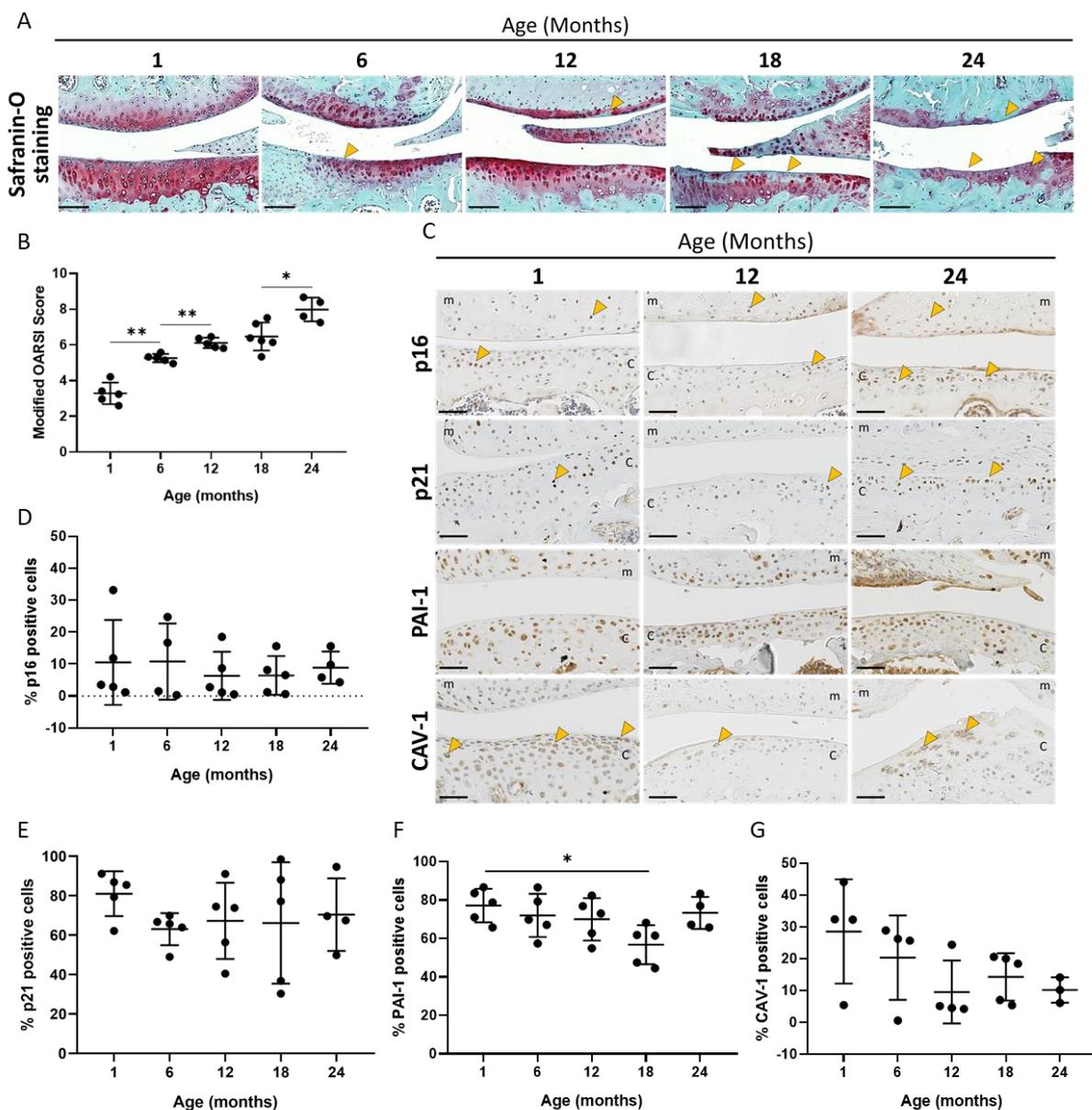
	<b>p16</b>	<b>p21</b>	<b>CAV-1</b>	<b>PAI-1</b>
<b>Démasquage</b>	0.25% hyaluronidase W/W, 1h 4°C	Tampon Tris EDTA, pH 9, 70°C, sur la nuit	Tampon Citrate pH 6, 70°C, sur la nuit	Tampon Citrate pH 6, 70°C, sur la nuit
<b>Ac I<sup>aire</sup></b>	1/400 Ab54210, Abcam	1/500 Ab188244, Abcam	1/200 610407, BD Biosciences	1/500 Ab66705, Abcam
<b>Ac II<sup>aire</sup></b>	1/500, E433, Dako	1/500 E0432, Dako	1/500, E433, Dako	1/500 E0432, Dako

Table 3: Conditions expérimentales des IHC p16, p21, CAV-1 et PAI-1

#### e. Analyses statistiques

Les analyses statistiques et les représentations graphiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8. Pour toutes les expériences, les valeurs aberrantes ont été identifiées à l'aide du test de Grubbs avec  $\alpha = 0,05$  et ont été exclues des l'analyses ultérieures. Les données ont été analysées par le test de Mann-Whitney. Les valeurs de P-values inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives, \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ .

## B. Résultats



**Figure 18** : Expression de marqueurs de sénescence ( $p16^{INK4A}$ ,  $p21^{CIP-1}$ , PAI-1 et CAV-1) au cours de l'arthrose liée à l'âge, sur des articulations de genou de souris mâles C57BL/6 d'âge croissant. (A) Safranin O Fast-Green coloration. Les flèches jaunes indiquent des dommages au cartilage. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m (B) Atteinte arthrosique évaluée à l'aide du score OARSI modifié. (C) Immunohistochimie représentative des marqueurs de sénescence  $p16^{INK4A}$ ,  $p21^{CIP-1}$ , PAI-1 et CAV-1 sur des articulations de genou de souris mâles C57BL/6 âgées de 1, 12 et 24 mois. Les flèches jaunes indiquent une coloration brune positive. Barre d'échelle : 50  $\mu$ m. (D-G) Quantification des marqueurs de sénescence  $p16^{INK4A}$ ,  $p21^{CIP-1}$ , PAI-1 et CAV-1 dans le cartilage de souris mâle C57BL/6 d'âge croissant. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SD, ( $n \geq 3$ ). Les P-values sont calculées par le test de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

## **Expression de marqueurs de sénescence dans un modèle d'OA spontanée liée à l'âge chez la souris**

Nous avons tout d'abord réalisé une coloration Safranine-O-Fast-Green des coupes d'articulations de souris C57BL/6 mâles d'âge croissant (Figure 18, A) suivi d'une quantification de l'atteinte arthrosique par un score OARSI modifié (Figure 18, B).

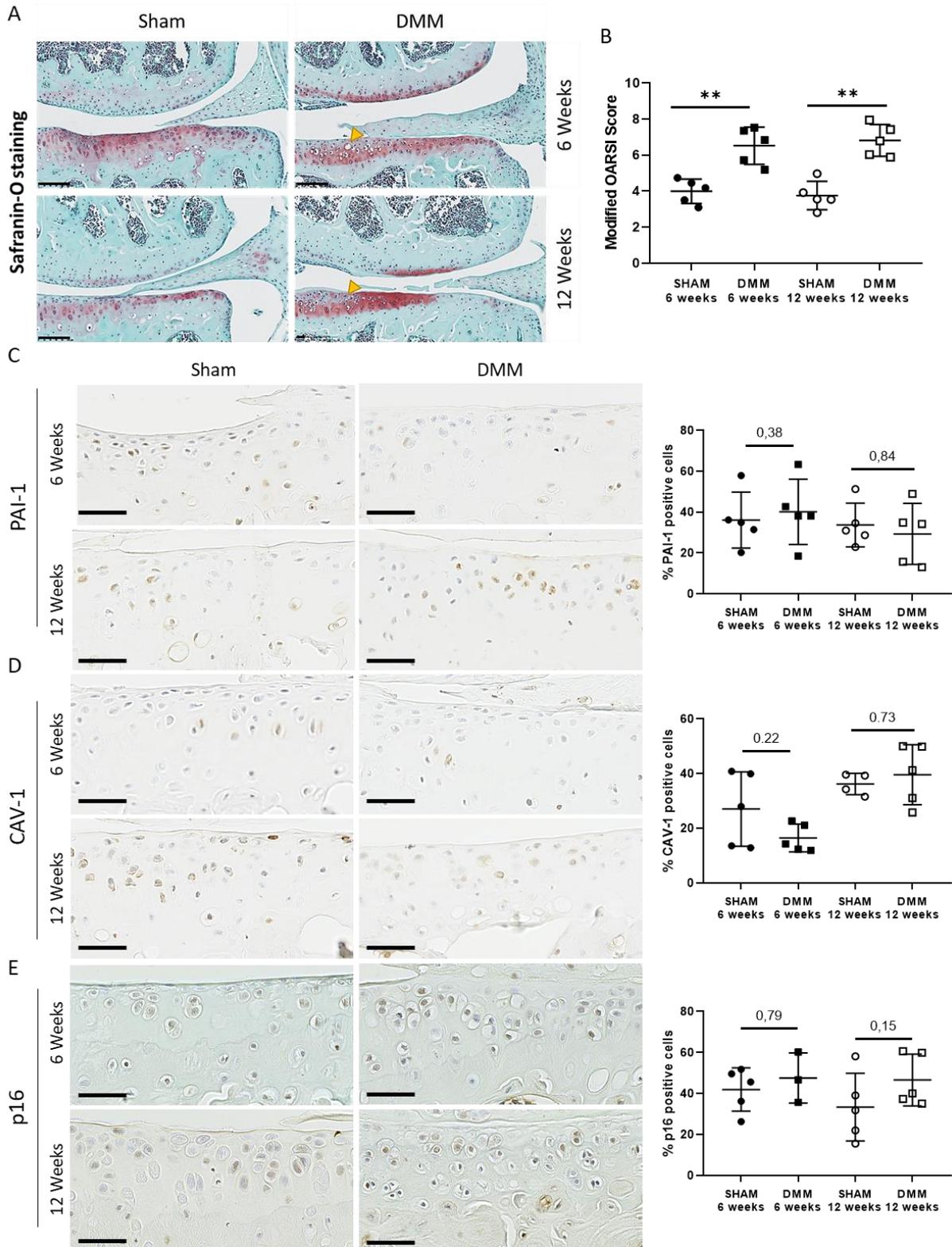
Nous observons dans notre modèle une augmentation significative du score OARSI avec l'âge (Figure 18, A-B) bien qu'entre 12 et 18 mois la différence entre ces deux âges ne soit pas significative. Tous les marqueurs recherchés à savoir p16, p21, CAV-1 et PAI-1 sont exprimés dans le cartilage articulaire avec une forte coloration à 1 mois (Figure 18, C).

La quantification des IHC révèle d'abord une grande variabilité entre les souris et par conséquent, aucune modification significative des marqueurs de sénescence n'est montrée avec l'âge (Figure 18, D-G) sauf pour PAI-1 qui diminue significativement de 1 à 18 mois (Figure 18, F).

Cependant, certains marqueurs tels que p16, p21 et la CAV-1 ont tendance à diminuer de 1 à 12 mois. Par ailleurs, une tendance vers une légère augmentation à 18 et 24 mois est observée pour de nombreux marqueurs.

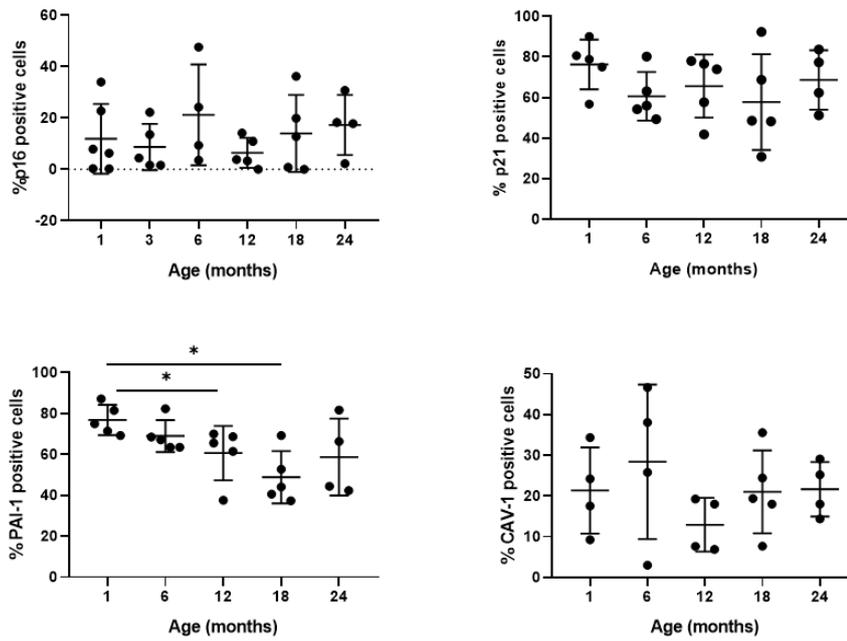
## **Expression de marqueurs de sénescence dans un modèle d'OA post-traumatique chez la souris**

Dans un deuxième temps, nous avons conduit la même analyse que précédemment, mais dans un modèle d'OA post-traumatique chez la souris C57BL/6 mâle induit par déstabilisation du ménisque médiale (DMM). La coloration Safranine-O-Fast-Green permet de mettre en évidence des altérations du cartilage dans le groupe DMM dès 6 semaines post-chirurgie avec notamment une perte de la coloration safranine-O en surface dans le cartilage, une hypertrophie des chondrocytes ainsi que l'apparition de clusters chondrocytaires. Ces altérations du cartilage se retrouvent également à 12 semaines (Figure 19, A). L'atteinte arthrosique a ainsi été confirmée par une augmentation significative du score OARSI modifié dès 6 semaines post-chirurgie dans le groupe DMM vis-à-vis du groupe SHAM. La différence de score entre les groupes SHAM et DMM se maintient à 12 semaines (Figure 19, B). Dans ce modèle, tous les marqueurs recherchés à savoir PAI-1, CAV-1 et p16 ont été retrouvés dans le cartilage articulaire (Figure 19, C-E). La quantification des IHC révèle encore une variabilité importante entre les souris au sein d'un même groupe. Aucune modification significative des marqueurs de sénescence PAI-1, CAV-1 et p16 n'a pu être mise en évidence entre les groupes SHAM et DMM.



**Figure 19 : Expression des marqueurs de sénescence (p16<sup>INK4A</sup>, PAI-1 et CAV-1) dans l'arthrose post-traumatique, sur les articulations du genou des souris mâles C57BL/6. (A) Safranin O Fast-Green coloration. Les flèches jaunes indiquent des dommages au cartilage. (B) Atteinte arthrosique évaluée à l'aide du score OARSI modifié. (C-E) Immunohistochimie représentative des marqueurs de sénescence p16<sup>INK4A</sup>, PAI-1 et CAV-1 sur les articulations de genou de souris mâle C57BL/6 SHAM et DMM. Barre d'échelle : 50  $\mu$ m. (F-H) Quantification des marqueurs de sénescence p16<sup>INK4A</sup>, PAI-1 et coloration CAV-1 dans le cartilage de souris mâle C57BL/6 (n = 3-5). Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SD, (n $\geq$ 3). Les P-values calculées par le test de Mann-Whitney. \*\*p<0,01.**

A



B

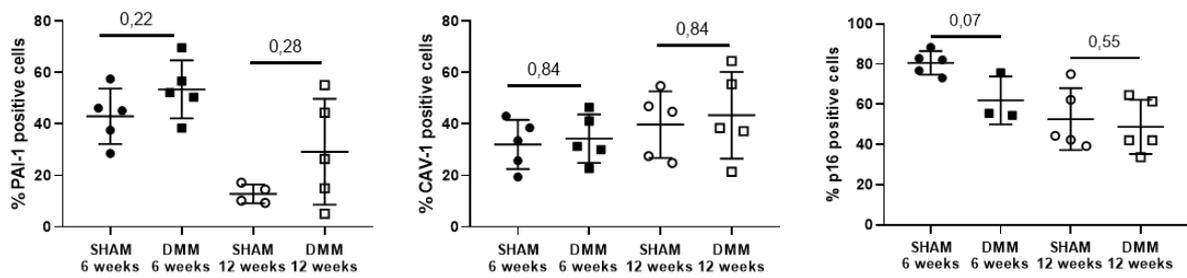


Figure 20 : Expression des marqueurs de sénescence ( $p16^{INK4A}$ ,  $p21^{CIP-1}$ , PAI-1 et CAV-1) dans les ménisques de souris mâles C57BL/6 dans un modèle (A) d'arthrose liée à l'âge et (B) d'arthrose post-traumatique. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SD, ( $n \geq 3$ ). Les P-values calculées par le test de Mann-Whitney. \*  $p < 0,05$ .

### **Expression des marqueurs de sénescence dans les ménisques dans un modèle d'OA liée à l'âge ou post-traumatique**

Enfin, nous avons également quantifié le pourcentage de cellules sénescents dans les ménisques de nos deux précédents modèles d'OA liée à l'âge (Figure 20, A) et post-traumatique (Figure 20, B). Globalement, nous observons des tendances similaires d'expression des marqueurs entre les cartilages et les ménisques. Ainsi, aucune modification significative du pourcentage de cellules positives pour les marqueurs de sénescence n'est montrée dans le modèle d'OA liée à l'âge sauf pour PAI-1 qui présente une diminution significative du pourcentage de cellules positives entre 1 et 12 à 18 mois (Figure 20, A) et qui semble ensuite augmenter entre 18 et 24 mois.

Dans le modèle d'arthrose post-traumatique, nous pouvons noter que le nombre de cellules positives pour PAI-1 tend à être supérieur dans le groupe DMM par rapport au groupe SHAM. Pour CAV-1, pas de différence notable entre les groupes n'est observée, quel que soit le temps post-chirurgie. Enfin, le nombre de cellules positives pour p16 semble être diminué dans la condition DMM par rapport à la condition SHAM à 6 semaines, mais à 12 semaines cette différence n'est plus visible.

### C. Conclusion et perspectives

Grace à une coloration Safranine-O fast green associée au score OARSI modifié, nous avons pu dans 2 modèles murin d'OA, montrer que l'atteinte arthrosique augmente avec l'âge<sup>603</sup>, mais également à la suite d'une induction d'OA post-traumatique par DMM chez la souris<sup>604</sup>.

Nous avons également réussi à mettre en évidence dans nos deux modèles, différents marqueurs associés à la sénescence, à savoir p16, p21, CAV-1 et PAI-1. Ces marqueurs présentent des localisations distinctes ; p16 et p21 sont essentiellement retrouvés au niveau nucléaire, CAV-1 dans le cytoplasme et à la membrane et PAI-1 dans le noyau et le cytoplasme.

Cependant, malgré nos efforts pour caractériser le nombre et la localisation des cellules sénescents dans ces deux modèles au sein des articulations et plus particulièrement dans le cartilage et les ménisques nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de différences majeures au cours du vieillissement ou à la suite d'un traumatisme articulaire pour p16, p21 et CAV-1. Seul PAI-1 est diminué significativement entre 1 et 18 mois dans le cartilage et les ménisques.

Néanmoins, de manière intéressante nous observons pour un même marqueur des variations similaires du pourcentage de cellules positives entre le cartilage et les ménisques. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le cartilage articulaire et les ménisques partagent des caractéristiques communes et notamment la présence au sein des ménisques d'un unique type de cellules différenciées, appelées fibro-chondrocytes proches des chondrocytes retrouvés dans le cartilage articulaire<sup>605</sup>. Ceux-ci sont enchâssés au sein d'une MEC qui constitue la plus grande partie du volume tissulaire. Les ménisques sont constitués principalement de fibre de collagène de type I et II, de GAGs et assurent tout comme le cartilage un rôle d'absorption et de transmission des forces de cisaillements et de compressions<sup>605</sup>.

Bien que ces différents marqueurs aient été rapportés comme augmentés lors de l'OA, leur augmentation dans le cartilage articulaire a essentiellement été montrée au niveau génique et non protéique. Ainsi, pour Cav-1, son expression a été rapporté comme accrue dans les zones abimées du cartilage articulaire humain en comparaison d'une zone moins abimée chez un même patient<sup>587</sup>. La même observation a été faite dans des disques intervertébraux avec une augmentation graduelle de l'expression de CAV-1 entre des disques sains, moyennement et fortement dégénérés<sup>606</sup>. Pour autant les augmentations rapportées sont généralement faibles et ne sont donc peut-être pas détectables par IHC. Chose intéressante, dans cette même étude ils ont également montré une diminution de l'expression de CAV-1 avec l'âge dans le disque

intervertébral humain. Nous retrouvons également une tendance à la diminution avec l'âge du nombre de cellules positives pour CAV-1 dans notre modèle de souris vieillissantes.

Pour PAI-1, nous sommes à notre connaissance les seuls avoir montré sa présence dans le cartilage articulaire murin arthrosique par IHC. Pour autant sa présence a été montrée comme augmentée de 2,5 fois dans le liquide synovial de patient arthrosique<sup>607</sup>. Des études *in vitro*, semblent également indiquer qu'un niveau élevé de PAI-1 peut favoriser le développement de l'OA<sup>608,609</sup>.

L'expression génique de p16 quant à elle est augmentée dans le cartilage dans des modèles murin avec l'âge<sup>269</sup> ou suite à l'induction d'une OA post-traumatique<sup>211</sup>. Cependant, dans ce même modèle d'OA post-traumatique par IHC, ils n'ont pas montré de différence significative du nombre de cellules p16 positives entre les souris SHAM et DMM.

Enfin, l'étude du rôle de p21 dans la sénescence et le développement de l'OA est plus récent. Son rôle dans le développement de l'OA est encore mal connu et les études menées présentent des résultats contradictoires. Ainsi après une DMM, les souris p21<sup>-/-</sup> montrent une dégradation accrue de la matrice cartilagineuse et une atteinte de l'os sous-chondrale plus importante que les souris de type sauvage<sup>610,611</sup>. Cependant, ces observations sont en contradiction avec des études antérieures démontrant que la perte et/ou la diminution de p21 augmente le potentiel chondrogénique des cellules souches adultes<sup>612</sup> et pluripotentes<sup>400</sup> et que les souris p21<sup>-/-</sup> démontrent une régénération accrue du cartilage auriculaire *in vivo*<sup>613</sup>.

Ainsi, bien que la sénescence soit admise comme un mécanisme participant au développement de l'OA. On constate des lacunes sur nos connaissances de la sénescence tant au niveau des marqueurs que des mécanismes d'induction de la sénescence au sein des tissus de l'articulation *in vivo*. Afin de palier à ce manque, l'IHC nous a semblé être une approche pertinente. Cependant, au vu de nos résultats, il semble important de les compléter avec d'autres méthodes telles que la quantification aux niveaux géniques et protéiques dans les tissus, afin d'étudier les variations des marqueurs que nous avons choisis dans nos deux modèles murins.

## II. Etude du rôle de la *O*-GlcNAcylation dans le développement de l'arthrose

### 1. Rationnel de l'étude

L'OA, la maladie articulaire la plus répandue, affecte les articulations rachidiennes et périphériques. Elle se caractérise par une dégradation du cartilage articulaire, une inflammation synoviale, une sclérose osseuse sous-chondrale associée à la formation d'ostéophytes<sup>6</sup>. Le vieillissement qui est l'un des principaux facteurs de risque de l'OA est un processus physiologique complexe consistant en un déclin progressif de certaines fonctions, de la coordination, de l'homéostasie et de l'intégrité physiologique<sup>554</sup>. L'OA, comme le vieillissement, est également décrite comme le résultat d'une perturbation de l'homéostasie du tissu. Les chondrocytes articulaires s'appuient sur le processus autophagique comme mécanisme principal pour le maintien de leur fonction cellulaire normale et de leur survie. Cependant, au cours du vieillissement, l'autophagie diminue progressivement dans les chondrocytes tandis que la sénescence augmente, participant au développement et à l'aggravation de l'OA<sup>349</sup>.

Diverses preuves indiquent que la *O*-GlcNAcylation des protéines, joue un rôle important dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la transcription, l'activation de la signalisation cellulaire, le métabolisme, la fonction mitochondriale ainsi que la survie cellulaire, la sénescence et l'autophagie<sup>420</sup>. La modification des niveaux d'*O*-GlcNAcylation des protéines a été impliqué dans une grande variété de troubles comme l'obésité, le diabète, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et le cancer<sup>420</sup>.

L'OA s'accompagne d'une accumulation de protéines *O*-GlcNAcylées dans le cartilage des patients arthrosiques par rapport aux sujets sains<sup>456</sup>. Le niveau de *O*-GlcNAcylation des protéines est également augmenté au cours de la différenciation chondrogénique et s'accompagne d'une expression accrue des enzymes OGT et OGA dans les chondrocytes ATDC5 murins<sup>523</sup> et de l'*O*-GlcNAcylation de facteurs de transcription tels que SOX-9 ou RUNX-2 impliqués dans la différenciation chondro-ostéogénique<sup>563</sup>. Il convient également de souligner que parmi les protéines bien connues pour être *O*-GlcNAcylées, PPAR $\gamma$ <sup>566</sup>, SIRT1, FOXO<sup>614</sup>, YAP<sup>568</sup> sont également décrites pour jouer un rôle dans l'homéostasie du cartilage ou de l'OA.

Il est également intéressant de souligner que le sucre donneur l'UDP-GlcNAc requis pour la *O*-GlcNAcylation des protéines peut également servir à la biosynthèse des GAGs tels que le kératane

sulfate, la chondroïtine sulfate et l'acide hyaluronique qui sont des composants structurels majeurs du cartilage articulaire<sup>570</sup>.

Enfin, la GlcN qui a été largement étudiée pour son potentiel thérapeutique chez les patients arthrosiques<sup>573,574</sup> peut contribuer à la synthèse du sucre donneur UDP-GlcNAc renforçant l'importance de la *O*-GlcNAcylation dans l'homéostasie du cartilage.

L'ensemble de ces données soutient fortement l'hypothèse selon laquelle la *O*-GlcNAcylation des protéines joue un rôle central dans l'homéostasie du cartilage. Cependant, le rôle de cette MPT reste largement inconnu dans le cartilage arthrosique et l'intérêt thérapeutique de la régulation de la *O*-GlcNAcylation largement sous-exploré dans l'OA. C'est pourquoi le second axe de travail de ma thèse a été dédié à l'étude de cette MPT dans l'OA.

La première partie de ce travail a eu pour objectif d'étudier l'impact de l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation *in vitro* dans des chondrocytes primaires humains prétraités avec deux molécules connues pour augmenter le niveau de *O*-GlcNAcylation : le thiamet-G et la GlcN avant de stimuler les cellules avec de l'IL-1 $\beta$ . nous avons également évalué l'impact *in vivo* d'une augmentation du niveau de *O*-GlcNAcylation via l'administration dans l'eau de boisson de GlcN dans un modèle d'OA post-traumatique murin.

L'ensemble de ces résultats sont présentés dans l'article en préparation intitulé « Impact of increased *O*-GlcNAcylation level in experimental osteoarthritis » et présenté pages 150 à 185.

La *O*-GlcNAcylation intervenant dans de nombreux processus cellulaires, nous nous sommes également interrogés sur l'impact de la *O*-GlcNAcylation sur la sénescence dans les chondrocytes.

Pour cela nous avons prétraité pendant 24h des HACs avec deux molécules connues pour augmenter le niveau de *O*-GlcNAcylation : le thiamet-G (TG) et la glucosamine (GlcN) avant d'appliquer nos traitements IL-1 $\beta$  et étoposide.

A. Article expérimental

## Impact of increased *O*-GlcNAcylation level in experimental osteoarthritis

Mélina Georget, Cécile Boyer, Sabine Rabreau, Nina Bon, Thomas Dupas, Anaïs Defois, Yoan Le Guennec, Joëlle Veziers, Gaël Grimandi, Alban Fouasson-Chailloux, Benjamin Lauzier, Jérôme Guicheux, and Claire Vinatier

En préparation

**Title:** Impact of increase *O*-GlcNAcylation level in experimental osteoarthritis

**Authors:** Méлина Georget<sup>a</sup>, Cécile Boyer<sup>a</sup>, Sabine Rabreau<sup>a</sup>, Nina Bon<sup>a</sup>, Thomas Dupas<sup>b</sup>, Anaïs Defois<sup>a</sup>, Yoan Le Guennec<sup>a</sup>, Joëlle Vezières<sup>a</sup>, Gaël Grimandi<sup>a</sup>, Alban Fouasson-Chailloux<sup>a</sup>, Benjamin Lauzier<sup>b</sup>, Jérôme Guicheux<sup>a</sup>, and Claire Vinatier<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Nantes Université Oniris, CHU Nantes, Inserm, Regenerative Medicine and Skeleton RMeS, UMR 1229 F-44000 Nantes, France

<sup>b</sup>Nantes Université, CHU Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France.

**Corresponding author:**

Claire Vinatier, PhD, HDR, MCU

Inserm, UMR 1229, RMeS, Regenerative Medicine and, Skeleton,

1, place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes, France, France

E-mail address: [claire.vinatier@univ-nantes.fr](mailto:claire.vinatier@univ-nantes.fr)

**Key words:** Osteoarthritis, *O*-GlcNAcylation, IL-1 $\beta$ , Chondrocytes, mice.

## **Abstract**

*Background:* Increasing evidence indicates that protein *O*-GlcNAcylation plays an important role in age-related diseases such as osteoarthritis (OA). In OA patients, protein *O*-GlcNAcylation level is increased in the cartilage. This post-translational modification (PTM) also plays a pivotal role in chondrogenesis and the activity of proteins implicated in cartilage development and OA pathogenesis. However, the impact of elevated *O*-GlcNAcylation in vitro and in vivo remains largely unknown. This study aimed to investigate the impact of increased *O*-GlcNAcylation on OA in vitro and also in vivo in a post-traumatic murine OA model.

*Study design:* In vitro, human osteoarthritic articular chondrocytes (HACs) were pre-treated with thiamet-G (TG) and glucosamine (GlcN) and then stimulated with the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$ . Gene expression of the pro-inflammatory enzymes COX2 and iNOS and the matrix metalloproteases MMP3 and MMP13 were assessed by RT-qPCR. The expression level of *O*-GlcNAc transferase (OGT), *O*-GlcNAcase (OGA), and glutamine fructose-6-phosphate aminotransferase (GFATs) were also evaluated. Total protein *O*-GlcNAcylation levels were assessed by western blot. In vivo, we examined the impact of GlcN administration on OA progression in a post-traumatic murine OA model, on total protein *O*-GlcNAcylation level, and associated regulatory enzymes by western blot.

*Results:* In vitro, increased levels of *O*-GlcNAcylation reduced the expression of enzymes involved in cartilage degradation and inflammation. The administration of GlcN in a murine post-traumatic OA model increases the level of *O*-GlcNAcylation in joint tissues, and reduces osteophyte formation but increases OA histological scores.

*Conclusions:* Our results suggest that increased protein *O*-GlcNAcylation decreases inflammation in chondrocytes in vitro and osteophytes formation in vivo. However, increased *O*-GlcNAcylation seems to worsen cartilage and meniscus damage, and synovitis in vivo. Taken together, our results indicate that *O*-GlcNAcylation plays a role in OA development and progression and call for additional studies to further decipher its role.

## **Introduction**

Osteoarthritis (OA), the most common rheumatic joint disease concerns over 500 million people worldwide<sup>1</sup>. This joint debilitating disorder affects mainly the elderly with more than half of those aged 65 years or older concerned<sup>2</sup>. The incidence of OA is expected to rise by 35% in the coming years with the increase in global life expectancy and aging to reach over 78 million people by 2040 in the US alone<sup>2</sup>. The socio-economic cost of OA accounts for 1% to 2,5% of the gross national product in developed countries<sup>3</sup> and is likely to rise alongside its incidence, imposing a growing burden on individuals and societies.

Unfortunately, no disease-modifying drugs are available on the market, and current treatments are limited to pain management, articular mobility improvement, and joint replacement surgery for end-stage OA<sup>4</sup>. Therefore, the investigation of novel therapeutic approaches is crucial.

Historically viewed as a degenerative cartilage disease linked to the accumulation of wear and tear with age, OA is now recognized as a disease of the whole joint and is characterized by cartilage degradation, subchondral bone sclerosis, osteophytes formation, and low-grade synovitis<sup>5</sup>. In OA, joint inflammation promotes chondrocytes' secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines, as well as matrix-degrading enzymes such as matrix metalloproteinases (MMPs) that contribute to the development of OA and cartilage degradation<sup>6</sup>.

The *O*-linked-*N*-acetylglucosaminylation or *O*-GlcNAcylation is a reversible post-translational modification discovered in the mid-1980s by Torres and Hart<sup>7</sup>. It consists of the addition of a unique monosaccharide  $\beta$ -D-*N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) on serine and threonine residues of nuclear, mitochondrial, and cytoplasmic proteins<sup>8,9</sup>. This PTM has emerged as a key regulatory mechanism for numerous cellular processes<sup>10,11</sup> such as metabolic regulation, mitochondrial function, cellular stress response, transcription, and epigenetics regulation<sup>11</sup>.

This PTM is under the concerted control of only three enzymes. The *O*-GlcNAc transferase (OGT) responsible for the grafting of the *O*-GlcNAc residue from the uridine donor sugar 5'-diphospho-*N*-

acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) and the *O*-GlcNAcase (OGA) responsible for its removal. A third enzyme, the glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT), uses glutamine and fructose-6-phosphate to perform the first step of the hexosamine biosynthesis pathway (HBP) and the synthesis of UDP-GlcNAc.

The synthesis of UDP-GlcNAc by the HBP integrates multiple metabolic pathways such as glucose, amino acid, fatty acid, and nucleotide metabolisms and makes *O*-GlcNAcylation sensitive to nutrients and stress<sup>12</sup>. This sensitivity allows feedback on overall cellular energy levels that can induce drastic and rapid changes in the cellular *O*-GlcNAcylation level in response to stress such as heat shock<sup>12</sup>, hypoxia<sup>13</sup>, and nutrient deprivation<sup>14</sup>.

Since its discovery, more than five thousand proteins have been identified as *O*-GlcNAcylated. Among them are transcription factors, enzymes, and signaling molecules<sup>11</sup>. Dysregulation of *O*-GlcNAcylation has been linked to a wide range of age-related diseases such as diabetes<sup>15</sup>, cancer<sup>16–18</sup>, cardiovascular<sup>19,20</sup>, neurodegenerative diseases<sup>21,22</sup>, and OA<sup>23</sup>. Indeed, the articular cartilage of OA patients presents an overall rise in protein *O*-GlcNAcylation<sup>23</sup>. This PTM also appears to play a pivotal role in chondrogenesis, as increased protein *O*-GlcNAcylation and OGT and OGA expression is observed during chondrogenic differentiation of the murine ATDC5 chondrocyte cell line<sup>24</sup>. *O*-GlcNAcylation also impacts the activity of SRY-Box Transcription Factor 9 (Sox9) and RUNX Family Transcription Factor 2 (Runx2), two transcription factors implicated in cartilage development and OA pathogenesis<sup>25</sup>. While the whole of these data strongly support the hypothesis that the *O*-GlcNAcylation of proteins may play a pivotal role in cartilage homeostasis, the exact role of protein *O*-GlcNAcylation remains largely unknown in OA cartilage. Moreover, and in contrast to other age-related diseases, the therapeutic interest of the *O*-GlcNAcylation regulation is largely underexplored in OA. In this context, this study aimed to investigate the impact of increased *O*-GlcNAcylation on OA chondrocytes in vitro and in vivo in a post-traumatic murine OA model.

## **Method**

### **Isolation and amplification of primary human articular chondrocytes (HACs),**

Primary human articular chondrocytes (HACs) were isolated from the femoral condyles of OA patients undergoing total knee arthroplasty. All samples were harvested from patients after their informed consent according to the Declaration of Helsinki. This study was carried out following the recommendation of the Committee for Person Protection of Pays de La Loire and approved by the French Ministry of Higher Education and Research (registration number: DC-2017-2987).

Articular cartilage was cut into small slices and digested at 37°C with 0.2% type II collagenase for 30 min. Finally, slices were digested overnight at 37°C in 0.03% collagenase in DMEM (DMEM-Glutamax, 61965-026, Gibco) containing 10% fetal calf serum (FCS, S1810-500, Dominique Dutscher). Cell suspensions were then filtered through a cell strainer with 70 µm pores and cells plated at the density of  $6.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> (passage 0 (P0)). Chondrocytes were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, and 1% penicillin/streptomycin (PS, 1000 U/ml, 15140122, Thermo Fisher Scientific) (complete medium). chondrocytes were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and the culture medium was renewed every 2-3 days. For all the experiments, the HACs were used at P1.

### **Chondrocyte treatments**

The experimental layout is provided in Figure 1, A. At day -2 (D-2) HACs were plated at a density of 15 000 cells/cm<sup>2</sup> in a complete medium in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> and allowed to adhere for 24h. At day -1 (D -1), cells were pre-treated either with 1µM of thiamet-G (TG) or with 5mM Glucosamine (GlcN) (27055, Cayman). After 24h, at D0, IL-1β at 1ng/ml (IL038, Millipore) was added for the duration of the remaining experiment. Subsequent analyses were performed on day 1 and day 8 as illustrated by the experimental design (Figure 1, A).

### **Cell proliferation assay**

At each indicated time, HACs were trypsinized and the number of living cells was counted using Trypan Blue exclusion dye.

### RNA extraction and Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

RNA was extracted using a NucleoSpin® RNA XS kit (74092, Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions. RNA yield was measured using NanoDrop™ 1000 Spectrophotometers (Thermo Scientific™). Reverse transcription was performed using the Verso cDNA Synthesis Kit (AB1453B, Thermo Scientific™). Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed using specific primers (table 1) with SYBR™ Select Master Mix (4472908, Applied Biosystems™) on the CFX96 Touch Real-time PCR Detection System (Bio-Rad). GUS-B and PPIA were used as reference genes and results were expressed as relative expression levels using the Pfaffl method<sup>26</sup>.

Gene	Forward	Reverse
<b>OGT</b>	5'- CCTGCCCCAGAACCGTATCA -3'	5'- GCAAGTGAGCTGGGATGCTG -3'
<b>OGA</b>	5'- GCAAGAGTTTGGTGTGCCTCATC -3'	5'- GTGCTGCAACTAAAGGAGTCCC -3'
<b>GFAT1</b>	5'- GGATATGATTCTGCTGGTGTG -3'	5'- CCAACGGGTATGAGCTATTC -3'
<b>GFAT2</b>	5'- GCTCATCGTGATTGGCTGTGGA -3'	5'- CAACCATCACAGGAAGCTCAGTC -3'
<b>MMP3</b>	5'- CACTCACAGACCTGACTCGGTT -3'	5'- AAGCAGGATCACAGTTGGCTGG -3'
<b>MMP13</b>	5'- CCAGTCTCCGAGGAGAAACA -3'	5'- AAAACAGCTCCGCATCAAC -3'
<b>COX-2</b>	5'- CTTACGCATCAGTTTTTCAAG -3'	5'- TCACCGTAAATATGATTTAAGTCCAC -3'
<b>iNOS</b>	5'- GCTCAAATCTCGGCAGAATC -3'	5'- GCCATCCTCACAGGAGAGTT -3'
<b>Gus-b</b>	5'- CGCCTGCCTATCTGTATTC -3'	5'- TCCCCACAGGGAGTGTGTAG -3'
<b>PPIA</b>	5'- ATGCTGGACCCAACACAAAT -3'	5'- TCTTCACTTTGCCAAACACC -3'

Table 1: List of the PCR primers

### Animals and ethical aspects

Animal experiments were performed according to the European guidelines for the care and use of laboratory animals (2010/63/EU) and approved by the local ethics committee (CEEA.PdL.06), and the French Ministry of research (authorization n° 2021070817561382 / APAFIS #32378). Concerted and special efforts were made to minimize psychological and physical suffering as well as to reduce the

number of animals used. All mice were housed on a 12-hour light/dark cycle with unrestricted access to a regular chow diet and water

### **Surgical induction of post-traumatic OA**

Eighty 10-week-old male C57BL/6 mice (Janvier Labs, Saint-Berthevin, France) were randomly divided into 2 groups: DMM (destabilization of the medial meniscus n=60) and SHAM (n=20) for the 6 weeks and 12 weeks post-surgery time point. After 1 week of acclimatization, DMM surgery was performed on the right knee joint of mice (n=60) as previously described<sup>27</sup>. For sham operation (n=20), an arthrotomy without the section of the medial meniscal-tibial ligament was performed. Following surgery, DMM mice were separated in two groups. The first group (n=20) received no treatment, and the second one (n=40) GlcN at 0.825mg/ml was added to the drinking water. Mice were sacrificed 6 weeks (n=10 for SHAM and DMM; n=20 for DMM + GlcN) or 12 weeks (n=10 for SHAM and DMM; n=20 for DMM + GlcN) post-DMM surgery. The right knee joints were collected and fixed for 24 hours in a 4% paraformaldehyde solution and then placed in 70° ethanol for  $\mu$ CT, histological study, and Immunohistochemistry analysis. The left knee joint, heart, and serum were collected and placed in liquid nitrogen for subsequent analysis by western blot.

### **$\mu$ CT analysis**

The knees were analyzed by Micro-Computed Tomography (Skyscan 1272<sup>®</sup>, Bruker, Germany), with the following parameters: 60Kv, 180  $\mu$ A, a resolution of 10.7  $\mu$ m with a 0.25 aluminum filter and a rotation angle of 0.5, and a frame averaging of 3 to reduce noise. The 3D reconstructions were performed using NRecon software (Bruker). Spatial orientation was done using Dataviewer<sup>®</sup> software (Bruker). Selection and analysis of bone structural parameters, including bone volume (BV; mm<sup>3</sup>), Tissue volume (TV; mm<sup>3</sup>), and bone volume fraction (BV/TV, %), were done using CT-Analyser<sup>®</sup> software (Bruker). 3D models of the knee joints were created using CTVox software (Bruker).

### **Histological study**

After  $\mu$ CT assessment the knee joints were decalcified in 0.5 M EDTA solution (pH 7.4) at 4 °C for three weeks, dehydrated with graded ethanol solution from 70° to 100°, and embedded in paraffin. Serial paraffin sections of 5  $\mu$ m were stained with safranin O/Fast green staining using an automaton, Varistain Gemini S (Thermo Scientific, USA). The OA severity was evaluated using a scoring system adapted from the osteoarthritis research society international (OARSI) scoring system as previously described<sup>27-29</sup>. Synovial inflammation was assessed by a synovitis score developed by Lewis et al<sup>30</sup>. Scorings were performed independently by 3 different trained readers on at least 2 or 3 levels and the average scores were used for statistical analyses.

### **Tissue preparation**

Frozen tissues in liquid nitrogen were crushed in a mortar to obtain a powder for protein analysis. To preserve post-translational modifications, all grinding steps were performed in liquid nitrogen. Then the powder was collected in ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1 mM Nonidet P-40, 0,5 mM Sodium deoxycholate, 20 mM EDTA) supplemented with protease and phosphatase inhibitor mixture (Sigma Aldrich, P8340 and P044), and TG. Western blots were performed as described for cell analysis below.

### **Western blot**

Whole-cell lysates were collected and lysed in an ice-cold RIPA buffer. Protein concentration was measured with the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™, 23225). 20  $\mu$ g of protein were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) on a 4-15% polyacrylamide Criterion™ TGX Stain-Free™ gel (Bio-rad) and transferred into polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Trans-Blot Turbo Midi 0.2  $\mu$ m PVDF Transfer Packs BioRad) using a Trans-Blot Turbo System (BioRad). Membranes were blocked in 5% non-fat dry milk for OGT, OGA, GFAT2 or 3% BSA for GFAT1 and O-GlcNAC in TBS-T. The membranes were immunoblotted overnight at 4°C with the following antibodies: OGT (Cell Signaling Technology, 24083, 1/1000), OGA (Abcam, ab105217,

1/1000), GFAT1 (Cell Signaling Technology, 5322, 1/1000); GFAT2 (Abcam, ab190966, 1/2000) and O-GlcNAC-RL2 (Abcam, ab2739, 1/1000).

Blots were incubated with HRP conjugated secondary antibodies (Cell Signaling Technology, 7074S, 1/2000 or 7076 CST, 1/80 000 in TBS-T 5% non-fat dry milk), and signals detected with SuperSignal™ West Femto (Thermo Scientific™, 34094) or SuperSignal™ West Dura (Thermo Scientific™, 34075,). The images of the blots were analyzed with Image Lab software (Bio-Rad Laboratories, version 6.1.0) and normalized versus stain free.

### **Statistical analyses**

Statistical analyses and graphical representation were performed using GraphPad 8.0v Prism Software. For all experiments distribution was assessed using the Shapiro–Wilk normality test. In vitro, if data passed the normality test, they were subsequently analyzed by paired t-test or Two-way ANOVA with Tukey’s multiple comparisons. Otherwise, we use the Wilcoxon matched-pairs test. For in vivo experiments, data presented in scatter plots were analyzed by the Mann-Whitney test, and data presented in bars were analyzed by ordinary one-way ANOVA test if they passed the normality test. Otherwise, we used the Kruskal-Wallis test. P-values less than 0.05 were considered significant, \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

## **Results**

To select the appropriate dose of thiamet-G (TG) to use in this work, we first tested several concentrations of TG and assessed their impacts on HACs viability. We found that TG did not impact cell proliferation regardless of the doses evaluated over a three-day time course [Fig S1] and that the 1 $\mu$ M concentration was sufficient to induce a marked rise in protein O-GlcNAcylation level (2.5-fold change) [Fig.S1B]. Those results indicate that chondrocytes are sensitive to OGA inhibition induced by TG. Therefore, the subsequent in vitro experiments were performed using TG at 1 $\mu$ M as described in Fig. 1(A).

### ***TG and GlcN dampen inflammation in vitro***

We first evaluated whether increased O-GlcNAcylation could modulate the expression levels of IL-1 $\beta$ -responsive genes involved in inflammation and catabolic processes in cartilage. HACs were pretreated with TG or GlcN for 24h and then stimulated or not with IL-1 $\beta$ . The treatment of HACs with either TG or GlcN alone did not impact the expression of the cyclooxygenase-2 (COX-2) and the inducible nitric oxide synthase (iNOS) respectively involved in the synthesis and production of prostaglandins and nitric oxide; two factors known to promote and supports inflammation. They also did not change the expression of matrix metalloproteinase-3 (MMP3) and MMP13, two enzymes implicated in cartilage degradation at days 1 and 8 [Fig. 1(B)].

As expected, IL-1 $\beta$  at 1ng/ml significantly increased the expression of COX-2 (105.2-fold change), iNOS (7207.7-fold change), MMP3 (10.1-fold change), and MMP13 (114.3-fold change) after 24h of treatment (D1). At day 8, while the induction of those markers was still higher in the IL-1 $\beta$  treated condition, only MMP3 (61.4-fold change) remained significantly elevated [Fig. 1(B)]. Interestingly, our results demonstrated a significant decrease in IL-1 $\beta$ -induced COX-2 and iNOS gene expression levels at day 1 in HACs pre-treated with TG or GlcN. However, only GlcN pre-treatment significantly reduced the expression of MMP3 and MMP13 on day 1. At day 8, neither TG nor GlcN pre-treatment dampened

the IL-1 $\beta$  increased expression of COX-2, iNOS, MMP3, and MMP13. In parallel, protein O-GlcNAcylation levels were analyzed by WB [Fig. 1(C-D)]. Our results showed that TG led to a significant increase in protein O-GlcNAcylation on days 1 and 8, whereas GlcN only tended to increase overall protein O-GlcNAcylation on day 1 trend was lost on day 8. IL-1 $\beta$  treatment alone or combined with TG or GlcN does not seem to impact protein O-GlcNAcylation.

### **IL-1 $\beta$ , TG, and GlcN module the expression of OGT, OGA, and GFATs**

We then looked at the impact of IL-1 $\beta$ , TG, and GlcN treatments on the key enzymes implicated in UDP-GlcNAc synthesis GFAT1 and GFAT2, as well as OGT and OGA, responsible for the addition and removal of O-GlcNAc moieties [Fig. 2]. OGA expression level is significantly increased by TG treatment with or without IL-1 $\beta$ , only on day 8, whereas TG and GlcN showed only a trend to increase OGT expression over time. On the contrary, IL-1 $\beta$  does not impact OGT and OGA expressions on days 1 and 8. Interestingly, IL-1 $\beta$  treatment alone significantly increased GFAT1 and GFAT2 expression on day 1 but not on day 8. Pre-treatment with TG deepens GFAT 1 and GFAT2 expression, whereas GlcN only affects GFAT2 expression spurred by IL-1 $\beta$ .

### **GlcN does prevent osteophytes formation in the DMM murine model**

To evaluate the effect of increased O-GlcNAcylation on OA onset in vivo, we investigated the effect of GlcN supplementation in drinking water in a post-traumatic OA (DMM) murine model. We first assessed subchondral bone modification by  $\mu$ CT analyses. Regarding the subchondral bone, 6 weeks post DMM, no differences were visible between the groups as illustrated in Fig. 3(A). In line with this observation, the bone volume fraction (BV/TV) was unchanged 6 weeks post-surgery [Fig. 3(B)]. At 12 weeks post-surgery, osteophytes were visible in the DMM group, and the bone volume fraction was significantly increased. Interestingly, GlcN has significantly protected DMM mice from bone alterations, as illustrated in Fig. 3(A), and presented a bone volume fraction equivalent to the SHAM group [Fig. 3(B)].

### **GlcN does not protect cartilage and synovial membrane from induced OA in the DMM murine model**

At the histological level, the OA score known to increase with articular cartilage alterations was higher in the DMM and GlcN group compared to the SHAM group at the same time [Fig. 4(A-B)]. Moreover, at 12 weeks, the GlcN group exhibited a higher OARSI score compared to the DMM group. Similarly, we also observe a worsening of the synovial scores in the DMM and GlcN groups compared to the SHAM group [Fig. 4(C)]. In SHAM and DMM groups, OARSI and synovial scores are stable between 6 and 12 weeks, whereas OARSI scores increased over time in the GlcN group indicating a worsening of OA.

### **Quantification of *O*-GlcNAcylated proteins in the cartilage, heart, and blood in vivo**

We then assessed how DMM induction and GlcN administration would influence overall *O*-GlcNAcylation protein levels in different tissues. No differences were observed in protein *O*-GlcNAcylation levels between the SHAM and DMM groups in the knee joint [Fig. 5(A)] and heart [Fig. 5(B)] tissues as well as in blood [Fig. 5(C)] except for the heart at 12 weeks. The administration of GlcN through the drinking water in our DMM model tended to increase protein *O*-GlcNAcylation, at 6 and 12 weeks in the knee joint [Fig. 5(A)], at 12 weeks in the heart [Fig. 5(B)] and at 6 weeks in the blood [Fig. 5(C)]. Throughout our study, the *O*-GlcNAcylation level increased between 6 and 12 weeks in the knee joint of the DMM and GlcN groups, and in the three groups in blood. Conversely, the *O*-GlcNAcylation level decreased in SHAM and DMM hearts in the groups between the two-time points at 6 and 12 weeks post-surgery. Altogether, these results suggest a tissue-specific regulation of *O*-GlcNAcylation levels upon GlcN administration.

### **Quantification of enzymes implicated in *O*-GlcNAcylation regulation in the cartilage and heart in vivo**

To gain insight into the regulation of the *O*-GlcNAcylation level in vivo, we measured the level of several enzymes implicated in *O*-GlcNAcylation regulation. In the knee joint and the heart, we were able to

visualize OGT [Fig. 6] and GFAT2 [Fig. 7] by WB. Additionally, OGA et GFAT1 were detected in the heart [Supp. Fig. 2]. At 6 weeks, in the knee joint [Fig. 6(A)], and the heart [Fig. 6(B)] we observed a marked increase of OGT in the DMM group compared to the SHAM, whereas GlcN administration significantly downregulated OGT protein level in the knee. At 12 weeks, the OGT level is equivalent across the three groups in both tissues. OGT level increased in the GlcN group in the knee while it decreased in the heart tissues between 6 and 12 weeks. GFAT2 expression is diminished in the cartilage of the GlcN group at 6 weeks but elevated in the DMM and GlcN group at 12 weeks in the heart.

## Discussion

*O*-GlcNAcylation is implicated in numerous cellular functions and dysregulation of *O*-GlcNAc levels found in a variety of age-related diseases<sup>11</sup>. Despite a previous study showing that *O*-GlcNAcylation of cartilage proteins is increased in OA patients<sup>23</sup>, the role of this PTM in the pathogenesis of OA remains largely unknown. In this context, our work aimed at investigating the impact of elevated *O*-GlcNAcylation in OA. To this end, we selected two molecules known to increase protein *O*-GlcNAcylation: the TG, an OGA inhibitor, and the GlcN<sup>11</sup>, a naturally occurring monosaccharide able to bypass the rate-limiting enzyme GFAT to fuel the HBP, increase the synthesis and the pool of the donor sugar UDP-GlcNAc available in the cell.

In vitro, we pre-treated HACs with either of the molecules for 24h before exposing the cells to IL-1 $\beta$ , a cytokine commonly used in vitro to mimic the OA environment<sup>31,32</sup>. Despite being water soluble, the long-term administration of TG in drinking water for in vivo study would be too costly. GlcN has been widely studied for its therapeutic potential in the treatment of OA both in vitro and in vivo<sup>33,34</sup> so we decided to administrate GlcN.

First of all, our in vitro results showed that treatment with TG and to a lesser extent GlcN is accompanied by an increase in protein *O*-GlcNAcylation, consistent with what has been previously reported in other cell types such as pancreatic or synovial cell lines. Moreover, pre-treatment with either TG or GlcN treatment was able to reduce the IL-1 $\beta$ -induced expression of MMP3 and MMP13, two enzymes implicated in cartilage degradation, as well as COX-2 and iNOS, two enzymes responsible for the production of prostaglandins, and nitric oxide respectively. This observation is in line with previous studies that reported a beneficial effect of GlcN on inflammation and the production of MMPs in rodent chondrocytes<sup>35</sup>. Interestingly, the in vitro anti-inflammatory effect of GlcN is greater than TG. This difference could be explained by the fact that TG specifically inhibits OGA to increase GlcNAcylation, whereas GlcN can fuel other biological pathways than the HBP. To investigate to which extent the effect of glucosamine is mediated by elevated GlcNAcylation, conducting further studies by

inhibiting specifically OGT, the enzyme responsible for the *O*-GlcNAc moiety grafting onto protein could be useful.

When we looked at the key enzymes implicated in *O*-GlcNAcylation regulation, we noted that OGT and OGA expression increase in paralleled in the condition treated by TG and GlcN in vitro. This observation is consistent with the concept that OGT and OGA may increase or decrease in tandem in response to *O*-GlcNAc levels modifications. Indeed, even if IL-1 $\beta$  did not impact the expression of OGT and OGA, it did trigger an increased expression of both GFAT1 and GFAT2 enzymes on day 1, the TG and, to a lesser extent, the GlcN reduced it.

In our DMM model, contrary to what was previously reported we did not observe an amelioration of the OARSI and synovial scores upon GlcN administration. But we saw a beneficial effect on bone remodeling with the absence of osteophyte formation and a bone quality equivalent to the sham group 12 weeks post-surgery. The apparent discrepancy between our results and the previous ones showing a beneficial effect of GlcN treatment could be explained by differences in how our study was designed. Indeed, we started GlcN administration on the day of surgery, whereas studies demonstrating beneficial effects started the treatment one or two weeks before the DMM induction<sup>37</sup>.

Since the administration of GlcN through drinking water allow a systemic effect of the molecule, we look at its impact on proteins *O*-GlcNAcylation in different tissues, the knee joint, the heart, and the blood. Our results tend to show an increased *O*-GlcNAcylation level in the GlcN group compared to the Sham and DMM groups. We were also able to detect OGT and GFAT2 proteins in the joint and the heart and additionally OGA and GFAT1 in the heart. So additional work must be conducted to detect those proteins in the knee. In conclusion, these results show that pharmacologically increased *O*-GlcNAcylation in vitro seems to have a beneficial effect on OA environment triggered by IL-1 $\beta$ , especially on inflammation and that IL-1 $\beta$  disturbed the expression of GFAT1 and GFAT2 however the impact of their elevated expression remains to be investigated.

In vivo, our result showed a beneficial effect of GlcN administration on bone remodeling and osteophyte formation. However, we also observed the detrimental effect of GlcN administration on cartilage and synovitis. Whether both beneficial and detrimental effects are mediated by increased *O*-GlcNAcylation in the joint tissues remains to be deciphered in further experiments with inhibition of the *O*-GlcNAcylation process. Our data highlighted the need for a better understanding and investigation of the role *O*-GlcNAcylation in the development and progression of OA.

### **Authors contributions**

MG, JG, and CV conceived the study, designed, and supervised the experiment. MG, CB, SR, TD, AD, NB, YLG, JV, BL performed the experiment, analyzed data, and/or provide samples. MG and CV drafted the article. CV and JG provide financial support.

### **Conflict of interest:**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Role of the funding source:**

The authors are grateful to the Arthritis R&D and “fondation Arthritis” for funding the emerging project GHOST (CV), the Agence Nationale de la Recherche (ANR) for funding the projects JCJC KLOTHOA (ANR-18-CE14-0024-01; CV), the Foundation for Research in Rheumatology for funding the project FOREUM-EULAR SEN-OA (CV, JG, MG), the region of the Pays de la Loire RFI BIOREGATE for funding the projects GENOA (CV, AD), and INSERM for funding the cross-disciplinary program AGEMED 2.0 (JG, CV) for their financial support.

### **References**

1. Leifer, V. P., Katz, J. N. & Losina, E. The burden of OA-health services and economics. *Osteoarthritis and Cartilage* **30**, 10–16 (2022).
2. Hootman, J. M., Helmick, C. G., Barbour, K. E., Theis, K. A. & Boring, M. A. Updated Projected Prevalence of Self-Reported Doctor-Diagnosed Arthritis and Arthritis-Attributable Activity Limitation Among US Adults, 2015–2040. *Arthritis & Rheumatology* **68**, 1582–1587 (2016).
3. Hunter, D. J., Schofield, D. & Callander, E. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **10**, 437–441 (2014).

4. Kolasinski, S. L. *et al.* 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Rheumatol* **72**, 220–233 (2020).
5. Martel-Pelletier, J. *et al.* Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers* **2**, 1–18 (2016).
6. Greene, M. A. & Loeser, R. F. Aging-related inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **23**, 1966–1971 (2015).
7. Torres, C. R. & Hart, G. W. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* **259**, 3308–3317 (1984).
8. Holt, G. D. & Hart, G. W. The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* **261**, 8049–8057 (1986).
9. Schindler, M., Hogan, M., Miller, R. & DeGaetano, D. A nuclear specific glycoprotein representative of a unique pattern of glycosylation. *The Journal of Biological Chemistry* **262**, 1254–1260 (1987).
10. Yang, X. & Qian, K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 452–465 (2017).
11. Chatham, J. C., Zhang, J. & Wende, A. R. Role of O-linked N-acetylglucosamine protein modification in cellular (patho)physiology. *Physiological Reviews* **101**, 427–493 (2021).
12. Zachara, N. E. & Hart, G. W. O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1673**, 13–28 (2004).
13. Sharma, N. S., Saluja, A. K. & Banerjee, S. “Nutrient-sensing” and self-renewal: O-GlcNAc in a new role. *J Bioenerg Biomembr* **50**, 205–211 (2018).

14. Hanover, J. A., Krause, M. W. & Love, D. C. The Hexosamine Signaling Pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochim Biophys Acta* **1800**, 80 (2010).
15. Bolanle, I. O. & Palmer, T. M. Targeting Protein O-GlcNAcylation, a Link between Type 2 Diabetes Mellitus and Inflammatory Disease. *Cells* **11**, 705 (2022).
16. Wu, D., Jin, J., Qiu, Z., Liu, D. & Luo, H. Functional Analysis of O-GlcNAcylation in Cancer Metastasis. *Front Oncol* **10**, 585288 (2020).
17. Lee, J. B., Pyo, K.-H. & Kim, H. R. Role and Function of O-GlcNAcylation in Cancer. *Cancers (Basel)* **13**, 5365 (2021).
18. Ouyang, M. *et al.* O-GlcNAcylation and Its Role in Cancer-Associated Inflammation. *Front Immunol* **13**, 861559 (2022).
19. Bolanle, I. O., Riches-Suman, K., Williamson, R. & Palmer, T. M. Emerging roles of protein O-GlcNAcylation in cardiovascular diseases: Insights and novel therapeutic targets. *Pharmacol Res* **165**, 105467 (2021).
20. Wang, H.-F. *et al.* Protein O-GlcNAcylation in cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol Sin* (2022) doi:10.1038/s41401-022-00934-2.
21. Lee, B. E., Suh, P.-G. & Kim, J.-I. O-GlcNAcylation in health and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med* **53**, 1674–1682 (2021).
22. Park, J., Lai, M. K. P., Arumugam, T. V. & Jo, D.-G. O-GlcNAcylation as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Neuromolecular Med* **22**, 171–193 (2020).
23. Tardio, L. *et al.* O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) protein modification is increased in the cartilage of patients with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* **22**, 259–263 (2014).

24. Andrés-Bergós, J. *et al.* The Increase in O-Linked N-Acetylglucosamine Protein Modification Stimulates Chondrogenic Differentiation Both in Vitro and in Vivo. *J Biol Chem* **287**, 33615–33628 (2012).
25. Sun, C. *et al.* Glucose regulates tissue-specific chondro-osteogenic differentiation of human cartilage endplate stem cells via O-GlcNAcylation of Sox9 and Runx2. *Stem Cell Res Ther* **10**, (2019).
26. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, e45 (2001).
27. Fouasson-Chailloux, A. *et al.* Posttraumatic Osteoarthritis Damage in Mice: From Histological and Micro-Computed Tomodensitometric Changes to Gait Disturbance. *Cartilage* **13**, 1478S-1489S (2021).
28. Mével, E. *et al.* Olive and grape seed extract prevents post-traumatic osteoarthritis damages and exhibits in vitro anti IL-1 $\beta$  activities before and after oral consumption. *Sci Rep* **6**, 33527 (2016).
29. Bodic, B. *et al.* Development and characterization of a humanized mouse model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **30**, 875–885 (2022).
30. Lewis, J. S. *et al.* Acute joint pathology and synovial inflammation is associated with increased intra-articular fracture severity in the mouse knee. *Osteoarthritis Cartilage* **19**, 864–873 (2011).
31. Wojdasiewicz, P., Poniatowski, Ł. A. & Szukiewicz, D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm.* **2014**, 561459 (2014).
32. Dai, S.-M. *et al.* Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation

- of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **54**, 818–831 (2006).
33. Zhu, X., Sang, L., Wu, D., Rong, J. & Jiang, L. Effectiveness and safety of glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Orthop Surg Res* **13**, 170 (2018).
34. Simental-Mendía, M. *et al.* Effect of glucosamine and chondroitin sulfate in symptomatic knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Rheumatol Int* **38**, 1413–1428 (2018).
35. Gouze, J.-N. *et al.* Exogenous glucosamine globally protects chondrocytes from the arthritogenic effects of IL-1 $\beta$ . *Arthritis Res Ther* **8**, R173 (2006).
36. Byron, C. R., Stewart, M. C., Stewart, A. A. & Pondenis, H. C. Effects of clinically relevant concentrations of glucosamine on equine chondrocytes and synoviocytes in vitro. *Am J Vet Res* **69**, 1129–1134 (2008).
37. Fernández-Martín, S. *et al.* Glucosamine and Chondroitin Sulfate: Is There Any Scientific Evidence for Their Effectiveness as Disease-Modifying Drugs in Knee Osteoarthritis Preclinical Studies?—A Systematic Review from 2000 to 2021. *Animals* **11**, 1608 (2021).

**Figures legends:**

Figure 1: **O-GlcNAcylation attenuates inflammation in IL-1 $\beta$  stimulated HACs.** (A) Treatment plan; the HACs were pre-treated with either 1 $\mu$ M TG (blue), 5mM GlcN (red), or untreated (black) 24h before HACs stimulation with IL-1 $\beta$  at 1ng/ml. (B) The expressions of COX-2, iNOS, MMP3, and MMP13 were evaluated by RT-qPCR. Data are shown as mean  $\pm$  SD, (n $\geq$ 3). P-values were calculated by 2way-ANOVA test \*p<0.05; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001. (C) Evaluation by Western blot of O-GlcNAcylation levels normalized versus stain free. Data are shown as mean  $\pm$  SD, (n $\geq$ 3). P-values were calculated by t-test. \*p<0.05.

Figure 2: **Impact of elevated O-GlcNAcylation in IL-1 $\beta$  stimulated HACs on key enzymes implicated in O-GlcNAcylation regulation level.** HACs were pre-treated with either 1 $\mu$ M TG (blue), 5mM GlcN (red), or untreated (black) 24h before HACs stimulation with IL-1 $\beta$  at 1ng/ml. The expressions of OGT, OGA, GFAT1, and GFAT2 were evaluated by RT-qPCR. Data are shown as mean  $\pm$  SD, (n $\geq$ 3). P-values were calculated by 2way-ANOVA test \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

Figure 3: **GlcN inhibits osteophyte formation in the post-traumatic OA, on knee joints of male C57BL/6 mice.** (A) Representative 3D reconstructed  $\mu$ CT images of knee joints from Sham, DMM, and GlcN mice groups, at 6 and 12 weeks post-surgery. (B) Quantitative analysis of the bone volume/tissue volume (BV/TV) on Sham (n=10), DMM (n=10) and GlcN (n=19) at each time point. Data are shown as mean  $\pm$  SD,. P-values calculated by Mann-Whitney test vs Sham, \*\* p<0.01; or vs DMM, ## p<0.01.

Figure 4: **Evaluation of post-traumatic OA, on knee joints of male C57BL/6 mice.** (A) Safranin O Fast-Green staining. Yellow arrows indicate cartilage damage. Scale bar: 100 $\mu$ m. Osteoarthritis severity was assessed using the Modified OARSI (B) and synovial score (C) on Sham (n=10), DMM (n=10) and GlcN

(n=19) at each time point. Data are shown as mean  $\pm$  SD, P-values calculated by Mann-Whitney test vs Sham, \*p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\*p<0.001 or by Mann-Whitney test vs DMM, ## p<0.01; or italic value.

**Figure 5: Impact of GlcN administration in vivo on protein O-GlcNAcylation levels in the knee joint, heart, and blood of mice.** Representative western blot and associated quantification of O-GlcNAcylation levels normalized to stain-free in the knee joint (A), heart (B), and blood (C) of SHAM, DMM, and GlcN groups. Results are expressed as a mean  $\pm$  SD, (n  $\geq$  4). P-values calculated by one-way ANOVA, \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

**Figure 6: Variations in the knee joints (A) and heart (B) of OGT levels in the post-traumatic OA murine model.** Representative western blot and associated quantification of OGT level normalized to stain-free in the knee joint (A) and heart (B) of mice 6 weeks and 12 weeks post-surgery. Results are expressed as a mean  $\pm$  SD, (n  $\geq$  4). P-values calculated by one-way ANOVA, \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001.

**Figure 7: Variations in the knee joint (A) and heart (B) of GFAT2 levels in the post-traumatic OA murine model.** Representative western blot and associated quantification of GFAT2 level normalized to stain-free in the knee joint (A) and heart (B) of mice 6 weeks and 12 weeks post-surgery. Results are expressed as a mean  $\pm$  SD, (n  $\geq$  4). P-values calculated by one-way ANOVA, \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001.

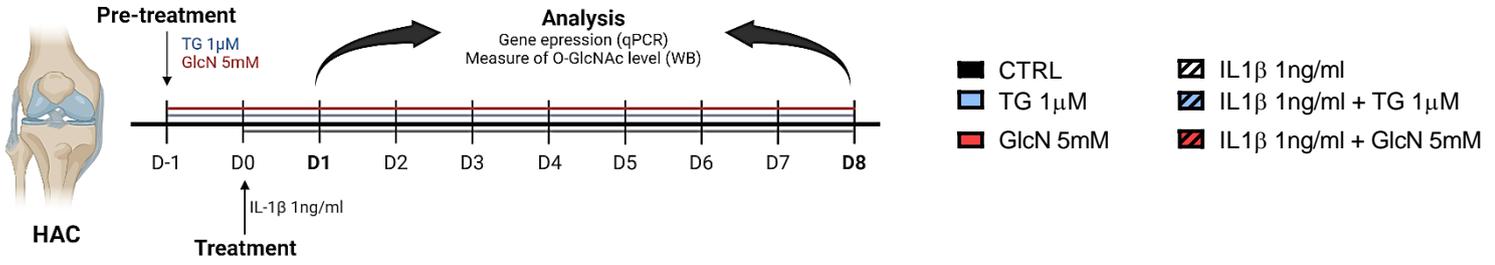
**Supplementary figure 1: Impact of TG treatment on HACs viability.** HACs were treated with TG (blue) at 0.1, 1, 10  $\mu$ M or untreated (Black) for the length of the experiment, and cell viability was assessed by trypan blue exclusion dye. Results are expressed as the % of viable cells versus the number of viable

cells in the control (CTRL) condition at day 0. Data are shown as mean  $\pm$  SD, (n=3). **(B)** Representative western blot of HACs O-GlcNAcylation level after 24h of treatment with TG at 1  $\mu$ M and their associated quantification. Data are shown as mean  $\pm$  SD, (n=7). P-values were calculated by t-test, \*\*\*p<0.001.

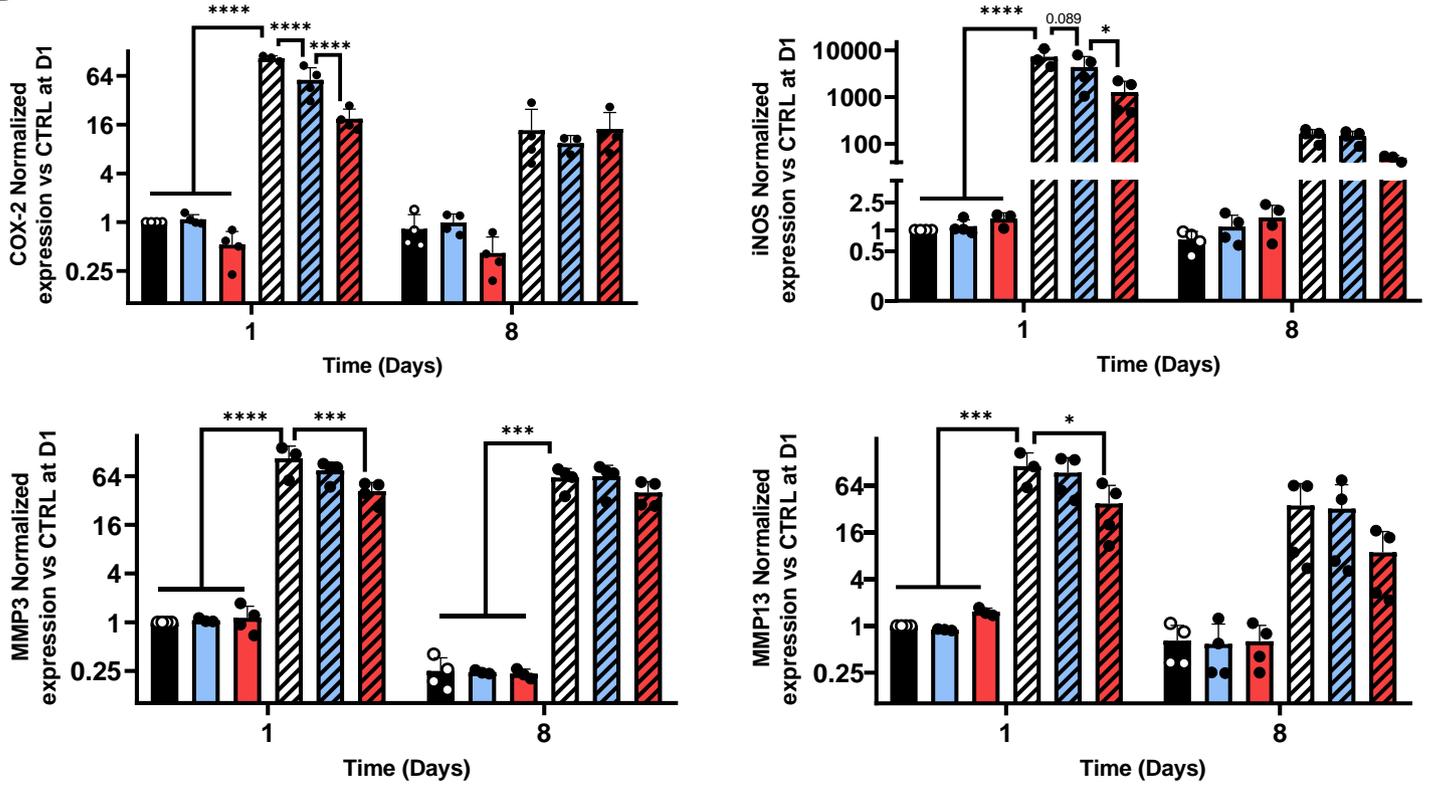
Supplementary figure 2: **Variations in the heart of OGA (A) and GFAT1 (B) levels in the post-traumatic OA murine model.** Representative western blot and associated quantification of OGA **(A)** and GFAT1 **(B)** level normalized to stain-free in the heart of mice 6 weeks and 12 weeks post-surgery. Results are expressed as a mean  $\pm$  SD, (n  $\geq$  4). P-values calculated by one-way ANOVA, \*\* p<0.01.

Figure 1

A



B



C

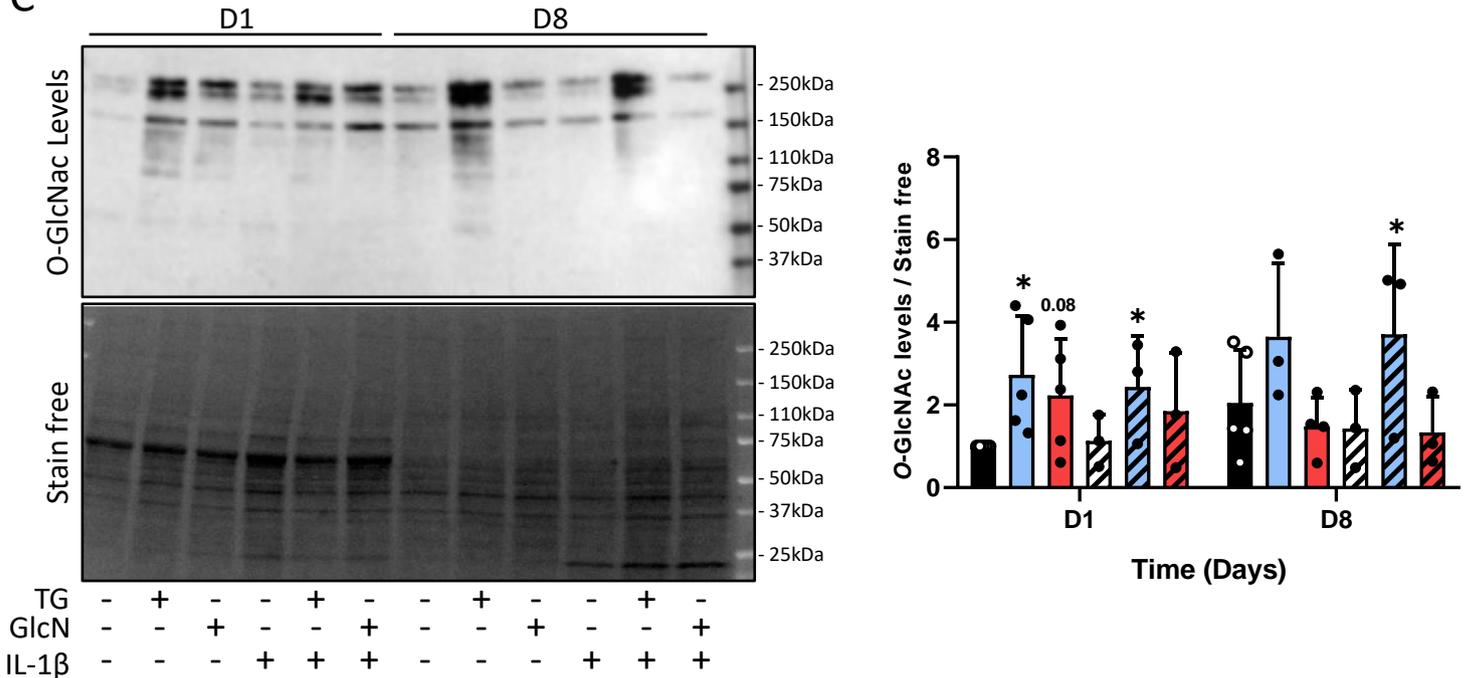


Figure 2

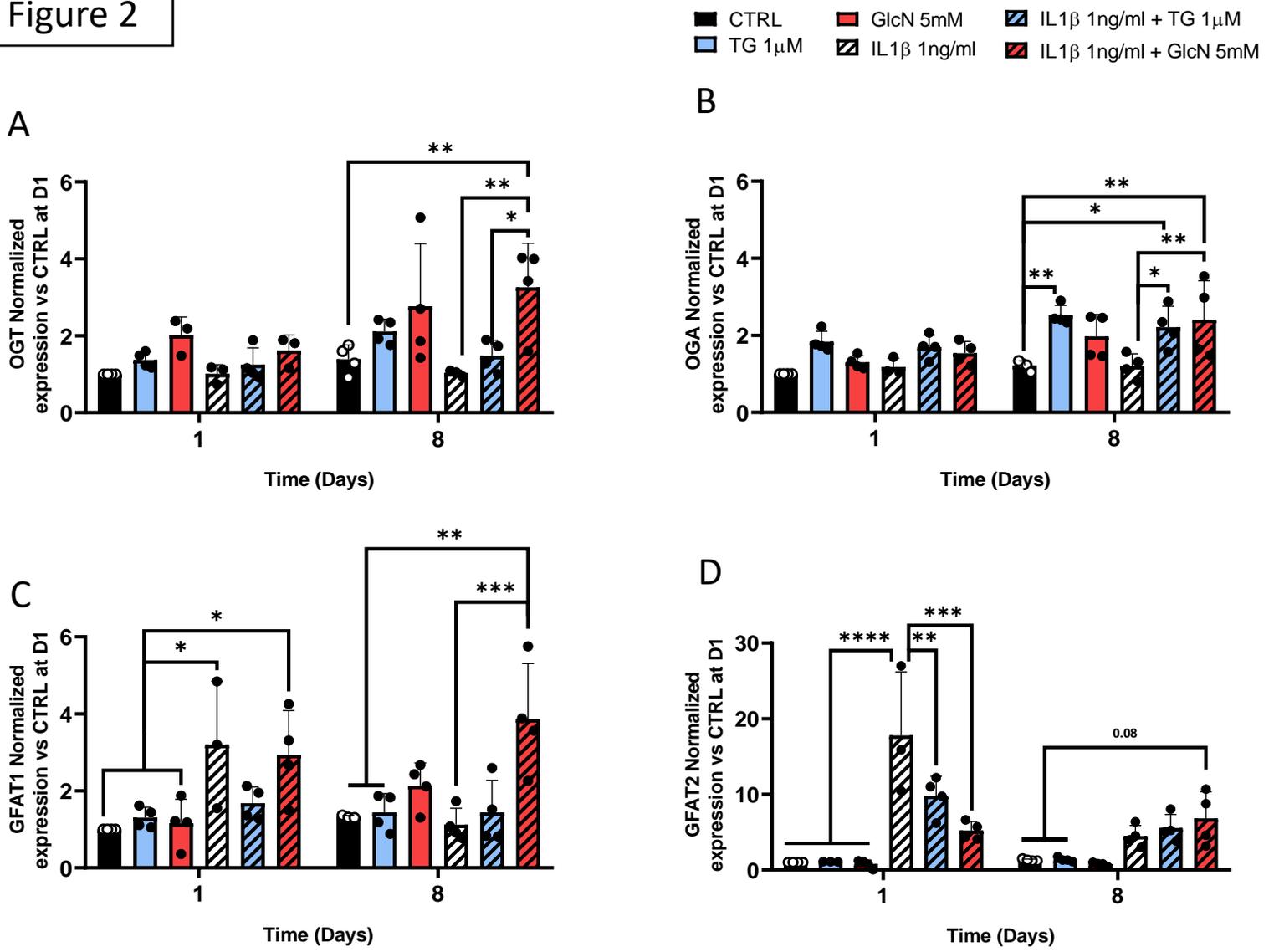


Figure 3

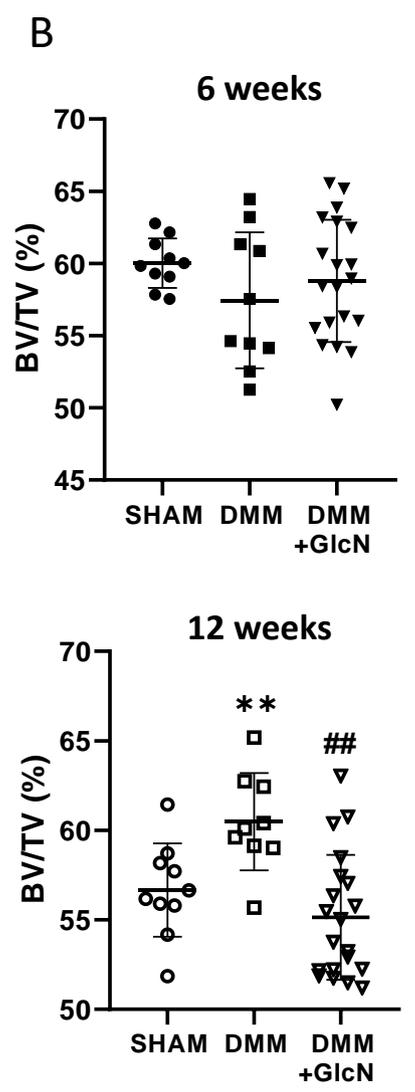
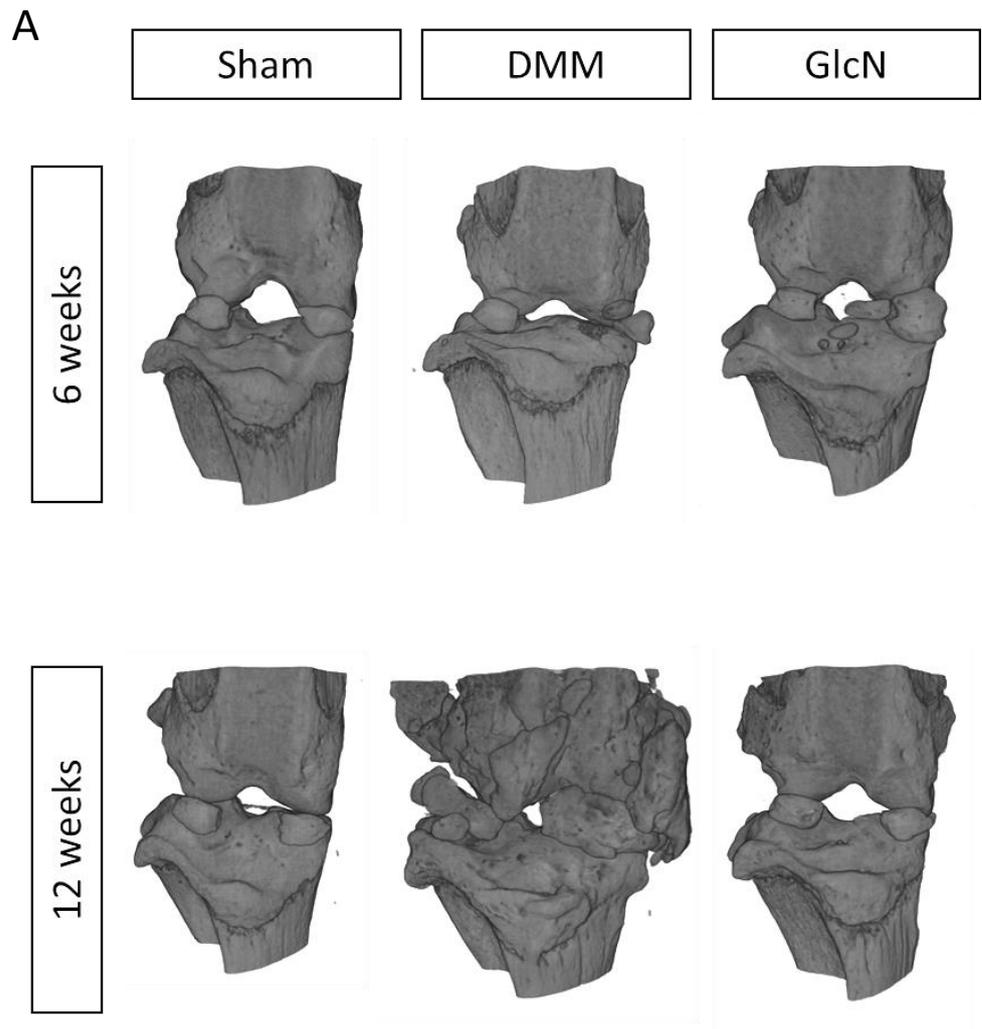


Figure 4

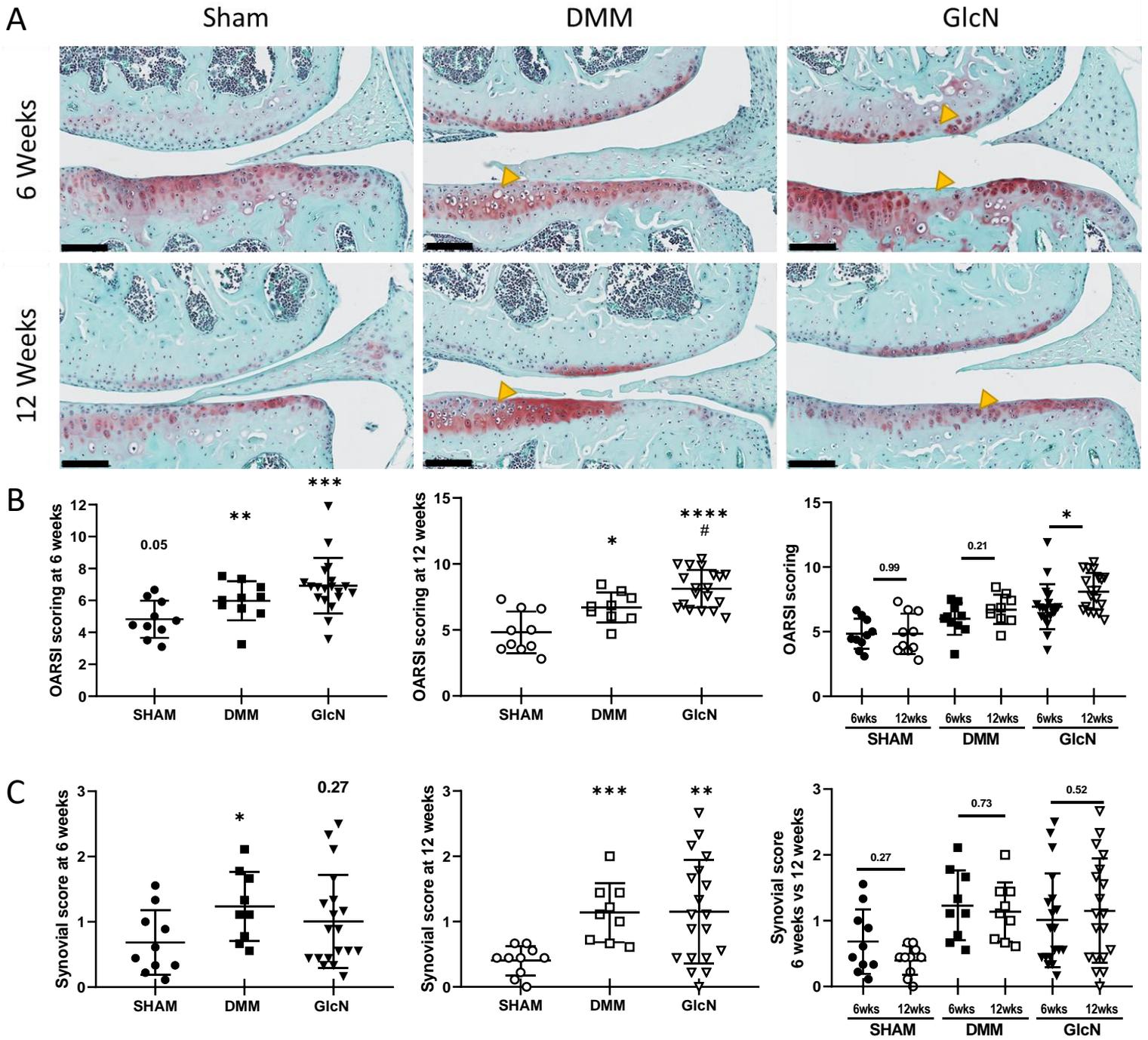
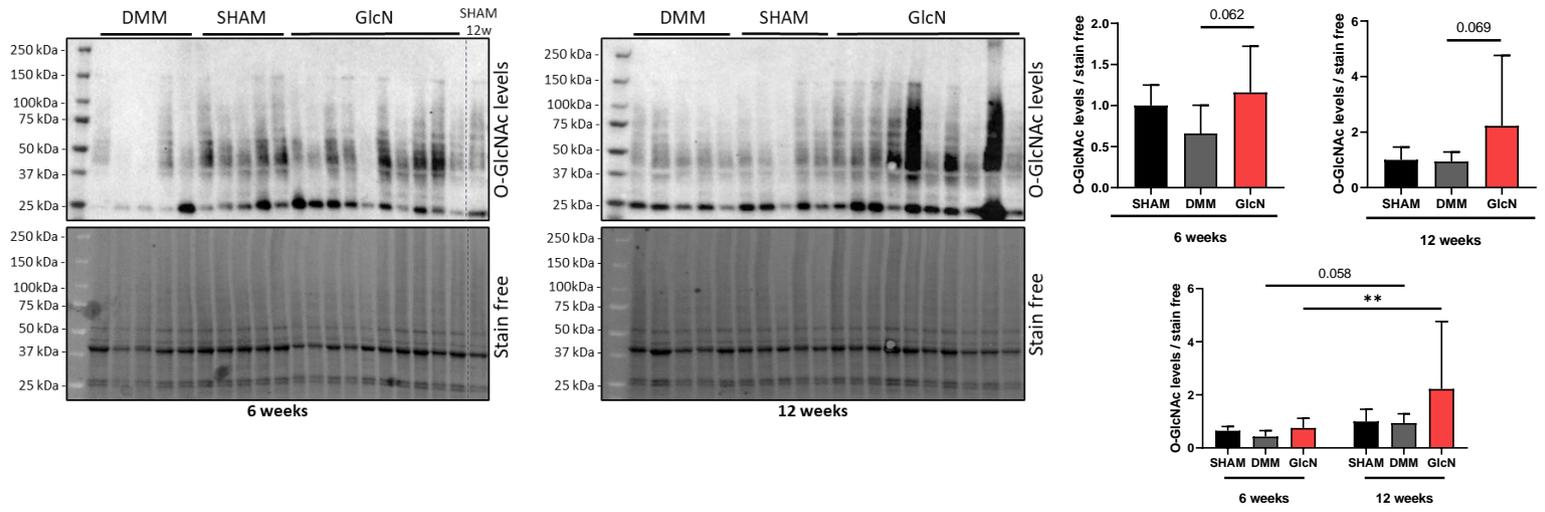
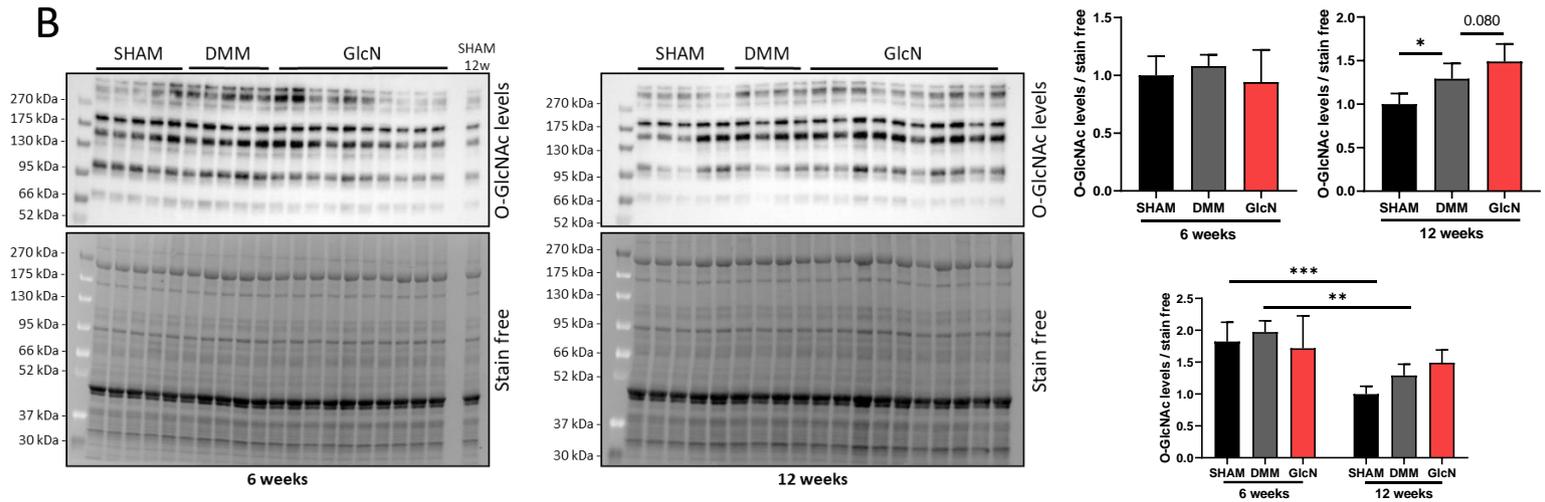


Figure 5

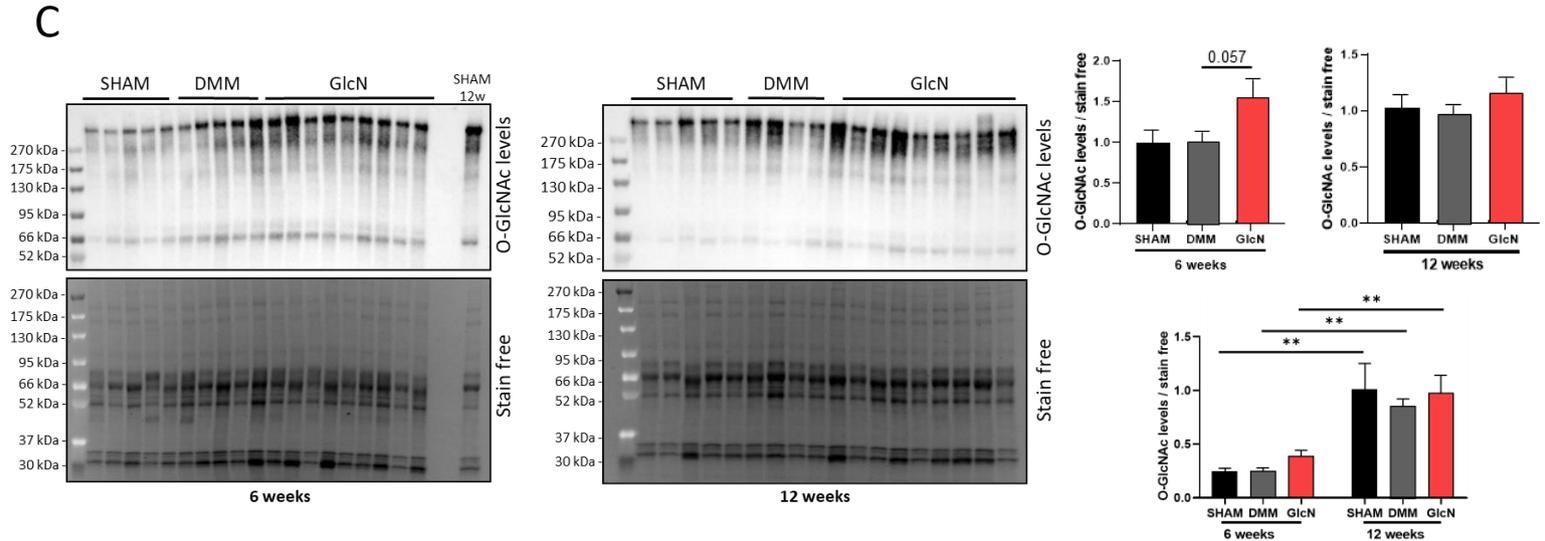
A



B

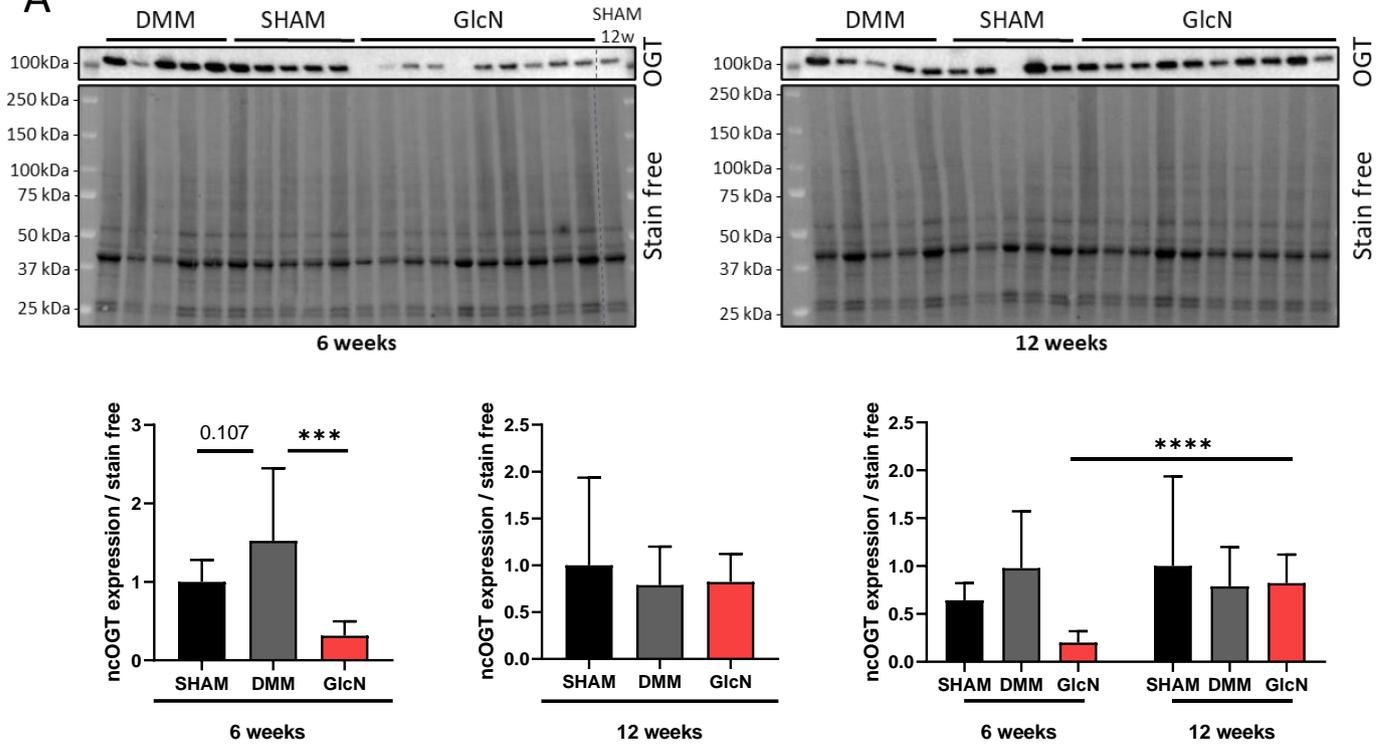


C



**Figure 6**

**A**



**B**

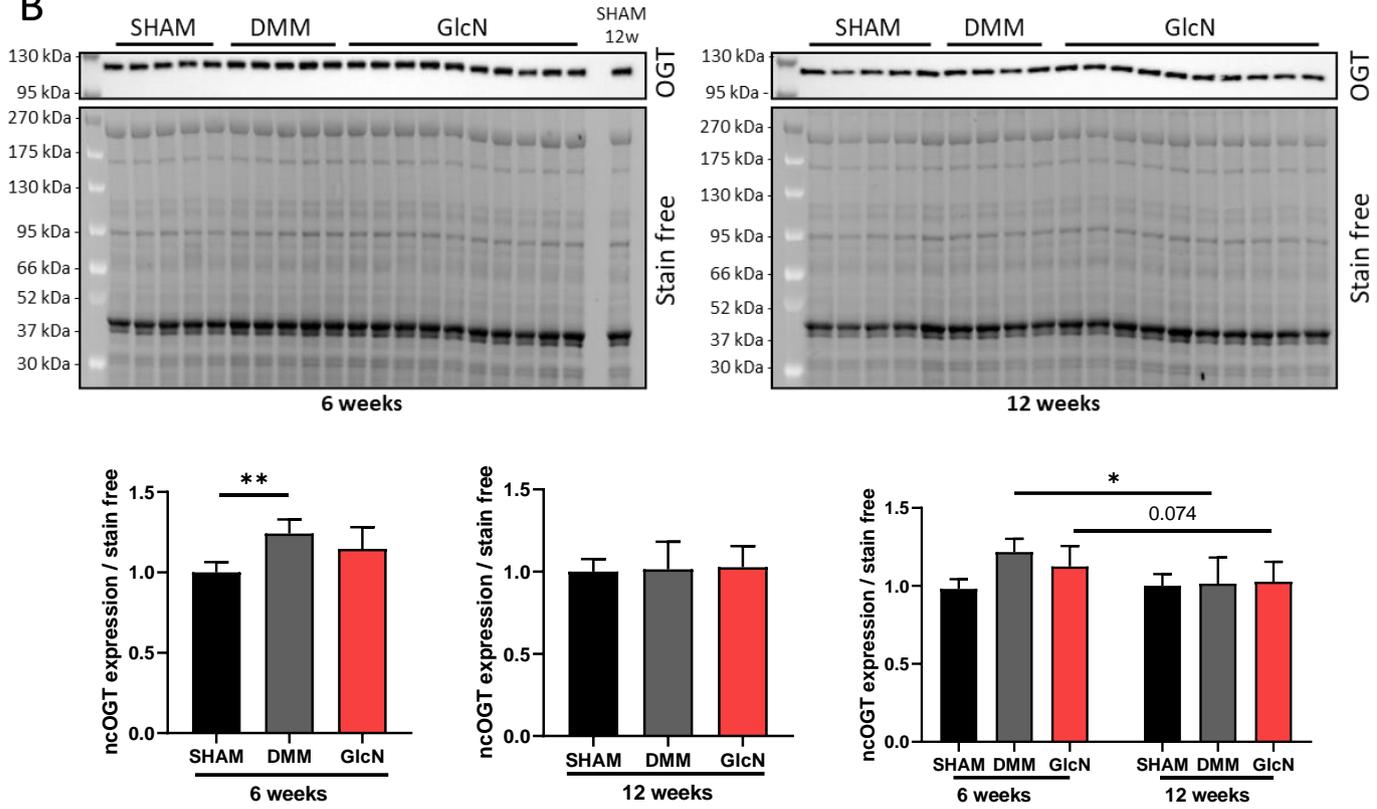
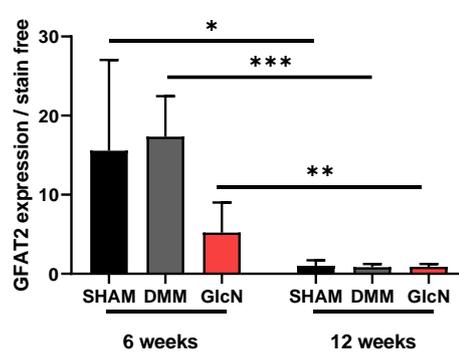
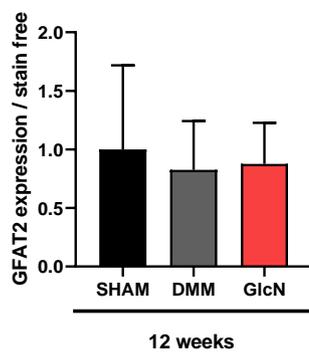
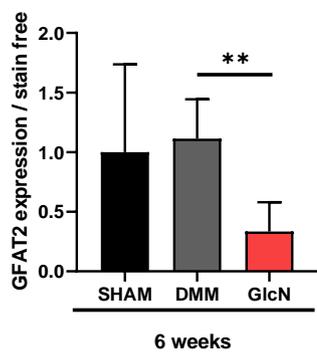
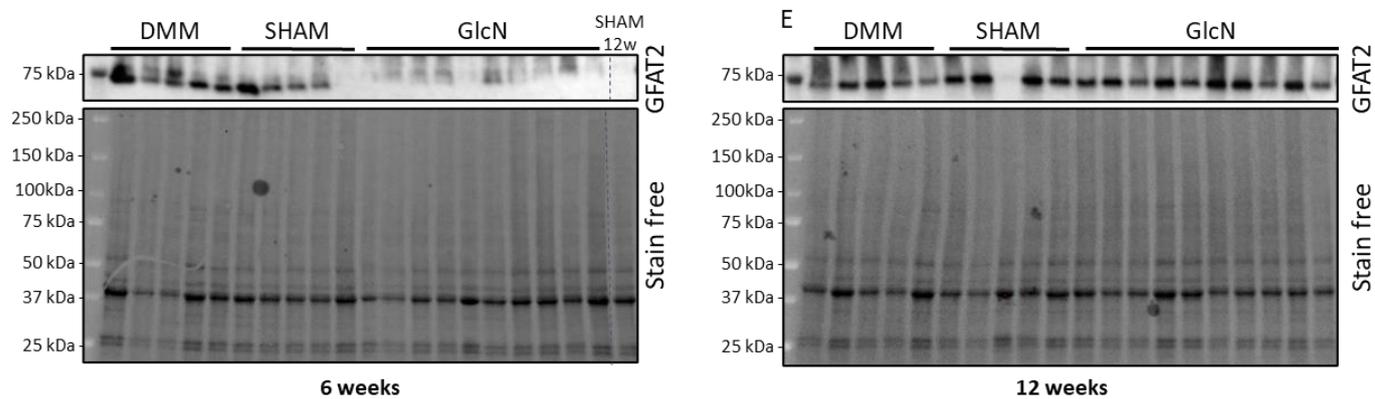
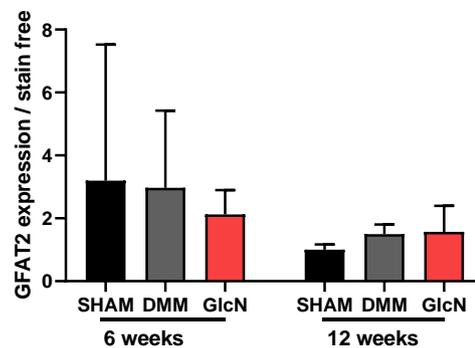
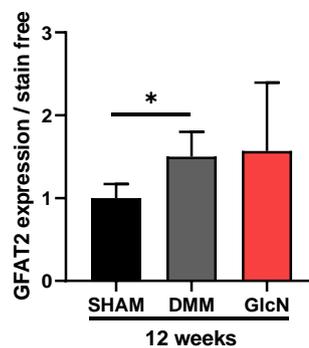
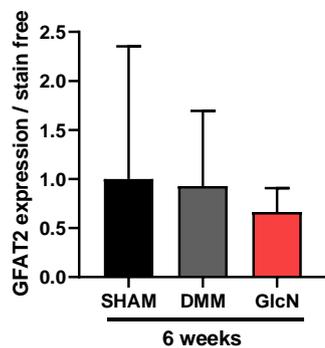
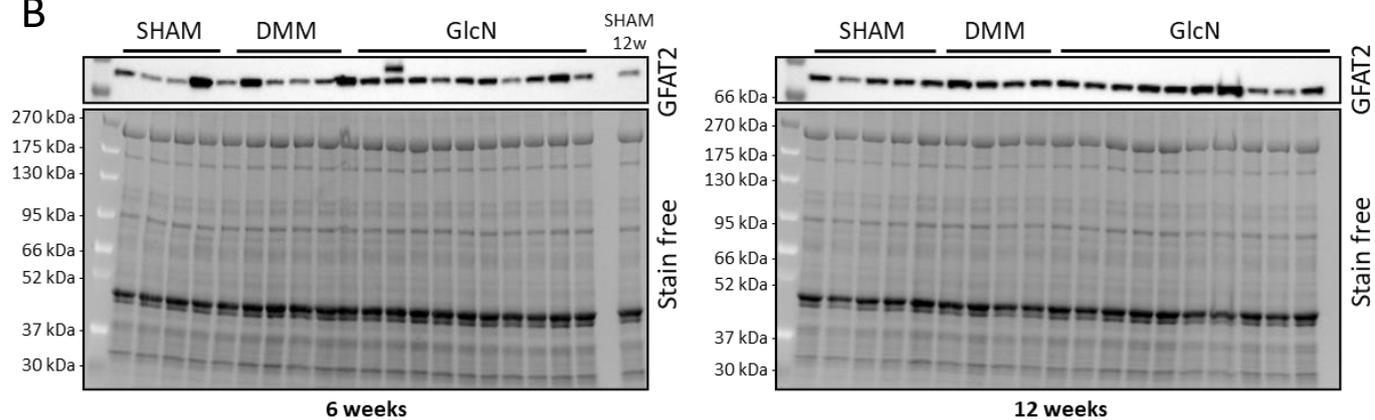


Figure 7

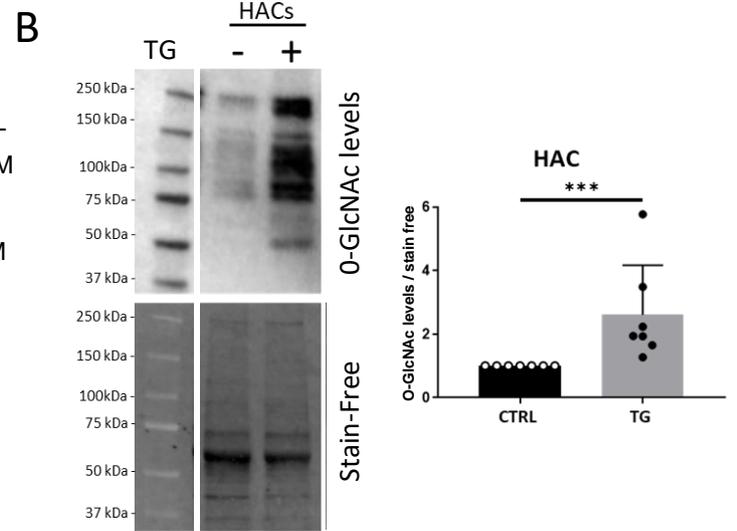
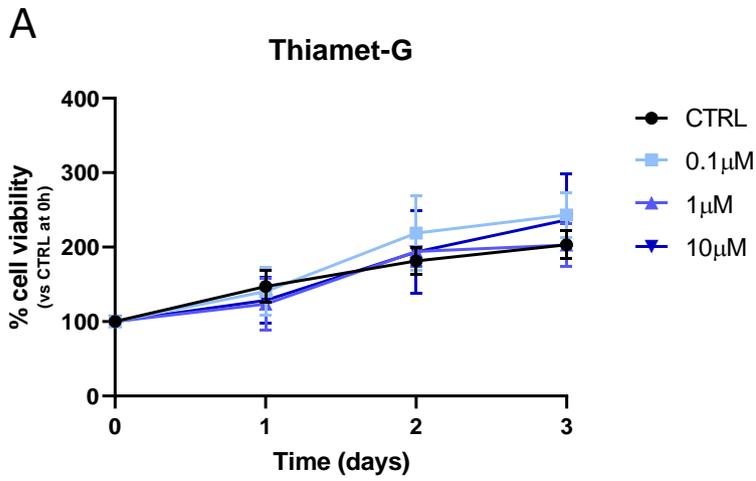
A



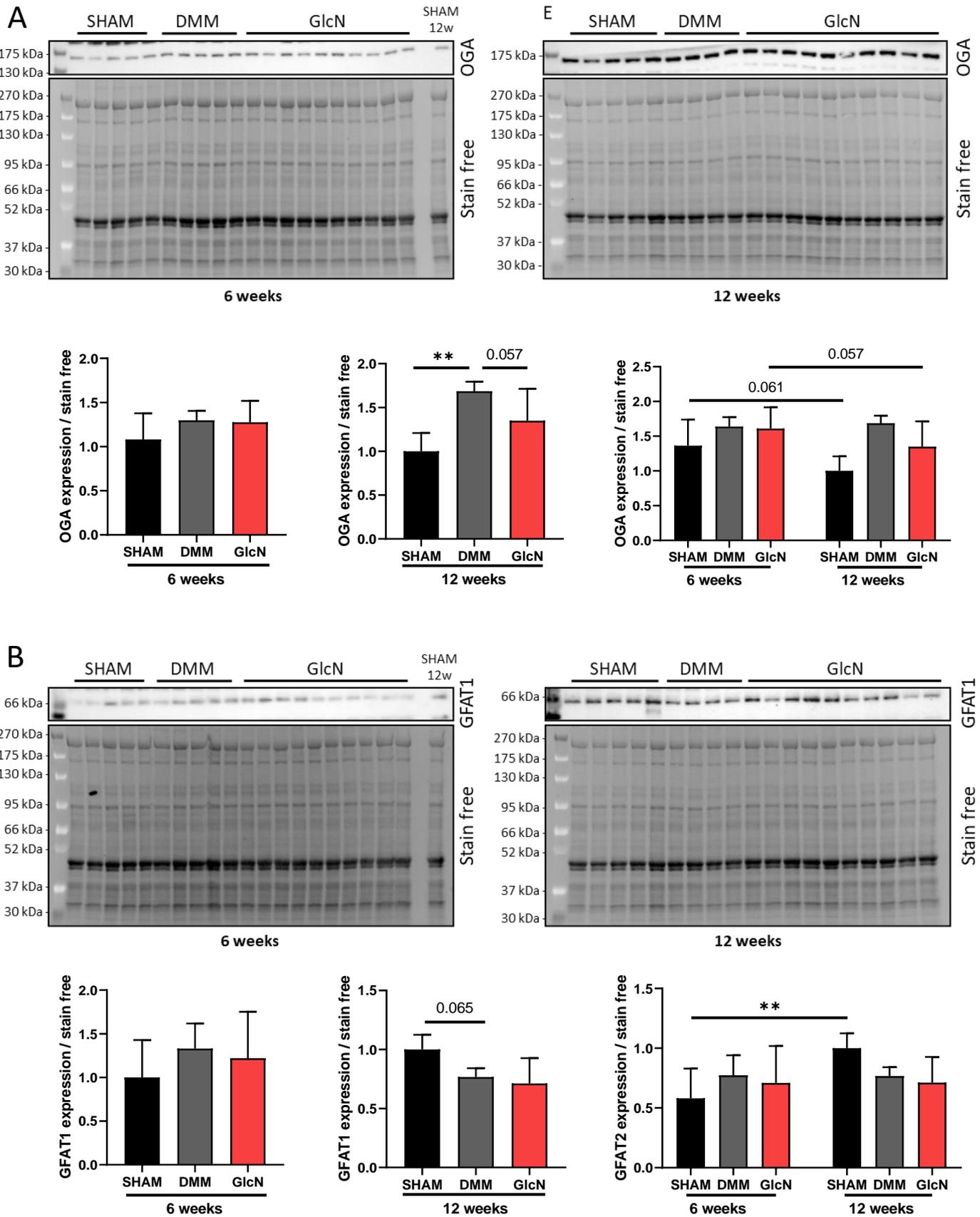
B



# Supplementary Figure 1



# Supplementary Figure 2





## B. Résultats complémentaires

La *O*-GlcNAcylation des protéines intervient dans de nombreux processus cellulaires et notamment au cours du cycle cellulaire en régulant la réplication de l'ADN, la mitose et la cytokinèse qui aboutit à la formation des deux cellules filles. De plus, en plus de preuves soulignent le rôle de cette MPT lors de la prolifération cellulaire. Ainsi les niveaux d'*O*-GlcNAcylation fluctuent au cours des phases du cycle cellulaire et sont notamment diminués lors de la phase S et de la mitose. Cette MPT contrôle également l'activité de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, telles que p53, p27, CDK1, Plk1 et pRB.

La *O*-GlcNAcylation participe également au maintien de l'intégrité du génome en modifiant un ensemble d'histones tels que H2A, H2B, H3 et H4<sup>615</sup>, de kinases ainsi que de protéines d'échafaudage, mais aussi en modifiant un grand nombre de protéines impliquées dans la DDR, parmi lesquelles Chk1, ATM et MDC1<sup>615-617</sup>. Enfin plus récemment, il a été montré qu'OGT et OGA sont recrutés aux sites de dommages à l'ADN et augmentent les niveaux d'*O*-GlcNAc aux sites endommagés<sup>617</sup>.

C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à l'impact de la *O*-GlcNAcylation dans nos modèles de chondrocytes sénescents étudiés dans la première partie de cette thèse. Pour cela nous avons suivi le même schéma de traitement que dans l'article 2. Brièvement, nous avons prétraité des HACs avec 1µM de TG ou 5mM de GlcN pendant 24h, puis nous les avons stimulés soit avec 1ng.ml d'IL-1β pendant 8 jours (comme dans l'article précédents) ou avec 20µM d'étoposide pendant 24h. Le milieu a ensuite été remplacé par du milieu sans étoposide mais en maintenant les traitements TG ou GlcN pendant 7 jours.

En parallèle, nous avons souhaité améliorer la caractérisation de cette modification *in vivo* dans le cartilage et les ménisques dans un modèle murin d'OA lié à l'âge. Pour cela nous avons développé une IHC afin de la détecter dans les tissus des articulations murines.

### a. Matériel et méthodes

#### **Isolement et amplification de chondrocytes articulaires primaires humains (HACs)**

Les chondrocytes articulaires primaires humains (HACs) ont été isolés des condyles fémoraux de patients arthrosiques subissant une arthroplastie totale du genou. Tous les échantillons ont été prélevés sur des patients après obtention de leur consentement éclairé conformément à la Déclaration d'Helsinki. Cette étude a été réalisée en accord avec les recommandations du Comité de Protection des Personnes des Pays de La Loire et agréée par le ministère de l'Enseignement

Supérieur et de la Recherche (numéro d'enregistrement : DC-2017-2987). Dès réception des cartilages articulaires humains, des copeaux sont réalisés digérés à 37°C avec 0,2% de collagénase de type II pendant 30 min. Ensuite, les copeaux ont été digérés pendant une nuit à 37°C dans une solution de collagénase à 0,03 % dans du DMEM (DMEM-Glutamax, 61965-026, Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal (FCS, S1810-500, Dominique Dutscher) et 1% de pénicilline/streptomycine (PS, 1000 U/ml, 15140122, Thermo Fisher Scientific) (milieu complet). La suspension cellulaire obtenue est ensuite filtrée à travers un tamis cellulaire de 70 µm et les cellulesensemencées à une densité de  $6 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> (P0). Les HACs ont été cultivées dans du milieu complet. Les cellules ont été maintenues à 37°C en atmosphère humide, avec 5% de CO<sub>2</sub> et le milieu de culture changé tous les 2 à 3 jours.

### Traitements des chondrocytes

24h avant le début de l'expérimentation, les chondrocytes ont étéensemencées à une densité de 15 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu complet en atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>. Au jour-1, les cellules sont prétraitées avec 1µM de thiamet-G (TG) ou 5 mM de glucosamine (GlcN) (27055, Cayman). 24h après soit au jour 0, les cellules sont stimulées avec 20µM d'étoposide (E1383, Sigma-Aldrich), pendant 24h, puis au jour 1 le milieu est remplacé par du milieu complet sans étoposide jusqu'à la fin de l'expérimentation au jour 8 (bleu). Sinon les HACs sont traités avec 1ng.ml d'IL-1β (IL038, Millipore) jusqu'à la fin de l'expérimentation au jour 8. Le milieu ainsi que les traitements sont renouvelés tous les 2 à 3 jours. Les analyses ultérieures ont été effectuées aux jours 1 et 8.

### Extraction d'ARN et réaction quantitative en chaîne par polymérase (qPCR)

Les ARN ont été extraits à l'aide d'un kit NucleoSpin® RNA XS (74092, Macherey-Nagel, Hoerd, France) conformément aux instructions du fabricant. Le rendement en ARN a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific™). La transcription inverse a été réalisée à l'aide du kit de synthèse d'ADNc Verso (AB1453B, Thermo Scientific™). La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel a été réalisée à l'aide d'amorces spécifiques (Table 4) avec le SYBR™ Select Master Mix (4472908, Applied Biosystems™) en utilisant le système de détection PCR en temps réel CFX96 Touch (Bio-Rad). GUS-B et PPIA ont été utilisés comme gènes de référence et les résultats ont été exprimés sous forme de niveaux d'expressions relatifs en utilisant la méthode Pfaffl<sup>586</sup>.

Gène	Sens	Anti-sens
------	------	-----------

<b>OGT</b>	5'- CCTGCCCCAGAACCGTATCA -3'	5'- GCAAGTGAGCTGGGATGCTG -3'
<b>OGA</b>	5'- GCAAGAGTTTGGTGTGCCTCATC -3'	5'- GTGCTGCAACTAAAGGAGTCCC -3'
<b>GFAT1</b>	5'- GGATATGATTCTGCTGGTGTG -3'	5'- CCAACGGGTATGAGCTATTC -3'
<b>GFAT2</b>	5'- GCTCATCGTGATTGGCTGTGGA -3'	5'- CAACCATCACAGGAAGCTCAGTC -3'
<b>COX-2</b>	5'- CTTACGCATCAGTTTTTCAAG -3'	5'- TCACCGTAAATATGATTTAAGTCCAC -3'
<b>iNOS</b>	5'- GCTCAAATCTCGGCAGAATC -3'	5'- GCCATCCTCACAGGAGAGTT -3'
<b>MMP3</b>	5'- CACTCACAGACCTGACTCGGTT -3'	5'- AGCAGGATCACAGTTGGCTGG -3' -3'
<b>MMP13</b>	5'- CCAGTCTCCGAGGAGAAACA -3'	5'- AAAACAGCTCCGCATCAAC -3'
<b>CDKN1A - p21</b>	5'- GCAGACCAGCATGACAGATTTC -3'	5'- GCGGATTAGGGCTTCTCTT -3'
<b>CDKN2A - p16</b>	5'- AAGGTCCCTCAGACATCCCC -3'	5'- CCCTGTAGGACCTTCGGTGAC -3'
<b>CDKN2B - p15</b>	5'- GCGGGGACTAGTGGAGAAG -3'	5'- CTCCCGAAACGGTTGACTC -3'
<b>p53</b>	5'- CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG -3'	5'- TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC -3'
<b>PAI-1</b>	5'- CTCATCAGCCACTGGAAAGGCA -3'	5'- GACTCGTGAAGTCAGCCTGAAAC -3'
<b>Gus-b</b>	5'- CGCCTGCCTATCTGTATTC -3'	5'- TCCCCACAGGGAGTGTGTAG -3'
<b>PPIA</b>	5'- ATGCTGGACCCAACAAAT -3'	5'- TCTTTCACCTTTCGCAACACC -3'

*Table 4: Liste des amorces de qPCR pour l'étude de la O-GlcNAcylation*

## **Animaux et aspects éthiques**

Les expérimentations animales ont été réalisées conformément aux directives européennes pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire (2010/63/UE) et approuvées par le comité d'éthique local (CEEA.PdL.06) et le Ministère français de la recherche (autorisation n° 2021070817561382 / APAFIS #32378). Des efforts concertés et particuliers ont été déployés pour minimiser les souffrances psychologiques et physiques ainsi que pour réduire le nombre d'animaux utilisés. Toutes les souris ont été hébergées selon un cycle lumière/obscurité de 12 heures avec un accès illimité à un régime alimentaire standard et à de l'eau. Trente-trois souris mâles C57BL/6 d'âge croissant (1, 6, 12, 18 et 24 mois) ont été utilisées pour évaluer le niveau d'O-GlcNAcylation au cours de l'OA liée à l'âge.

## **Etude histologique**

Les articulations du genou ont été décalcifiées dans une solution d'EDTA 0,5 M (pH 7,4) à 4°C pendant trois semaines, déshydratées avec une solution d'éthanol graduée de 70° à 100° et incluses dans de la paraffine. Des sections de paraffine en série de 5 µm ont été colorées avec une coloration safranine O / Fast green à l'aide d'un automate, Varistain Gemini S (Thermo Scientific, USA). La gravité de l'OA a été évaluée à l'aide d'un système de notation adapté du système de notation de l'OARSI tel que décrit dans la Table 2 de ce manuscrit. La notation a été effectuée

indépendamment par 3 lecteurs différents formés sur au moins 2 ou 3 niveaux par souris et les scores moyens ont été utilisés pour les analyses statistiques.

### **Etude immunohistochimie (IHC)**

Pour l'IHC, les coupes ont été déparaffinées, réhydratées et démasquées sur la nuit à 70°C dans du tampon citrate pH 6. Les coupes ont ensuite été incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire RL2 (ab2739) dilué au 1/200 dans du diluant Dako (Agilent Dako, S3022) et avec un anticorps secondaires anti-souris biotinylé (E433, Dako) pendant 1 h à température ambiante. Ensuite, les coupes ont été incubées avec de la streptavidine conjuguée au peroxyde de raifort au 1/400 (Dako, p0397) et la liaison des anticorps a été visualisée à l'aide de diaminobenzidine (DAB). Les noyaux ont été contre-colorés avec de l'hématoxyline. Pour le contrôle négatif, les sections ont été traitées en utilisant un protocole identique mais en omettant l'anticorps primaire. La coloration des tissus a été visualisée à l'aide du scanner de lames Nanozoomer 2.0 Hamamatsu (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japon). Le nombre de cellules totales et de cellules positives pour les marquages ont été comptées à l'aide du logiciel QuPath.

### **Analyses statistiques**

Les analyses statistiques et les représentations graphiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8. Pour toutes les expériences, les valeurs aberrantes ont été identifiées à l'aide du test de Grubbs avec  $\alpha = 0,05$  et ont été exclues de l'analyse ultérieure. Pour les données *in vitro*, la distribution des données a été évaluée à l'aide du test de normalité de Shapiro-Wilk. Si les données passent le test de normalité, elles sont ensuite analysées par une ANOVA deux voies avec comparaisons multiples de Tukey. Sinon, elles sont analysées grâce au test de Wilcoxon. Pour les expérimentations vivo, les données ont été analysées par le test de Mann-Whitney. Les valeurs de P-values inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives, \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## b. Résultats

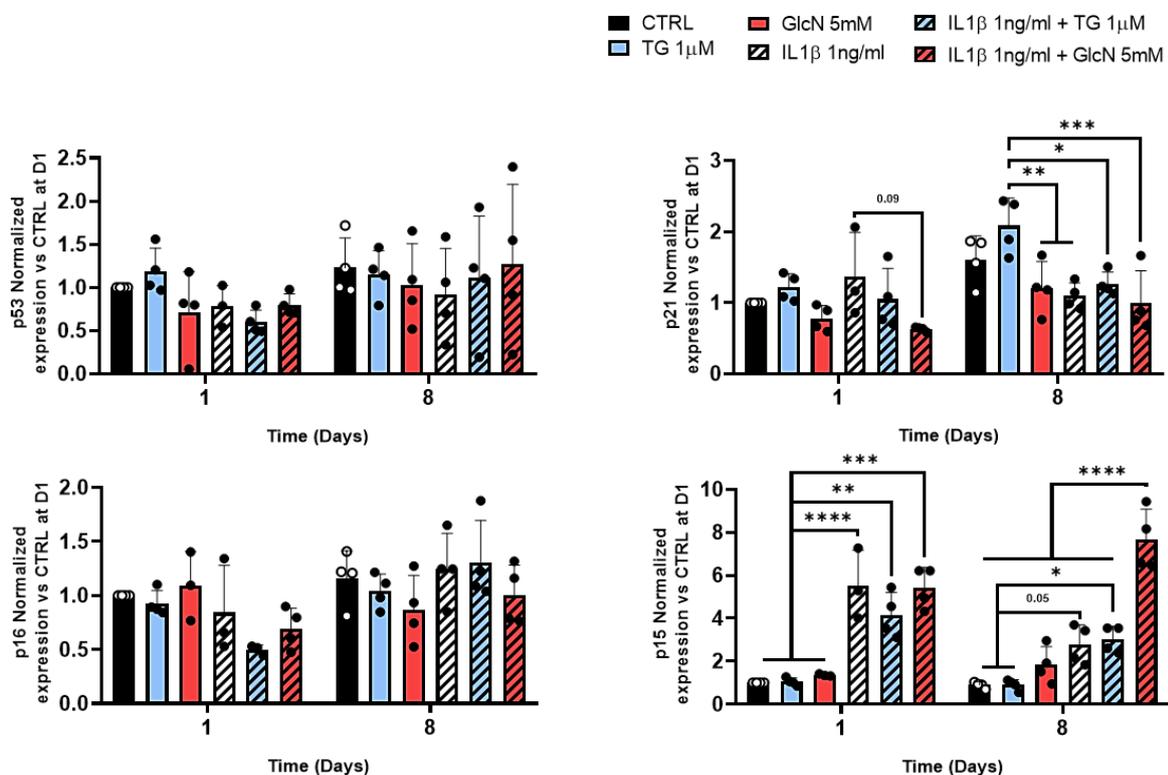
### Impact de l'augmentation de la O-GlcNAcylation sur l'expression de CDKi dans des HACs stimulés à l'IL-1 $\beta$ .

En complément des résultats *in vitro* présentés dans l'article 2, nous avons également souhaité étudier l'impact de l'augmentation du niveau d'O-GlcNAcylation des protéines sur l'expression de plusieurs CDKi dans les HACs prétraités au TG ou à la GlcN puis stimulés à l'IL-1 $\beta$  (Figure 21).

Les expressions de p53 et p16 ne sont pas affectées par l'augmentation de la O-GlcNAcylation ou le traitement à l'IL-1 $\beta$ .

L'expression de p21 au jour 1 n'est pas modifiée sauf dans la condition GlcN+IL-1 $\beta$  où elle semble être diminuée. Au jour 8, l'expression de p21 dans les conditions contrôle et traitée avec le TG seul sont équivalentes. L'IL-1 $\beta$  seul ou en association ainsi que la GlcN seule induisent une diminution de l'expression de p21 vis-à-vis de la condition traitée au TG.

L'expression de p15, quant à elle est augmentée dans les HACs stimulés par l'IL-1 $\beta$  seule ou dans les conditions prétraitées au TG et à la GlcN aux jours 1 et 8. De plus, le pré-traitement à la GlcN accroît fortement cette élévation au jour 8.



**Figure 21: Impact de l'augmentation de la O-GlcNAcylation sur l'expression d'inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes dans des HACs prétraités avec 1 $\mu$ M TG (bleu) ou 5mM GlcN (rouge) pendant 24h puis stimulés à l'IL-1 $\beta$  (hachures). L'expression des inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes a été évaluée par RT-qPCR au jour 1 et au jour 8. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SD, (n $\geq$ 3). Les valeurs P ont été calculées par une ANOVA à 2 voies, \*p $\leq$ 0,05 ; \*\*p $\leq$ 0,01 ; \*\*\*p $\leq$ 0,001 ; \*\*\*\*p $\leq$ 0,0001.**

De la même façon que nous nous sommes intéressés à l'impact de l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation sur la réponse inflammatoire des chondrocytes stimulés à IL-1 $\beta$ , nous avons ensuite souhaité évaluer le rôle de l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation dans notre modèle de chondrocytes sénescents induit par un traitement à l'étoposide.

Ainsi des HACs ont été prétraités pendant 24h avec 1 $\mu$ M de TG ou 5mM de GlcN puis induit en sénescence grâce à un traitement à 20 $\mu$ M d'étoposide pendant 24h. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'expression de gènes impliqués dans la sécrétion du SASP (COX-2, iNOS, MMP3 et MMP13) puis, des différentes enzymes responsables dans la régulation de la *O*-GlcNAcylation et pour finir de plusieurs CDKi impliquées dans la régulation du cycle cellulaire.

### **Impact de l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation sur l'expression de gènes associés au SASP dans des HACs stimulés à l'étoposide**

Les traitements TG et GlcN seuls n'impactent pas l'expression de COX-2 aux jours 1 et 8 (Figure 22). Il en est de même pour l'étoposide seul ou associé avec le TG ou la GlcN au jour 1. Cependant, au jour 8, le traitement à l'étoposide augmente significativement l'expression de COX-2 vis-à-vis des conditions sans étoposide. La présence de la GlcN et dans une moindre mesure de l'étoposide semble réduire cette augmentation.

Pour iNOS, c'est également au jour 8 que des modifications de son expression sont visibles dans la condition traitée à l'étoposide associée au prétraitement à la GlcN.

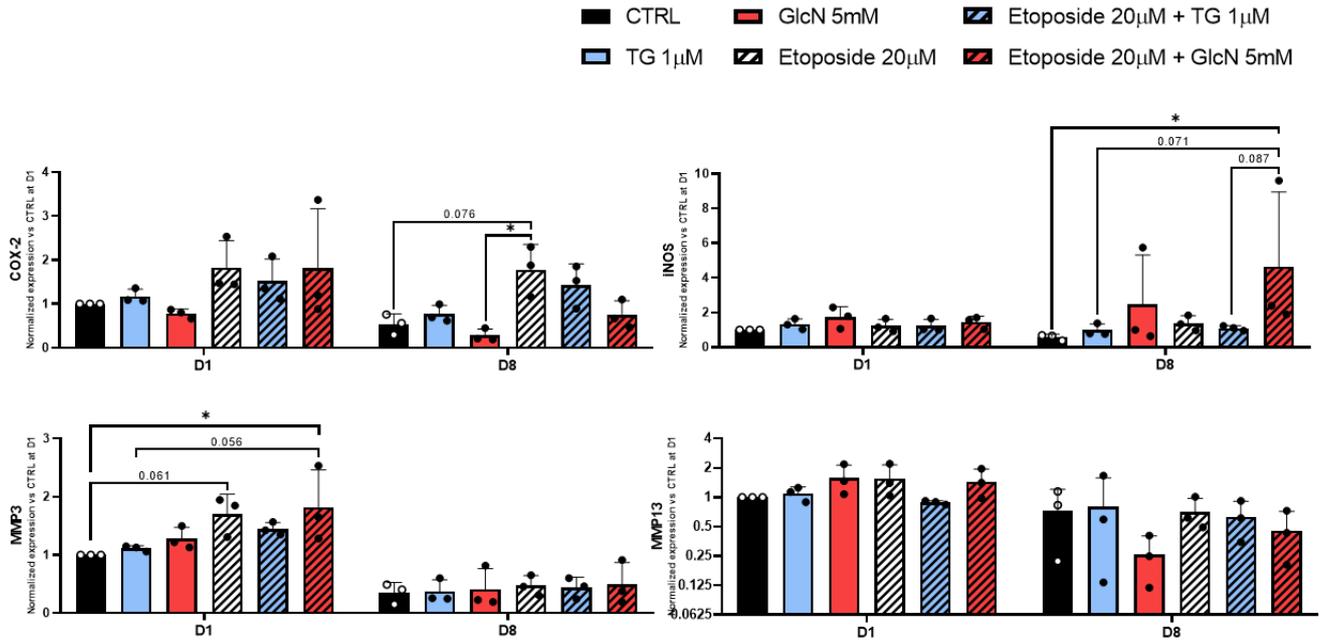
Pour MMP3, c'est au jour 1 que des modifications de son expression sont détectées avec une expression qui est augmentée dans la condition étoposide seule ou associée à la GlcN vis-à-vis de la condition contrôle.

Enfin nous n'observons pas de changement dans l'expression de MMP13 quelle que soit la condition.

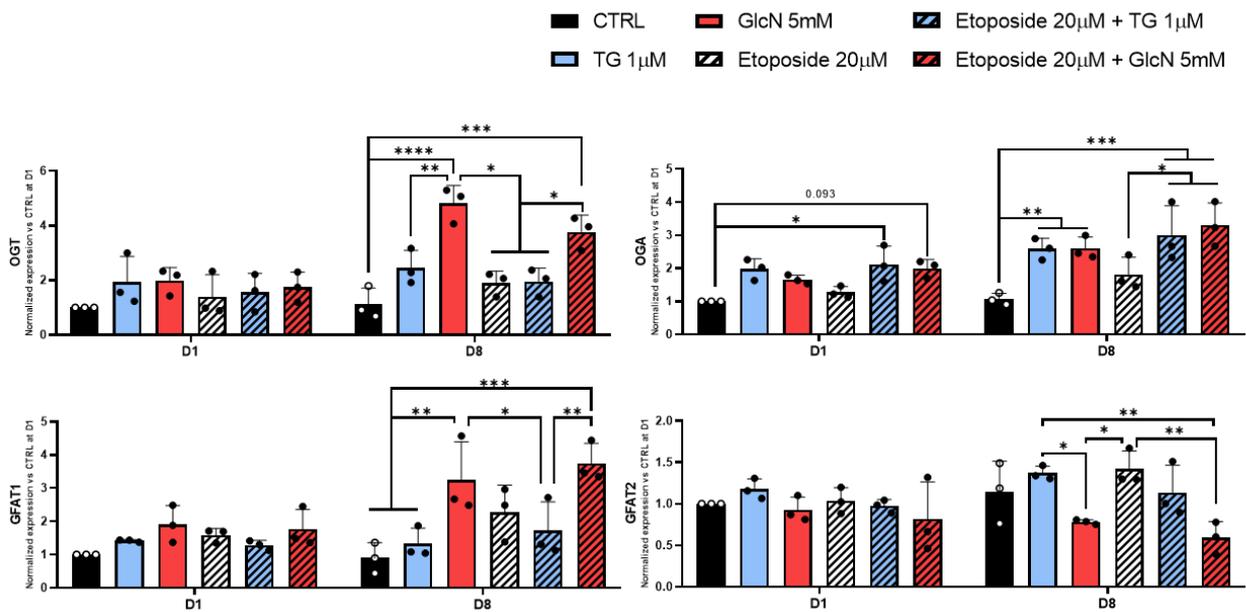
### **Impact de l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation sur l'expression des gènes des enzymes clés dans la régulation de la *O*-GlcNAcylation dans des HACs stimulés à l'étoposide**

L'expression de OGT est inchangée au jour 1, quelle que soit la condition (Figure 23). Au jour 8, la GlcN seule ou en présence d'étoposide induit une augmentation significative de l'expression de OGT.

Pour OGA son expression est augmentée dès le jour 1, mais seulement dans les conditions traitées avec l'étoposide à 20 $\mu$ M en association avec le TG ou la GlcN. Au jour 8, le TG et la GlcN



**Figure 22: Impact de l'augmentation de la O-GlcNAcylation sur l'expression de gènes impliqués dans la sécrétion du SASP dans des HACs prétraités avec 1µM TG (bleu) ou 5mM GlcN (rouge) pendant 24h puis stimulés avec 20µM d'étoposide (hachures) pendant 24h. Les HACs sont ensuite cultivés pendant 7 jours dans du milieu sans étoposide mais avec le maintien des traitements TG et GlcN. L'expression des gènes a été évaluée par RT-qPCR au jour 1 et au jour 8. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SD, ( $n \geq 3$ ). Les valeurs P ont été calculées par une ANOVA à 2 voies, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .**



**Figure 23 : Impact de l'augmentation de la O-GlcNAcylation sur l'expression des enzymes clés impliquées dans la régulation de la O-GlcNAcylation dans des HACs prétraités avec 1µM TG (bleu) ou 5mM GlcN (rouge) pendant 24h puis stimulés avec 20µM d'étoposide (hachures) pendant 24h. Les HACs sont ensuite cultivés pendant 7 jours dans du milieu sans étoposide mais avec le maintien des traitements TG et GlcN. L'expression des gènes a été évaluée par RT-qPCR au jour 1 et au jour 8. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SD, ( $n \geq 3$ ). Les valeurs P ont été calculées par une ANOVA à 2 voies, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .**

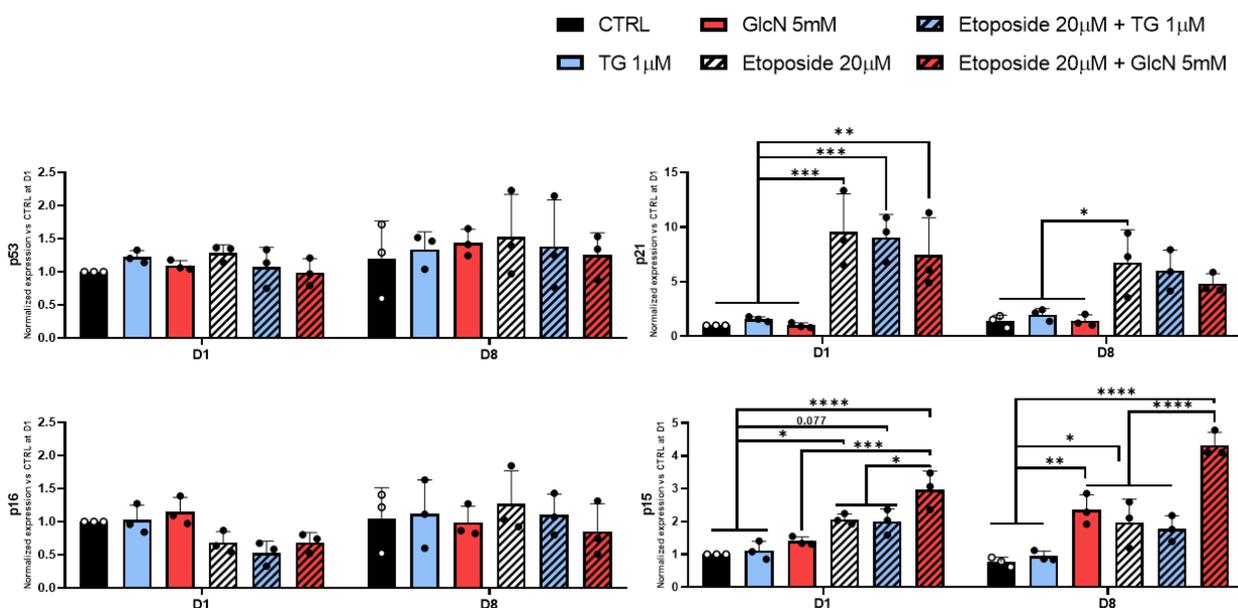
augmentant significativement son expression et la présence de l'étoposide semble accroître cette induction.

Pour GFAT 1 et GFAT2 les différents traitements n'impactent pas leurs expressions au jour 1. Au jour 8, les deux isoformes présentent une réponse différenciée. Alors que la GlcN seule ou associée avec l'étoposide augmente l'expression de GFAT1 au jour 8 elle tend à diminuer celle de GFAT2 aux mêmes temps. Les traitements TG et étoposide quant à eux ne semblent pas avoir d'effet majeur sur l'expression des gènes de ces deux enzymes.

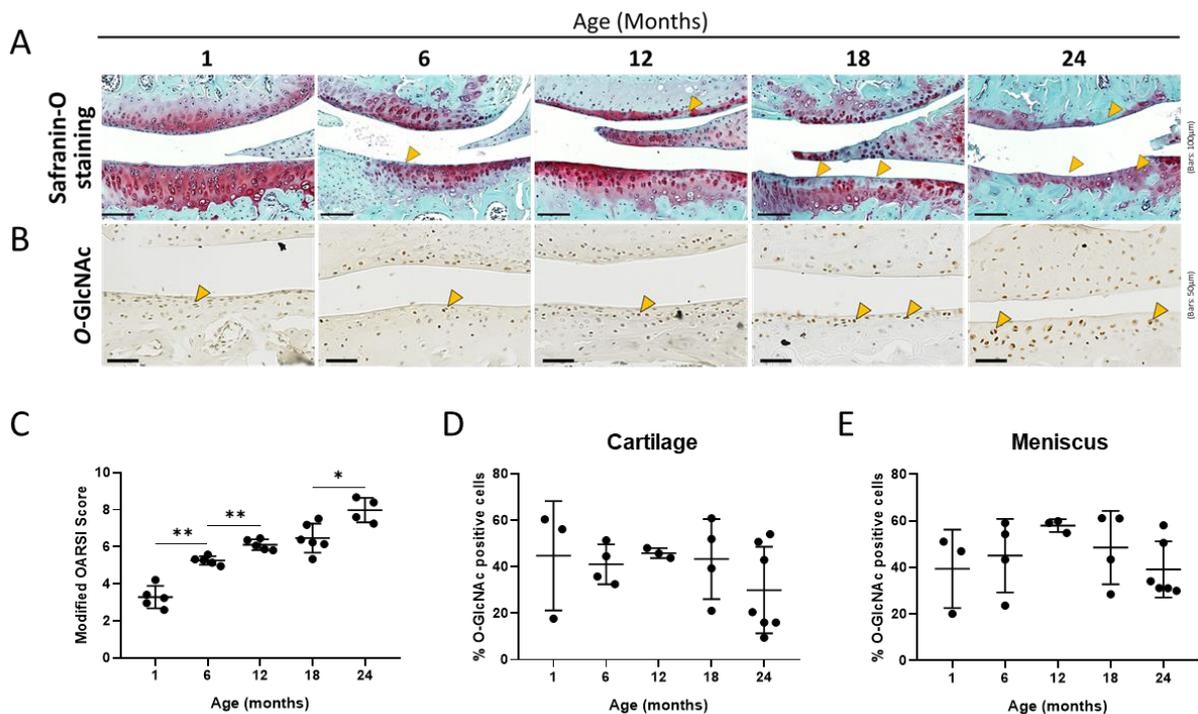
### Impact de l'augmentation de la O-GlcNAcylation sur l'expression des CDKi dans des HACs stimulés à l'étoposide.

L'expression de p53 et p16 sont inchangées quelle que soit la condition et le jour d'analyse.

L'expression de p21 quant à elle est significativement augmentée dès le jour 1 en présence d'étoposide. Les prétraitements à la GlcN et dans une moindre mesure au TG semblent faiblement diminuer cette induction. Ainsi au jour 8 l'expression de p21 est augmentée significativement, la GlcN et dans une moindre mesure le TG réduisent là encore son induction mais de manière plus marquée car dans ces conditions l'expression de p21 n'est plus statistiquement différente de la condition contrôle non traitée.



**Figure 24: Impact de l'augmentation de la O-GlcNAcylation sur l'expression d'inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes dans des HACs pré-traités avec 1µM TG (bleu) ou 5mM GlcN (rouge) pendant 24h puis stimulés avec 20µM d'étoposide 24h (hachures) pendant 24h. Les HACs sont ensuite cultivés pendant 7 jours dans du milieu sans étoposide mais avec le maintien des traitements TG et GlcN. L'expression des gènes a été évaluée par RT-qPCR au jour 1 et au jour 8. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SD, (n $\geq$ 3). Les valeurs P ont été calculées par ANOVA 2 voies, \*p $\leq$ 0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001.**



**Figure 25 : Evaluation du niveau d'O-GlcNAcylation au cours de l'arthrose liée à l'âge, sur des articulations de genou de souris mâles C57BL/6 d'âge croissant.** (A) Safranin O Fast-Green coloration. Les flèches jaunes indiquent des dommages au cartilage. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m (B) Image d'immunohistochimie représentative du niveau de O-GlcNAcylation sur des articulations de genou de souris mâles C57BL/6 âgées de 1, 6, 12, 18 et 24 mois. Les flèches jaunes indiquent une coloration brune positive. Barre d'échelle : 50  $\mu$ m. (C) Atteinte arthrosique évaluée à l'aide du score OARSI modifié. (D) Quantification de la O-GlcNAcylation dans le cartilage et les ménisques (E) de souris mâles C57BL/6 d'âge croissant. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SD, ( $n \geq 3$ ). Les P-values sont calculées par le test de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ .

### Evaluation de la O-GlcNAcylation dans un modèle d'OA spontanée liée à l'âge chez la souris

Nous avons tout d'abord réalisé une coloration Safranin-O-Fast-Green des coupes d'articulations de souris C57BL/6 mâles d'âge croissant (Figure 25, A) suivi d'une quantification de l'atteinte arthrosique par un score OARSI modifié (Figure 25, C).

Nous observons dans notre modèle une augmentation significative du score OARSI avec l'âge (Figure 25, A, C) bien qu'entre 12 et 18 mois la différence entre ces deux âges ne soit pas significative.

Nous avons mis en évidence la présence de la O-GlcNAcylation dans tous les tissus de l'articulation murine et plus spécifiquement dans les cellules du cartilage articulaire et des ménisques avec un signal marqué par une forte coloration visible dans les noyaux et dans une moindre mesure dans le cytoplasme des cellules (Figure 25, B).

La quantification de l'IHC révèle une grande variabilité entre les souris et par conséquent, aucune modification significative de la O-GlcNAcylation n'est montrée avec l'âge dans le cartilage articulaire (Figure 25, D) et les ménisques (Figure 25, E).

## 2. Conclusion et perspectives

Cette partie de mon projet de thèse visait à mieux comprendre le rôle de la *O*-GlcNAcylation dans l'OA. A cette fin, nous avons essentiellement étudié l'impact d'une augmentation du niveau d'*O*-GlcNAcylation des protéines *in vitro* dans notre modèle d'exposition chronique à l'IL-1 $\beta$ , ainsi que dans notre modèle de sénescence induit par l'étoposide et *in vivo* dans un modèle murin d'OA post-traumatique induite par DMM.

*In vitro*, nous pouvons tout d'abord noter que les résultats obtenus avec IL-1 $\beta$  et l'étoposide seuls sont cohérents avec ceux présentés dans le premier article de ce manuscrit qui porte sur l'étude de la sénescence et la mise en place d'un modèle de sénescence chondrocytaire.

L'augmentation pharmacologique de la *O*-GlcNAcylation via le prétraitement à la GlcN présente un effet bénéfique sur l'inflammation induite par l'IL-1 $\beta$  *in vitro*. Cette observation est en accord avec des études antérieures qui ont rapporté que la GlcN diminue l'inflammation et la production de MMPs dans des chondrocytes humain<sup>511,618</sup> et de rongeurs<sup>619</sup>. Dans une moindre mesure, le prétraitement avec le TG présente des effets similaires, suggérant que l'action bénéfique de la GlcN serait en partie médiée par l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation.

L'IL-1 $\beta$  est un puissant activateur du facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui a son tour va notamment favoriser l'expression de gènes pro-inflammatoires et des MMPs impliqués dans la pathogénicité de l'OA. Or, de précédents travaux ont montré que la GlcN et le thiamet-G préviennent la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B<sup>511,618</sup>, augmentent la *O*-GlcNAcylation de sa sous-unité p65 en inhibant de manière concomitante la phosphorylation de la Ser536. Cette *O*-GlcNAcylation favorise de ce fait l'association de NF- $\kappa$ B avec la protéine inhibitrice I $\kappa$ B dans le cytoplasme et empêchant sa translocation nucléaire<sup>620</sup>. Il serait donc intéressant de continuer nos travaux *in vitro* en analysant le statut de NF- $\kappa$ B et de sa sous-unité p65 dans nos modèles.

Cependant, il est important de noter qu'il a également été rapporté que la *O*-GlcNAcylation peut inversement participer à l'activation de NF- $\kappa$ B dans de nombreuses cellules, telles que les cellules cancéreuses pancréatiques<sup>551</sup>, les cellules musculaires lisses vasculaires<sup>621</sup> et les lymphocytes<sup>622</sup> là encore en modifiant l'interaction de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B avec les kinases IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ . Ces résultats contradictoires, ont cependant majoritairement été montrés dans des contextes d'hyper-*O*-GlcNAcylation et illustre bien le rôle complexe de la *O*-GlcNAcylation dans les processus cellulaires et le concept qu'il existe un niveau optimal de *O*-GlcNAcylation nécessaire au maintien

d'une fonction cellulaire physiologique et qu'en cas de *O*-GlcNAcylation trop élevée ou trop basse, il en résulte un dysfonctionnement cellulaire<sup>505</sup>.

Au-delà de la régulation de NF- $\kappa$ B par la *O*-GlcNAcylation, d'autres protéines impliquées dans les phénomènes inflammatoires et dans l'OA ont été montrées comme modifiées ou régulées par la *O*-GlcNAcylation. On peut notamment citer p38 et p44/42 MAKP (Erk1/2), STAT, SMAD, AP-1 et C/EBP<sup>420,623</sup>. Or, l'impact de l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation dans les chondrocytes sur ces protéines n'a encore jamais été étudié et pourrait faire l'objet de recherche dans le futur.

Dans cette partie, nous avons également montré que l'exposition des HACs à l'IL-1 $\beta$  augmente l'expression de GFAT1 et GFAT2 de manière concomitante, sans pour autant influencer sur le niveau de *O*-GlcNAcylation. GFAT, assurant la première étape de la synthèse d'UDP-GlcNAc, participe avec OGT et OGA au contrôle des niveaux globaux d'*O*-GlcNAc. De ce fait, nous aurions pu nous attendre à une élévation du niveau de *O*-GlcNAcylation des protéines, comme cela a été montré dans des macrophages stimulés au LPS qui présentent une augmentation de la *O*-GlcNAcylation des protéines liée à un accroissement concomitant de l'expression de GFAT<sup>624</sup>. Enfin, de façon similaire à nos résultats, avec les traitements IL-1 $\beta$  et étoposide, ils n'ont pas montré d'impact de leur traitement LPS sur l'expression de OGT et OGA. Cependant, indépendamment de l'augmentation de l'expression de leurs gènes nous ne pouvons exclure que les activités d'OGT et d'OGA soient modifiées. De ce fait, il serait intéressant d'évaluer leurs activités enzymatiques dans nos différents modèles et conditions *in vitro*.

Au-delà du rôle avéré de la *O*-GlcNAcylation dans la régulation de l'inflammation, celle-ci est également impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et la réparation des dommages à l'ADN. Dans notre modèle de sénescence induit par l'étoposide nos traitements TG et GlcN sont capables de modifier l'expression génique de plusieurs CDKi comme p12 et p15.

Nos résultats très préliminaires ne nous permettent cependant pas de conclure à un effet bénéfique sur la prévention de la sénescence. Aussi, il serait intéressant d'évaluer l'impact de l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation, sur la phosphorylation de p53 et les niveaux protéiques des CDKi par WB. Cela semble d'autant plus pertinent que p53 a été montré comme pouvant être modifié par la *O*-GlcNAcylation sur la ser139, conduisant à une diminution de sa phosphorylation et de sa stabilité<sup>547</sup>. p27 une autre CDKi peut également être *O*-GlcNAcylée sur plusieurs résidus Ser 2, Ser106, Ser 110, Thr157 et Thr 197 impactant la prolifération et la migration cellulaire<sup>625,626</sup>.

Dans le premier article, nous avons observé une accumulation de la protéine  $\gamma$ H2AX à la suite du traitement à l'étoposide. Or, il a été montré que la *O*-GlcNAcylation participe également au maintien de l'intégrité du génome en participant notamment à la réponse au dommage à l'ADN<sup>615-617</sup>. Il pourrait donc être pertinent de regarder si l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation dans notre modèle pourrait favoriser la résolution des dommages à l'ADN.

Enfin, *in vitro* nous avons seulement investigué l'impact de l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation. Comme souligné précédemment, bien que, le prétraitement avec le TG présente des effets similaires à ceux de la GlcN, nous avons tout de même noté une différence dans l'intensité de réponse plus élevée avec la GlcN. Cela suggère que l'action bénéfique de la GlcN n'est que partiellement médiée par l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation induite par OGT. Afin, d'évaluer si l'action de la GlcN est bien médiée par l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation il serait pertinent d'inhiber spécifiquement OGT et ainsi valider que l'effet bénéfique de la GlcN est abrogé. A cette fin, l'utilisation de composé pharmacologique tels que l'OSMI-1 pourrait s'avérer pertinent. Cependant, des tests préliminaires réalisés avec l'OSMI-1 et non présentés dans ce manuscrit ont révélé une mortalité accrue de nos chondrocytes en présence de cette molécule. De ce fait, nous envisageons l'utilisation d'autres composés dérivés de l'OSMI-1 dont la spécificité a été améliorée tels que l'OSMI-3 et l'OSMI-4, mais également d'autres approches par exemple en utilisant des siRNA ciblant OGT.

*In vivo*, par IHC, nous avons montré la présence de la *O*-GlcNAcylation dans les différents tissus de l'articulation et plus particulièrement dans le cartilage et les ménisques au niveau nucléaire et cytoplasmique. Cependant, malgré nos efforts pour caractériser le nombre et la localisation des cellules positives dans ce modèle au sein des articulations et plus particulièrement dans le cartilage et les ménisques nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de différences majeures au cours du vieillissement. Cependant, dans notre modèle murin d'OA post-traumatique, nous avons détectés des différences dans les niveaux d'*O*-GlcNAcylation entre nos groupes et dans plusieurs tissus tels que les tissus de l'articulation, du cœur ou bien du sang. Il semble donc pertinent à l'avenir de coupler l'IHC qui permet de détecter la localisation des cellules dans les tissus avec une approche quantitative par WB afin de mesurer les variations du niveau d'*O*-GlcNAcylation.

*In vivo*, nos résultats ont montré un effet bénéfique de l'administration de GlcN sur le remodelage osseux et la formation d'ostéophytes. L'exposition au thiamet-G *in vitro* de cellules souches de la

plaque de croissance<sup>563</sup>, de la moelle osseuse<sup>627</sup> et de pré-ostéoblastes murins a favorisé<sup>628,629</sup> la différenciation ostéogénique. En favorisant la différenciation ostéogénique et la formation d'ostéoclastes l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation que nous avons observée suite à l'administration de la GlcN dans les tissus de l'articulation pourrait participer à la prévention de la formation des ostéophytes. Cependant, nous avons également observé un effet néfaste de la GlcN sur le cartilage et la synovite. Que les effets bénéfiques et néfastes soient médiés par une *O*-GlcNAcylation accrue dans les tissus articulaires reste à déchiffrer dans d'autres expériences en envisageant là encore l'inhibition du processus de *O*-GlcNAcylation.

L'ensemble de nos données mettent en évidence la nécessité de mieux comprendre et d'étudier le rôle de l'*O*-GlcNAcylation dans le développement et la progression de l'OA.

Afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, il pourrait être envisagé de développer des approches OMICS afin d'identifier les protéines différenciellement *O*-GlcNAcylées entre le cartilage de patient sain et arthrosique par exemple. Cependant, les techniques conventionnelles par spectrométrie ne sont pas adaptées à l'étude de la *O*-GlcNAcylation des protéines, en raison de la labilité de la liaison  $\beta$ -glycosidique entraînant la perte des résidu GlcNAc lors de l'étape d'électrospray.

De ce fait, l'étude des protéines *O*-GlcNAcylées par spectrométrie de masse nécessite l'adaptation des méthodes et le développement de nouvelles approches d'enrichissement ce qui explique pourquoi peu d'études de ce type ont été réalisées à ce jour.

## Partie III - Conclusion générale

---

Au cours de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à la sénescence et à l'identification de nouvelles pistes thérapeutiques en étudiant le rôle de la O-GlcNAcylation au cours de l'OA.

Dans une première partie nous nous sommes intéressés à la sénescence dans l'OA, et plus particulièrement dans le cartilage articulaire. En effet, bien que l'implication de la sénescence dans le développement et la progression de l'OA soit établie, les mécanismes impliqués dans la sénescence des chondrocytes sont mal connus.

C'est pourquoi nous avons travaillé au développement d'un modèle de sénescence chondrocytaire et à l'identification des cellules sénescents dans deux modèles murins d'OA *in vivo*. Nous avons ainsi pu montrer que l'IL-1 $\beta$ , une cytokine classiquement utilisée pour mimer l'environnement inflammatoire et catabolique de l'articulation arthrosique et plus récemment détournée comme inducteur de sénescence dans les chondrocytes, ne résume que partiellement le phénotype sénescents. Au contraire, le second modèle de sénescence utilisant l'étoposide que nous avons développé se présente comme un bon candidat afin d'induire la sénescence dans des chondrocytes articulaires primaires humains et dans la lignée chondrocytaire TC28A2 humaine. Néanmoins, il serait intéressant de poursuivre la caractérisation de ce modèle, en validant d'autres caractéristiques propres des cellules sénescents telles que la résistance accrue de ce modèle aux signaux pro-apoptotiques ou inversement sa sensibilité aux sénomorphiques. De plus, ce modèle bien que pouvant être instructif pour étudier la sénescence induite par l'accumulation de dommages à l'ADN, ne reflète peut-être pas l'ensemble des modes d'inductions de la sénescence intervenant au cours de l'OA. En effet, d'autres modèles de sénescence des chondrocytes peuvent être ou sont d'ores et déjà développés, mettant en jeu d'autres processus. L'étude de la sénescence des chondrocytes en combinant ces différents modèles devrait permettre d'obtenir une connaissance plus complète des mécanismes de sénescence prépondérants dans l'articulation au cours de l'OA.

En parallèle du développement de notre modèle de chondrocytes sénescents, nous avons également cherché à identifier et caractériser *in vivo* les cellules sénescents au sein des articulations par une étude histologique dans deux modèles murins d'OA. Nous avons ainsi réussi

à mettre en évidence différents marqueurs associés à la sénescence au sein des tissus articulaires et plus particulièrement dans les ménisques et le cartilage articulaire. Pour autant, nous n'avons globalement pas mis en lumière de différences significatives du nombre de cellules positives pour ces marqueurs au cours du développement dans l'OA liée à l'âge ou post-traumatique.

Dans la seconde partie nous nous sommes intéressés au rôle de la O-GlcNAcylation dans le développement de l'OA. En effet, bien que de plusieurs données soutiennent l'idée selon laquelle la O-GlcNAcylation des protéines jouerait un rôle central dans l'homéostasie du cartilage, le rôle de cette MPT reste largement inconnu dans le cartilage arthrosique et l'intérêt thérapeutique de la régulation de la O-GlcNAcylation sous-exploré dans l'OA. Les résultats de cette seconde partie bien qu'incomplets ont tout de même permis de mettre en évidence d'une part l'impact positif de l'augmentation de cette MPT sur l'inflammation *in vitro* et sur la formation des ostéophytes *in vivo*. D'autre part, un effet néfaste a été observé, avec une aggravation de la destruction cartilagineuse et de la synovite aux temps longs de notre expérimentation. Ces résultats soulignent la complexité de la maladie arthrosique impliquant plusieurs tissus pouvant réagir de façon différente voir opposée aux traitements. Pour autant, le rôle de la O-GlcNAcylation des protéines reste largement sous documenté dans l'OA. Nous ne savons pas, par exemple, si une dérégulation de la O-GlcNAcylation se retrouve dans tous les types d'OA, mais également qu'elles sont les protéines différenciellement régulées par cette modification au cours de l'OA. Des études d'envergures avec notamment comme évoqué précédemment des études OMICS permettront certainement d'améliorer nos connaissances de l'O-GlcNAcylation dans le contexte de l'OA.

Pour terminer ce manuscrit, toutes ces études soulignent que l'OA est une maladie complexe, multifactorielle et de ce fait aucune piste thérapeutique ne doit être écartée. Ces résultats révèlent l'intérêt de mieux comprendre l'impact de la sénescence mais également de la O-GlcNAcylation dans l'OA. En effet, l'étude plus en avant des mécanismes biologiques sous-jacent à la mise en place de la sénescence et au rôle de la O-GlcNAcylation dans l'apparition et le développement de l'OA pourrait permettre l'identification de nouvelles pistes thérapeutiques.

## Bibliographie

1. Partridge, L., Deelen, J. & Slagboom, P. E. Facing up to the global challenges of ageing. *Nature* **561**, 45–56 (2018).
2. Crimmins, E. M. Lifespan and Healthspan: Past, Present, and Promise. *Gerontologist* **55**, 901–911 (2015).
3. Suzman, R., Beard, J. R., Boerma, T. & Chatterji, S. Health in an ageing world—what do we know? *The Lancet* **385**, 484–486 (2015).
4. Christensen, K., McGue, M., Petersen, I., Jeune, B. & Vaupel, J. W. Exceptional longevity does not result in excessive levels of disability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13274–13279 (2008).
5. Andersen, S. L., Sebastiani, P., Dworkis, D. A., Feldman, L. & Perls, T. T. Health Span Approximates Life Span Among Many Supercentenarians: Compression of Morbidity at the Approximate Limit of Life Span. *The Journals of Gerontology: Series A* **67A**, 395–405 (2012).
6. Martel-Pelletier, J. *et al.* Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers* **2**, 1–18 (2016).
7. Kraus, V. B., Blanco, F. J., Englund, M., Karsdal, M. A. & Lohmander, L. S. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis Cartilage* **23**, 1233–1241 (2015).
8. Hawker, G. A. Osteoarthritis is a serious disease. *Clin Exp Rheumatol* **37 Suppl 120**, 3–6 (2019).
9. Leifer, V. P., Katz, J. N. & Losina, E. The burden of OA-health services and economics. *Osteoarthritis and Cartilage* **30**, 10–16 (2022).
10. Hunter, D. J., Schofield, D. & Callander, E. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **10**, 437–441 (2014).
11. Gupta, S., Hawker, G. A., Laporte, A., Croxford, R. & Coyte, P. C. The economic burden of disabling hip and knee osteoarthritis (OA) from the perspective of individuals living with this condition. *Rheumatology* **44**, 1531–1537 (2005).
12. Schofield, D. *et al.* The long-term economic impacts of arthritis through lost productive life years: results from an Australian microsimulation model. *BMC Public Health* **18**, 654 (2018).
13. Vos, T. *et al.* Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* **396**, 1204–1222 (2020).
14. Kloppenburg, M. & Berenbaum, F. Osteoarthritis year in review 2019: epidemiology and therapy. *Osteoarthritis Cartilage* **28**, 242–248 (2020).
15. Hunter, D. J. & Guermazi, A. Imaging techniques in osteoarthritis. *PM R* **4**, S68–74 (2012).
16. Kellgren, J. H. & Lawrence, J. S. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Ann Rheum Dis* **16**, 494–502 (1957).
17. Cadet, C. & Maheu, E. Évaluation radiographique de l’arthrose : critères et indices. *Revue du Rhumatisme Monographies* **77**, 135–143 (2010).
18. Altman, R. D. & Gold, G. E. Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis, revised. *Osteoarthritis Cartilage* **15 Suppl A**, A1–56 (2007).
19. Bedson, J. & Croft, P. R. The discordance between clinical and radiographic knee osteoarthritis: A systematic search and summary of the literature. *BMC Musculoskelet Disord* **9**, 1–11 (2008).
20. Pereira, D. *et al.* The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthritis and Cartilage* **19**, 1270–1285 (2011).
21. Palmer, A. J. R. *et al.* Non-invasive imaging of cartilage in early osteoarthritis. *Bone Joint J* **95-B**, 738–746 (2013).
22. Wirth, W. *et al.* MRI-based extended ordered values more efficiently differentiate cartilage loss in knees with and without joint space narrowing than region-specific approaches using MRI or radiography—data from the OA initiative. *Osteoarthritis Cartilage* **19**, 689–699 (2011).
23. Guermazi, A. *et al.* Prevalence of abnormalities in knees detected by MRI in adults without knee osteoarthritis: population based observational study (Framingham Osteoarthritis Study). *BMJ* **345**, e5339 (2012).
24. Lequesne, M. G., Mery, C., Samson, M. & Gerard, P. Indexes of severity for osteoarthritis of the hip and knee. Validation—value in comparison with other assessment tests. *Scand J Rheumatol Suppl* **65**, 85–89 (1987).
25. Bellamy, N., Buchanan, W. W., Goldsmith, C. H., Campbell, J. & Stitt, L. W. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J Rheumatol* **15**, 1833–1840 (1988).
26. Hunter, D. J. & Bierma-Zeinstra, S. Osteoarthritis. *The Lancet* **393**, 1745–1759 (2019).

27. Kolasinski, S. L. *et al.* 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Rheumatol* **72**, 220–233 (2020).
28. Long, H. *et al.* Prevalence trends of site-specific osteoarthritis from 1990 to 2019: findings from the Global Burden of Disease Study 2019. *Arthritis Rheumatol* (2022) doi:10.1002/art.42089.
29. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* **396**, 1204–1222 (2020).
30. Ataey, A., Jafarvand, E., Adham, D. & Moradi-Asl, E. The Relationship Between Obesity, Overweight, and the Human Development Index in World Health Organization Eastern Mediterranean Region Countries. *J Prev Med Public Health* **53**, 98–105 (2020).
31. Greene, M. A. & Loeser, R. F. Aging-related inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **23**, 1966–1971 (2015).
32. Mathiessen, A. & Conaghan, P. G. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. *Arthritis Res Ther* **19**, 1–9 (2017).
33. Martin, J. A. & Buckwalter, J. A. Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **56**, B172-179 (2001).
34. Baker, D. J. *et al.* Clearance of p16<sup>Ink4a</sup>-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**, 232–236 (2011).
35. Baker, D. J. *et al.* Naturally occurring p16<sup>Ink4a</sup>-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184–189 (2016).
36. Loeser, R. F. Aging and Osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* **23**, 492–496 (2011).
37. Jordan, J. M. *et al.* Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J Rheumatol* **34**, 172–180 (2007).
38. Johnson, V. L. & Hunter, D. J. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **28**, 5–15 (2014).
39. Williams, V. F., Clark, L. L. & Oh, G.-T. Update: Osteoarthritis and spondylosis, active component, U.S. Armed Forces, 2010-2015. *MSMR* **23**, 14–22 (2016).
40. Stevens-Lapsley, J. E. & Kohrt, W. M. Osteoarthritis in Women: Effects of Estrogen, Obesity and Physical Activity. *Womens Health (Lond Engl)* **6**, 601–615 (2010).
41. Tschon, M., Contartese, D., Pagani, S., Borsari, V. & Fini, M. Gender and Sex Are Key Determinants in Osteoarthritis Not Only Confounding Variables. A Systematic Review of Clinical Data. *Journal of Clinical Medicine* **10**, 3178 (2021).
42. Hanna, F. S. *et al.* Women have increased rates of cartilage loss and progression of cartilage defects at the knee than men: a gender study of adults without clinical knee osteoarthritis. *Menopause* **16**, 666–670 (2009).
43. Sluka, K. A. *et al.* Neural and psychosocial contributions to sex differences in knee osteoarthritic pain. *Biol Sex Differ* **3**, 26 (2012).
44. Gao, W. *et al.* Serum concentrations of selected endogenous estrogen and estrogen metabolites in pre- and post-menopausal Chinese women with osteoarthritis. *J Endocrinol Invest* **33**, 644–649 (2010).
45. Afzal, S. & Khanam, A. Serum estrogen and interleukin-6 levels in postmenopausal female osteoarthritis patients. *Pak J Pharm Sci* **24**, 217–219 (2011).
46. Ren, Y. *et al.* Association between polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and osteoarthritis susceptibility: a meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord* **16**, 1–10 (2015).
47. Messier, S. P. *et al.* Effects of intensive diet and exercise on knee joint loads, inflammation, and clinical outcomes among overweight and obese adults with knee osteoarthritis: the IDEA randomized clinical trial. *JAMA* **310**, 1263–1273 (2013).
48. Jiang, L. *et al.* Body mass index and hand osteoarthritis susceptibility: an updated meta-analysis. *International Journal of Rheumatic Diseases* **19**, 1244–1254 (2016).
49. Oliveira, M. C., Vullings, J. & van de Loo, F. A. J. Osteoporosis and osteoarthritis are two sides of the same coin paid for obesity. *Nutrition* **70**, 110486 (2020).
50. Zorena, K., Jachimowicz-Duda, O., Ślęzak, D., Robakowska, M. & Mrugacz, M. Adipokines and Obesity. Potential Link to Metabolic Disorders and Chronic Complications. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 3570 (2020).
51. Bao, J. *et al.* Leptin plays a catabolic role on articular cartilage. *Mol Biol Rep* **37**, 3265–3272 (2010).
52. Vuolteenaho, K. *et al.* Leptin Enhances Synthesis of Proinflammatory Mediators in Human Osteoarthritic Cartilage—Mediator Role of NO in Leptin-Induced

4.32007pt;width:49.974998px;" id="M1" height="20.4125" version="1.1" viewBox="0 0 49.974998 20.4125" width="49.974998" xmlns:xlink="http://www.w3.org/1999/xlink" xmlns="http://www.w3.org/2000/svg"> <g transform="matrix(.022,-0,0,-.022,.062,14.975)"><path id="x50" d="M46 650h247q112 0 169 -41q64 -49 64 -141q0 -91 -56.5 -143t-138.5 -62q-23 -3 -45 -11-74 19v-157q0 -63 15.5 -77t83.5 -19v-28h-271v28q60 5 74 20t14 77v400q0 65 -12.5 79t-69.5 18v28zM212 559v-245q31 -12 73 -12q59 0 102 38t43 124q0 77 -42.5 115.5 t-108.5 38.5q-44 0 -56 -12q-11 -8 -11 -47z" /></g><g transform="matrix(.022,-0,0,-.022,12.683,14.975)"><path id="x47" d="M692 302v-28q-45 -6 -54.5 -17t-9.5 -55v-86q0 -62 7 -95q-7 -2 -32 -7.5l-37 -8l-35.5 -7.5t-40.5 -7t-38.5 -4t-40.5 -2q-165 0 -266 93t-101 243q0 84 32 151t86 108t121.5 63t142.5 22q29 0 62.5 -4t52 -7.5t47.5 -10.5t31 -7l15 -156l-28 -6q-17 87 -66.5 121.5 t-128.5 34.5q-117 0 -191 -80.5t-74 -216.5q0 -56 17 -110t49.5 -100.5t87.5 -74.5t124 -28q53 0 87 17q17 9 24.5 23t7.5 43v85q0 54 -15.5 67.5t-89.5 18.5v28h254z" /></g><g transform="matrix(.022,-0,0,-.022,28.71,14.975)"><path id="x45" d="M517 162l29 -4q-18 -100 -35 -158h-482v28q68 5 83.5 20t15.5 77v398q0 66 -13 80t-73 19v28h446q0 -8 8 -144l-29 -4q-11 51 -32 85q-11 17 -35 23t-78 6h-76q-23 0 -28 -5t-5 -27v-228h94q67 0 83 12t25 63h29v-191h-29q-10 54 -26 65.5t-81 11.5h-95v-189 q0 -65 24 -81q19 -13 104 -13q57 0 83 7t43 27q28 33 50 94z" /></g> <g transform="matrix(.016,-0,0,-.016,41.438,20.35)"><path id="x1D7D0" d="M453 211h25l-46 -211h-415v23q97 102 151 166q42 49 81 110q51 78 51 148q0 56 -31.5 91.5t-87.5 35.5q-77 0 -122 -90h-28q67 204 223 204q82 0 132 -49.5t50 -133.5q0 -110 -114 -218l-162 -154h140q82 0 107 13q27 13 46 65z" /></g> </svg>, IL-6, and IL-8 Production. *Mediators of Inflammation* **2009**, e345838 (2009).

53. Yaykasli, K. O. *et al.* Leptin induces ADAMTS-4, ADAMTS-5, and ADAMTS-9 genes expression by mitogen-activated protein kinases and NF- $\kappa$ B signaling pathways in human chondrocytes. *Cell Biology International* **39**, 104–112 (2015).
54. Koskinen, A., Vuolteenaho, K., Nieminen, R., Moilanen, T. & Moilanen, E. Leptin enhances MMP-1, MMP-3 and MMP-13 production in human osteoarthritic cartilage and correlates with MMP-1 and MMP-3 in synovial fluid from oa patients. *Clinical and Experimental Rheumatology* **29**, 57–64 (2011).
55. Louati, K., Vidal, C., Berenbaum, F. & Sellam, J. Association between diabetes mellitus and osteoarthritis: systematic literature review and meta-analysis. *RMD Open* **1**, e000077 (2015).
56. Williams, M. F., London, D. A., Husni, E. M., Navaneethan, S. & Kashyap, S. R. Type 2 diabetes and osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Diabetes and its Complications* **30**, 944–950 (2016).
57. Schett, G. *et al.* Diabetes Is an Independent Predictor for Severe Osteoarthritis: Results from a longitudinal cohort study. *Diabetes Care* **36**, 403–409 (2013).
58. Zhang, Y., Wang, J. & Liu, X. Association between hypertension and risk of knee osteoarthritis. *Medicine (Baltimore)* **96**, e7584 (2017).
59. Veronese, N. *et al.* Knee Osteoarthritis and Risk of Hypertension: A Longitudinal Cohort Study. *Rejuvenation Research* **21**, 15–21 (2018).
60. Baudart, P., Louati, K., Marcelli, C., Berenbaum, F. & Sellam, J. Association between osteoarthritis and dyslipidaemia: a systematic literature review and meta-analysis. *RMD Open* **3**, e000442 (2017).
61. Quemeneur, A.-S., Trocello, J.-M., Ea, H.-K., Woimant, F. & Lioté, F. Musculoskeletal conditions associated with Wilson's disease. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* **25**, 627–636 (2011).
62. O'Neill, T. W., McCabe, P. S. & McBeth, J. Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* **32**, 312–326 (2018).
63. Magnusson, K., Turkiewicz, A. & Englund, M. Nature vs nurture in knee osteoarthritis – the importance of age, sex and body mass index. *Osteoarthritis and Cartilage* **27**, 586–592 (2019).
64. Zengini, E. *et al.* Genome-wide analyses using UK Biobank data provide insights into the genetic architecture of osteoarthritis. *Nat Genet* **50**, 549–558 (2018).
65. Tachmazidou, I. *et al.* Identification of new therapeutic targets for osteoarthritis through genome-wide analyses of UK Biobank data. *Nat Genet* **51**, 230–236 (2019).
66. Boer, C. G. *et al.* Deciphering osteoarthritis genetics across 826,690 individuals from 9 populations. *Cell* **184**, 6003–6005 (2021).
67. Posey, K. L. & Hecht, J. T. The role of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in skeletal disease. *Curr Drug Targets* **9**, 869–877 (2008).
68. Lee, Y.-J., Park, S.-Y., Park, E. K. & Kim, J.-E. Unique cartilage matrix-associated protein regulates fibrillin-2 expression and directly interacts with fibrillin-2 protein independent of calcium binding. *Biochem Biophys Res Commun* **511**, 221–227 (2019).
69. Thulson, E. *et al.* 3D Chromatin Structure in Chondrocytes Identifies Putative Osteoarthritis Risk Genes. *Genetics* iyac141 (2022) doi:10.1093/genetics/iyac141.

70. Kim, K.-I., Park, Y.-S. & Im, G.-I. Changes in the epigenetic status of the SOX-9 promoter in human osteoarthritic cartilage. *Journal of Bone and Mineral Research* **28**, 1050–1060 (2013).
71. Zheng, L. *et al.* Identification of abnormally methylated–differentially expressed genes and pathways in osteoarthritis: a comprehensive bioinformatic study. *Clin Rheumatol* **40**, 3247–3256 (2021).
72. Smeriglio, P., Grandi, F. C., Taylor, S. E. B., Zalc, A. & Bhutani, N. TET1 Directs Chondrogenic Differentiation by Regulating SOX9 Dependent Activation of Col2a1 and Acan In Vitro. *JBMR Plus* **4**, e10383 (2020).
73. Neogi, T. *et al.* Magnetic Resonance Imaging–Based Three-Dimensional Bone Shape of the Knee Predicts Onset of Knee Osteoarthritis: Data From the Osteoarthritis Initiative. *Arthritis & Rheumatism* **65**, 2048–2058 (2013).
74. Gregory, J. S. *et al.* Early identification of radiographic osteoarthritis of the hip using an active shape model to quantify changes in bone morphometric features: Can hip shape tell us anything about the progression of osteoarthritis? *Arthritis & Rheumatism* **56**, 3634–3643 (2007).
75. Terjesen, T. Residual hip dysplasia as a risk factor for osteoarthritis in 45 years follow-up of late-detected hip dislocation. *Journal of Children's Orthopaedics* **5**, 425–431 (2011).
76. Kotlarsky, P., Haber, R., Bialik, V. & Eidelman, M. Developmental dysplasia of the hip: What has changed in the last 20 years? *World Journal of Orthopedics* **6**, 886–901 (2015).
77. Sharma, L. *et al.* Varus and valgus alignment and incident and progressive knee osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **69**, 1940–1945 (2010).
78. Brown, T. D., Johnston, R. C., Saltzman, C. L., Marsh, J. L. & Buckwalter, J. A. Posttraumatic Osteoarthritis: A First Estimate of Incidence, Prevalence, and Burden of Disease. *Journal of Orthopaedic Trauma* **20**, 739–744 (2006).
79. Delco, M. L., Kennedy, J. G., Bonassar, L. J. & Fortier, L. A. Post-traumatic osteoarthritis of the ankle: A distinct clinical entity requiring new research approaches. *Journal of Orthopaedic Research* **35**, 440–453 (2017).
80. Kujala, U. M. *et al.* Knee osteoarthritis in former runners, soccer players, weight lifters, and shooters. *Arthritis & Rheumatism* **38**, 539–546 (1995).
81. Aicale, R., Tarantino, D. & Maffulli, N. Overuse injuries in sport: a comprehensive overview. *J Orthop Surg Res* **13**, 1–11 (2018).
82. Maetzel, A., Mäkelä, M., Hawker, G. & Bombardier, C. Osteoarthritis of the hip and knee and mechanical occupational exposure—a systematic overview of the evidence. *J Rheumatol* **24**, 1599–1607 (1997).
83. Keays, S. L., Newcombe, P. A., Bullock-Saxton, J. E., Bullock, M. I. & Keays, A. C. Factors Involved in the Development of Osteoarthritis after Anterior Cruciate Ligament Surgery. *Am J Sports Med* **38**, 455–463 (2010).
84. Øiestad, B. E., Holm, I., Gunderson, R., Myklebust, G. & Risberg, M. A. Quadriceps muscle weakness after anterior cruciate ligament reconstruction: A risk factor for knee osteoarthritis? *Arthritis Care & Research* **62**, 1706–1714 (2010).
85. Øiestad, B. E., Juhl, C. B., Eitzen, I. & Thorlund, J. B. Knee extensor muscle weakness is a risk factor for development of knee osteoarthritis. A systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis and Cartilage* **23**, 171–177 (2015).
86. Shah, R. F. *et al.* Variation in the Thickness of Knee Cartilage. The Use of a Novel Machine Learning Algorithm for Cartilage Segmentation of Magnetic Resonance Images. *J Arthroplasty* **34**, 2210–2215 (2019).
87. Si, L. *et al.* Knee Cartilage Thickness Differs Alongside Ages: A 3-T Magnetic Resonance Research Upon 2,481 Subjects via Deep Learning. *Front Med (Lausanne)* **7**, 600049 (2020).
88. Jackson, A. & Gu, W. TRANSPORT PROPERTIES OF CARTILAGINOUS TISSUES. *Curr Rheumatol Rev* **5**, 40 (2009).
89. Roughley, P. J. Articular cartilage and changes in arthritis: noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Res* **3**, 342–347 (2001).
90. Rozario, T. & DeSimone, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *Developmental Biology* **341**, 126–140 (2010).
91. Clark, J. M. Variation of collagen fiber alignment in a joint surface: A scanning electron microscope study of the tibial plateau in dog, rabbit, and man. *Journal of Orthopaedic Research* **9**, 246–257 (1991).
92. Eyre, D. Articular cartilage and changes in Arthritis: Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res Ther* **4**, 30 (2001).
93. Schumacher, B. L., Block, J. A., Schmid, T. M., Aydelotte, M. B. & Kuettner, K. E. A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* **311**, 144–152 (1994).
94. Zhang, Y. *et al.* Analysis of the Mineral Composition of the Human Calcified Cartilage Zone. *Int J Med Sci* **9**, 353–360 (2012).

95. Lyons, T. J., McClure, S. F., Stoddart, R. W. & McClure, J. The normal human chondro-osseous junctional region: evidence for contact of uncalcified cartilage with subchondral bone and marrow spaces. *BMC Musculoskelet Disord* **7**, 52 (2006).
96. Hall, A. C. The Role of Chondrocyte Morphology and Volume in Controlling Phenotype—Implications for Osteoarthritis, Cartilage Repair, and Cartilage Engineering. *Curr Rheumatol Rep* **21**, 38 (2019).
97. Woods, A., Wang, G. & Beier, F. Regulation of chondrocyte differentiation by the actin cytoskeleton and adhesive interactions. *J Cell Physiol* **213**, 1–8 (2007).
98. Goldring, M. B. & Marcu, K. B. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* **11**, 224 (2009).
99. Wong, M., Siegrist, M. & Cao, X. Cyclic compression of articular cartilage explants is associated with progressive consolidation and altered expression pattern of extracellular matrix proteins. *Matrix Biology* **18**, 391–399 (1999).
100. Ng, K. W. *et al.* Duty Cycle of Deformational Loading Influences the Growth of Engineered Articular Cartilage. *Cell Mol Bioeng* **2**, 386–394 (2009).
101. Alford, J. W. & Cole, B. J. Cartilage Restoration, Part 1: Basic Science, Historical Perspective, Patient Evaluation, and Treatment Options. *Am J Sports Med* **33**, 295–306 (2005).
102. Vignon, E., Arlot, M., Patricot, L. M. & Vignon, G. The cell density of human femoral head cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 303–308 (1976).
103. Mitrovic, D., Quintero, M., Stankovic, A. & Ryckewaert, A. Cell density of adult human femoral condylar articular cartilage. Joints with normal and fibrillated surfaces. *Lab Invest* **49**, 309–316 (1983).
104. Kiaer, T., Grønlund, J. & Sørensen, K. H. Subchondral pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, pressure, pH, and lactate in human osteoarthritis of the hip. *Clin Orthop Relat Res* 149–155 (1988).
105. DiDomenico, C. D., Lintz, M. & Bonassar, L. J. Molecular transport in articular cartilage — what have we learned from the past 50 years? *Nat Rev Rheumatol* **14**, 393–403 (2018).
106. Quinn, T. M., Studer, C., Grodzinsky, A. J. & Meister, J.-J. Preservation and analysis of nonequilibrium solute concentration distributions within mechanically compressed cartilage explants. *J Biochem Biophys Methods* **52**, 83–95 (2002).
107. Haider, M. A., Schugart, R. C., Setton, L. A. & Guilak, F. A mechano-chemical model for the passive swelling response of an isolated chondron under osmotic loading. *Biomech Model Mechanobiol* **5**, 160–171 (2006).
108. Chao, P.-H. G., West, A. C. & Hung, C. T. Chondrocyte intracellular calcium, cytoskeletal organization, and gene expression responses to dynamic osmotic loading. *Am J Physiol Cell Physiol* **291**, C718–725 (2006).
109. O’Conor, C. J., Leddy, H. A., Benefield, H. C., Liedtke, W. B. & Guilak, F. TRPV4-mediated mechanotransduction regulates the metabolic response of chondrocytes to dynamic loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 1316–1321 (2014).
110. Wilusz, R. E., Sanchez-Adams, J. & Guilak, F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biology* **39**, 25–32 (2014).
111. Poole, C. A., Flint, M. H. & Beaumont, B. W. Chondrons in cartilage: Ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *Journal of Orthopaedic Research* **5**, 509–522 (1987).
112. Youn, I., Choi, J. B., Cao, L., Setton, L. A. & Guilak, F. Zonal variations in the three-dimensional morphology of the chondron measured in situ using confocal microscopy. *Osteoarthritis and Cartilage* **14**, 889–897 (2006).
113. Zhang, Z. Chondrons and the Pericellular Matrix of Chondrocytes. *Tissue Engineering Part B: Reviews* **21**, 267–277 (2015).
114. Sanchez-Adams, J., Leddy, H. A., McNulty, A. L., O’Conor, C. J. & Guilak, F. The Mechanobiology of Articular Cartilage: Bearing the Burden of Osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* **16**, 451 (2014).
115. Rim, Y. A., Nam, Y. & Ju, J. H. The Role of Chondrocyte Hypertrophy and Senescence in Osteoarthritis Initiation and Progression. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 2358 (2020).
116. von der Mark, K. *et al.* Upregulation of type X collagen expression in osteoarthritic cartilage. *Acta Orthopaedica Scandinavica* **66**, 125–129 (1995).
117. Shlopov, B. V. *et al.* Osteoarthritic Lesions. Involvement of three different collagenases. *Arthritis & Rheumatism* **40**, 2065–2074 (1997).
118. Shlopov, B. V., Gumanovskaya, M. L. & Hasty, K. A. Autocrine regulation of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) during osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* **43**, 195–205 (2000).
119. Rahmati, M., Nalesso, G., Mobasheri, A. & Mozafari, M. Aging and osteoarthritis: Central role of the extracellular matrix. *Ageing Res. Rev.* **40**, 20–30 (2017).
120. Varela-Eirin, M. *et al.* Cartilage regeneration and ageing: Targeting cellular plasticity in osteoarthritis. *Ageing Research Reviews* **42**, 56–71 (2018).

121. Loeser, R. F., Collins, J. A. & Diekman, B. O. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **12**, 412–420 (2016).
122. Wojdasiewicz, P., Poniatowski, Ł. A. & Szukiewicz, D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm.* **2014**, 561459 (2014).
123. Pfander, D., Heinz, N., Rothe, P., Carl, H.-D. & Swoboda, B. Tenascin and aggrecan expression by articular chondrocytes is influenced by interleukin 1 $\beta$ : a possible explanation for the changes in matrix synthesis during osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **63**, 240–244 (2004).
124. Goldring, M. B., Birkhead, J., Sandell, L. J., Kimura, T. & Krane, S. M. Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. *J Clin Invest* **82**, 2026–2037 (1988).
125. Li, G. *et al.* Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis Research & Therapy* **15**, 223 (2013).
126. Milz, S. & Putz, R. Quantitative morphology of the subchondral plate of the tibial plateau. *J Anat* **185**, 103–110 (1994).
127. Stewart, H. L. & Kawcak, C. E. The Importance of Subchondral Bone in the Pathophysiology of Osteoarthritis. *Front Vet Sci* **5**, 178 (2018).
128. Suri, S. & Walsh, D. A. Osteochondral alterations in osteoarthritis. *Bone* **51**, 204–211 (2012).
129. Donell, S. Subchondral bone remodelling in osteoarthritis. *EFORT Open Reviews* **4**, 221 (2019).
130. Hadjidakis, D. J. & Androulakis, I. I. Bone Remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1092**, 385–396 (2006).
131. Klose-Jensen, R. *et al.* Subchondral bone turnover, but not bone volume, is increased in early stage osteoarthritic lesions in the human hip joint. *Osteoarthritis and Cartilage* **23**, 2167–2173 (2015).
132. Li, B. & Aspden, R. M. Composition and Mechanical Properties of Cancellous Bone from the Femoral Head of Patients with Osteoporosis or Osteoarthritis. *Journal of Bone and Mineral Research* **12**, 641–651 (1997).
133. Burr, D. B. & Gallant, M. A. Bone remodelling in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **8**, 665–673 (2012).
134. Goldring, S. R. & Goldring, M. B. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage–bone crosstalk. *Nat Rev Rheumatol* **12**, 632–644 (2016).
135. Lajeunesse, D. & Rebour, P. Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. *Curr Opin Rheumatol* **15**, 628–633 (2003).
136. Pan, J. *et al.* In situ measurement of transport between subchondral bone and articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Research* **27**, 1347–1352 (2009).
137. Enomoto, H. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms and Their Receptors Are Expressed in Human Osteoarthritic Cartilage. *The American Journal of Pathology* **162**, 171–181 (2003).
138. Agas, D., Sabbieti, M. G., Marchetti, L., Xiao, L. & Hurley, M. M. FGF-2 enhances Runx-2/Smads nuclear localization in BMP-2 canonical signaling in osteoblasts. *J Cell Physiol* **228**, 2149–2158 (2013).
139. Smith, M. D. The normal synovium. *Open Rheumatol J* **5**, 100–106 (2011).
140. Singh, J. A., Arayssi, T., Duray, P. & Schumacher, H. R. Immunohistochemistry of normal human knee synovium: a quantitative study. *Annals of the Rheumatic Diseases* **63**, 785–790 (2004).
141. Brannan, S. R. & Jerrard, D. A. Synovial fluid analysis. *The Journal of Emergency Medicine* **30**, 331–339 (2006).
142. Kofoed, H. Synovitis causes hypoxia and acidity in synovial fluid and subchondral bone. *Injury* **17**, 391–394 (1986).
143. Kurowska-Stolarska, M. & Alivernini, S. Synovial tissue macrophages: friend or foe? *RMD Open* **3**, e000527 (2017).
144. Sanchez-Lopez, E., Coras, R., Torres, A., Lane, N. E. & Guma, M. Synovial inflammation in osteoarthritis progression. *Nat Rev Rheumatol* **18**, 258–275 (2022).
145. Riis, R. G. C. *et al.* The association between histological, macroscopic and magnetic resonance imaging assessed synovitis in end-stage knee osteoarthritis: a cross-sectional study. *Osteoarthritis and Cartilage* **25**, 272–280 (2017).
146. Roemer, F. W. *et al.* Anatomical distribution of synovitis in knee osteoarthritis and its association with joint effusion assessed on non-enhanced and contrast-enhanced MRI. *Osteoarthritis Cartilage* **18**, 1269–1274 (2010).
147. de Lange-Brokaar, B. J. E. *et al.* Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis and Cartilage* **20**, 1484–1499 (2012).
148. Berenbaum, F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis and Cartilage* **21**, 16–21 (2013).

149. Hwang, H. S., Park, S. J., Cheon, E. J., Lee, M. H. & Kim, H. A. Fibronectin fragment-induced expression of matrix metalloproteinases is mediated by MyD88-dependent TLR-2 signaling pathway in human chondrocytes. *Arthritis Res Ther* **17**, 320 (2015).
150. Lambert, C. *et al.* The Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) as Potential Targets to Treat Osteoarthritis: Perspectives From a Review of the Literature. *Frontiers in Medicine* **7**, (2021).
151. Mabey, T. & Honsawek, S. Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis. *World J Orthop* **6**, 95–105 (2015).
152. Szekanecz, Z., Besenyi, T., Paragh, G. & Koch, A. E. New insights in synovial angiogenesis. *Joint Bone Spine* **77**, 13–19 (2010).
153. Sellam, J. & Berenbaum, F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **6**, 625–635 (2010).
154. Macchi, V. *et al.* The infrapatellar fat pad and the synovial membrane: an anatomo-functional unit. *Journal of Anatomy* **233**, 146–154 (2018).
155. Eymard, F. & Chevalier, X. Inflammation of the infrapatellar fat pad. *Joint Bone Spine* **83**, 389–393 (2016).
156. Favero, M. *et al.* Infrapatellar fat pad features in osteoarthritis: a histopathological and molecular study. *Rheumatology* **56**, 1784–1793 (2017).
157. Kontny, E. *et al.* Comparison of rheumatoid articular adipose and synovial tissue reactivity to proinflammatory stimuli: contribution to adipocytokine network. *Annals of the Rheumatic Diseases* **71**, 262–267 (2012).
158. Belluzzi, E. *et al.* Infrapatellar Fat Pad Gene Expression and Protein Production in Patients with and without Osteoarthritis. *Int J Mol Sci* **21**, 6016 (2020).
159. Fernandes, L. *et al.* EULAR recommendations for the non-pharmacological core management of hip and knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **72**, 1125–1135 (2013).
160. Dantas, L. O., Salvini, T. de F. & McAlindon, T. E. Knee osteoarthritis: key treatments and implications for physical therapy. *Braz J Phys Ther* **25**, 135–146 (2021).
161. Bennell, K. L., Dobson, F. & Hinman, R. S. Exercise in osteoarthritis: moving from prescription to adherence. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **28**, 93–117 (2014).
162. Dobson, F. *et al.* Barriers and Facilitators to Exercise Participation in People with Hip and/or Knee Osteoarthritis: Synthesis of the Literature Using Behavior Change Theory. *Am J Phys Med Rehabil* **95**, 372–389 (2016).
163. Nicolson, P. J. A. *et al.* Interventions to increase adherence to therapeutic exercise in older adults with low back pain and/or hip/knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med* **51**, 791–799 (2017).
164. Bliddal, H., Leeds, A. R. & Christensen, R. Osteoarthritis, obesity and weight loss: evidence, hypotheses and horizons - a scoping review. *Obes Rev* **15**, 578–586 (2014).
165. Felson, D. T., Zhang, Y., Anthony, J. M., Naimark, A. & Anderson, J. J. Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study. *Ann Intern Med* **116**, 535–539 (1992).
166. Atukorala, I. *et al.* Is There a Dose-Response Relationship Between Weight Loss and Symptom Improvement in Persons With Knee Osteoarthritis? *Arthritis Care Res (Hoboken)* **68**, 1106–1114 (2016).
167. Machado, G. C. *et al.* Efficacy and safety of paracetamol for spinal pain and osteoarthritis: systematic review and meta-analysis of randomised placebo controlled trials. *BMJ* **350**, h1225 (2015).
168. da Costa, B. R. *et al.* Effectiveness of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of pain in knee and hip osteoarthritis: a network meta-analysis. *The Lancet* **390**, e21–e33 (2017).
169. Bannuru, R. R. *et al.* OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **27**, 1578–1589 (2019).
170. Busse, J. W. *et al.* Opioids for Chronic Noncancer Pain: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* **320**, 2448–2460 (2018).
171. Krebs, E. E. *et al.* Effect of Opioid vs Nonopioid Medications on Pain-Related Function in Patients With Chronic Back Pain or Hip or Knee Osteoarthritis Pain: The SPACE Randomized Clinical Trial. *JAMA* **319**, 872–882 (2018).
172. Agarwal, P. & Sambamoorthi, U. Healthcare Expenditures Associated with Depression Among Individuals with Osteoarthritis: Post-Regression Linear Decomposition Approach. *J Gen Intern Med* **30**, 1803–1811 (2015).
173. Osani, M. C. & Bannuru, R. R. Efficacy and safety of duloxetine in osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Korean J Intern Med* **34**, 966–973 (2019).
174. Kelly, K., Posternak, M. & Jonathan, E. A. Toward achieving optimal response: understanding and managing antidepressant side effects. *Dialogues Clin Neurosci* **10**, 409–418 (2008).

175. Colletti, A. & Cicero, A. F. G. Nutraceutical Approach to Chronic Osteoarthritis: From Molecular Research to Clinical Evidence. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 12920 (2021).
176. Henrotin, Y. & Mobasheri, A. Natural Products for Promoting Joint Health and Managing Osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* **20**, 72 (2018).
177. Hochberg, M. C. *et al.* American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care & Research* **64**, 465–474 (2012).
178. McAlindon, T. E. *et al.* OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **22**, 363–388 (2014).
179. Hochberg, M. C. *et al.* Combined chondroitin sulfate and glucosamine for painful knee osteoarthritis: a multicentre, randomised, double-blind, non-inferiority trial versus celecoxib. *Ann Rheum Dis* **75**, 37–44 (2016).
180. Martel-Pelletier, J. *et al.* First-line analysis of the effects of treatment on progression of structural changes in knee osteoarthritis over 24 months: data from the osteoarthritis initiative progression cohort. *Ann Rheum Dis* **74**, 547–556 (2015).
181. Fransen, M. *et al.* Glucosamine and chondroitin for knee osteoarthritis: a double-blind randomised placebo-controlled clinical trial evaluating single and combination regimens. *Ann Rheum Dis* **74**, 851–858 (2015).
182. Gerwin, N., Hops, C. & Lucke, A. Intraarticular drug delivery in osteoarthritis. *Adv Drug Deliv Rev* **58**, 226–242 (2006).
183. Bannuru, R. R., Natov, N. S., Dasi, U. R., Schmid, C. H. & McAlindon, T. E. Therapeutic trajectory following intra-articular hyaluronic acid injection in knee osteoarthritis – meta-analysis. *Osteoarthritis and Cartilage* **19**, 611–619 (2011).
184. Maheu, E. *et al.* Why we should definitely include intra-articular hyaluronic acid as a therapeutic option in the management of knee osteoarthritis: Results of an extensive critical literature review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* **48**, 563–572 (2019).
185. Jones, I. A., Togashi, R., Wilson, M. L., Heckmann, N. & Vangsness, C. T. Intra-articular treatment options for knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **15**, 77–90 (2019).
186. Pereira, T. V. *et al.* Viscosupplementation for knee osteoarthritis: systematic review and meta-analysis. *BMJ* **378**, e069722 (2022).
187. Arden, N. K. *et al.* Non-surgical management of knee osteoarthritis: comparison of ESCEO and OARSI 2019 guidelines. *Nat Rev Rheumatol* **17**, 59–66 (2021).
188. McAlindon, T. E. *et al.* Effect of Intra-articular Triamcinolone vs Saline on Knee Cartilage Volume and Pain in Patients With Knee Osteoarthritis. *JAMA* **317**, 1967–1975 (2017).
189. Choong, P. F. M. & Dowsey, M. M. Update in surgery for osteoarthritis of the knee. *International Journal of Rheumatic Diseases* **14**, 167–174 (2011).
190. Dervin, G. F., Stiell, I. G., Rody, K. & Grabowski, J. Effect of arthroscopic débridement for osteoarthritis of the knee on health-related quality of life. *J Bone Joint Surg Am* **85**, 10–19 (2003).
191. Roemer, F. W. *et al.* Partial meniscectomy is associated with increased risk of incident radiographic osteoarthritis and worsening cartilage damage in the following year. *Eur Radiol* **27**, 404–413 (2017).
192. Rodríguez-Merchán, E. C. & Gómez-Cardero, P. Unicompartmental knee arthroplasty: Current indications, technical issues and results. *EFORT Open Rev* **3**, 363–373 (2018).
193. Liu, X., Chen, Z., Gao, Y., Zhang, J. & Jin, Z. High Tibial Osteotomy: Review of Techniques and Biomechanics. *J Healthc Eng* **2019**, 8363128 (2019).
194. Hofmann, A. A., Heithoff, S. M. & Camargo, M. Cementless total knee arthroplasty in patients 50 years or younger. *Clin Orthop Relat Res* 102–107 (2002) doi:10.1097/00003086-200211000-00018.
195. Rand, J. A., Trousdale, R. T., Ilstrup, D. M. & Harmsen, W. S. Factors affecting the durability of primary total knee prostheses. *J Bone Joint Surg Am* **85**, 259–265 (2003).
196. Skou, S. T. *et al.* A Randomized, Controlled Trial of Total Knee Replacement. *N Engl J Med* **373**, 1597–1606 (2015).
197. Bourne, R. B., Chesworth, B. M., Davis, A. M., Mahomed, N. N. & Charron, K. D. J. Patient Satisfaction after Total Knee Arthroplasty: Who is Satisfied and Who is Not? *Clin Orthop Relat Res* **468**, 57–63 (2010).
198. Nam, Y., Rim, Y. A., Lee, J. & Ju, J. H. Current Therapeutic Strategies for Stem Cell-Based Cartilage Regeneration. *Stem Cells Int* **2018**, 8490489 (2018).
199. Viste, A. *et al.* Autologous chondrocyte implantation for traumatic full-thickness cartilage defects of the knee in 14 patients: 6-year functional outcomes. *Orthop Traumatol Surg Res* **98**, 737–743 (2012).
200. Andriolo, L., Merli, G., Filardo, G., Marcacci, M. & Kon, E. Failure of Autologous Chondrocyte Implantation. *Sports Med Arthrosc Rev* **25**, 10–18 (2017).

201. Mistry, H. *et al.* Autologous chondrocyte implantation in the knee: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* **21**, 1–294 (2017).
202. Kong, L., Zheng, L.-Z., Qin, L. & Ho, K. K. W. Role of mesenchymal stem cells in osteoarthritis treatment. *J Orthop Translat* **9**, 89–103 (2017).
203. Im, G.-I. Tissue Engineering in Osteoarthritis: Current Status and Prospect of Mesenchymal Stem Cell Therapy. *BioDrugs* **32**, 183–192 (2018).
204. Song, Y. *et al.* Mesenchymal stem cells in knee osteoarthritis treatment: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Orthopaedic Translation* **24**, 121–130 (2020).
205. Evans, C. H. & Huard, J. Gene therapy approaches to regenerating the musculoskeletal system. *Nat Rev Rheumatol* **11**, 234–242 (2015).
206. Roseti, L., Desando, G., Cavallo, C., Petretta, M. & Grigolo, B. Articular Cartilage Regeneration in Osteoarthritis. *Cells* **8**, 1305 (2019).
207. Evans, C. H., Ghivizzani, S. C. & Robbins, P. D. Gene Delivery to Joints by Intra-Articular Injection. *Hum Gene Ther* **29**, 2–14 (2018).
208. Kim, M.-K. *et al.* A Multicenter, Double-Blind, Phase III Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of a Cell and Gene Therapy in Knee Osteoarthritis Patients. *Human Gene Therapy Clinical Development* **29**, 48–59 (2018).
209. Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J. & van Deursen, J. M. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med* **21**, 1424–1435 (2015).
210. Childs, B. G. *et al.* Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov* **16**, 718–735 (2017).
211. Jeon, O. H. *et al.* Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nature Medicine* **23**, 775–781 (2017).
212. Martel, J. *et al.* Emerging use of senolytics and senomorphics against aging and chronic diseases. *Medicinal Research Reviews* **40**, 2114–2131 (2020).
213. Lagoumtzi, S. M. & Chondrogianni, N. Senolytics and senomorphics: Natural and synthetic therapeutics in the treatment of aging and chronic diseases. *Free Radical Biology and Medicine* **171**, 169–190 (2021).
214. Zhang, L., Pitcher, L. E., Prahalad, V., Niedernhofer, L. J. & Robbins, P. D. Targeting cellular senescence with senotherapeutics: senolytics and senomorphics. *The FEBS Journal* **n/a**, (2022).
215. Yousefzadeh, M. J. *et al.* Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. *EBioMedicine* **36**, 18–28 (2018).
216. Roos, C. M. *et al.* Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell* **15**, 973–977 (2016).
217. Palmer, A. K. *et al.* Targeting senescent cells alleviates obesity-induced metabolic dysfunction. *Aging Cell* **18**, e12950 (2019).
218. Aguayo-Mazzucato, C. *et al.* Acceleration of  $\beta$  Cell Aging Determines Diabetes and Senolysis Improves Disease Outcomes. *Cell Metabolism* **30**, 129–142.e4 (2019).
219. Yang, H. *et al.* Navitoclax (ABT263) reduces inflammation and promotes chondrogenic phenotype by clearing senescent osteoarthritic chondrocytes in osteoarthritis. *Aging* **12**, 12750–12770 (2020).
220. Xu, M. *et al.* Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med* **24**, 1246–1256 (2018).
221. Chaib, S., Tchkonja, T. & Kirkland, J. L. Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. *Nat Med* **28**, 1556–1568 (2022).
222. Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585–621 (1961).
223. Gorgoulis, V. *et al.* Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell* **179**, 813–827 (2019).
224. de Magalhães, J. P. & Passos, J. F. Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* **170**, 2–9 (2018).
225. Scudellari, M. To stay young, kill zombie cells. *Nature* **550**, 448–450 (2017).
226. Hernandez-Segura, A., Nehme, J. & Demaria, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology* **28**, 436–453 (2018).
227. Coryell, P. R., Diekman, B. O. & Loeser, R. F. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* **17**, 47–57 (2021).
228. Di Micco, R. *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638–642 (2006).
229. Passos, J. F. *et al.* Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Molecular Systems Biology* **6**, 347 (2010).

230. Dabrowska, M., Uram, L., Zielinski, Z., Rode, W. & Sikora, E. Oxidative stress and inhibition of nitric oxide generation underlie methotrexate-induced senescence in human colon cancer cells. *Mech Ageing Dev* **170**, 22–29 (2018).
231. Petrova, N. V., Velichko, A. K., Razin, S. V. & Kantidze, O. L. Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Ageing Cell* **15**, 999–1017 (2016).
232. Pazolli, E. *et al.* Chromatin remodeling underlies the senescence-associated secretory phenotype of tumor stromal fibroblasts that supports cancer progression. *Cancer Res* **72**, 2251–2261 (2012).
233. García-Prat, L. *et al.* Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature* **529**, 37–42 (2016).
234. Ewald, J. A., Desotelle, J. A., Wilding, G. & Jarrard, D. F. Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst* **102**, 1536–1546 (2010).
235. Dörr, J. R. *et al.* Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* **501**, 421–425 (2013).
236. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J. & Peeper, D. S. The essence of senescence. *Genes Dev* **24**, 2463–2479 (2010).
237. Lozano-Torres, B. *et al.* The chemistry of senescence. *Nat Rev Chem* **3**, 426–441 (2019).
238. Olovnikov, A. M. [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Dokl Akad Nauk SSSR* **201**, 1496–1499 (1971).
239. Watson, J. D. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* **239**, 197–201 (1972).
240. Victorelli, S. & Passos, J. F. Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not. *EBioMedicine* **21**, 14–20 (2017).
241. Giardini, M. A., Segatto, M., da Silva, M. S., Nunes, V. S. & Cano, M. I. N. Chapter One - Telomere and Telomerase Biology. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (ed. Calado, R. T.) vol. 125 1–40 (Academic Press, 2014).
242. Shay, J. W. & Wright, W. E. Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 577–584 (2006).
243. Bodnar, A. G. *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349–352 (1998).
244. Vaziri, H. & Benchimol, S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* **8**, 279–282 (1998).
245. Shay, J. W. & Bacchetti, S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* **33**, 787–791 (1997).
246. Muntoni, A. & Reddel, R. R. The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum Mol Genet* **14 Spec No. 2**, R191–196 (2005).
247. Sulli, G., Di Micco, R. & d’Adda di Fagagna, F. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat Rev Cancer* **12**, 709–720 (2012).
248. Min, S., Ji, J.-H., Heo, Y. & Cho, H. Transcriptional regulation and chromatin dynamics at DNA double-strand breaks. *Exp Mol Med* **54**, 1705–1712 (2022).
249. Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D. & d’Adda di Fagagna, F. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol* **22**, 75–95 (2021).
250. Fumagalli, M., Rossiello, F., Mondello, C. & d’Adda di Fagagna, F. Stable cellular senescence is associated with persistent DDR activation. *PLoS One* **9**, e110969 (2014).
251. Galbiati, A., Beauséjour, C. & d’Adda di Fagagna, F. A novel single-cell method provides direct evidence of persistent DNA damage in senescent cells and aged mammalian tissues. *Ageing Cell* **16**, 422–427 (2017).
252. Fagagna, F. d’Adda di *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194–198 (2003).
253. González-Gualda, E., Baker, A. G., Fruk, L. & Muñoz-Espín, D. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *The FEBS Journal* **288**, 56–80 (2021).
254. Uyar, B. *et al.* Single-cell analyses of aging, inflammation and senescence. *Ageing Res Rev* **64**, 101156 (2020).
255. Basisty, N. *et al.* A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biol* **18**, (2020).
256. Özcan, S. *et al.* Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. *Ageing* **8**, 1316–1327 (2016).
257. Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K. & Wahl, G. M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* **8**, 2540–2551 (1994).
258. Calcinotto, A. *et al.* Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiological Reviews* **99**, 1047–1078 (2019).
259. Wiley, C. D. & Campisi, J. The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention. *Nat Metab* **3**, 1290–1301 (2021).

260. Schmitt, C. A., Wang, B. & Demaria, M. Senescence and cancer — role and therapeutic opportunities. *Nat Rev Clin Oncol* **19**, 619–636 (2022).
261. Witkiewicz, A. K., Knudsen, K. E., Dicker, A. P. & Knudsen, E. S. The meaning of p16ink4a expression in tumors. *Cell Cycle* **10**, 2497–2503 (2011).
262. Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J. & van Deursen, J. M. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep* **15**, 1139–1153 (2014).
263. Ryu, S. J., Oh, Y. S. & Park, S. C. Failure of stress-induced downregulation of Bcl-2 contributes to apoptosis resistance in senescent human diploid fibroblasts. *Cell Death Differ* **14**, 1020–1028 (2007).
264. Yang, C. & Wang, X. Lysosome biogenesis: Regulation and functions. *J Cell Biol* **220**, e202102001 (2021).
265. Perera, R. M. & Zoncu, R. The Lysosome as a Regulatory Hub. *Annual review of cell and developmental biology* **32**, 223 (2016).
266. Dimri, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363–9367 (1995).
267. Melk, A. *et al.* Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int* **65**, 510–520 (2004).
268. Lee, B. Y. *et al.* Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal  $\beta$ -galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187–195 (2006).
269. Diekmann, B. O. *et al.* Expression of p16INK 4a is a biomarker of chondrocyte aging but does not cause osteoarthritis. *Aging Cell* **17**, (2018).
270. Cho, S. & Hwang, E. S. Status of mTOR activity may phenotypically differentiate senescence and quiescence. *Mol Cells* **33**, 597–604 (2012).
271. Berkenkamp, B. *et al.* In vivo and in vitro analysis of age-associated changes and somatic cellular senescence in renal epithelial cells. *PLoS One* **9**, e88071 (2014).
272. Baisanry, A. *et al.* The impact of autophagy on the development of senescence in primary tubular epithelial cells. *Cell Cycle* **15**, 2973–2979 (2016).
273. Georgakopoulou, E. A. *et al.* Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Aging (Albany NY)* **5**, 37–50 (2013).
274. Terman, A. & Brunk, U. T. Lipofuscin: Mechanisms of formation and increase with age. *APMIS* **106**, 265–276 (1998).
275. Evangelou, K. & Gorgoulis, V. G. Sudan Black B, The Specific Histochemical Stain for Lipofuscin: A Novel Method to Detect Senescent Cells. *Methods Mol Biol* **1534**, 111–119 (2017).
276. Huang, W., Hickson, L. J., Eirin, A., Kirkland, J. L. & Lerman, L. O. Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. *Nat Rev Nephrol* 1–17 (2022) doi:10.1038/s41581-022-00601-z.
277. Blagosklonny, M. V. Cell senescence: Hypertrophic arrest beyond the restriction point. *Journal of Cellular Physiology* **209**, 592–597 (2006).
278. Demidenko, Z. N. & Blagosklonny, M. V. Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. *Cell Cycle* **7**, 3355–3361 (2008).
279. Prokocimer, M. *et al.* Nuclear lamins: key regulators of nuclear structure and activities. *J Cell Mol Med* **13**, 1059–1085 (2009).
280. Sadaie, M. *et al.* Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence. *Genes Dev* **27**, 1800–1808 (2013).
281. Radspieler, M. M. *et al.* Lamin-B1 is a senescence-associated biomarker in clear-cell renal cell carcinoma. *Oncol Lett* **18**, 2654–2660 (2019).
282. Bedrosian, T. A. *et al.* Lamin B1 decline underlies age-related loss of adult hippocampal neurogenesis. *EMBO J* **40**, e105819 (2021).
283. Freund, A., Laberge, R.-M., Demaria, M. & Campisi, J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell* **23**, 2066–2075 (2012).
284. Shimi, T. *et al.* The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes Dev* **25**, 2579–2593 (2011).
285. Miller, K. N., Dasgupta, N., Liu, T., Adams, P. D. & Vizioli, M. G. Cytoplasmic chromatin fragments—from mechanisms to therapeutic potential. *eLife* **10**, e63728.
286. Glück, S. *et al.* Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat Cell Biol* **19**, 1061–1070 (2017).
287. Dou, Z. *et al.* Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature* **550**, 402–406 (2017).

288. Vizioli, M. G. *et al.* Mitochondria-to-nucleus retrograde signaling drives formation of cytoplasmic chromatin and inflammation in senescence. *Genes Dev* **34**, 428–445 (2020).
289. Dou, Z. *et al.* Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature* **527**, 105–109 (2015).
290. Harding, S. M. *et al.* Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature* **548**, 466–470 (2017).
291. Mackenzie, K. J. *et al.* cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature* **548**, 461–465 (2017).
292. De Cecco, M. *et al.* L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature* **566**, 73–78 (2019).
293. Aird, K. M. & Zhang, R. Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). *Methods Mol Biol* **965**, 185–196 (2013).
294. Zhang, R. *et al.* Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* **8**, 19–30 (2005).
295. Costanzi, C. & Pehrson, J. R. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* **393**, 599–601 (1998).
296. Narita, M. *et al.* A Novel Role for High-Mobility Group A Proteins in Cellular Senescence and Heterochromatin Formation. *Cell* **126**, 503–514 (2006).
297. Narita, M. *et al.* Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence. *Cell* **113**, 703–716 (2003).
298. Zhang, R., Chen, W. & Adams, P. D. Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol Cell Biol* **27**, 2343–2358 (2007).
299. Trojer, P. & Reinberg, D. Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell* **28**, 1–13 (2007).
300. Kennedy, A. L. *et al.* Senescent mouse cells fail to overtly regulate the HIRA histone chaperone and do not form robust Senescence Associated Heterochromatin Foci. *Cell Div* **5**, 16 (2010).
301. Di Micco, R. *et al.* Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. *Nat Cell Biol* **13**, 292–302 (2011).
302. Zirkel, A. *et al.* HMGB2 Loss upon Senescence Entry Disrupts Genomic Organization and Induces CTCF Clustering across Cell Types. *Mol Cell* **70**, 730–744.e6 (2018).
303. Lukášová, E., Kovařík, A. & Kozubek, S. Consequences of Lamin B1 and Lamin B Receptor Downregulation in Senescence. *Cells* **7**, E11 (2018).
304. Meqbel, B. R. M., Gomes, M., Omer, A., Gallouzi, I. E. & Horn, H. F. LINCing Senescence and Nuclear Envelope Changes. *Cells* **11**, 1787 (2022).
305. Polo, S. E. & Jackson, S. P. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev* **25**, 409–433 (2011).
306. Shiloh, Y. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends in Biochemical Sciences* **31**, 402–410 (2006).
307. Noren Hooten, N. & Evans, M. K. Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence. *J Vis Exp* (2017) doi:10.3791/55533.
308. Gal, H., Porat, Z. & Krizhanovsky, V. A Multiparametric Assay to Evaluate Senescent Cells. in *Cellular Senescence: Methods and Protocols* (ed. Demaria, M.) 107–117 (Springer, 2019). doi:10.1007/978-1-4939-8931-7\_11.
309. Beauséjour, C. M. *et al.* Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* **22**, 4212–4222 (2003).
310. Schieber, M. & Chandel, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol* **24**, R453–462 (2014).
311. Ray, P. D., Huang, B.-W. & Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* **24**, 981–990 (2012).
312. Green, D. R., Galluzzi, L. & Kroemer, G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* **333**, 1109–1112 (2011).
313. Hirano, T., Yamaguchi, R., Asami, S., Iwamoto, N. & Kasai, H. 8-hydroxyguanine levels in nuclear DNA and its repair activity in rat organs associated with age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **51**, B303–307 (1996).
314. Wolf, F. I. *et al.* Peripheral lymphocyte 8-OHdG levels correlate with age-associated increase of tissue oxidative DNA damage in Sprague-Dawley rats. Protective effects of caloric restriction. *Exp Gerontol* **40**, 181–188 (2005).
315. Hamilton, M. L. *et al.* Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10469–10474 (2001).

316. Mecocci, P. *et al.* Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol* **34**, 609–616 (1993).
317. Zhang, C., Chen, M., Zhou, N. & Qi, Y. Metformin Prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Senescence in Human Lens Epithelial B3 Cells. *Med Sci Monit Basic Res* **26**, e923391 (2020).
318. Wang, X. *et al.* Induction of Fibroblast Senescence During Mouse Corneal Wound Healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **60**, 3669–3679 (2019).
319. Kaplon, J. *et al.* A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature* **498**, 109–112 (2013).
320. Birch, J. & Passos, J. F. Targeting the SASP to combat ageing: Mitochondria as possible intracellular allies? *Bioessays* **39**, (2017).
321. Korolchuk, V. I., Miwa, S., Carroll, B. & von Zglinicki, T. Mitochondria in Cell Senescence: Is Mitophagy the Weakest Link? *EBioMedicine* **21**, 7–13 (2017).
322. Zielonka, J., Hardy, M. & Kalyanaraman, B. HPLC study of oxidation products of hydroethidine in chemical and biological systems: ramifications in superoxide measurements. *Free Radic Biol Med* **46**, 329–338 (2009).
323. Robinson, K. M. *et al.* Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15038–15043 (2006).
324. Perry, S. W., Norman, J. P., Barbieri, J., Brown, E. B. & Gelbard, H. A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* **50**, 98–115 (2011).
325. Zhu, Y., Armstrong, J. L., Tchkonja, T. & Kirkland, J. L. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype in age-related chronic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **17**, 324–328 (2014).
326. Kennedy, B. K. *et al.* Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell* **159**, 709–713 (2014).
327. Cevenini, E., Monti, D. & Franceschi, C. Inflamm-aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **16**, 14–20 (2013).
328. Franceschi, C. & Campisi, J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *The Journals of Gerontology: Series A* **69**, S4–S9 (2014).
329. Furman, D. *et al.* Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med* **25**, 1822–1832 (2019).
330. Acosta, J. C. *et al.* A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* **15**, 978–990 (2013).
331. Jeon, O. H. *et al.* Systemic induction of senescence in young mice after single heterochronic blood exchange. *Nat Metab* **4**, 995–1006 (2022).
332. Xue, W. *et al.* Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**, 656–660 (2007).
333. Acosta, J. C. *et al.* Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell* **133**, 1006–1018 (2008).
334. Krizhanovsky, V. *et al.* Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell* **134**, 657–667 (2008).
335. Lopes-Paciencia, S. *et al.* The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine* **117**, 15–22 (2019).
336. Yun, M. H., Davaapil, H. & Brookes, J. P. Recurrent turnover of senescent cells during regeneration of a complex structure. *eLife* **4**, e05505.
337. Kuilman, T. & Peeper, D. S. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer* **9**, 81–94 (2009).
338. Kang, C. *et al.* The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science* **349**, aaa5612 (2015).
339. Ito, Y., Hoare, M. & Narita, M. Spatial and Temporal Control of Senescence. *Trends in Cell Biology* **27**, 820–832 (2017).
340. Jeon, O. H. *et al.* Senescence cell-associated extracellular vesicles serve as osteoarthritis disease and therapeutic markers. *JCI Insight* **4**, e125019 (2019).
341. Vargas, J. N. S., Hamasaki, M., Kawabata, T., Youle, R. J. & Yoshimori, T. The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1–19 (2022) doi:10.1038/s41580-022-00542-2.
342. Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. & Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 458–467 (2009).
343. Hurley, J. H. & Young, L. N. Mechanisms of Autophagy Initiation. *Annu Rev Biochem* **86**, 225–244 (2017).
344. Leprivier, G. & Rotblat, B. How does mTOR sense glucose starvation? AMPK is the usual suspect. *Cell Death Discov.* **6**, 1–5 (2020).
345. Hansen, M., Rubinsztein, D. C. & Walker, D. W. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 579–593 (2018).
346. Levine, B. & Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**, 27–42 (2008).

347. Leidal, A. M., Levine, B. & Debnath, J. Autophagy and the cell biology of age-related disease. *Nat Cell Biol* **20**, 1338–1348 (2018).
348. Sun, Y. *et al.* Lysosome activity is modulated by multiple longevity pathways and is important for lifespan extension in *C. elegans*. *Elife* **9**, e55745 (2020).
349. Caramés, B., Taniguchi, N., Otsuki, S., Blanco, F. J. & Lotz, M. Autophagy is a Protective Mechanism in Normal Cartilage and its Aging-related Loss is Linked with Cell Death and Osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **62**, 791–801 (2010).
350. Caramés, B. *et al.* Autophagy Activation by Rapamycin Reduces Severity of Experimental Osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **71**, 575–581 (2012).
351. Rubinsztein, D. C., Mariño, G. & Kroemer, G. Autophagy and Aging. *Cell* **146**, 682–695 (2011).
352. Madeo, F., Pietrocola, F., Eisenberg, T. & Kroemer, G. Caloric restriction mimetics: towards a molecular definition. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 727–740 (2014).
353. Tai, H. *et al.* Autophagy impairment with lysosomal and mitochondrial dysfunction is an important characteristic of oxidative stress-induced senescence. *Autophagy* **13**, 99–113 (2017).
354. Young, A. R. J. *et al.* Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* **23**, 798–803 (2009).
355. Narita, M. *et al.* Spatial Coupling of mTOR and Autophagy Augments Secretory Phenotypes. *Science* **332**, 966–970 (2011).
356. Muñoz-Espín, D. *et al.* Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* **155**, 1104–1118 (2013).
357. Storer, M. *et al.* Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* **155**, 1119–1130 (2013).
358. Gibaja, A. *et al.* TGFβ2-induced senescence during early inner ear development. *Sci Rep* **9**, 5912 (2019).
359. Nacher, V. *et al.* The quail mesonephros: a new model for renal senescence? *J Vasc Res* **43**, 581–586 (2006).
360. Davaapil, H., Brockes, J. P. & Yun, M. H. Conserved and novel functions of programmed cellular senescence during vertebrate development. *Development* **144**, 106–114 (2017).
361. Villiard, É. *et al.* Senescence gives insights into the morphogenetic evolution of amniotes. *Biol Open* **6**, 891–896 (2017).
362. Chuprin, A. *et al.* Cell fusion induced by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence. *Genes Dev* **27**, 2356–2366 (2013).
363. Coppé, J.-P. *et al.* Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biol* **6**, e301 (2008).
364. Freund, A., Orjalo, A. V., Desprez, P.-Y. & Campisi, J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med* **16**, 238–246 (2010).
365. Sagiv, A. *et al.* Granule exocytosis mediates immune surveillance of senescent cells. *Oncogene* **32**, 1971–1977 (2013).
366. Jun, J.-I. & Lau, L. F. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat Cell Biol* **12**, 676–685 (2010).
367. Schafer, M. J. *et al.* Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun* **8**, 14532 (2017).
368. Zhu, F. *et al.* Senescent cardiac fibroblast is critical for cardiac fibrosis after myocardial infarction. *PLoS One* **8**, e74535 (2013).
369. Da Silva-Álvarez, S. *et al.* Cell senescence contributes to tissue regeneration in zebrafish. *Aging Cell* **19**, e13052 (2020).
370. Silva-Álvarez, S. D. *et al.* Developmentally-programmed cellular senescence is conserved and widespread in zebrafish. *Aging* **12**, 17895–17901 (2020).
371. Demaria, M. *et al.* An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* **31**, 722–733 (2014).
372. Liu, X., Ding, J. & Meng, L. Oncogene-induced senescence: a double edged sword in cancer. *Acta Pharmacol Sin* **39**, 1553–1558 (2018).
373. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593–602 (1997).
374. Sarkisian, C. J. *et al.* Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat Cell Biol* **9**, 493–505 (2007).
375. Courtois-Cox, S., Jones, S. L. & Cichowski, K. Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene* **27**, 2801–2809 (2008).
376. Michaloglou, C. *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**, 720–724 (2005).

377. Kuilman, T. *et al.* Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **133**, 1019–1031 (2008).
378. Wajapeyee, N., Serra, R. W., Zhu, X., Mahalingam, M. & Green, M. R. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* **132**, 363–374 (2008).
379. Rao, S. G. & Jackson, J. G. SASP: Tumor Suppressor or Promoter? Yes! *Trends Cancer* **2**, 676–687 (2016).
380. Ovadya, Y. *et al.* Impaired immune surveillance accelerates accumulation of senescent cells and aging. *Nat Commun* **9**, 5435 (2018).
381. Ray, D. & Yung, R. Immune senescence, epigenetics and autoimmunity. *Clinical Immunology* **196**, 59–63 (2018).
382. He, S. & Sharpless, N. E. Senescence in Health and Disease. *Cell* **169**, 1000–1011 (2017).
383. Fabbri, E. *et al.* Aging and the burden of multimorbidity: associations with inflammatory and anabolic hormonal biomarkers. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **70**, 63–70 (2015).
384. Baar, M. P. *et al.* Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* **169**, 132–147.e16 (2017).
385. Kollman, C. *et al.* Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood* **98**, 2043–2051 (2001).
386. Chang, J. *et al.* Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* **22**, 78–83 (2016).
387. Gnani, D. *et al.* An early-senescence state in aged mesenchymal stromal cells contributes to hematopoietic stem and progenitor cell clonogenic impairment through the activation of a pro-inflammatory program. *Aging Cell* **18**, e12933 (2019).
388. Molofsky, A. V. *et al.* Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* **443**, 448–452 (2006).
389. Raggi, C. & Berardi, A. C. Mesenchymal stem cells, aging and regenerative medicine. *Muscles Ligaments Tendons J* **2**, 239–242 (2012).
390. Loeser, R. F. Aging and Osteoarthritis: The Role of Chondrocyte Senescence and Aging Changes in the Cartilage Matrix. *Osteoarthritis Cartilage* **17**, 971–979 (2009).
391. Tchkonja, T. *et al.* Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* **9**, 667–684 (2010).
392. Chung, P.-L. *et al.* Effect of age on regulation of human osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* **115**, 1412–1419 (2014).
393. Daniali, L. *et al.* Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat Commun* **4**, 1597 (2013).
394. Benetos, A. *et al.* Tracking and fixed ranking of leukocyte telomere length across the adult life course. *Aging Cell* **12**, 615–621 (2013).
395. D’Mello, M. J. J. *et al.* Association between shortened leukocyte telomere length and cardiometabolic outcomes: systematic review and meta-analysis. *Circ Cardiovasc Genet* **8**, 82–90 (2015).
396. Price, J. S. *et al.* The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell* **1**, 57–65 (2002).
397. Gao, S.-G. *et al.* Correlation between senescence-associated beta-galactosidase expression in articular cartilage and disease severity of patients with knee osteoarthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases* **19**, 226–232 (2016).
398. Zhou, H. W., Lou, S. Q. & Zhang, K. Recovery of function in osteoarthritic chondrocytes induced by p16INK4a-specific siRNA in vitro. *Rheumatology* **43**, 555–568 (2004).
399. Kim, H. J., Park, S. R., Park, H. J., Choi, B. H. & Min, B.-H. Potential Predictive Markers for Proliferative Capacity of Cultured Human Articular Chondrocytes: PCNA and p21. *Artificial Organs* **29**, 393–398 (2005).
400. Diekman, B. O. *et al.* Knockdown of the cell cycle inhibitor p21 enhances cartilage formation by induced pluripotent stem cells. *Tissue Eng Part A* **21**, 1261–1274 (2015).
401. D’Costa, S., Rich, M. J. & Diekman, B. O. Engineered Cartilage from Human Chondrocytes with Homozygous Knockout of Cell Cycle Inhibitor p21. *Tissue Eng Part A* **26**, 441–449 (2020).
402. Ibaraki, K. *et al.* Deletion of p21 expression accelerates cartilage tissue repair via chondrocyte proliferation. *Molecular Medicine Reports* **21**, 2236–2242 (2020).
403. Aigner, T., Zien, A., Gehrsitz, A., Gebhard, P. M. & McKenna, L. Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA–array technology. *Arthritis & Rheumatism* **44**, 2777–2789 (2001).
404. Neuhold, L. A. *et al.* Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest* **107**, 35–44 (2001).
405. Little, C. B. *et al.* Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum* **60**, 3723–3733 (2009).

406. Xu, M. *et al.* Transplanted Senescent Cells Induce an Osteoarthritis-Like Condition in Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **72**, 780–785 (2017).
407. Del Rey, M. J. *et al.* Senescent synovial fibroblasts accumulate prematurely in rheumatoid arthritis tissues and display an enhanced inflammatory phenotype. *Immun Ageing* **16**, 1–9 (2019).
408. Farr, J. N. *et al.* Identification of Senescent Cells in the Bone Microenvironment. *J Bone Miner Res* **31**, 1920–1929 (2016).
409. Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* **5**, 99–118 (2010).
410. Aigner, T. *et al.* Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritic human articular knee cartilage: A study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage. *Arthritis & Rheumatism* **44**, 1304–1312 (2001).
411. Yudoh, K. *et al.* Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther* **7**, R380–391 (2005).
412. Harbo, M. *et al.* The distribution pattern of critically short telomeres in human osteoarthritic knees. *Arthritis Res Ther* **14**, R12 (2012).
413. Torres, C. R. & Hart, G. W. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* **259**, 3308–3317 (1984).
414. Holt, G. D. & Hart, G. W. The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* **261**, 8049–8057 (1986).
415. Schindler, M., Hogan, M., Miller, R. & DeGaetano, D. A nuclear specific glycoprotein representative of a unique pattern of glycosylation. *The Journal of Biological Chemistry* **262**, 1254–1260 (1987).
416. Schjoldager, K. T., Narimatsu, Y., Joshi, H. J. & Clausen, H. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 729–749 (2020).
417. Zachara, N. E. & Hart, G. W. O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1673**, 13–28 (2004).
418. Sharma, N. S., Saluja, A. K. & Banerjee, S. “Nutrient-sensing” and self-renewal: O-GlcNAc in a new role. *J Bioenerg Biomembr* **50**, 205–211 (2018).
419. Hanover, J. A., Krause, M. W. & Love, D. C. The Hexosamine Signaling Pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochim Biophys Acta* **1800**, 80 (2010).
420. Chatham, J. C., Zhang, J. & Wende, A. R. Role of O-linked N-acetylglucosamine protein modification in cellular (patho)physiology. *Physiological Reviews* **101**, 427–493 (2021).
421. Sun, C. *et al.* O-GlcNAcylation: a bridge between glucose and cell differentiation. *J Cell Mol Med* **20**, 769–781 (2016).
422. Mobasher, A., Neama, G., Bell, S., Richardson, S. & Carter, S. D. Human articular chondrocytes express three facilitative glucose transporter isoforms: GLUT1, GLUT3 and GLUT9. *Cell Biol Int* **26**, 297–300 (2002).
423. Shikhman, A. R., Brinson, D. C., Valbracht, J. & Lotz, M. K. Cytokine Regulation of Facilitated Glucose Transport in Human Articular Chondrocytes. *The Journal of Immunology* **167**, 7001–7008 (2001).
424. Richardson, S. *et al.* Molecular characterization and partial cDNA cloning of facilitative glucose transporters expressed in human articular chondrocytes; stimulation of 2-deoxyglucose uptake by IGF-I and elevated MMP-2 secretion by glucose deprivation. *Osteoarthritis and Cartilage* **11**, 92–101 (2003).
425. Lee, S.-Y., Abel, E. D. & Long, F. Glucose metabolism induced by Bmp signaling is essential for murine skeletal development. *Nat Commun* **9**, 4831 (2018).
426. Marshall, S., Bacote, V. & Traxinger, R. R. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 4706–4712 (1991).
427. Gibb, A. A. *et al.* Integration of flux measurements to resolve changes in anabolic and catabolic metabolism in cardiac myocytes. *Biochem J* **474**, 2785–2801 (2017).
428. Gibb, A. A. *et al.* Correction: Integration of flux measurements to resolve changes in anabolic and catabolic metabolism in cardiac myocytes. *Biochem J* **474**, 4271–4272 (2017).
429. Olson, A. K., Bouchard, B., Zhu, W. Z., Chatham, J. C. & Des Rosiers, C. First characterization of glucose flux through the hexosamine biosynthesis pathway (HBP) in ex vivo mouse heart. *J Biol Chem* **295**, 2018–2033 (2020).

430. Ferron, M., Denis, M., Persello, A., Rathagirishnan, R. & Lauzier, B. Protein O-GlcNAcylation in Cardiac Pathologies: Past, Present, Future. *Front Endocrinol (Lausanne)* **9**, (2019).
431. McCarty, M. F., O'Keefe, J. H. & DiNicolantonio, J. J. Glucosamine for the Treatment of Osteoarthritis: The Time Has Come for Higher-Dose Trials. *Journal of Dietary Supplements* **16**, 179–192 (2019).
432. Marshall, S., Nadeau, O. & Yamasaki, K. 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.* **279**, 35313–35319 (2004).
433. Massière, F. & Badet-Denisot, M. A. The mechanism of glutamine-dependent amidotransferases. *Cell Mol Life Sci* **54**, 205–222 (1998).
434. Milewski, S. Glucosamine-6-phosphate synthase—the multi-facets enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1597**, 173–192 (2002).
435. DeHaven, J. E., Robinson, K. A., Nelson, B. A. & Buse, M. G. A novel variant of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase-1 (GFAT1) mRNA is selectively expressed in striated muscle. *Diabetes* **50**, 2419–2424 (2001).
436. Oki, T., Yamazaki, K., Kuromitsu, J., Okada, M. & Tanaka, I. cDNA Cloning and Mapping of a Novel Subtype of Glutamine:fructose-6-phosphate Amidotransferase (GFAT2) in Human and Mouse. *Genomics* **57**, 227–234 (1999).
437. Riegger, J., Baumert, J., Zaucke, F. & Brenner, R. E. 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. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 7247 (2021).
438. Sayeski, P. P., Wang, D., Su, K., Han, I.-O. & Kudlow, J. E. Cloning and Partial Characterization of the Mouse Glutamine: Fructose-6-Phosphate Amidotransferase (GFAT) Gene Promoter. *Nucleic Acids Research* **25**, 1458–1466 (1997).
439. Chaveroux, C. *et al.* Nutrient shortage triggers the hexosamine biosynthetic pathway via the GCN2-ATF4 signalling pathway. *Sci Rep* **6**, 27278 (2016).
440. Shu, X. E., Mao, Y., Jia, L. & Qian, S.-B. Dynamic eIF3a O-GlcNAcylation controls translation reinitiation during nutrient stress. *Nat Chem Biol* **18**, 134–141 (2022).
441. Almeida, L. M., Pinho, B. R., Duchen, M. R. & Oliveira, J. M. A. The PERKs of mitochondria protection during stress: insights for PERK modulation in neurodegenerative and metabolic diseases. *Biological Reviews* **n/a**.
442. Broschat, K. O. *et al.* Kinetic Characterization of Human Glutamine-fructose-6-phosphate Amidotransferase I: POTENT FEEDBACK INHIBITION BY GLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE\*. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 14764–14770 (2002).
443. Graack, H. R., Cinque, U. & Kress, H. Functional regulation of glutamine:fructose-6-phosphate aminotransferase 1 (GFAT1) of *Drosophila melanogaster* in a UDP-N-acetylglucosamine and cAMP-dependent manner. *Biochem J* **360**, 401–412 (2001).
444. Robinson, K. A., Weinstein, M. L., Lindenmayer, G. E. & Buse, M. G. Effects of diabetes and hyperglycemia on the hexosamine synthesis pathway in rat muscle and liver. *Diabetes* **44**, 1438–1446 (1995).
445. Paterson, A. J. & Kudlow, J. E. Regulation of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase gene transcription by epidermal growth factor and glucose. *Endocrinology* **136**, 2809–2816 (1995).
446. Zhou, J. *et al.* Regulation of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase by cAMP-dependent protein kinase. *Diabetes* **47**, 1836–1840 (1998).
447. Hu, Y., Riesland, L., Paterson, A. J. & Kudlow, J. E. Phosphorylation of mouse glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase 2 (GFAT2) by cAMP-dependent protein kinase increases the enzyme activity. *J Biol Chem* **279**, 29988–29993 (2004).
448. Chang, Q. *et al.* Phosphorylation of human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase by cAMP-dependent protein kinase at serine 205 blocks the enzyme activity. *J Biol Chem* **275**, 21981–21987 (2000).
449. Zibrova, D. *et al.* GFAT1 phosphorylation by AMPK promotes VEGF-induced angiogenesis. *Biochemical Journal* **474**, 983–1001 (2017).
450. Haltiwanger, R. S., Holt, G. D. & Hart, G. W. Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 2563–2568 (1990).
451. Shafi, R. *et al.* The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5735–5739 (2000).
452. Kreppel, L. K., Blomberg, M. A. & Hart, G. W. Dynamic Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 9308–9315 (1997).
453. Hanover, J. A. *et al.* Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Arch Biochem Biophys* **409**, 287–297 (2003).

454. Levine, Z. G. & Walker, S. The Biochemistry of O-GlcNAc Transferase: Which Functions Make It Essential in Mammalian Cells? *Annu Rev Biochem* **85**, 631–657 (2016).
455. Hu, Y. *et al.* Increased Enzymatic O-GlcNAcylation of Mitochondrial Proteins Impairs Mitochondrial Function in Cardiac Myocytes Exposed to High Glucose. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 547–555 (2009).
456. Tardio, L. *et al.* O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) protein modification is increased in the cartilage of patients with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* **22**, 259–263 (2014).
457. Aquino-Gil, M., Pierce, A., Perez-Cervera, Y., Zenteno, E. & Lefebvre, T. OGT: a short overview of an enzyme standing out from usual glycosyltransferases. *Biochemical Society Transactions* **45**, 365–370 (2017).
458. Yang, X. *et al.* Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* **451**, 964–969 (2008).
459. Lazarus, M. B., Nam, Y., Jiang, J., Sliz, P. & Walker, S. Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature* **469**, 564–567 (2011).
460. Haltiwanger, R. S., Blomberg, M. A. & Hart, G. W. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* **267**, 9005–9013 (1992).
461. Jínek, M. *et al.* The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin  $\alpha$ . *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1001–1007 (2004).
462. Meek, R. W. *et al.* Cryo-EM structure provides insights into the dimer arrangement of the O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine transferase OGT. *Nat Commun* **12**, 6508 (2021).
463. O'Donnell, N., Zachara, N. E., Hart, G. W. & Marth, J. D. Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol Cell Biol* **24**, 1680–1690 (2004).
464. Watson, L. J. *et al.* Cardiomyocyte Ogt is essential for postnatal viability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **306**, H142–H153 (2014).
465. Ida, S. *et al.* Diverse metabolic effects of O-GlcNAcylation in the pancreas but limited effects in insulin-sensitive organs in mice. *Diabetologia* **60**, 1761–1769 (2017).
466. Niranjana, T. S. *et al.* Affected kindred analysis of human X chromosome exomes to identify novel X-linked intellectual disability genes. *PLoS One* **10**, e0116454 (2015).
467. Vaidyanathan, K. *et al.* Identification and characterization of a missense mutation in the O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) transferase gene that segregates with X-linked intellectual disability. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 8948–8963 (2017).
468. Selvan, N. *et al.* O-GlcNAc transferase missense mutations linked to X-linked intellectual disability deregulate genes involved in cell fate determination and signaling. *J Biol Chem* **293**, 10810–10824 (2018).
469. Gundogdu, M. *et al.* The O-GlcNAc Transferase Intellectual Disability Mutation L254F Distorts the TPR Helix. *Cell Chem Biol* **25**, 513–518.e4 (2018).
470. Pravata, V. M. *et al.* An intellectual disability syndrome with single-nucleotide variants in O-GlcNAc transferase. *Eur J Hum Genet* **28**, 706–714 (2020).
471. Mitchell, C. W., Czajewski, I. & van Aalten, D. M. F. Bioinformatic prediction of putative conveyers of O-GlcNAc Transferase intellectual disability. *Journal of Biological Chemistry* 102276 (2022) doi:10.1016/j.jbc.2022.102276.
472. Dorfmueller, H. C. *et al.* Substrate and product analogues as human O-GlcNAc transferase inhibitors. *Amino Acids* **40**, 781–792 (2011).
473. Slawson, C. *et al.* Perturbations in O-linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine Protein Modification Cause Severe Defects in Mitotic Progression and Cytokinesis\*. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 32944–32956 (2005).
474. Zhang, Z., Tan, E. P., VandenHull, N. J., Peterson, K. R. & Slawson, C. O-GlcNAcase Expression is Sensitive to Changes in O-GlcNAc Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* **5**, 206 (2014).
475. Kaasik, K. *et al.* Glucose sensor O-GlcNAcylation coordinates with phosphorylation to regulate circadian clock. *Cell Metab* **17**, 291–302 (2013).
476. Seo, H. G. *et al.* Identification of the nuclear localisation signal of O-GlcNAc transferase and its nuclear import regulation. *Sci Rep* **6**, 34614 (2016).
477. Lundby, A. *et al.* Proteomic analysis of lysine acetylation sites in rat tissues reveals organ specificity and subcellular patterns. *Cell Rep* **2**, 419–431 (2012).
478. Whelan, S. A., Lane, M. D. & Hart, G. W. Regulation of the O-Linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine Transferase by Insulin Signaling\*. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 21411–21417 (2008).
479. Song, M. *et al.* O-GlcNAc transferase is activated by CaMKIV-dependent phosphorylation under potassium chloride-induced depolarization in NG-108-15 cells. *Cell Signal* **20**, 94–104 (2008).

480. Ruan, H.-B. *et al.* Calcium-dependent O-GlcNAc signaling drives liver autophagy in adaptation to starvation. *Genes Dev.* **31**, 1655–1665 (2017).
481. Heckel, D. *et al.* Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Hum Mol Genet* **7**, 1859–1872 (1998).
482. Dong, D. L. & Hart, G. W. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J Biol Chem* **269**, 19321–19330 (1994).
483. Gao, Y., Wells, L., Comer, F. I., Parker, G. J. & Hart, G. W. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. *J Biol Chem* **276**, 9838–9845 (2001).
484. Comtesse, N., Maldener, E. & Meese, E. Identification of a Nuclear Variant of MGEA5, a Cytoplasmic Hyaluronidase and a  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **283**, 634–640 (2001).
485. Keembiyehetty, C. N., Krzeslak, A., Love, D. C. & Hanover, J. A. A lipid-droplet-targeted O-GlcNAcase isoform is a key regulator of the proteasome. *J Cell Sci* **124**, 2851–2860 (2011).
486. Macauley, M. S. & Vocadlo, D. J. Enzymatic characterization and inhibition of the nuclear variant of human O-GlcNAcase. *Carbohydr Res* **344**, 1079–1084 (2009).
487. Toleman, C., Paterson, A. J., Whisenhunt, T. R. & Kudlow, J. E. Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities. *J Biol Chem* **279**, 53665–53673 (2004).
488. Toleman, C. A., Paterson, A. J. & Kudlow, J. E. The Histone Acetyltransferase NCOAT Contains a Zinc Finger-like Motif Involved in Substrate Recognition\*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 3918–3925 (2006).
489. Butkinaree, C. *et al.* Characterization of beta-N-acetylglucosaminidase cleavage by caspase-3 during apoptosis. *J Biol Chem* **283**, 23557–23566 (2008).
490. Rao, F. V. *et al.* Structure of a bacterial putative acetyltransferase defines the fold of the human O-GlcNAcase C-terminal domain. *Open Biol* **3**, 130021 (2013).
491. He, Y., Roth, C., Turkenburg, J. P. & Davies, G. J. Three-dimensional structure of a *Streptomyces sviveus* GNAT acetyltransferase with similarity to the C-terminal domain of the human GH84 O-GlcNAcase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **70**, 186–195 (2014).
492. Roth, C. *et al.* Structural and functional insight into human O-GlcNAcase. *Nat Chem Biol* **13**, 610–612 (2017).
493. Li, B., Li, H., Lu, L. & Jiang, J. Structures of human O-GlcNAcase and its complexes reveal a new substrate recognition mode. *Nat Struct Mol Biol* **24**, 362–369 (2017).
494. Elsen, N. L. *et al.* Insights into activity and inhibition from the crystal structure of human O-GlcNAcase. *Nat Chem Biol* **13**, 613–615 (2017).
495. Yang, Y. R. *et al.* O-GlcNAcase is essential for embryonic development and maintenance of genomic stability. *Aging Cell* **11**, 439–448 (2012).
496. Keembiyehetty, C. *et al.* Conditional Knock-out Reveals a Requirement for O-Linked N-Acetylglucosaminase (O-GlcNAcase) in Metabolic Homeostasis\*. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 7097–7113 (2015).
497. Love, D. C., Krause, M. W. & Hanover, J. A. O-GlcNAc cycling: Emerging roles in development and epigenetics. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **21**, 646–654 (2010).
498. Love, D. C. *et al.* Dynamic O-GlcNAc cycling at promoters of *Caenorhabditis elegans* genes regulating longevity, stress, and immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 7413–7418 (2010).
499. Kohler, J. J. Carb cutting works better with a partner. *Nat Struct Mol Biol* **24**, 433–435 (2017).
500. Qian, K. *et al.* Transcriptional regulation of O-GlcNAc homeostasis is disrupted in pancreatic cancer. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 13989–14000 (2018).
501. St. Amand, M. M. *et al.* A genetic model to study O-GlcNAc cycling in immortalized mouse embryonic fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 13673–13681 (2018).
502. Park, S.-K. *et al.* A Conserved Splicing Silencer Dynamically Regulates O-GlcNAc Transferase Intron Retention and O-GlcNAc Homeostasis. *Cell Rep* **20**, 1088–1099 (2017).
503. Kazemi, Z., Chang, H., Haserodt, S., McKen, C. & Zachara, N. E. O-Linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) Regulates Stress-induced Heat Shock Protein Expression in a GSK-3 $\beta$ -dependent Manner\*. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 39096–39107 (2010).
504. Burén, S. *et al.* Regulation of OGT by URI in Response to Glucose Confers c-MYC-Dependent Survival Mechanisms. *Cancer Cell* **30**, 290–307 (2016).
505. Yang, X. & Qian, K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 452–465 (2017).
506. Hanover, J. A., Chen, W. & Bond, M. R. O-GlcNAc in cancer: An Oncometabolism-fueled vicious cycle. *J. Bioenerg. Biomembr.* **50**, 155–173 (2018).

507. Slawson, C., Copeland, R. J. & Hart, G. W. O-GlcNAc signaling: a metabolic link between diabetes and cancer? *Trends Biochem Sci* **35**, 547–555 (2010).
508. Park, J., Lai, M. K. P., Arumugam, T. V. & Jo, D.-G. O-GlcNAcylation as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Neuromolecular Med* **22**, 171–193 (2020).
509. Wani, W. Y., Chatham, J. C., Darley-Usmar, V., McMahon, L. L. & Zhang, J. O-GlcNAcylation and neurodegeneration. *Brain Res Bull* **133**, 80–87 (2017).
510. Peng, C. *et al.* Regulation of the Hippo-YAP Pathway by Glucose Sensor O-GlcNAcylation. *Molecular Cell* **68**, 591–604.e5 (2017).
511. Largo, R. *et al.* Glucosamine inhibits IL-1 $\beta$ -induced NF $\kappa$ B activation in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* **11**, 290–298 (2003).
512. Weimer, S. *et al.* D-Glucosamine supplementation extends life span of nematodes and of ageing mice. *Nat Commun* **5**, (2014).
513. Silva, J. F. *et al.* Acute Increase in O-GlcNAc Improves Survival in Mice With LPS-Induced Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Front Physiol* **10**, 1614 (2019).
514. Yuzwa, S. A. & Vocadlo, D. J. O-GlcNAc and neurodegeneration: biochemical mechanisms and potential roles in Alzheimer's disease and beyond. *Chem Soc Rev* **43**, 6839–6858 (2014).
515. Haltiwanger, R. S., Grove, K. & Philipsberg, G. A. Modulation of O-Linked N-Acetylglucosamine Levels on Nuclear and Cytoplasmic Proteins in Vivo Using the Peptide O-GlcNAc- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase Inhibitor O-(2-Acetamido-2-deoxy-dglucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate\*. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 3611–3617 (1998).
516. Beer, D., Maloisel, J.-L., Rast, D. M. & Vasella, A. Synthesis of 2-Acetamido-2-deoxy-D-gluconhydroximolactone- and Chitobionhydroximolactone-Derived N-Phenylcarbamates, Potential Inhibitors of  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase. *Helvetica Chimica Acta* **73**, 1918–1922 (1990).
517. Dorfmüller, H. C. *et al.* GlcNAcstatin - a picomolar, selective O-GlcNAcase inhibitor that modulates intracellular O-GlcNAcylation levels. *J Am Chem Soc* **128**, 16484–5 (2006).
518. Macauley, M. S., Whitworth, G. E., Debowski, A. W., Chin, D. & Vocadlo, D. J. O-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis: kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. *J Biol Chem* **280**, 25313–25322 (2005).
519. Yuzwa, S. A. *et al.* A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nat Chem Biol* **4**, 483–490 (2008).
520. Yuzwa, S. A. *et al.* Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. *Nat Chem Biol* **8**, 393–399 (2012).
521. Borghgraef, P. *et al.* Increasing brain protein O-GlcNAcylation mitigates breathing defects and mortality of Tau.P301L mice. *PLoS One* **8**, e84442 (2013).
522. Yuzwa, S. A. *et al.* Pharmacological inhibition of O-GlcNAcase (OGA) prevents cognitive decline and amyloid plaque formation in bigenic tau/APP mutant mice. *Mol Neurodegener* **9**, 42 (2014).
523. Andrés-Bergós, J. *et al.* The Increase in O-Linked N-Acetylglucosamine Protein Modification Stimulates Chondrogenic Differentiation Both in Vitro and in Vivo. *J Biol Chem* **287**, 33615–33628 (2012).
524. Elbatrawy, A. A., Kim, E. J. & Nam, G. O-GlcNAcase: Emerging Mechanism, Substrate Recognition and Small-Molecule Inhibitors. *ChemMedChem* **15**, 1244–1257 (2020).
525. Estevez, A., Zhu, D., Blankenship, C. & Jiang, J. Molecular Interrogation to Crack the Case of O-GlcNAc. *Chemistry – A European Journal* **26**, 12086–12100 (2020).
526. Stock, C. C., Reilly, H. C., Buckley, S. M., Clarke, D. A. & Rhoads, C. P. Azaserine, a new tumour-inhibitory substance; studies with Crocker mouse sarcoma 180. *Nature* **173**, 71–72 (1954).
527. Konrad, R. J. *et al.* Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 207–212 (2002).
528. Zhang, H., Gao, G. & Brunk, U. T. Extracellular reduction of alloxan results in oxygen radical-mediated attack on plasma and lysosomal membranes. *APMIS* **100**, 317–325 (1992).
529. Ostrowski, A. & van Aalten, D. M. F. Chemical tools to probe cellular O-GlcNAc signalling. *Biochemical Journal* **456**, 1–12 (2013).
530. Hennebicq-Reig, S. *et al.* Permanent exposure of mucin-secreting HT-29 cells to benzyl-N-acetyl-alpha-D-galactosaminide induces abnormal O-glycosylation of mucins and inhibits constitutive and stimulated MUC5AC secretion. *Biochem J* **334** ( Pt 1), 283–295 (1998).
531. James, L. R. *et al.* Flux through the hexosamine pathway is a determinant of nuclear factor kappaB-dependent promoter activation. *Diabetes* **51**, 1146–1156 (2002).
532. Liu, T.-W. *et al.* Metabolic Inhibitors of O-GlcNAc Transferase That Act In Vivo Implicate Decreased O-GlcNAc Levels in Leptin-Mediated Nutrient Sensing. *Angew Chem Int Ed Engl* **57**, 7644–7648 (2018).

533. Gloster, T. M. *et al.* Hijacking a biosynthetic pathway yields a glycosyltransferase inhibitor within cells. *Nat Chem Biol* **7**, 174–181 (2011).
534. Gross, B. J., Kraybill, B. C. & Walker, S. Discovery of O-GlcNAc Transferase Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 14588–14589 (2005).
535. Itkonen, H. M. *et al.* O-GlcNAc transferase integrates metabolic pathways to regulate the stability of c-MYC in human prostate cancer cells. *Cancer Res* **73**, 5277–5287 (2013).
536. Ortiz-Meoz, R. F. *et al.* A small molecule that inhibits OGT activity in cells. *ACS Chem Biol* **10**, 1392–1397 (2015).
537. Martin, S. E. S. *et al.* Structure-Based Evolution of Low Nanomolar O-GlcNAc Transferase Inhibitors. *J Am Chem Soc* **140**, 13542–13545 (2018).
538. Hart, G. W., Slawson, C., Ramirez-Correa, G. & Lagerlof, O. Cross Talk Between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription, and Chronic Disease. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 825–858 (2011).
539. Butkinaree, C., Park, K. & Hart, G. W. O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1800**, 96–106 (2010).
540. Wells, L., Vosseller, K. & Hart, G. W. Glycosylation of Nucleocytoplasmic Proteins: Signal Transduction and O-GlcNAc. *Science* **291**, 2376–2378 (2001).
541. Chou, T.-Y., Hart, G. W. & Dang, C. V. c-Myc Is Glycosylated at Threonine 58, a Known Phosphorylation Site and a Mutational Hot Spot in Lymphomas \*. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 18961–18965 (1995).
542. Cheng, X. & Hart, G. W. Alternative O-Glycosylation/O-Phosphorylation of Serine-16 in Murine Estrogen Receptor  $\beta$ : POST-TRANSLATIONAL REGULATION OF TURNOVER AND TRANSACTIVATION ACTIVITY\*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 10570–10575 (2001).
543. Kelly, W. G., Dahmus, M. E. & Hart, G. W. RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 10416–10424 (1993).
544. Comer, F. I. & Hart, G. W. Reciprocity between O-GlcNAc and O-Phosphate on the Carboxyl Terminal Domain of RNA Polymerase II. *Biochemistry* **40**, 7845–7852 (2001).
545. Du, X. L. *et al.* Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* **108**, 1341–1348 (2001).
546. Zeidan, Q. & Hart, G. W. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *J Cell Sci* **123**, 13–22 (2010).
547. Yang, W. H. *et al.* Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat Cell Biol* **8**, 1074–1083 (2006).
548. Li, X. *et al.* O-Linked N-Acetylglucosamine Modification on CCAAT Enhancer-binding Protein  $\beta$ : ROLE DURING ADIPOCYTE DIFFERENTIATION\*. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 19248–19254 (2009).
549. Dias, W. B., Cheung, W. D., Wang, Z. & Hart, G. W. Regulation of Calcium/Calmodulin-dependent Kinase IV by O-GlcNAc Modification\*. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 21327–21337 (2009).
550. Ball, L. E., Berkaw, M. N. & Buse, M. G. Identification of the Major Site of O-Linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine Modification in the C Terminus of Insulin Receptor Substrate-1. *Mol Cell Proteomics* **5**, 313–323 (2006).
551. Ma, Z., Chalkley, R. J. & Vosseller, K. Hyper-O-GlcNAcylation activates nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) signaling through interplay with phosphorylation and acetylation. *J Biol Chem* **292**, 9150–9163 (2017).
552. Banerjee, P. S., Lagerlöf, O. & Hart, G. W. Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging. *Molecular Aspects of Medicine* **51**, 1–15 (2016).
553. Flatt, T. A New Definition of Aging? *Frontiers in Genetics* **3**, (2012).
554. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The Hallmarks of Aging. *Cell* **153**, 1194–1217 (2013).
555. Dupas, T. *et al.* Protein O-GlcNAcylation levels are regulated independently of dietary intake in a tissue and time-specific manner during rat postnatal development. *Acta Physiologica* **n/a**, e13566.
556. Fülöp, N. *et al.* Aging leads to increased levels of protein O-linked N-acetylglucosamine in heart, aorta, brain and skeletal muscle in Brown-Norway rats. *Biogerontology* **9**, 139–151 (2008).
557. Forsythe, M. E. *et al.* Caenorhabditis elegans ortholog of a diabetes susceptibility locus: oga-1 (O-GlcNAcase) knockout impacts O-GlcNAc cycling, metabolism, and dauer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11952–11957 (2006).
558. Hanover, J. A. *et al.* A Caenorhabditis elegans model of insulin resistance: altered macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11266–11271 (2005).

559. Rahman, M. M. *et al.* Intracellular protein glycosylation modulates insulin mediated lifespan in *C. elegans*. *Aging* **2**, 678–690 (2010).
560. Denzel, M. S. *et al.* Hexosamine Pathway Metabolites Enhance Protein Quality Control and Prolong Life. *Cell* **156**, 1167–1178 (2014).
561. Ruegenberg, S. *et al.* Loss of GFAT-1 feedback regulation activates the hexosamine pathway that modulates protein homeostasis. *Nat Commun* **11**, (2020).
562. Su, L. *et al.* ELT-2 promotes O-GlcNAc transferase OGT-1 expression to modulate *Caenorhabditis elegans* lifespan. *Journal of Cellular Biochemistry* **121**, 4898–4907 (2020).
563. Sun, C. *et al.* Glucose regulates tissue-specific chondro-osteogenic differentiation of human cartilage endplate stem cells via O-GlcNAcylation of Sox9 and Runx2. *Stem Cell Res Ther* **10**, (2019).
564. Nikolaou, G. *et al.* Detection of O-Linked-N-Acetylglucosamine Modification and Its Associated Enzymes in Human Degenerated Intervertebral Discs. *Asian Spine J* **11**, 863–869 (2017).
565. Luo, R. *et al.* O-GlcNAc transferase regulates intervertebral disc degeneration by targeting FAM134B-mediated ER-phagy. *Exp Mol Med* 1–14 (2022) doi:10.1038/s12276-022-00844-7.
566. Vasheghani, F. *et al.* PPAR $\gamma$  deficiency results in severe, accelerated osteoarthritis associated with aberrant mTOR signalling in the articular cartilage. *Ann Rheum Dis* **74**, 569–578 (2015).
567. Vinatier, C., Domínguez, E., Guicheux, J. & Caramés, B. *Front Physiol* **9**, (2018).
568. Deng, Y. *et al.* Reciprocal inhibition of YAP/TAZ and NF- $\kappa$ B regulates osteoarthritic cartilage degradation. *Nat Commun* **9**, 4564 (2018).
569. Wang, W. *et al.* Atf4 regulates chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification by activating Ihh transcription. *Development* **136**, 4143–4153 (2009).
570. Vigetti, D. *et al.* Role of UDP-N-Acetylglucosamine (GlcNAc) and O-GlcNAcylation of Hyaluronan Synthase 2 in the Control of Chondroitin Sulfate and Hyaluronan Synthesis. *The Journal of biological chemistry* **287**, 35544–55 (2012).
571. Kim, H. B. *et al.* O-linked N-acetylglucosamine glycosylation of p65 aggravated the inflammation in both fibroblast-like synoviocytes stimulated by tumor necrosis factor- $\alpha$  and mice with collagen induced arthritis. *Arthritis Res Ther* **17**, (2015).
572. Umar, S. *et al.* Penta-o-galloyl-beta-d-Glucose (PGG) inhibits inflammation in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and rat adjuvant-induced arthritis model. *Front Immunol* **13**, 928436 (2022).
573. Zhu, X., Sang, L., Wu, D., Rong, J. & Jiang, L. Effectiveness and safety of glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Orthop Surg Res* **13**, 170 (2018).
574. Simental-Mendía, M. *et al.* Effect of glucosamine and chondroitin sulfate in symptomatic knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Rheumatol Int* **38**, 1413–1428 (2018).
575. Li, Y. *et al.* Anti-inflammatory effects in a mouse osteoarthritis model of a mixture of glucosamine and chitooligosaccharides produced by bi-enzyme single-step hydrolysis. *Sci Rep* **8**, 5624 (2018).
576. Waly, N. E., Refaiy, A. & Aborehab, N. M. IL-10 and TGF- $\beta$ : Roles in chondroprotective effects of Glucosamine in experimental Osteoarthritis? *Pathophysiology* **24**, 45–49 (2017).
577. Navarro, S. L. *et al.* Randomized trial of glucosamine and chondroitin supplementation on inflammation and oxidative stress biomarkers and plasma proteomics profiles in healthy humans. *PLoS One* **10**, e0117534 (2015).
578. Cen, X. *et al.* Glucosamine oral administration as an adjunct to hyaluronic acid injection in treating temporomandibular joint osteoarthritis. *Oral Dis* **24**, 404–411 (2018).
579. Chelleschi, S. *et al.* A Combination of Celecoxib and Glucosamine Sulfate Has Anti-Inflammatory and Chondroprotective Effects: Results from an In Vitro Study on Human Osteoarthritic Chondrocytes. *Int J Mol Sci* **22**, 8980 (2021).
580. Mendis, E., Kim, M.-M., Rajapakse, N. & Kim, S.-K. Sulfated glucosamine inhibits oxidation of biomolecules in cells via a mechanism involving intracellular free radical scavenging. *European Journal of Pharmacology* **579**, 74–85 (2008).
581. Valvason, C. *et al.* Influence of glucosamine sulphate on oxidative stress in human osteoarthritic chondrocytes: effects on HO-1, p22(Phox) and iNOS expression. *Rheumatology (Oxford)* **47**, 31–35 (2008).
582. Garstang, S. V. & Stitik, T. P. Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *Am J Phys Med Rehabil* **85**, S2-11; quiz S12-14 (2006).
583. Muñoz-Espín, D. & Serrano, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 482–496 (2014).

584. Litwiniec, A., Gackowska, L., Helmin-Basa, A., Żuryń, A. & Grzanka, A. Low-dose etoposide-treatment induces endoreplication and cell death accompanied by cytoskeletal alterations in A549 cells: Does the response involve senescence? The possible role of vimentin. *Cancer Cell International* **13**, 9 (2013).
585. Tamamori-Adachi, M. *et al.* DNA damage response induced by Etoposide promotes steroidogenesis via GADD45A in cultured adrenal cells. *Sci Rep* **8**, 9636 (2018).
586. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, e45 (2001).
587. Dai, S.-M. *et al.* Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **54**, 818–831 (2006).
588. Chai, B. *et al.* The protective role of omentin-1 in IL-1 $\beta$ -induced chondrocyte senescence. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **48**, 8–14 (2020).
589. Lü, G., Li, L., Wang, B. & Kuang, L. LINC00623/miR-101/HRAS axis modulates IL-1 $\beta$ -mediated ECM degradation, apoptosis and senescence of osteoarthritis chondrocytes. *Aging (Albany NY)* **12**, 3218–3237 (2020).
590. Chen, A. F., Davies, C. M., De Lin, M. & Fermor, B. Oxidative DNA damage in osteoarthritic porcine articular cartilage. *Journal of Cellular Physiology* **217**, 828–833 (2008).
591. Rose, J. *et al.* DNA damage, disordinated gene expression and cellular senescence in osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* **20**, 1020–1028 (2012).
592. Hande, K. R. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European Journal of Cancer* **34**, 1514–1521 (1998).
593. Biran, A. *et al.* Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell* **16**, 661–671 (2017).
594. Teng, Y.-N. *et al.* Etoposide Triggers Cellular Senescence by Inducing Multiple Centrosomes and Primary Cilia in Adrenocortical Tumor Cells. *Cells* **10**, 1466 (2021).
595. Copp, M. E. *et al.* The combination of mitogenic stimulation and DNA damage induces chondrocyte senescence. *Osteoarthritis and Cartilage* **29**, 402–412 (2021).
596. Passos, J. F. & von Zglinicki, T. Methods for Cell Sorting of Young and Senescent Cells. in *Biological Aging: Methods and Protocols* (ed. Tollefsbol, T. O.) 33–44 (Humana Press, 2007). doi:10.1007/978-1-59745-361-5\_4.
597. Bertolo, A., Baur, M., Guerrero, J., Pötzel, T. & Stoyanov, J. Autofluorescence is a Reliable in vitro Marker of Cellular Senescence in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Sci Rep* **9**, 2074 (2019).
598. Bertolo, A., Guerrero, J. & Stoyanov, J. Autofluorescence-based sorting removes senescent cells from mesenchymal stromal cell cultures. *Sci Rep* **10**, 19084 (2020).
599. Budamagunta, V. *et al.* Senescence-associated hyper-activation to inflammatory stimuli *in vitro*. *Aging* **13**, 19088–19107 (2021).
600. Volonte, D. & Galbiati, F. Caveolin-1, a master regulator of cellular senescence. *Cancer Metastasis Rev* **39**, 397–414 (2020).
601. Fouasson-Chailloux, A. *et al.* Posttraumatic Osteoarthritis Damage in Mice: From Histological and Micro-Computed Tomodensitometric Changes to Gait Disturbance. *Cartilage* **13**, 1478S-1489S (2021).
602. Bodic, B. *et al.* Development and characterization of a humanized mouse model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **30**, 875–885 (2022).
603. Akoum, J. *et al.* Aging Cartilage in Wild-Type Mice: An Observational Study. *CARTILAGE* **13**, 1407S-1411S (2021).
604. Lorenz, J. & Grässel, S. Experimental Osteoarthritis Models in Mice. in *Mouse Genetics: Methods and Protocols* (eds. Singh, S. R. & Coppola, V.) 401–419 (Springer, 2014). doi:10.1007/978-1-4939-1215-5\_23.
605. Bian, Y., Wang, H., Zhao, X. & Weng, X. Meniscus repair: up-to-date advances in stem cell-based therapy. *Stem Cell Research & Therapy* **13**, 207 (2022).
606. Heathfield, S. K., Le Maitre, C. L. & Hoyland, J. A. Caveolin-1 expression and stress-induced premature senescence in human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* **10**, 1–9 (2008).
607. Yang, L. *et al.* Extensive cytokine analysis in synovial fluid of osteoarthritis patients. *Cytokine* **143**, 155546 (2021).
608. Campbell, I. K., Last, K., Novak, U., Lund, L. R. & Hamilton, J. A. Recombinant human interleukin-1 inhibits plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) production by human articular cartilage and chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **174**, 251–257 (1991).
609. Campbell, I. K., Wojta, J., Novak, U. & Hamilton, J. A. Cytokine modulation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) production by human articular cartilage and chondrocytes. Down-regulation by tumor necrosis

- factor alpha and up-regulation by transforming growth factor-B basic fibroblast growth factor. *Biochim Biophys Acta* **1226**, 277–285 (1994).
610. Hayashi, S. *et al.* p21 deficiency is susceptible to osteoarthritis through STAT3 phosphorylation. *Arthritis Res Ther* **17**, 314 (2015).
  611. Kihara, S. *et al.* Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor-1-Deficient Mice are Susceptible to Osteoarthritis Associated with Enhanced Inflammation. *J Bone Miner Res* **32**, 991–1001 (2017).
  612. Masson, A. O. *et al.* Increased levels of p21((CIP1/WAF1)) correlate with decreased chondrogenic differentiation potential in synovial membrane progenitor cells. *Mech Ageing Dev* **149**, 31–40 (2015).
  613. Rai, M. F. *et al.* Heritability of articular cartilage regeneration and its association with ear wound healing in mice. *Arthritis Rheum* **64**, 2300–2310 (2012).
  614. Vinatier, C., Domínguez, E., Guicheux, J. & Caramés, B. Role of the Inflammation-Autophagy-Senescence Integrative Network in Osteoarthritis. *Frontiers in Physiology* **9**, (2018).
  615. Hayakawa, K. *et al.* H2A O-GlcNAcylation at serine 40 functions genomic protection in association with acetylated H2AZ or  $\gamma$ H2AX. *Epigenetics & Chromatin* **10**, 1–14 (2017).
  616. Averbek, S., Jakob, B., Durante, M. & Averbek, N. B. O-GlcNAcylation Affects the Pathway Choice of DNA Double-Strand Break Repair. *Int J Mol Sci* **22**, 5715 (2021).
  617. Chen, Q. & Yu, X. OGT restrains the expansion of DNA damage signaling. *Nucleic Acids Res* **44**, 9266–9278 (2016).
  618. Shikhman, A. R., Kuhn, K., Alaeddine, N. & Lotz, M. N-Acetylglucosamine Prevents IL-1 $\beta$ -Mediated Activation of Human Chondrocytes. *The Journal of Immunology* **166**, 5155–5160 (2001).
  619. Gouze, J.-N. *et al.* Exogenous glucosamine globally protects chondrocytes from the arthritogenic effects of IL-1 $\beta$ . *Arthritis Res Ther* **8**, R173 (2006).
  620. Xing, D. *et al.* O-GlcNAc Modification of NF $\kappa$ B p65 Inhibits TNF- $\alpha$ -Induced Inflammatory Mediator Expression in Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *PLOS ONE* **6**, e24021 (2011).
  621. Yang, W. H. *et al.* NF $\kappa$ B activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 17345–17350 (2008).
  622. Golks, A., Tran, T.-T. T., Goetschy, J. F. & Guerini, D. Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation. *EMBO J* **26**, 4368–4379 (2007).
  623. Hwang, J.-S. *et al.* Glucosamine improves survival in a mouse model of sepsis and attenuates sepsis-induced lung injury and inflammation. *J. Biol. Chem.* **294**, 608–622 (2019).
  624. Al-Mukh, H. *et al.* Lipopolysaccharide Induces GFAT2 Expression to Promote O-Linked  $\beta$ -N-Acetylglucosaminylation and Attenuate Inflammation in Macrophages. *The Journal of Immunology* **205**, 2499–2510 (2020).
  625. Qiu, H. *et al.* Modification of p27 with O-linked N-acetylglucosamine regulates cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Molecular Carcinogenesis* **56**, 258–271 (2017).
  626. Mao, X. *et al.* O-GlcNAc glycosylation of p27kip1 promotes astrocyte migration and functional recovery after spinal cord contusion. *Experimental Cell Research* **339**, 197–205 (2015).
  627. Kim, M. J. *et al.* Hexosamine Biosynthetic Pathway-Derived O-GlcNAcylation Is Critical for RANKL-Mediated Osteoclast Differentiation. *Int J Mol Sci* **22**, 8888 (2021).
  628. Nagel, A. K., Schilling, M., Comte-Walters, S., Berkaw, M. N. & Ball, L. E. Identification of O-Linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc)-modified Osteoblast Proteins by Electron Transfer Dissociation Tandem Mass Spectrometry Reveals Proteins Critical for Bone Formation. *Mol Cell Proteomics* **12**, 945–955 (2013).
  629. Nagel, A. K. & Ball, L. E. O-GlcNAc Modification of the runt-Related Transcription Factor 2 (Runx2) Links Osteogenesis and Nutrient Metabolism in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells\*. *Molecular & Cellular Proteomics* **13**, 3381–3395 (2014).

**Titre :** Mise au point d'un modèle de sénescence chondrocytaire et rôle de la O-GlcNAcylation dans l'arthrose

**Mots clés :** Arthrose, vieillissement, sénescence, O-GlcNAcylation

**Résumé :** L'Arthrose (OA) touche tous les composants de l'articulation et se caractérise notamment par une dégradation du cartilage, un remodelage de l'os sous-chondral, la formation d'ostéophytes et une inflammation synoviale. Les patients atteints d'OA présentent une diminution de la mobilité articulaire, des douleurs et une qualité de vie dégradée. Or à ce jour, il n'existe pas de traitement curatif de l'OA et la prise en charge est limitée au soulagement des douleurs et au maintien de la mobilité articulaire. Un des facteurs de risque majeur de l'OA est l'âge. La sénescence cellulaire a été décrite comme l'un des principaux moteurs du vieillissement et l'accumulation de cellules sénescents dans les tissus est impliquée dans la pathogenèse et la progression de nombreuses maladies liées à l'âge tels que l'OA. Malgré des résultats encourageants dans les modèles précliniques, le ciblage des cellules sénescents au moyen de composés sénolytiques présente des résultats cliniques décevants pour le traitement de l'OA sûrement dû au fait que la compréhension des

processus biologiques reliant l'accumulation de cellules sénescents dans l'espace articulaire et la pathologie de l'OA reste floue. Dans ce contexte, le premier objectif de ma thèse a donc été de développer un modèle de chondrocytes sénescents par induction de dommages à l'ADN et de le comparer à un second modèle d'inflammation induit par l'IL-1 $\beta$  dans des chondrocytes humains. J'ai également mesuré différents marqueurs de sénescence dans des modèles d'OA liés à l'âge et post-traumatique. Parallèlement, à l'augmentation de la sénescence de nombreuses pathologies liées au vieillissement présentent également une dérégulation des niveaux d'O-GlcNAcylation. C'est également le cas pour l'OA où une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation a été observée dans les articulations de patients OA. La seconde partie de ma thèse a donc eu pour but d'investiguer le rôle de la O-GlcNAcylation in vitro dans les deux modèles précédemment évoqués ainsi que in vivo dans un modèle d'OA post-traumatique induite chez la souris.

**Title:** Development of chondrocytes senescence model and role of O-GlcNAcylation in osteoarthritis

**Keywords:** Osteoarthritis, aging, senescence, O-GlcNAcylation

**Abstract:** Osteoarthritis (OA) affects all the joint components and is characterized by cartilage degradation, subchondral bone remodelling, osteophyte development, and synovial inflammation. OA patients exhibit decreased joint mobility, pain, and a degraded quality of life. However, no curative OA treatment exists, and OA management is limited to pain relief and joint mobility improvement. One of the significant risk factors for OA is age. Cellular senescence has been described as one of the main drivers of aging and senescent cell accumulation in tissues is implicated in the pathogenesis and progression of many age-related diseases such as OA. Despite encouraging results in preclinical models, targeting senescent cells using senolytics produced disappointing results in clinics for the treatment of OA. This is probably because the understanding of the biological processes linking

senescent cells accumulation in the joint space and the pathology of OA remains unclear. In this context, the first objective of my PhD was to develop a model of senescence in human chondrocytes by DNA damage induction and to compare it to a second model of chondrocytes inflammation induced by IL-1 $\beta$ . I have also investigated different senescent markers in age-related and post-traumatic OA models. Along with increased senescence, many age-related pathologies exhibit dysregulation of O-GlcNAcylation levels. This is also the case for OA where an increased level of O-GlcNAcylation has been observed in the joints of patients. Therefore, the second part of my PhD aimed to investigate the role of O-GlcNAcylation in vitro in the two models mentioned above as well as in vivo in a posttraumatic OA model in mice.