



**HAL**  
open science

## Deux enzymes au pouvoir oxydoréducteur

Clara Pinosa-Zezza

► **To cite this version:**

Clara Pinosa-Zezza. Deux enzymes au pouvoir oxydoréducteur : La NADPH Oxydase 4, cible thérapeutique dans l'arthrose & VDAC, origine de l'activité oxydoréductase des érythrocytes. Sciences du Vivant [q-bio]. 2016. hal-01571793

**HAL Id: hal-01571793**

**<https://ephe.hal.science/hal-01571793>**

Submitted on 3 Aug 2017

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

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

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE présenté par

*PINOSA-ZEZZA Clara*

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

## **Deux enzymes au pouvoir oxydoréducteur :**

*La NADPH Oxydase 4, cible thérapeutique dans l'arthrose*

&

*VDAC, origine de l'activité oxydoréductase des érythrocytes*

Soutenu le 16 décembre 2016

Devant le jury suivant :

Dr. Stéphanie PLENCHETTE-COLAS	– Président
Dr. Bernard LARDY	– Tuteur scientifique
Dr. Véronique FRACHET	– Tuteur pédagogique
Dr. Sylvia PIETRI	– Rapporteur
Pr. Jean-Luc LENORMAND	– Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr. Bernard LARDY

Laboratoire de : GREPI EA 7408 UGA  
(Groupe de recherche et d'étude du processus inflammatoire)

Directeur : Pr Philippe GAUDIN

Laboratoire de : Laboratoire Cancer Cycle cellulaire et Sénescence (CaCys)

Directeur : Dr. Véronique FRACHET

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

# Remerciements

Je voudrais commencer par remercier le jury présent aujourd'hui, le Dr. Stéphanie Plenchette-Colas, le Dr. Véronique Frachet, le Dr. Sylvia Pietri, et enfin le Pr. Jean-Luc Lenormand, j'espère que vous aurez autant de plaisir à lire ce travail que j'ai eu à le réaliser. Merci pour votre temps et votre implication.

C'est avec beaucoup de bonheur et d'émotion que je présente ce travail aujourd'hui, devant ma famille, mes amis et toutes les merveilleuses personnes que j'ai pu rencontrer tout au long de cette aventure. Il serait inutile d'essayer de retranscrire en quelques lignes ce que ces trois années d'études au sein de ce laboratoire m'ont apporté, cela ne suffirait pas. Je m'efforcerais donc de remercier tous les acteurs de cette période de ma vie.

Je pense que tous ceux qui ont eu la chance de travailler au GREPI vous diront que c'est une grande famille, et même après avoir quitté le laboratoire pour la vie active, à chaque visite je m'y sens toujours la bienvenue, merci à Christian et au Pr. Françoise Morel, de m'avoir offert la chance de faire ce stage au sein de ce laboratoire et de cette équipe.

Tout d'abord je voudrais remercier mon tuteur, Bernard. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir donné cette confiance sans faille et de m'avoir aidé à devenir autonome. Grâce à toi, la jeune fille en stage de BTS 1<sup>ère</sup> année est devenue une jeune femme ambitieuse et pleine d'initiatives professionnelles. Nos réunions autour d'un café, PowerPoint devant les yeux et cahier de laboratoire à la main vont me manquer. J'espère, non, je ne doute pas que tu continueras à fournir un encadrement formidable avec tes futurs étudiants. Je te souhaite tout le bonheur du monde et de très belles réussites qui te mèneront à partir faire du surf en Australie avec toute ta petite famille !!

A nos « seniors-chefs » ! Et maintenant amis, merci pour votre bonne humeur, pour avoir partagé ces nombreux petit-déj, réunions de travail et manips à la paillasse. Aurélie, merci pour ta gentillesse et ton humour qui me laisseront des souvenirs remplis de rires, Chuong, je suis désolée d'avoir volé les m&m's de ton tiroir mais tu sais, pour sauver des vies, il faut avoir le ventre rempli, j'espère que tu me pardonneras. Marie-Hélène, ta douceur et ta bienveillance à fait de ce laboratoire une véritable équipe soudée, Bertrand, grâce à toi j'ai pu connaître le bonheur de rester pendant 4h en salle d'opération à découvrir la microchirurgie, et à apprécier la mode dernier cri des sur chaussures de bloc ! Habib, Arije, vous m'avez montré que tout est possible dans ses projets professionnels, il suffit d'y croire et de travailler dur.

A mes amis étudiants ! A ceux qui sont restés pendant de brèves périodes, Jennifer, Alexandra, Manon, Federico, mais qui ont tellement apporté à l'équipe, et surtout à mes amies, Sophie, Kathy et Pauline, avec qui j'ai partagé ces 3 années, merci pour votre aide, les fous rires partagés, les

soirées passées tard au laboratoire, avant d'aller se boire un bon café. A nos idées déco du laboratoire et à nos projets les plus fous (ça tiens toujours pour le Brésil ?). Vous faites partie de ma vie, je ne vous en remercierais jamais assez.

Et enfin, à ma famille. Merci à ma mère, Christine, qui m'a toujours soutenu dans n'importe quelle de mes décisions, même les plus folles mais qui m'a toujours appris à ne jamais abandonner. Merci à mon père, Claude, pour son soutien et pour la place qu'il a accepté de me donner dans sa vie. Mon plus grand bonheur est que tu sois fier que je sois devenue ta fille. A ma sœur, Sarah, pour sa compréhension et pour m'avoir aidé à me connaître mieux grâce à sa grande empathie, avec elle j'ai appris à me remettre sans cesse en question, et mes projets n'en ont été que plus beaux. Merci à toute ma famille présente aujourd'hui, votre soutien est ma plus belle réussite !

Et bien sûr merci à mon compagnon, pour ces soirées entières passées devant mon ordinateur et pour ces heures de préparation, pour m'avoir rassurée et avoir su me guider dans ma vie professionnelle. Merci beaucoup.

# SOMMAIRE

---

<b>AVANT PROPOS .....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>14</b>
I- Les ROS : intérêt en biologie .....	15
A) Les ROS : Espèces Réactives de l'oxygène.....	15
1) Rôle physiologique et pathologique .....	15
2) Contrôle du stress oxydant .....	16
3) Les sources de ROS .....	18
a. ROS exogènes.....	18
b. ROS endogènes .....	18
B) La famille des NADPH Oxydases.....	20
1) Présentation.....	20
2) Isoformes et fonctions .....	21
a. La NADPH Phagocytaire NOX 2 .....	21
b. La NOX1 .....	22
c. La NOX3 .....	23
d. La NOX5 .....	23
e. Les DUOXs 1 et 2 .....	24
f. La NADPH Oxydase 4 .....	24
II- La NOX4, cible thérapeutique dans l'arthrose.....	25
A- NOX4 et l'arthrose.....	25
1) Epidémiologie de l'arthrose.....	25
a- Physiopathologie de la maladie arthrosique et Structure du cartilage .....	27
b- Les acteurs du cartilage.....	28
2) Le catabolisme matriciel : rôle des métalloprotéases .....	30
a- Les métalloprotéases (MMP) .....	30
b- Les aggrecanases.....	32
3) Les ROS et l'arthrose : rôle de NOX4 .....	33
III- L'activité réductase : rôle dans les érythrocytes .....	34
1) Les Voltages Dependant Anion Channel (VDAC).....	35

2) Structure.....	35
3) Fonction de VDAC à la membrane plasmique .....	36
IV- VDAC et activité PMOR dans les érythrocytes.....	37
1) VDAC dans les érythrocytes .....	37
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>38</b>
I- Partie I : NOX4, cible thérapeutique dans l'arthrose.....	39
II- Partie II : VDAC et activité PMOR dans les érythrocytes .....	40
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>41</b>
I. Biologie cellulaire.....	42
A- Culture cellulaire .....	42
1) Entretien des cellules adhérentes .....	42
2) Cellules primaires : les chondrocytes articulaires humains (HAC) .....	42
3) La lignée chondrocytaires C-20/A4.....	42
4) La lignée HEK 293 T-Rex NOX4.....	43
5) Conservation des cellules .....	44
B- Cytométrie en Flux .....	44
1) Principe .....	44
2) Protocole d'analyse par Cytométrie en flux des érythrocytes .....	45
a. Fixation et perméabilisation .....	45
b. Préparation et Immunomarquage des érythrocytes .....	45
C- Fusion des protéoliposomes .....	46
1) Les différents types de liposomes et protéoliposomes utilisés.....	46
2) Préparation des globules rouges .....	47
3) Fusion des différents échantillons .....	48
4) Séparation des liposomes par gradient de Ficoll.....	48
II. Biologie moléculaire .....	50
A) Construction de plasmides.....	50
1) Coupure plasmidique.....	50
2) Ligation.....	51
3) Transformation bactérienne.....	51
4) Mini-préparations d'ADN.....	51
B) Transfection de rétrovirus permettant l'expression de NOX4.....	52

C)	Quantification d'ARN par RT-PCR quantitative.....	53
1)	Extraction d'ARN .....	53
2)	Dosage des acides nucléiques.....	53
3)	Transcription inverse .....	54
4)	PCR quantitative .....	54
III.	Biochimie.....	57
A-	Méthodes d'analyse des protéines .....	57
1)	Western Blot .....	57
a-	Solubilisation et dénaturation des protéines à analyser .....	57
b-	Préparation du gel polyacrylamide .....	57
c-	Electrophorèse sur gel.....	58
d-	Transfert sur membrane .....	58
e-	Blocage et révélation.....	59
2)	Quantification par méthode ELISA .....	61
a-	Récupération des membranes .....	61
b-	Protocole de marquage.....	61
B-	Mesure de l'activité oxydoréductase.....	62
a-	Amplex Red .....	62
b-	Chimioluminescence .....	63
c-	Activité réductase par réduction du WST-1 .....	63
IV.	Expérimentation animale.....	64
A-	La souris C57/BL6 .....	64
B-	Objectifs scientifiques .....	64
1)	Le projet .....	64
2)	Les animaux .....	65
3)	Points limites.....	65
4)	Déclenchement de l'arthrose par injection bilatérale.....	66
5)	Surveillance des animaux.....	67
6)	Test de motricité : le Rotarod .....	68
7)	Histologie .....	68
V.	Analyses statistiques.....	69

**RESULTATS : NOX4, CIBLE THERAPEUTIQUE DANS L'ARTHROSE ..... 70**

I-	NOX4 et les chondrocytes primaires .....	71
A-	Expression de l'isoforme Nox4 dans les chondrocytes primaires.....	71
II-	L'Interleukine 1 Bêta et les ROS.....	73
A-	L'IL-1 $\beta$ module la production de ROS dans les chondrocytes humains .....	73
B-	Modulation d'expression de Nox4 par l'IL1- $\beta$ .....	74
III-	Conséquences de l'IL-1 $\beta$ sur l'expression des métalloprotéases .....	77
A-	Production de MMP lors d'une stimulation à l'IL-1 $\beta$ .....	77
B-	Les ROS dans la boucle autocrine IL-1 $\beta$ / p22phox-.....	79
IV-	Nox4 dans les chondrocytes primaires arthrosiques .....	83
A-	Modèle de surexpression de Nox4 et p22phox par rétrovirus.....	83
B-	Nox4 est surexprimé dans les chondrocytes primaires arthrosiques.....	86
V-	Etude de Nox4 sur modèle in vivo .....	88
	<b>RESULTATS : VDAC ET ACTIVITE PMOR DANS LES ERYTHROCYTES .....</b>	<b>91</b>
I-	VDAC est présent à la membrane des érythrocytes.....	92
A-	Mise en évidence de VDAC endogène .....	92
B-	Lien entre VDAC et l'activité PMOR .....	92
II-	Conséquences de la surexpression de VDAC dans les érythrocytes. ....	96
A-	Augmentation de l'activité réductase par fusion de protéoliposomes .....	96
B-	Recherche d'un marqueur positif de fusion dans les érythrocytes .....	97
C-	Augmentation de VDAC His-Tag par Western Blot .....	99
	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>102</b>
I-	NOX4, cible thérapeutique dans l'arthrose .....	103
II-	VDAC et activité PMOR dans les érythrocytes.....	107
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>110</b>
	<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS .....</b>	<b>118</b>

# Table des Figures

---

Figure 1 : Equation électronique des ROS .....	18
Figure 2 : Famille des NADPH Oxydases, DUOX et leurs partenaires .....	21
Figure 3 : Schéma d'activation de NOX2 avec ses sous-unités régulatrices.....	22
Figure 4 : Localisation de l'arthrose et épidémiologie.....	26
Figure 5 : Structure du cartilage .....	28
Figure 6 : Processus de dégradation d'un cartilage arthrosique .....	30
Figure 7 : Les différentes familles de MMPs humaines .....	32
Figure 8 : Système Plasma Membrane Oxydoréductase .....	34
Figure 9 : Structure tri-dimensionnelle proposée de VDAC 1 .....	36
Figure 10 : Induction de l'expression de Nox4 par tétracycline .....	43
Figure 11 : Principe de Cytométrie en flux .....	45
Figure 12 : Fusion d'un liposome à la membrane érythrocytaire.....	48
Figure 13 : Carte du plasmide pLNHX .....	50
Figure 14 : Amorces utilisées en qRT-PCR .....	55
Figure 15 : Principe de la PCR quantitative.....	55
Figure 16 : Le suivi en temps réel d'une réaction PCR.....	56
Figure 17 : Organisation du transfert sur membrane de nitrocellulose.....	58
Figure 18 : Principe de révélation ECL .....	60
Figure 19 : Principe de l'ELISA type "sandwich" .....	62
Figure 20 : Chronogramme .....	67
Figure 21 : Test de motricité, le Rotarod .....	68
Figure 22 : Nox4 est la seule isoforme présente dans les chondrocytes primaires. ....	71
Figure 23 : Expression graduelle de NOX4 in vivo dans les HAC. ....	72
Figure 24 : Expression protéique de NOX4 dans les HAC. ....	72
Figure 25 : Nox4 est une source majeure de ROS lors d'une stimulation par l'IL-1 $\beta$ dans les HAC. ...	74
Figure 26 : Etude de la production de ROS dans les HAC .....	75
Figure 27 : Augmentation de Nox4 et de son partenaire p22phox lors d'une stimulation à l'IL1 $\beta$ .....	76
Figure 28 : Quantification de l'expression de MMP-1 et MMP-13 par les chondrocytes primaires suite à une stimulation à l'IL-1b.....	77
Figure 29 : Quantification des ARN de MMP-1 ADAMTS4 et MMP-13 par les HAC suite à une stimulation à l'IL-1b.....	78
Figure 30 : L'activité de NOX4 maintient la boucle autocrine / paracrine de l'IL-1b et la surexpression de p22phox. ....	80
Figure 31 : La voie de signalisation de NOX4 permet la médiation du catabolisme chondrocytaire. ....	81
Figure 32 : Création d'outil de surexpression de NOX4, les rétrovirus. ....	83
Figure 33 : Validation du modèle de surexpression de NOX4 .....	84
Figure 34 : Dosage des ROS produits par les C-20/A4 RV NOX4 par AmplexRed et Luminol.....	85
Figure 35 : NOX4 est surexprimé dans les chondrocytes primaires arthrosiques.....	87

Figure 36 : Performance des modèles murins arthrosiques : test ROTAROD .....	89
Figure 37 : Expression de VDAC dans la membrane érythrocytaire par Western Blot .....	92
Figure 38 : Activité réductase des érythrocytes .....	93
Figure 39 : Inhibition de l'activité réductase des érythrocytes humains.....	94
Figure 40 : Quantification de VDAC endogène et corrélation avec l'activité réductase .....	95
Figure 41 : Activité réductase des différents types de protéoliposomes fournis par Synthelis.....	97
Figure 42 : Séparation des liposomes non fusionnés par gradient de Ficoll .....	98
Figure 43 : Mesure d'absorbance du Crystal violet .....	99
Figure 44 : Augmentation de VDAC His-Tag et endogène après fusion dans les érythrocytes.....	100
Figure 45 : Activité réductase des érythrocytes enrichis en VDAC.....	101

# Liste des Abréviations

---

**Ac** : Anticorps

**ADAMTS** : ADisintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc** : ADN complémentaire

**ARN** : Acide ribonucléique

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger

**BSA** : albumine sérique bovine

**DFP** : Diisopropyl fluorophosphate

**DMEM** : « Dubelcco's Modified Eagle's Medium »

**DMF** : Diméthyl formamide

**DMSO** : Dimethyl sulfoxyde

**DPI** : Diphényliodonium

**ECL** : Détection améliorée de la chimiluminescence

**ELISA** : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

**FACS** : Fluorescence-activated cell sorting

**FAD** : Flavine adénine dinucléotide

**GR** : Globules rouges

**GREPI** : Groupe de Recherche et d'Etude du Processus Inflammatoire

**H2O2** : Peroxyde d'hydrogène

**HAC** : Human Articular Chondrocytes

**HEPES** : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

**Ht** : Hématocrite

**HEK** : Human embryonic kidney

**HRPO / HRP** : Horse Radish Peroxidase

**Ig** : Immunoglobuline

**IL1-β** : Interleukine 1-beta

**kDa** : Kilodaltons

**LB** : Luria-Bertani

**LDH** : Lactate déshydrogénase

**MMP** : Matrix Metalloprotéinase

**NAD(P)H** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)

**Nox** : NADPH oxydase

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Ion superoxyde

**PBS** : Tampon phosphate isotonique « Phosphate Buffer Saline »

**PCR** : Polymerase chain reaction

**PFA** : Paraformaldéhyde

**PMOR** : Plasma membrane Oxydoréductase System

**PMS** : Para-méthylstyrène, catalyseur biochimique

**PHOX** : Phagocyte oxidase

**PMA** : Phorbol myristate acétate

**PMSF** : Phényl méthyl sulfonyl fluorure

**p/v** : Poids pour volume

**RLU** : Relative Luminescent Unit

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**SDS** : Sodium dodécyl sulfate

**SDS-PAGE** : Electrophorèse en gel polyacrylamide en présence de SDS

**SOD** : Superoxyde dismutase

**SVF** : Sérum de veau fœtal

**TGS** : Tris Glycine SDS

**TIMP** : Tissue Inhibitor of Metalloprotéinase

**TNF- $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor

**TRIS** : Tris (hydroxyméthyl) aminométhane

**UV** : Ultra-violet

**VDAC** : Voltage Dependant Anion Channel

**WST1** : Water Soluble Tetrazolium, accepteur d'électron

**WT** : Wild type ou sauvage

# AVANT PROPOS

---

Le stress oxydant se définit par un déséquilibre entre la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et des capacités cellulaires antioxydantes. Les ROS ont longtemps été considérées comme des sous-produits toxiques du métabolisme de l'oxygène et impliqués dans de nombreuses pathologies. Cependant, depuis plusieurs années, la production contrôlée de radicaux apparaît comme un mécanisme essentiel de la signalisation cellulaire qui participe au maintien de l'homéostasie de la cellule. Les effets des radicaux libres en biologie sont maintenant bien documentés. Non seulement les organismes vivants se sont adaptés et coexistent en présence de ROS mais ils ont également développé des mécanismes pour les utiliser à leur avantage. Néanmoins, les sources de radicaux et leurs mécanismes d'action sont souvent mal définis. Nous avons choisi dans cette étude deux protéines utilisant les fonctions oxydatives et réductrices des ROS, la NADPH Oxydase et la Voltage Dependant Anion Channel (VDAC), nous permettant ainsi d'étudier et de comprendre le rôle de ces deux enzymes au pouvoir oxydo-réducteur, l'une dans un contexte pathologique, l'arthrose, et l'autre dans une cellule largement présente chez l'Homme, l'érythrocyte.

# INTRODUCTION

---

# I- Les ROS : intérêt en biologie

## A) Les ROS : Espèces Réactives de l'oxygène

### 1) Rôle physiologique et pathologique

Les dérivés réactifs de l'oxygène sont nécessaires à la vie des organismes multicellulaires (**Lalucque H et al 2003**). En contrôlant l'expression de certains gènes, les ROS jouent un rôle clé dans de nombreux processus physiologiques, notamment dans le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, la régulation de la prolifération, l'apoptose, ou encore le déclenchement de la migration cellulaire (**Bedard et Krauze review 2007**). De façon non exhaustive, dans la sphère rhumatologique, les ROS seraient par exemple impliqués dans la chondrogenèse à partir de cellules souches mésenchymateuses ou encore l'ossification endochondrale, processus par lequel le cartilage de croissance laisse place à l'os au cours de la croissance des organismes vertébrés (**Morita et al. 2007; Kim et al. 2010**). Les ROS sont également nécessaires à la différenciation des adipocytes, des cardiomyocytes et des ostéoblastes (**Schroder et al. 2009; Crespo et al. 2010; Mandal et al. 2012**). Ils sont également impliqués dans le maintien de la pluripotence des cellules souches de la moelle osseuse (à faible dose) ou leur différenciation (à plus forte dose) (**Urao and Ushio-Fukai 2012**). Les voies de signalisation activées par les ROS permettent également la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires ainsi que la synthèse de métalloprotéases matricielles (MMP) nécessaire au cours de l'angiogenèse (**Meng et al. 2008; Rodriguez et al. 2009**). L'homéostasie est ainsi régulée par une multitude de voies de signalisation contrôlées par les ROS. Par exemple, en modulant l'activité du NFkB, du facteur de transcription AP-1 et de HIF2 $\alpha$ , les ROS entraînent une augmentation de l'expression d'un certain nombre de métalloprotéases telles que la MMP-1, 3, 9, 12, 13 ou encore les ADAMTS 4 et 5.

La production des ROS reste un phénomène physiologique naturel lié à la vie aérobie. Leur concentration peut croître anormalement en période de stress (chaleur ou exposition aux ultraviolets) et endommager les structures cellulaires, on parle alors de « stress oxydant » qui peut conduire à la mort cellulaire, le vieillissement ou encore la cancérisation (**Beckman et Ames 1998**).

Les ROS possèdent de nombreuses propriétés : en oxydant certaines molécules comme les acides nucléiques, les protéines et les lipides, ils peuvent détruire des fonctions biologiques. Par exemple, dans le cas de l'ADN, le radical hydroxyle réagit avec les bases en s'additionnant sur les doubles

liaisons formant des radicaux peroxydes, issus de l'addition d'O<sub>2</sub> sur des radicaux libres carbonés, pouvant aboutir à des mutations de l'ADN. Ce radical est au cœur du processus de peroxydation lipidique qui dégrade les membranes biologiques. De même, les acides aminés constitutifs des protéines sont très sensibles à l'attaque des radicaux hydroxyles. Lorsqu'une protéine possède une fonction enzymatique, les radicaux hydroxyles sont susceptibles d'inactiver le site actif et par conséquent, leur efficacité (*Tiku et al. 1998*).

Le stress oxydatif est la cause essentielle du vieillissement, mais il est aussi impliqué dans de nombreuses maladies. Effet, les cellules dysfonctionnent ou meurent prématurément (dégénération) en partie à cause d'une production anormalement élevée de radicaux libres, comme dans la maladie d'Alzheimer ou bien encore la maladie de Parkinson. Pour d'autres maladies chroniques évolutives, le stress oxydatif important généré peut provoquer des maladies chroniques inflammatoires de l'appareil digestif, des maladies cardiovasculaires, broncho-pulmonaires, la fibrose hépatique conséquence d'affections virales chroniques, des cancers ou encore du diabète (*Kaneto et al. 2009*).

Le stress oxydatif est une cause importante des processus pathologiques liés au vieillissement. Ce stress est la conséquence de deux effets antagonistes : les défenses antioxydantes sont affaiblies et les produits oxydés sont produits en trop grande quantité dans l'organisme.

## **2) Contrôle du stress oxydant**

Pour combattre un stress oxydatif engendré par un taux élevé de ROS, les cellules ont développé plusieurs mécanismes de défense, pour maintenir une homéostasie redox. Deux stratégies différentes sont employées par les cellules :

Les molécules tampons : vitamine E, vitamine C, coenzyme Q, glutathion, acides aminés.

Ces composés sont réduits par les radicaux libres pour former des composés radicalaires stables qui seront secondairement régénérés par une oxydation lors d'une réaction enzymatique.

Processus enzymatiques de détoxification des ROS : Superoxide Dismutase, catalase, glutathion peroxydase, peroxyrédoxines.

Les ROS produits sont rendus inactifs par une série d'enzymes. La dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène est accélérée par l'enzyme superoxyde dismutase. Le peroxyde d'hydrogène est le substrat de la catalase qui produit de l'oxygène et de l'eau (**Kirkman et Gaetani, 2007**). La suppression des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cytosoliques est également réalisée par d'autres enzymes. Les propriétés antioxydantes du groupement thiol sont très importantes. Le glutathion et la thiorédoxine, contenant des thiols, sont au cœur de la régulation du statut redox de la cellule. La glutathion peroxydase catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en utilisant le glutathion réduit comme substrat. Cette enzyme intervient avec la glutathion réductase dans le cycle redox du glutathion permettant sa régénération.

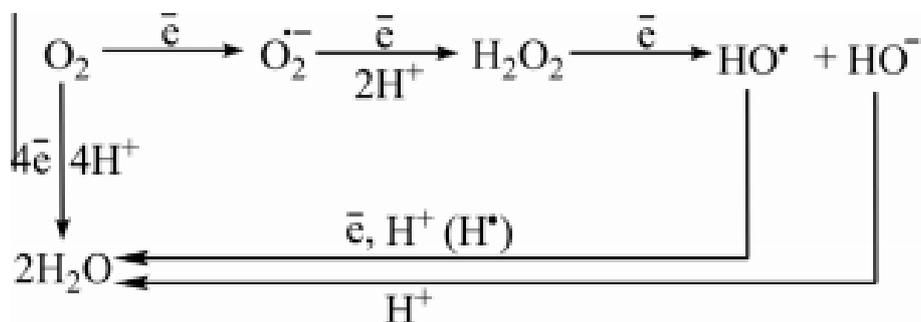
Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est aussi éliminé par les peroxyrédoxines. Le cœur catalytique de ces protéines est constitué de deux cystéines. Le surplus d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxyde le groupement thiol de la cystéine des peroxyrédoxines en groupement acide sulfénique en libérant une molécule d'eau. Les systèmes des thiorédoxines et glutarédoxines agissent comme des antioxydants en facilitant la réduction de protéines oxydées (**Holmgren, 1989**). Ces protéines peuvent agir par exemple pour régénérer les peroxyrédoxines oxydés.

L'attaque des radicaux libres sur les membranes cellulaires (lipopéroxydation) entraîne ensuite une cascade de réactions radicalaires des lipides (**Halliwell et Chirico, 1993**). Ceci a pour conséquence de réduire la fluidité membranaire, d'augmenter la perméabilité des ions et d'altérer le fonctionnement des protéines membranaires. La vitamine E est une molécule liposoluble capable d'interrompre ce processus en s'intercalant dans la cascade de réactions radicalaires. La vitamine E est régénérée par la vitamine C ou par le coenzyme Q.

L'attaque des ROS sur les protéines entraîne également une modification de leur fonctionnement et augmente leur susceptibilité à être dégradées par le protéasome (**Davies et al, 1987**). L'oxydation touche particulièrement les acides aminés tryptophanes, tyrosine, histidine et cystéine mais tous les acides aminés peuvent être oxydés. La capacité antioxydante des acides aminés est faible mais leur forte concentration leur confère un grand pouvoir tampon (**Dröge, 2002**).

Ainsi, l'équilibre redox est finement régulé entre la production de ROS et leur élimination par toute une batterie de systèmes antioxydants. L'homéostasie préservée permet le fonctionnement normal de la cellule. Un stress oxydatif avec ses conséquences désastreuses apparaît lorsque la balance

redox est perturbée soit par une augmentation de la synthèse des ROS, soit par un dysfonctionnement du système antioxydant. **(Figure1)**



**Figure 1 : Equation électronique des ROS**

Dans les mitochondries, une quantité d'oxygène consommée inférieure à 10% est réduite via des voies successives à un électron, ce qui entraîne une conversion de l'oxygène moléculaire en radical anionique superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), suivie d'une réduction d'un électron avec l'acceptation concomitante de deux protons pour produire du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### **3) Les sources de ROS**

L'origine des ROS est multiple. Les ROS peuvent être produits de manière fortuite par le cytochrome p450, la lipoxygénase, la cyclo-oxygénase, le gamma glutamyl transpeptidase, la chaîne respiratoire mitochondriale, la xanthine oxydoréductase ou par le fonctionnement détourné de certaines enzymes comme la NO synthase. Les NADPH oxydases sont les seules enzymes dont la fonction primaire et unique est de produire des ROS. C'est également la source principale de ROS pouvant être régulée.

#### **a. ROS exogènes**

Ils peuvent être produits à partir de polluants ou encore de radiations. Les rayonnements ionisants peuvent générer des ROS par un processus appelé radiolyse. Ce phénomène de radiolyse est notamment utilisé en radiothérapie afin de détruire les cellules cancéreuses **(Liou et al 2014)**

#### **b. ROS endogènes**

Les ROS au niveau intracellulaire sont produits par des mécanismes multiples et variables en fonction des types cellulaires, **(Gottlieb, 2003; Harrison, 2004; Schrader et al, 2004; Balaban et al, 2005; Gonzalez, 2005)** les principales sources étant les NADPH

oxydases membranaires, la chaîne respiratoire des mitochondries, les peroxysomes et le réticulum endoplasmique. La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente conduisant à la production d'eau. Cette réaction est catalysée par une oxydase, le complexe IV du cytochrome oxydase, accepteur terminal d'électrons présents dans la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne mitochondriale. Cependant, cette chaîne de transport peut parfois laisser « fuir » certains électrons qui vont réduire l'oxygène. Environ 0,1 à 2% d'électrons traversant la chaîne, peuvent réduire l'oxygène et donner le radical superoxyde ( $O_2^\circ$ ) (**Genestra 2007**). Par ailleurs, l'apparition d'anions superoxyde peut résulter de l'oxydation par l'oxygène de composés tels que l'adrénaline, la noradrénaline, des thiols (cystéine), des coenzymes réduits (FADH<sub>2</sub>), mais aussi de la détoxification des médicaments par le système des cytochromes P450 présents au niveau du réticulum endoplasmique des hépatocytes. Le radical superoxyde est maintenu à un niveau de concentration assez bas par les superoxydes dismutases (SOD) qui catalysent sa dismutation en peroxyde d'hydrogène.

## ***B) La famille des NADPH Oxydases***

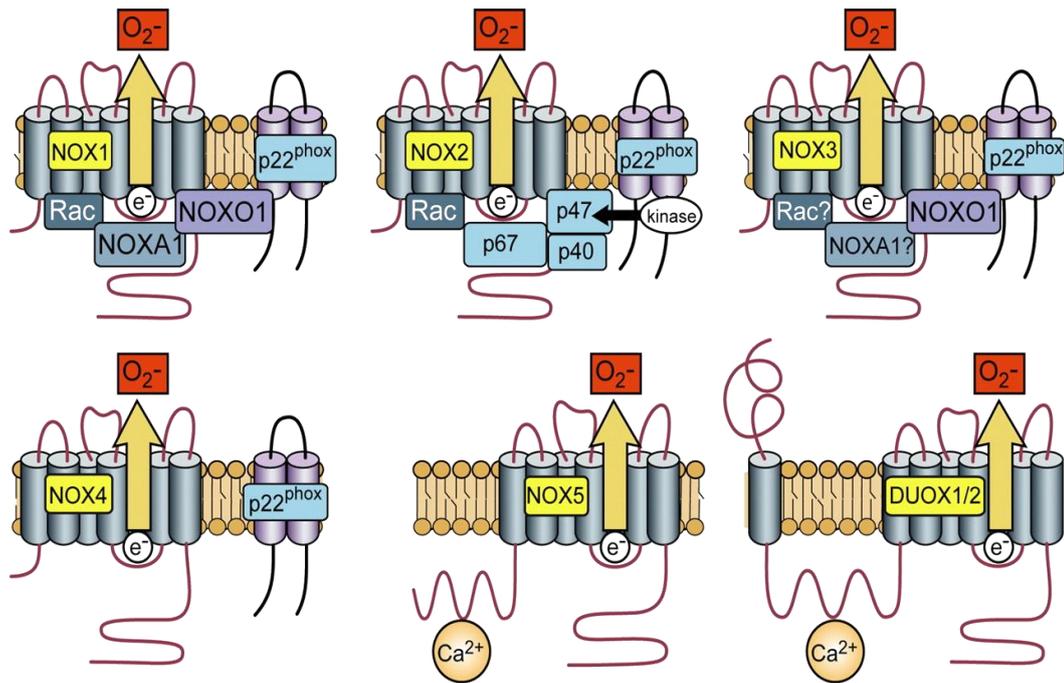
Les NADPH oxydase sont des enzymes membranaires dont le rôle unique est de produire des dérivés réactifs de l'oxygène

### **1) Présentation**

Historiquement, il faut attendre 1970 pour que la première NADPH oxydase soit décrite par **(Rossi et Zatti 1970)** il s'agit de la NADPH oxydase phagocytaire (NOX2). La découverte de p22phox, décrit comme l'un des premiers partenaires de NOX2, remonte à 1978 **(Segal and Coade, 1978)**. Puis celle des facteurs cytosoliques régulateurs, p47phox, p67phox et p40phox quelque temps après **(Volpp et al 1988, Wientjes et al 1993)**. Pendant longtemps, la production d'ion superoxyde par une NADPH oxydase était considérée comme présente uniquement dans les phagocytes. Au cours des quinze dernières années, six homologues de la NADPH phagocytaires ont été trouvés.

Chez l'Homme, la famille des NADPH oxydases est composée de 7 membres : NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 et DUOX2 **(Bedard et Krauze review 2007)**. Ce sont des protéines transmembranaires qui ont la capacité de transférer des électrons au travers des membranes biologiques à partir du NADPH, pour former au final l'ion superoxyde. Bien que l'on retrouve une certaine homologie dans leur structure, leur rôle, leur mécanisme d'activation ainsi que leur distribution tissulaire et leurs fonctions physiologiques demeurent très différentes.

Les NADPH Oxydases possèdent toutes un site de fixation au NADPH au niveau de l'extrémité C-terminale ainsi qu'un site de fixation au FAD. Elles sont également constituées de 6 ou 7 domaines transmembranaires contenant 4 histidines impliquées dans la coordination de deux molécules d'hème. Les parties N et C-terminales seraient à priori orientée vers le cytosol, sauf pour les Duox ou la partie N-terminale serait extracellulaire, mais à défaut d'analyse par cristallisation, les données topographiques des NADPH Oxydases ne sont pas encore connues. **(Figure 2)**



**Figure 2 : Famille des NADPH Oxydases, DUOX et leurs partenaires**

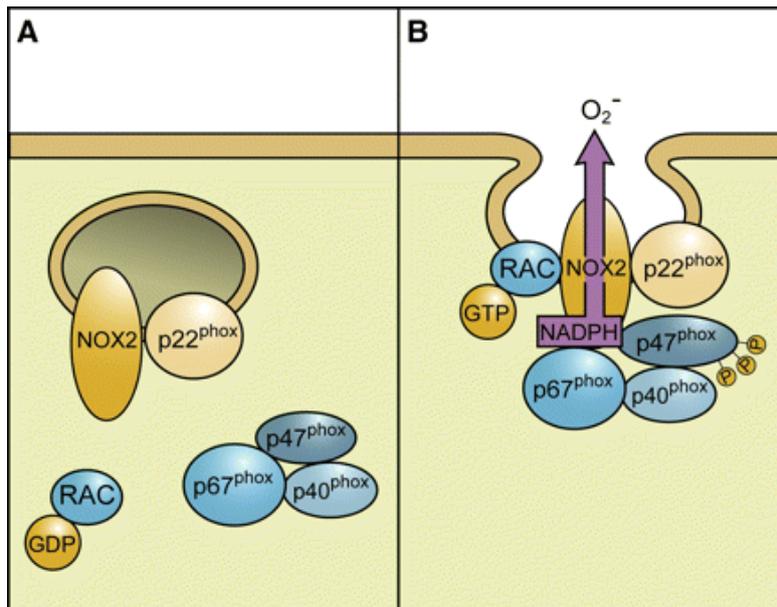
Les différentes isoformes de NOX possèdent toutes 6 passages transmembranaires et sont capables de transférer des électrons au travers des membranes biologiques à partir du NADPH vers l'oxygène (d'après Bedard et Krauze, review 2007)

## **2) Isoformes et fonctions**

### **a. La NADPH Phagocytaire NOX 2**

La NADPH Oxydase 2, également connu sous le nom de gp91phox, a été la première NADPH Oxydase décrite (**Babior et al 2002, Cross AR et al 1990, Nauseef WM et al 2004**). Ses caractéristiques biochimiques ont été largement étudiées ainsi que ses particularités topographiques qui ont permis, par homologie, d'en savoir plus sur la structure des autres isoformes de NOX.

Les études actuelles suggèrent six domaines transmembranaires pour NOX2. Des études de cartographie à l'aide d'anticorps montrent une localisation cytoplasmique pour la partie C terminale et des données de séquençage confirment que l'extrémité NH2-terminale est cytoplasmique. Globalement, les données suggèrent donc que NOX2 possède six domaines transmembranaires et que ses extrémités COOH et NH2 terminale sont orientées vers le cytoplasme. La NOX2 humaine est une protéine hautement glycosylée qui possède une masse moléculaire d'environ 70-90 kDa. (**Figure 3**)



**Figure 3 : Schéma d'activation de NOX2 avec ses sous-unités régulatrices**

L'activation de NOX2 se produit à travers une série d'interactions protéiques, à l'origine d'un complexe multi protéique actif. L'activité de NOX2 nécessite la présence de son partenaire p22phox. En effet, en l'absence de p22phox, la protéine devient instable. L'activation de NOX2 nécessite la translocation de facteurs cytosoliques au complexe NOX2-P22phox. La phosphorylation de p47phox conduit à un changement de conformation permettant son interaction avec p22phox. La sous-unité p47phox organise la translocation de facteurs cytosoliques, d'où son appellation de sous-unité organisatrice. Elle permet le contact de p67phox et de NOX2 et apporte également la sous-unité p40phox au complexe. Enfin, la GTPase Rac interagit avec NOX2 par l'intermédiaire de p67phox. Une fois assemblé, le complexe est actif et génère des ions superoxyde en transférant un électron du NADPH vers le FADH<sub>2</sub>, puis vers les deux hèmes et enfin vers l'oxygène accepteur final de l'électron dans l'espace extracellulaire. *(D'après Bedard et Krauze review 2007)*

### b. La NOX1

La NOX1 a été le premier homologue de NOX2 découvert *(Suh et al 1999)*. Au niveau protéique il existe un degré élevé d'homologie de séquence avec NOX2 (60%). La plupart des études suggèrent que la masse moléculaire de NOX1 se situe aux alentours des 55-60 kDa. Si ces valeurs sont correctes, NOX1 n'est probablement pas N-glycosylée, malgré la présence de deux sites de N-glycosylation dans les domaines extracellulaires.

NOX1 est fortement exprimée dans l'épithélium du côlon, cependant, il est également exprimé dans d'autres variétés de cellules, notamment les cellules musculaires lisses des vaisseaux, les cellules endothéliales, utérines, placentaires, de la prostate, dans les ostéoclastes, ainsi que dans plusieurs lignées cellulaires d'origine cancéreuse, telles que les lignées de cellules tumorales du côlon et du poumon. Les données sur la localisation subcellulaire des NOX1 sont rares, principalement parce que la génération d'anticorps de haute qualité contre NOX1 s'est avérée très difficile.

La production d'ion superoxyde par NOX1 dépend également de sous-unités cytosoliques. Ces sous-unités cytosoliques ont été nommées NOXO1 (NOX organisateur 1, un homologue de p47phox) et NOXA1 (NOX activateur 1, un homologue de p67phox). En plus de cette dépendance pour ses sous-unités cytosoliques, l'activité de NOX1 nécessite également la sous-unité membranaire p22phox.

### c. La NOX3

NOX3 a été décrite en 2007 (**Nakano et al. 2007**) grâce à la similarité de séquence avec d'autres isoformes de NOX mais les premières études sur la fonction de la protéine ne sont pas apparues avant 2004 (**Banfi et al.**). NOX3 possède 56% de similarité avec NOX2. La structure globale de NOX3 pourrait être très similaire à celle de NOX1 et NOX2, en termes de domaines transmembranaires, de la longueur des boucles extracellulaires ainsi que de la localisation des histidines.

Deux approches différentes ont conduit à la désignation de NOX3 comme étant la principale NADPH oxydase de l'oreille interne (**Rousset et al 2015**). Par analyse en PCR temps réel et hybridation in situ les auteurs ont montré une expression très élevée de NOX3 dans l'oreille interne. Une étude de l'équilibre d'une souris mutante KO NOX3 a montré le rôle de NOX3 dans l'équilibre géré par l'oreille interne. Par contre, on ne sait rien à propos de la localisation subcellulaire des NOX3.

### d. La NOX5

NOX5 a été découverte en 2001 (**Cheng et al 2001**). Elle se distingue des enzymes NOX 1-4 par la présence d'une longue terminaison NH2 intracellulaire contenant quatre domaines « EF hand » capables de fixer le calcium. Concernant sa masse moléculaire, NOX5 est décrit comme une protéine de 85 kDa, égale au poids théorique calculé, ce qui suggère que la protéine ne serait pas glycosylée.

L'expression de l'ARNm de NOX5 est décrite dans les testicules, la rate, les ganglions lymphatiques, le muscle lisse vasculaire, la moelle osseuse, le pancréas, le placenta, l'ovaire, l'utérus, l'estomac et dans divers tissus du fœtus.

L'activité de NOX5 ne nécessite pas le partenaire p22phox, comme démontré par la suppression de p22phox par siRNA qui d'ordinaire diminue l'activité des NOX 1 à 4.

NOX5 ne nécessite pas de sous-unités cytosoliques et a été démontrée fonctionnant dans un système sans protéines cytosoliques. L'activation de NOX5 est médiée par une augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique.

#### e. Les DUOXs 1 et 2

Les DUOX, appelées à l'origine THOX pour « Thyroid Oxidase », ont été clonées à partir de glandes thyroïdes humaines (*Morand et al, 2009*). Il a été récemment montré que la Duox-1 serait exprimée dans l'épithélium pulmonaire et Duox-2 dans l'épithélium salivaire et digestif. Les Duox-1 et 2 possèdent 83 % d'homologie entre elles, et contiennent un domaine transmembranaire additionnel et deux domaines EF hand de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### f. La NADPH Oxydase 4

NOX4 a été initialement identifiée comme une NADPH Oxydase fortement exprimée dans le rein (*Ambasta et al 2004, Martyn et al, 2005*). Mais NOX4 reste l'isoforme exprimé de façon la plus ubiquitaire. C'est l'isoforme qui partage le moins d'homologie avec les autres NOX. En effet, elle ne possède que 39% d'homologie avec NOX2. Une étude de la masse moléculaire de NOX4 par immunoblot révèle deux bandes: l'une de 75 -80 kDa et l'autre de 65 kDa, que ce soit réalisé sur des extraits de cellules exprimant NOX4 de façon endogène ou après surexpression exogène (muscle lisse et cellules Cos7).

En plus de son expression forte dans les reins, l'ARN messager de NOX4 est également trouvé dans les ostéoclastes, les cellules endothéliales, les cellules de muscle lisse ainsi que de nombreux autres types cellulaires. La NADPH oxydase Nox4 est en fait l'oxydase qui est exprimée de façon la plus ubiquitaire dans les tissus humain. L'induction de l'expression d'ARNm de NOX4 est observée en réponse au stress du réticulum endoplasmique et en réponse à un stimulus TNF dans les muscles lisses.

Dans les cellules primaires, NOX4 est principalement observée dans le réticulum endoplasmique (RE). Bien qu'un rôle fonctionnel pour NOX4 dans le RE soit tout à fait possible, une telle localisation peut également représenter une accumulation au niveau de son site de synthèse. L'expression de NOX4 dans le noyau est suggérée par plusieurs arguments (microscopie confocale, microscopie électronique, des immunoblots sur des extraits nucléaires, et la génération de ROS nucléaires). Cependant, il est difficile de comprendre comment une protéine qui possède 6 passages

transmembranaires peut se retrouver dans un espace libre sans membrane, tel que l'intérieur du noyau. Sa localisation à la membrane plasmique, montré par un travail réalisé au laboratoire (**Leilei Zhang. Nox4 : structure/fonction protéomique recombinante et approche immunologique. 2011**) mais également par d'autres équipes (**Chen et al 2009, Von Löhneysen et al 2010**) pourrait désigner NOX4 comme faisant partie d'une famille de réductases membranaires impliquées dans le transfert d'électrons de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule: le Plasma Membrane Oxydo Reductase (PMOR), dont la fonction peut être réalisée par des complexes enzymatiques dont la composition peut être variable.

## II- La NOX4, cible thérapeutique dans l'arthrose

### A- NOX4 et l'arthrose

Les maladies ostéoarticulaires représentent la cause la plus fréquente de douleurs chroniques et d'invalidité. Des centaines de millions d'individus sont touchés à travers le monde. L'arthrose reste la maladie ostéoarticulaire la plus fréquente, elle touche plus de la moitié de la population âgée en France, entraînant des conséquences socio-économiques majeures. L'arthrose se caractérise dans un premier temps par la destruction du cartilage avant de s'étendre ensuite à toutes les structures de l'articulation, notamment l'os et le tissu synovial.

#### 1) Epidémiologie de l'arthrose

En France, l'arthrose touche 17 % de la population, soit 9 à 10 millions de français. Parmi les personnes âgées, 68 % des personnes atteintes d'arthrose ont plus de 50 ans, 50 % des personnes ont de l'arthrose après 65 ans et 85 % des personnes sont touchées après 70 ans (**Le Pen C. et al 2005, Yelin E. et al 1995**). Concernant le sexe, les hommes et les femmes sont touchés de façon identique jusqu'à la cinquantaine, ensuite, les femmes sont plus nombreuses à être concernées, sans doute pour des raisons hormonales.

L'arthrose est très répandue dans les populations âgées. Elle touche un grand nombre d'articulations différentes, notamment les articulations inter-phalangiennes, carpo-

métacarpiennes, colonne vertébrale, hanche, genou, 1ère métatarso-phalangienne et épargne le plus souvent la cheville, le poignet ou le coude.

Cependant, il ne faut pas négliger le fait que l'arthrose peut aussi se retrouver chez des personnes jeunes, en particulier l'arthrose des doigts ou du genou.

Il a été décrit que certains facteurs pouvaient augmenter le risque d'arthrose, comme l'obésité pour le genou, ce qui explique en partie pourquoi l'arthrose touche des personnes de plus en plus jeunes. Le diabète a également été mentionné comme un facteur de risque. Pour les femmes, une hypothèse suggère que les œstrogènes pourraient jouer un rôle protecteur contre l'arthrose, ce qui expliquerait l'augmentation de fréquence de la maladie après la ménopause.

Le facteur héréditaire aurait également une importance notamment dans l'arthrose des doigts où l'on retrouve des atteintes de mère en fille. Des travaux récents de biologie moléculaire ont montré que certaines arthroses familiales touchant les hanches et les genoux étaient dues à une anomalie du gène codant pour le procollagène II. **(Figure 4)**

Zones concernées	Epidémiologie
<b>Colonne vertébrale</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- 85 % des hommes de plus de 50 ans</li><li>- 75 % des femmes de plus de 50 ans</li><li>- Peu de symptômes</li></ul>
<b>Mains</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Forme d'arthrose douloureuse la plus fréquente</li><li>- Les femmes sont les plus touchées</li><li>- Forte composante familiale</li></ul>
<b>Genoux</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- 1/3 des personnes de plus de 60 ans</li><li>- Douloureuse chez 6,6 % des femmes et 4,7 % des hommes</li></ul>
<b>Hanches</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Invalidante</li><li>- Touche environ 3 % des adultes (sa prévalence varie de 1 à 3,9 % chez les hommes et de 0,8 à 5,1 % chez les femmes).</li></ul>

**Figure 4 : Localisation de l'arthrose et épidémiologie**

(<http://www.lesitedelarthrose.com>)

## a- Physiopathologie de la maladie arthrosique et Structure du cartilage

Le cartilage est un tissu conjonctif souple, parfois élastique, qui recouvre les deux extrémités épiphysaires des os. Le cartilage est composé d'un unique type cellulaire de forme arrondie, les chondrocytes, inclus dans des logettes nommées chondroplast, au sein d'une matrice extracellulaire constituée de glycosaminoglycanes et de collagène. Le rôle essentiel de cette matrice, dû à ses caractéristiques biomécaniques particulières, est d'assurer un bon glissement entre les pièces osseuses articulaires avec un coefficient de friction extrêmement bas (inférieur à celui d'un patin sur la glace) tout en amortissant et en répartissant les pressions, rendant les stress de contact les plus faibles possibles (**Vignon et al 1980**).

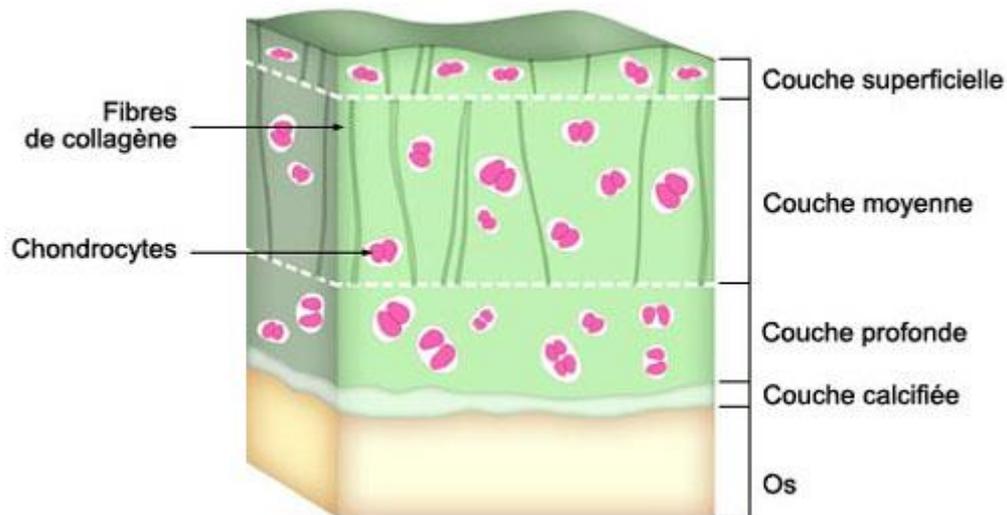
De la surface articulaire, vers l'os sous chondral, le cartilage articulaire est composé de quatre couches distinctes sur le plan histologique. La surface articulaire est acellulaire, elle est essentiellement composée de fibrilles de collagène. La composition, l'organisation et les propriétés biomécaniques du tissu cartilagineux ainsi que la morphologie adoptée par le chondrocyte varie en fonction de la profondeur du cartilage. Les différentes couches sont les suivantes (**Figure 5**) :

La zone superficielle (5 à 10%), sa fonction principale constitue le glissement entre les pièces articulaires. En contact avec le liquide synovial, elle est composée de chondrocytes et de fibres de collagène de type I et III orientées parallèlement à la surface articulaire.

La zone intermédiaire (40 à 45%) est riche en protéoglycanes, les chondrocytes sont arrondis, riches en organelles de synthèse et y sont plus actifs que dans la couche superficielle. Ils synthétisent du collagène de type II, IX et XI orienté obliquement à la surface.

La couche profonde (40 à 45%) est la plus riche en protéoglycanes et la plus pauvre en eau, les chondrocytes, abondamment présents, sont les plus actifs et présentent un aspect prolifératif dans la partie supérieure (en colonne). Les chondrocytes synthétisent du collagène de type II, IX et XI,

La couche calcifiée (5 à 10%) constitue l'interface entre le cartilage et l'os sous chondral. Elle est séparée de la couche profonde par un front de minéralisation. Les chondrocytes présentent un phénotype hypertrophique et synthétisent du collagène de type X. Au contact des fibres de collagène, ces cristaux permettent un enchevêtrement extrêmement dense des fibres



**Figure 5 : Structure du cartilage**

## **b- Les acteurs du cartilage**

### 1) Les chondrocytes :

Les chondrocytes sont les seules cellules représentées dans le cartilage hyalin. Elles sont d'origine mésenchymateuses et sont enfermées dans des logettes appelées chondroplastes. Ces cellules sont responsables de la synthèse et de la dégradation de la matrice extra cellulaire (MEC).

En termes d'organites, on observe les éléments habituels en quantité variable selon l'état fonctionnel du chondrocyte. Le chondrocyte jeune possède un noyau central nucléolé, un Réticulum Endoplasmique Granuleux (REG), un appareil de Golgi juxta-nucléaire, des vésicules, des mitochondries, des ribosomes libres, des inclusions lipidiques et de glycogène. Avec les temps, le REG et l'appareil de Golgi diminueront de taille. Le fait que l'articulation soit très peu vascularisée entraîne une faible pression partielle en oxygène, ce qui oblige le chondrocyte à s'adapter à ce manque. C'est pour cela que le chondrocyte privilégie la glycolyse anaérobie dans la production d'énergie. L'oxygène reste néanmoins indispensable pour sa fonction cellulaire.

## 2) La matrice extracellulaire (MEC):

La matrice extracellulaire est majoritairement composée d'eau (70 à 80%) ce qui permet une forte déformabilité du cartilage. Cette substance composée de fibres de collagène, de protéoglycanes et de macromolécules de nature polysaccharidique a une apparence compacte et translucide avec des reflets bleutés.

Le cartilage comporte en plus de l'eau, des sels, des glycosaminoglycanes, en particulier la chondroïtine-4-sulfate et la chondroïtine-6-sulfate et des kératanes sulfate. Ils sont liés à des protéines pour former des protéoglycanes.

## 3) Physiopathologie du cartilage dans l'arthrose

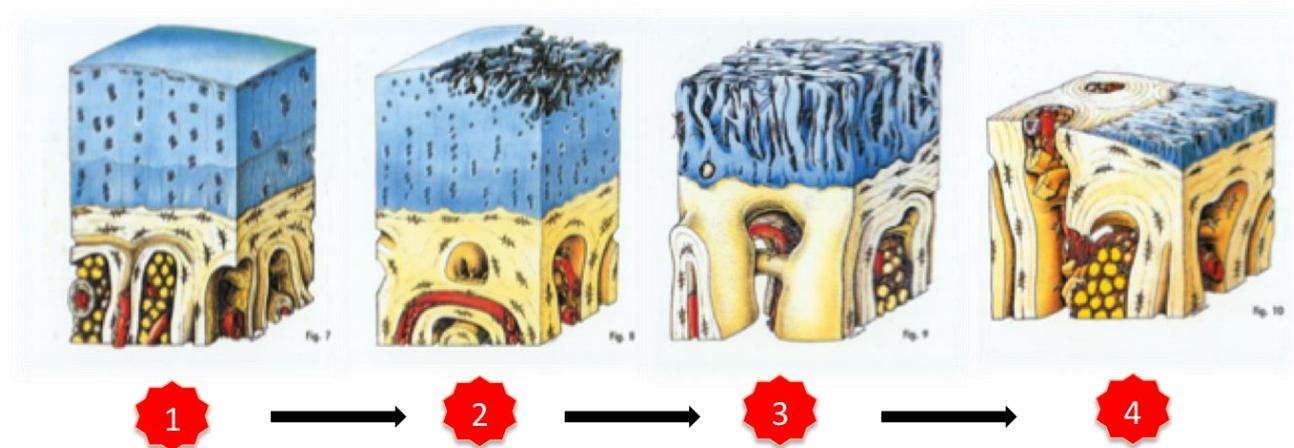
Sur un plan macroscopique, cette pathologie dégénérative correspond à une dégradation du cartilage. Progressivement apparaissent fissures, remaniements de l'os sous chondral et développement d'ostéophytes sur les zones non portantes pour aboutir aux pincements puis à la disparition de l'espace articulaire. Cette chronologie semble évoluer en trois stades :

Stade initial : le cartilage est œdématié. Cette réponse à l'agression initiale du tissu peut être assimilée à une tentative de réparation du cartilage sous l'effet de facteurs de croissance chondrocytaires, qui va échouer pour des raisons encore mal comprises. Ainsi l'activation des chondrocytes va augmenter leur activité anabolique et catabolique (**Buckwalter et coll. 1998**). Il y a surproduction de protéoglycanes qui entraînent une hyperhydratation néfaste, aboutissant au ramollissement du cartilage.

Stade intermédiaire : Apparition de fissures superficielles dues à une protéolyse matricielle augmentée. Il existe à ce stade, une hyperactivité catabolique des chondrocytes qui libèrent des cytokines pro inflammatoires, IL-1 $\beta$ , et le TNF- $\alpha$ . Sous l'influence de ces cytokines, les chondrocytes libèrent d'autres facteurs pro inflammatoires comme les dérivés radicalaires de l'oxygène, le monoxyde d'azote (NO), des enzymes protéolytiques (métalloprotéases et aggrecanases). En parallèle, les chondrocytes articulaires humains ont aussi une activité anabolique forte mais qui, progressivement, va s'épuiser aboutissant à la destruction du cartilage (destruction autocrine). Destruction d'autant plus rapide, que les cytokines produites (IL-1 et TNF), commandent aussi l'inhibition de la synthèse des composants naturels du cartilage (protéoglycanes et collagène). Finalement, défaut de réponse anabolique, déséquilibre entre enzymes et inhibiteurs, mort

cellulaire par nécrose, ou par apoptose du chondrocyte (**Loeser RF et al 2009**), s'additionnent et contribuent à la dégradation de la matrice extra cellulaire.

Stade final : La destruction gagne les couches profondes mettant à nu l'os sous chondral. Il persiste des chondrocytes hypertrophiques, ou en voie d'apoptose, ainsi qu'un tissu fibrocartilagineux. L'activation de la membrane synoviale, par les débris du cartilage libérés dans la cavité synoviale, pourrait contribuer à la chondrolyse, avec libération de métalloprotéases (MMPs), de cytokines telles que l'IL-1 et de dérivés radicalaires de l'oxygène. De même les altérations de l'os sous-chondral contribuent également à pérenniser la maladie. (**Figure 6**)



**Figure 6 : Processus de dégradation d'un cartilage arthrosique**

1 : Stade initial ; 2 et 3 : stades intermédiaires ; 4 : stade final

## **2) Le catabolisme matriciel : rôle des métalloprotéases**

Plusieurs protéases peuvent être à l'origine de la destruction du cartilage observée dans l'arthrose.

### **a- Les métalloprotéases (MMP)**

Les métalloprotéases (MMPs) forment une famille d'enzymes qui sont sécrétées principalement par les cellules participant à la réaction inflammatoire (**pour revue Gaudin coll. 1998**) mais aussi par d'autres types de cellules résidentes (cellules tumorales, fibroblastes, chondrocytes...). Ces enzymes sont synthétisées sous une forme latente inactive (pro enzyme) qui est activée *in vivo* par d'autres protéases, des substances radicalaires et *in vitro* par des composés comme des détergents ou encore la chaleur. L'activité de ces enzymes est contrôlée par des inhibiteurs spécifiques tissulaires les TIMPs (**Gomez, et coll. 1997**). Il existe trois niveaux de régulation des MMPs. Tout d'abord lors

de l'expression du gène (au niveau intracellulaire), ensuite dans le contrôle de leur activité par synthèse sous une forme inactive : le proenzyme (au niveau extracellulaire), et enfin par une compartimentation subcellulaire précise, soit dans des granules de sécrétion, soit par une fixation à la membrane plasmique ou aux constituants de la Matrice Extra Cellulaire (MEC). L'activation de ces metalloprotéases se fait par protéolyse en détachant le propeptide à l'extrémité N-terminale de la molécule et libère le site actif. Les peptidases activatrices sont nombreuses : plasmine, kalikréine, élastase, ou encore les MMPs elles-mêmes. Elles sont inhibées par l' $\alpha$ -macroglobuline et par des protéines inhibitrices telles que TIMP3 « Tissue Inhibitors of Matrix Metalloprotease », ils forment des complexes non covalents avec l'enzyme sous sa forme active. Les TIMP sont également des facteurs de croissance pour de nombreux types cellulaires. **(Figure 7)**

Enzymes	MMP's	Poids moléculaire		Principaux substrats matriciels
		NA	A (kDa)	
<b><u>Collagénase :</u></b>				
<b>Collagénase 1</b>	MMP-1	52	42	Collagènes II, III, I, VII, VIII, X
<b>Collagénase 2</b>	MMP-8	85	64	Collagènes II, III, I
<b>Collagénase 3</b>	MMP-3	52	42	Collagènes II, III, I, gélatines
<b>Collagénase 4</b>	MMP-18	53	42	
<b><u>Gélatinase :</u></b>				Gélatines, collagènes IV, V, VII, X
<b>Gélatinase A</b>	MMP-2	72	62	élastine, fibronectine
<b>Gélatinase B</b>	MMP-9	85	67	Gélatines, collagènes IV, V, VII, XI

				élastine,
<b><u>Stromélysine :</u></b>				Protéoglycannes, laminines,
<b>Stromélysine 1</b>	MMP-3	57	45	fibronectines, collagènes, II, III, IV,
<b>Stromélysine 2</b>	MMP-10	54	44	IX, gélatines
<b>Stromélysine 3</b>	MMP-11	64	46	Protéoglycannes, fibronectine, collagènes III, IV, V, gélatines
<b><u>Type</u></b>				
<b><u>membranaire :</u></b>				
<b>MT1-MMP</b>	MMP-14	66	54	Pro-gélatinase A, pro-collagénase
<b>MT2-MMP</b>	MMP-15	72	60	Pro-gélatinase A
<b>MT3-MMP</b>	MMP-16	64	53	
<b>MT4-MMP</b>	MMP-17	57	53	
<b><u>Autres :</u></b>				
<b>Matrilysine</b>	MMP-7	28	19	Elastine, collagène IV, laminine,
<b>Métalloélastase</b>	MMP-12	54	22	fibronectine, Amélogénine
<b>Sans nom usuel</b>	MMP-19	57	45	
<b>Enamélysine</b>	MMP-20	54	43	

Figure 7 : Les différentes familles de MMPs humaines

#### b- Les aggrecanases

Ces enzymes clivent la liaison Glu373- Ala374 de l'aggrecane et jouent un rôle majeur dans la dégradation de la matrice. Elles appartiennent à la famille des métalloprotéases et plus spécifiquement des ADAMTS. Les ADAMTS sont des métallopeptidases sécrétées dans le milieu extracellulaire ayant comme fonction le clivage de différents substrats de la matrice extracellulaire tel le collagène, l'aggrecane, ainsi que le facteur de Willebrand retrouvé dans le plasma. Il existe plusieurs mécanismes d'activation des ADAMTS : activation intracellulaire ou extracellulaire et inactivation extracellulaire par les convertases. L'inhibition de l'activation extracellulaire d'ADAMTS5, l'enzyme responsable de la dégradation du cartilage, serait une clef intéressante dans le traitement de l'arthrose.

### **3) Les ROS et l'arthrose : rôle de NOX4**

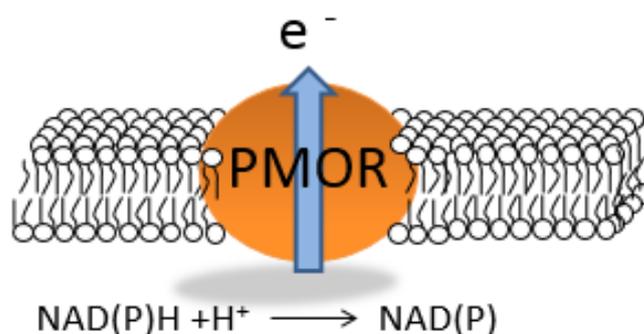
La lignée de chondrocytes humains immortalisés C-20/A4, a été développée et validée pour étudier le rôle des chondrocytes dans l'arthrose (*Henrotin Y et al 2005, Rousset et al 2013, Grange et al. 2006*). Les chondrocytes de cette lignée expriment NOX4 et son partenaire p22phox. Malgré la présence d'ARNm en faible quantité codant pour NOX2, cette oxydase est totalement inactive dans ces cellules. Les chondrocytes C-20/A4 augmentent leur production de ROS sous un stress cytokinique de type IL-1 $\beta$ . Dans ces mêmes cellules, et après surexpression des gènes codant pour NOX4 actif (NOX4A), ou NOX4 inactif (NOX4B), on observe une augmentation significative de la production de ROS associée à une hausse de l'expression de la collagénase MMP1, uniquement pour les cellules C-20/A4 surexprimant NOX4A comparativement aux cellules natives ou aux cellules exprimant NOX4B. La surexpression de l'isoforme NOX4B ou de l'oxydase NOX2, est incapable de produire des ROS, et n'a pas d'impact sur la synthèse de MMP1 (*Grange et al.2006*). Ces résultats suggèrent l'existence dans la lignée cellulaire C-20/A4, d'une voie de signalisation stimulée par l'interleukine IL-1 $\beta$ , dépendante de la production de ROS par NOX4 et ayant comme conséquence une protéolyse matricielle. On peut ainsi penser que dans l'arthrose, l'augmentation de la transcription du gène de la collagénase MMP1 est sous la dépendance d'un déséquilibre redox en faveur de la synthèse des ROS produits par NOX4 stimulée.

Dans les chondrocytes primaires, NOX4 semble être la seule oxydase présente. Par des expériences d'immunohistologie, une équipe japonaise a également montré la présence de NOX4 dans le cartilage de souris, mais il n'a pas été vérifié que l'expression de cette dernière pouvait être augmentée dans l'arthrose. La sous-unité stabilisatrice, p22phox et Poldip2, le partenaire activateur de Nox4, ont également été identifiés dans les chondrocytes ce qui suggérerait l'existence d'un complexe NADPH oxydase fonctionnel (*Rousset et al 2005*). Ainsi dans ces cellules, en réponse à l'IL-1 $\beta$ , une augmentation significative de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est observée de même qu'une augmentation de la synthèse des MMP1, MMP13 et de l'ADAMTS4. Par ailleurs, les inhibiteurs de NOX4, en réprimant la production de ROS, sont capables de diminuer la synthèse de ces métalloprotéases. Enfin, la stimulation des chondrocytes par l'IL-1 $\beta$  a pour effet d'augmenter sa propre synthèse. Ce rétrocontrôle positif favoriserait la persistance d'une inflammation localisée au sein du cartilage, et sa dégradation matricielle qui semble être sous la dépendance de NOX4. En effet, les inhibiteurs de NOX4 diminuent de manière significative l'expression de la cytokine. Ces résultats suggèrent donc que les ROS générés par NOX4 serviraient de relai pour les voies de

signalisation initiées par l'IL-1 $\beta$  conduisant à la protéolyse matricielle dans l'arthrose. L'hétérodimère NOX4/p22phox pourrait également être impliqué dans le maintien de l'environnement micro-inflammatoire nécessaire au processus arthrosique (*Rousset et al.2005*).

### III- L'activité réductase : rôle dans les érythrocytes

Les plasma membranes oxydo-réductases (PMORs) sont des systèmes de transport d'électrons transmembranaires présents dans toutes les membranes cellulaires (**Figure 8**) (*Crane et al 1978*). Ces systèmes ont été également décrits dans les érythrocytes humains (*Kennett et Kuchel, 2006*). Leur rôle le plus important est d'activer la réponse cellulaire à des changements redox dans l'environnement intra- et extracellulaire. Depuis toujours subsiste une certaine confusion sur la composition enzymatique de ces nombreux systèmes PMORs, certains de ces systèmes présentant des compositions variées incluant par exemple le cytochrome b ou bien le co-Enzyme Q10 (*Lawen et al. 2005*). L'accepteur d'électrons utilisé principalement pour étudier l'activité des oxydo-réductases membranaires est le ferricyanure qui est réduit en ferrocyanure. Une protéine en particulier a été purifiée à partir de préparations de membranes plasmiques érythrocytaires humaines et identifiée comme étant VDAC1 (*Baker et al, 2004*). Cette protéine est connue comme ayant une fonction PMOR dans les mitochondries. Un double rôle pour le VDAC1 à la membrane plasmique a été proposé, à savoir le maintien d'une homéostasie redox cellulaire et la régulation du volume cellulaire. L'expression de VDAC a été induite par un stimulus apoptotique dans la membrane plasmique de lignées de cellules neuronales, et le blocage de cette expression empêche l'apoptose (*Elinder et al, 2005, Sun et al. 1992*)



**Figure 8 : Système Plasma Membrane Oxydoréductase**

L'activité Plasma Membrane Oxydoréductase est portée par des enzymes ou des complexes multi protéiques pouvant varier de composition d'une cellule à l'autre. Ce système est responsable du transfert d'électrons de l'intérieur vers

l'extérieur de la cellule. Cette activité de transfert d'électrons localisée au niveau de la membrane plasmique, ubiquitaire, est impliquée dans de nombreux processus cellulaires ; comme la phosphorylation des protéines membranaires, le contrôle du pH interne, l'apoptose, la gestion du stress oxydant et le métabolisme énergétique.

### **1) Les Voltages Dependant Anion Channel (VDAC)**

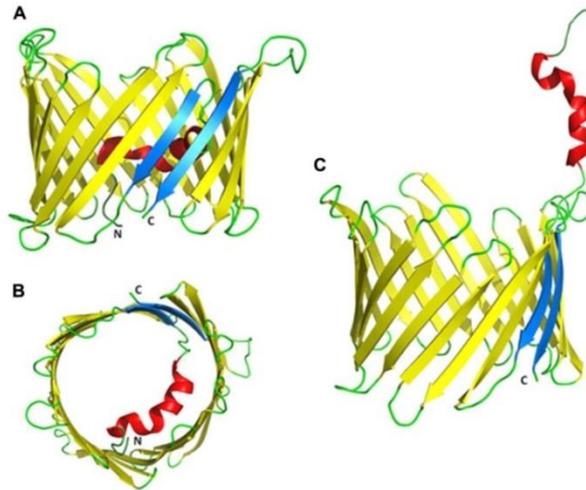
Les canaux anioniques voltages dépendants sont une classe de porine. Ces protéines majeures de la membrane mitochondriale externe des cellules eucaryotes forment des canaux anioniques voltage dépendants (VDAC) qui se comportent comme des pores de diffusion pour les petites molécules hydrophiles d'une taille d'environ 10 kDa. Les canaux adoptent une conformation ouverte lorsque le potentiel de membrane est faible ou nul et une conformation fermée lorsque ce dernier est au-dessus des 30-40 mV. Les porines VDAC facilitent l'échange d'ions et molécules entre les mitochondries et le cytosol.

D'un point de vue structural, VDAC est constituée de 280 acides aminés, et formée de 19 brins  $\beta$  et possède une taille avoisinant les 30 kDa. L'homme exprime trois isoformes de VDAC; VDAC1, VDAC2 et VDAC3.

### **2) Structure**

Les trois isoformes VDAC montrent des séquences, des structures similaires et la même organisation de gènes. Chez l'homme, VDAC1, VDAC2 et VDAC3 ont respectivement 2, 9 et 6 cystéines dans leurs séquences protéiques. Ces acides aminés sont orientés vers l'espace inter membranaire, ce qui fait d'eux une cible privilégiée pour l'oxydation par les ROS mitochondriaux. Ces cystéines ont également une fonction importante dans la stabilisation de la structure du pore.

VDAC1 a été décrite il y a maintenant 25 ans à la membrane externe mitochondriale. Son gène chez les cellules eucaryotes est bien connu, mais sa structure tertiaire n'a jamais été clairement déterminée, et est toujours très débattue (**Raghavan et al 2011**). Il semblerait qu'il y ait plusieurs brins bêta amphipathiques éventuellement organisés en un tonneau bêta. (**Figure 9**)



**Figure 9 : Structure tri-dimensionnelle proposée de VDAC 1**

(A) Vue latérale de la structure de VDAC1 murin après cristallisation aux rayons X 5 dans une représentation en ruban. Le tonneau  $\beta$  est formé par 19 brins  $\beta$  et l'hélice N-terminale est pliée à l'intérieur des pores. Les brins  $\beta$  1 et 19 sont parallèles et de couleur bleue. Les extrémités C- et N-terminales sont annotées comme C et N. Les boucles et les régions non structurées sont de couleur verte.

(B) Vue de dessus avec le VDAC1 N-terminale à l'intérieur du pore.

(C) Conformation VDAC1 proposée avec l'extrémité N-terminale à l'extérieur du canal où elle peut interagir avec d'autres protéines

VDAC1 a été récemment décrite comme étant une NADH réductase dans la membrane plasmique. Elle affecte la régulation de la croissance cellulaire ainsi que sa mort par apoptose (**Park et al. 2010**). La présence de VDAC dans la membrane plasmique établirait ici un nouveau niveau de régulation de l'apoptose par l'intermédiaire de l'activité redox de VDAC.

### **3) Fonction de VDAC à la membrane plasmique**

La porine VDAC est non seulement exprimée à la membrane externe de la mitochondrie mais elle est également retrouvée à la membrane plasmique. (**Shimada et al 2009**) ont démontré que VDAC possédait également une fonction réductase, donc PMOR à la membrane plasmique.

Les érythrocytes quant à eux, sont impliqués en tant que médiateurs du calibre vasculaire en raison de leur aptitude à libérer de l'ATP vasodilatatrice en réponse à des stimuli physiologiques ou bien pharmacologiques. Cette libération de l'ATP nécessite l'activation d'une voie de signalisation impliquant les protéines G ( $G_i$  ou  $G_s$ ), l'adénylcyclase ou encore la protéine kinase A. Bien que la pannexine 1 reste le canal principal et reconnu dans la libération de l'ATP dans le milieu extracellulaire, il ne participe pas au transport de l'ATP dans les globules rouges, ce qui suggère qu'une autre protéine pourrait être impliquée. VDAC1 étant présente dans les membranes des

globules rouges humains, elle pourrait avoir un rôle dans le phénomène de libération d'ATP et donc de régulation du tonus vasculaire (**Backer et al. 2004**).

## IV- VDAC et activité PMOR dans les érythrocytes

### 1) VDAC dans les érythrocytes

L'érythrocyte représente un modèle idéal afin d'étudier le rôle du complexe PMOR. Outre son abondance et son absence de mitochondries, cette cellule est soumise en permanence à un stress oxydant. Cette activité réductase est facilement mesurable par réduction du ferricyanure ou par réduction de dérivés du Tetrazolium (WST-1), mais la composition du complexe PMOR des érythrocytes reste encore un mystère.

La porine Voltage Dépendant Anion Channel 1 (VDAC1) est exprimée dans la membrane externe de la mitochondrie mais elle est également retrouvée à la membrane plasmique d'un grand nombre de cellules. Dans la mitochondrie, la surexpression de VDAC1 augmente la production d'ions superoxydes. En utilisant un inhibiteur de l'expression de VDAC, comme un siRNA anti VDAC, la production d'ion superoxyde par la mitochondrie diminue (**Shimada et al 2009**). VDAC, localisée à la membrane plasmique possède une fonction PMOR puisqu'elle est capable de réduire le Ferricyanide (**Backer et al 2004**). Comme l'ont montré **Shimizu et al 2001**, VDAC est exprimée à la membrane des érythrocytes. Pour confirmer cette localisation, des essais consistant à ajouter les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak recombinants ont montré une augmentation de l'hémolyse par le biais de VDAC.

Notre hypothèse est que VDAC pourrait être responsable de l'activité réductase (PMOR) dans les érythrocytes.

# OBJECTIFS

---

## **I- Partie I : NOX4, cible thérapeutique dans l'arthrose**

Parmi la famille des NADPH Oxydases, la NADPH Oxydase 4 reste l'isoforme la plus ubiquitaire au niveau tissulaire, et c'est par ce fait qu'elle se retrouve associée à de nombreuses pathologies liées au vieillissement, notamment dans la cancérisation, l'athérosclérose, la fibrose hépatique liée à l'hépatite C, la néphropathie diabétique ou bien l'arthrose, comme proposé par notre laboratoire.

En France, l'arthrose touche plus de 10 millions de patients, avec un impact socio-économique majeur. Malheureusement cette pathologie ne dispose pas d'outils thérapeutiques efficaces. Les nombreuses thérapies utilisées, notamment l'acétaminophène, les AINS, les inhibiteurs de la cyclo-oxygénase 2, l'acide hyaluronique, le chondroïtine sulfate et la glucosamine, ont une action limitée. Le défi actuel concernant l'arthrose est de découvrir et de développer des médicaments capables d'agir sur les phénomènes cellulaires et biochimiques à l'origine de l'atteinte articulaire, et n'agissant pas seulement sur les symptômes.

L'arthrose est la résultante de phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage. En cas de stress mécanique, les chondrocytes articulaires augmentent la sécrétion d'interleukine-1 $\beta$ , la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) ainsi que la synthèse de protéases matricielles : les métalloprotéases (MMPs). Notre projet a pour but :

- 1- De vérifier l'expression de l'isoforme Nox4 dans les chondrocytes primaires.**
- 2- D'identifier Nox4 comme source majeure des réactifs dérivés de l'oxygène dans les chondrocytes primaires humains stimulés à l'interleukine 1 bêta.**
- 3- De confirmer l'augmentation de production de MMPs 1 et 13 et ADAMTS4 par stimulation à l'interleukine 1 bêta sur les chondrocytes primaires.**
- 4- D'observer des variations d'expression d'ARNm codant pour NOX4 dans les chondrocytes primaires humains ostéoarthrosiques / sains.**
- 5- De moduler la quantité de ROS produite in vivo, grâce à un modèle murin ayant développé de l'arthrose et d'évaluer l'effet sur le développement de la maladie.**

## **II- Partie II : VDAC et activité PMOR dans les érythrocytes**

Les systèmes de transport d'électrons existent dans les membranes plasmiques de toutes les cellules. Bien que n'étant pas bien caractérisés, ils jouent un rôle dans la croissance cellulaire et la prolifération, ainsi que dans les réponses hormonales. Le Plasma membrane oxydoréductase system (PMOR) a comme rôle principal, de réguler l'homéostasie redox. Le PMOR est capable de réduire à la membrane des érythrocytes des accepteurs d'électrons tels que le Ferricyanide ou WST-1.

Au laboratoire, la capacité de réduction du WST-1 par les érythrocytes humains a été mesurée et la technique de mesure mise au point. Ce complexe aurait un rôle dans la défense antioxydante des érythrocytes, en réduisant le CoenzymeQ10 ainsi que les vitamines A et C. Mais la composition ainsi que le rôle exact du système PMOR des érythrocytes reste encore indéterminée.

Comme le montrent des résultats en Cytométrie et Western blot obtenus avec plusieurs anticorps différents, VDAC est exprimé à la membrane des érythrocytes mais son rôle dans ces cellules est totalement inconnu.

Nos objectifs sont les suivants :

- 1- Vérifier la fonction réductase de la porine VDAC.**
- 2- Confirmer l'expression de VDAC dans les membranes érythrocytaires humaines récupérées au sein notre laboratoire.**
- 3- Observer et moduler l'activité réductase des érythrocytes humains.**
- 4- Prouver le lien entre cette activité réductase et la présence de VDAC dans les membranes érythrocytaires humaines.**
- 5- Perfectionner une nouvelle technique d'enrichissement des érythrocytes avec la protéine VDAC par fusion avec des protéoliposomes.**

# MATERIELS ET METHODES

---

# I. Biologie cellulaire

## A- Culture cellulaire

Toutes les cellules quel que soit leur type sont mises en culture en atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

### 1) Entretien des cellules adhérentes

Après élimination du milieu de culture, les cellules adhérentes confluentes sont lavées en milieu DMEM dépourvu de sérum de veau fœtal (SVF), d'antibiotiques et de glutamine à pH=7.3. Les cellules sont ensuite traitées par trypsine EDTA (0.25%) jusqu'à leur décollement (contrôles réguliers à l'aide du microscope), la trypsine est neutralisée par l'addition de 10 volumes pour 1 de milieu DMEM complet (glucose, sodium pyruvate, 10% de SVF, antibiotiques). Les cellules peuvent être ensuite divisées en plusieurs boîtes de culture avec du milieu de culture complet dans des dilutions allant de 1:3 à 1:10 (en fonction du type cellulaire).

### 2) Cellules primaires : les chondrocytes articulaires humains (HAC)

Une culture primaire est une culture de cellules directement prélevées sur un tissu. Les cellules peuvent se diviser de façon très lente. Cette division s'arrête le plus souvent après quelques passages. Les chondrocytes primaires humains (HAC) sont dépourvus de capacités de migration et leur prolifération est quasi-inexistante dans le cartilage normal (*Chevalier et al 2005*). Ils consomment une quantité importante de glucose afin de le transformer en glucosamine, nécessaire la synthèse des protéoglycanes. Il faut compter environ 4 semaines pour que les HAC soit confluent dans une plaque 6 puits.

### 3) La lignée chondrocytaire C-20/A4

Une lignée cellulaire est une population homogène de cellules, ayant une capacité illimitée de division. Ces cellules sont rendues immortelles par traitement mutagène chimique ou physique ou par utilisation de virus oncogènes.

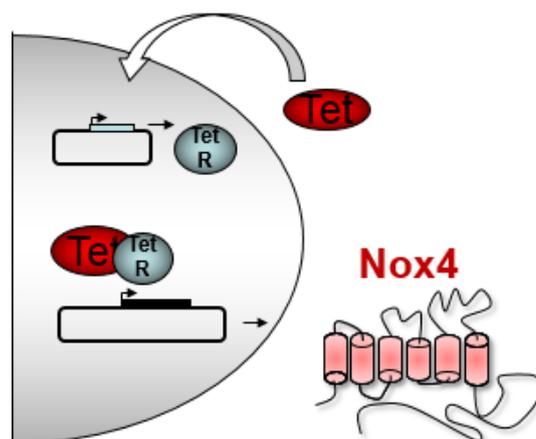
Dans ce cas, les cellules chondrocytaires C-20/A4 immortalisées par le virus SV40 (*Glodring et coll. 1994*) sont cultivées en milieu DMEM complet à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les chondrocytes sont repiqués une fois par semaine après décollement à la trypsine et cultivés en

grande flasque (175 cm<sup>2</sup>). A chaque repiquage, les cellules sont divisées en 1 :3 dans une nouvelle boîte.

#### 4) La lignée HEK 293 T-Rex NOX4

Les cellules HEK293 T-REx (Human Embryonic Kidney) sont des cellules issues de rein embryonnaire humain. Initialement de type fibroblastique, les HEK293 ont subi des transformations par les gènes E1A et E1B de l'adénovirus de type 5 (*Graham et al, 1977*).

Les cellules HEK293 T-REx sauvages (WT) expriment de manière stable la protéine « Tétracycline répresseur » provenant du plasmide pcDNA6/TR. (**Figure 10**) L'addition dans le milieu de culture de 5 µg/ml de blasticidine permet le maintien du plasmide permettant l'expression de cette protéine de façon stable. L'expression de Nox4 par les cellules HEK293 T-REx Nox4 se fait après ajout de tétracycline dans le milieu de culture, ce qui permet le retrait de l'inhibiteur (*Serrander et al 2007*).



**Figure 10 : Induction de l'expression de Nox4 par tétracycline**

Les cellules HEK 293 sont cultivées dans les mêmes conditions que la lignée C-20/A4, dans du DMEM complet en atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C. Leur entretien est bihebdomadaire avec une réduction du volume cellulaire de 1 :10 après chaque repiquage.

## **5) Conservation des cellules**

Les différents types cellulaires sont dénombrés puis ajustés à  $10^7$  cellules/ml dans du sérum de veau foetal contenant 10% volume à volume de Diméthylsulfoxyde (DMSO), aliquotés par fraction de 1 ml en cryotube et congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans un récipient contenant de l'isopropanol. Après 24h, les cryotubes sont stockés dans des bombonnes d'azote liquide.

La décongélation des cryotubes se fait par passage du tube dans un bain marie à  $37^{\circ}\text{C}$ . Après décongélation, les cellules sont immédiatement lavées 2 fois dans le milieu de culture adéquat complet, puis les cellules sont reprises dans 10 ml du milieu et mises en culture dans des flasques de  $25\text{ cm}^2$ . Le milieu est changé le lendemain puis les cellules sont cultivées selon les conditions classiques.

### ***B- Cytométrie en Flux***

Les origines de la Cytométrie en flux sont anciennes puisque c'est en 1934 que **Moldavan** conçut le premier appareil avec lequel il réalisait des numérations cellulaires. Dans les années 70, les chercheurs de Los Alamos et de Stanford associaient des méthodes de mesure individuelle du volume ou de la fluorescence de cellules entraînées par un flux avec des méthodes électrostatiques permettant le tri cellulaire dans des conditions vitales. La diffusion de la lumière compléta rapidement la liste des propriétés capables de discriminer plusieurs types cellulaires.

### **1) Principe**

La Cytométrie en flux est définie comme l'étude de cellules isolées entraînées par un flux liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser.

Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs:

- Aux propriétés optiques intrinsèques des particules, à leur structure interne, ou à l'auto fluorescence de certaines cellules comme les végétaux.
- Aux propriétés optiques de fluorescence induites par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires.

Ces signaux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur. (Figure 11)

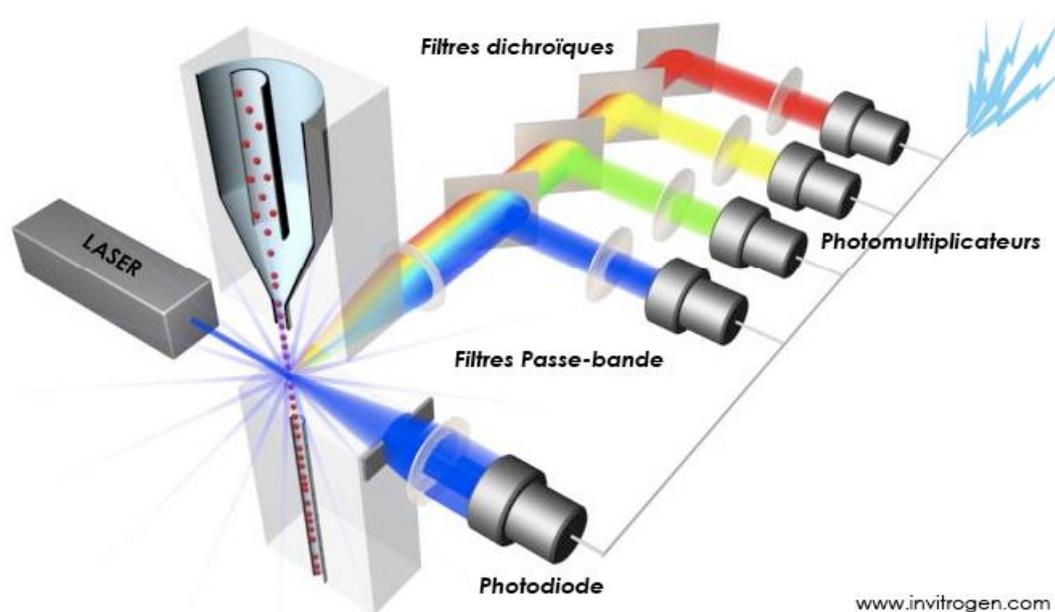


Figure 11 : Principe de Cytométrie en flux

## **2) Protocole d'analyse par Cytométrie en flux des érythrocytes**

### **a. Fixation et perméabilisation**

Les érythrocytes sont collectés le jour même sur tube héparine sans gel séparateur, lavés deux fois en PBS, puis ajustés à  $10^7$  cellules/ml dans une solution de PBS albumine 2%,  $\text{CaCl}_2$  0.5 mM. Les érythrocytes sont repris dans 2 ml de PBS Alb Calcium et le même volume de paraformaldéhyde (PFA) 4% (donc 2% final). Ils sont ensuite incubés 15 min dans de la glace, puis centrifugés 5 min à 400g, le surnageant est éliminé.

Afin de perméabiliser les cellules, le culot cellulaire préalablement fixé est repris dans 2 ml de PBS Albumine Calcium contenant 0.01% (vol/vol) de Saponine. Les cellules sont laissées 10 minutes sur la glace, centrifugées 5 min à 400g, puis lavées avec du PBS Albumine Calcium + 0.01% de Saponine.

### **b. Préparation et Immunomarquage des érythrocytes**

Le marquage est effectué en deux étapes. Un anticorps primaire monoclonal de souris, anti-VDAC1 (Abcam ab14734), est ajouté aux érythrocytes à marquer à raison de  $5 \mu\text{g}$  d'anticorps pour  $2 \cdot 10^6$  cellules pendant 30 minutes dans la glace. Les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS albumine

calcium. Intervient un second marquage avec l'anticorps secondaire anti-souris conjugué à un fluorochrome, ici l'Alexa Fluor 488 (abcam) pendant 30 minutes dans la glace. Les cellules sont à nouveau lavées deux fois avec du PBS albumine afin d'éliminer le marquage non spécifique, puis transférées dans un tube Falcon 5 ml (Becton Dickinson) avant acquisition au cytomètre en flux FACS Canto II et les résultats sont traités sur le logiciel FACS Diva VI.

Tubes contrôles :

- Erythrocytes seuls non marqués
- Erythrocytes fixés perméabilisés non marqués
- Erythrocytes + Ac secondaire fixés perméabilisés
- Erythrocytes + Ac secondaire fixés non perméabilisés

Conditions échantillons :

- Erythrocytes fixés marqués VDAC + Ac secondaire
- Erythrocytes fixés perméabilisés marqués VDAC + Ac secondaire

### ***C- Fusion des protéoliposomes***

Les liposomes sont de plus en plus développés dans la recherche comme vecteurs. Ils peuvent véhiculer plusieurs types de composés qu'ils soient hydrosolubles (encapsulés dans la phase aqueuse), liposolubles ou amphiphiles (empaquetés dans la bicouche lipidique). Ils ont une structure très proche de celle des membranes cellulaires, ce qui leur permet de fusionner avec elles en libérant le ou les principes actifs qu'ils contiennent. Nous avons choisi cette méthode grâce à sa simplicité d'exécution et son efficacité.

La transfection par protéoliposomes est l'un des moyens de transférer une protéine. Il s'agit d'une fusion de liposomes porteurs de la protéine, ici VDAC, à transférer dans la cellule cible. Cette technique est utilisée avec succès pour de nombreux types de cellules eucaryotes. Mais il n'existe que très peu de résultats publiés montrant une fusion de liposomes avec des érythrocytes (**Stoll C. et al 2011**), et aucun avec des protéoliposomes. La fusion se déroule en plusieurs étapes :

#### **1) Les différents types de liposomes et protéoliposomes utilisés**

SYNTHELIS est une société de biotechnologie offrant des services spécialisés dans le domaine des protéines membranaires : production, purification, caractérisation et vectorisation. Sa technologie d'expression permet de produire ces protéines rapidement avec un haut niveau d'activité et en

grande quantité (plusieurs mg) et sous deux formats possibles : en protéoliposomes ou solubilisés par des détergents.

La méthode établie par la société Synthelis met en présence 12µl de lysat de E. coli, 10 µl de mélange réactionnel, 12µl d'acides aminés, 1 µl de méthionine, 5 pi de tampon de reconstitution, et de 1pg de matrice d'ADN a été ajusté à 50µl avec de la RNase et de l'eau exempte de DNase. La réaction a été effectuée pendant 4 heures dans un agitateur à 30°C. La quantité de protéine synthétisée a été déterminée après la séparation des protéines sur des gels de polyacrylamide-SDS et coloration au bleu de Coomassie.

Nous testerons la fonction de ces différents liposomes en présence de WST-1 (10 Mm) et de NADH (1mM), afin de mesurer leur activité réductase. Nous les fusionnerons par la suite aux érythrocytes.

Dans le cadre de nos recherches, SYNTHELIS a synthétisé pour nous différents types de protéoliposomes :

- **Liposomes vides** : Il s'agit de simples liposomes, des vésicules artificielles formées par deux bicouches lipidiques, délimitant un compartiment aqueux.
- **Protéoliposomes VDAC**: Liposomes exprimant la protéine VDAC dans la bicouche lipidique.
- **Liposomes VDAC C -** : Liposomes ayant été traité comme les protéoliposome VDAC (contenant le matériel nécessaire à la l'expression de la protéine VDAC) mais n'ayant pas le plasmide pour la produire. Contrôle négatif des protéoliposomes VDAC.

## **2) Préparation des globules rouges**

Du sang prélevé du jour sur tube hépariné est lavé 3 fois au PBS et séparé de ses globules blancs ainsi que de ses plaquettes. Cette purification est vérifiée par une formule sanguine sur cytomètre en flux. Le culot, à 100% d'hématocrite, est dilué pour obtenir un hématocrite de 10%. Par exemple, 500µl de culot de GR sont mélangés avec 4.5 ml de PBS.

Certains de nos essais nécessitant uniquement les membranes érythrocytaires, le culot de globules rouges est lysé par exposition alternée au froid (-80°C) et au chaud (60°C). Le culot lysé est ensuite lavé abondamment au PBS, puis centrifugé pendant 10 min à 500g, jusqu'à ce que toute l'hémoglobine soit éliminée.

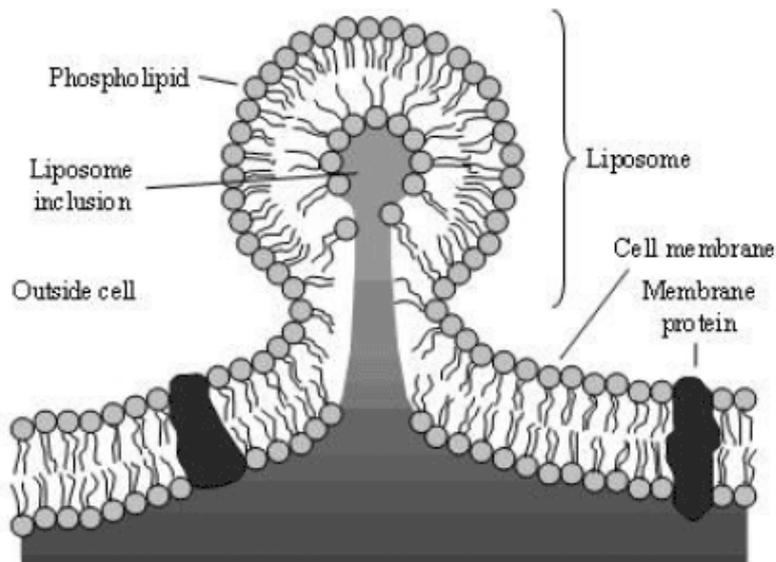


Figure 12 : Fusion d'un liposome à la membrane érythrocytaire

### **3) Fusion des différents échantillons**

Les échantillons sont préparés en tubes Eppendorf de 500µl à raison de 3 essais chacun. Pour cela, 200µl de GR à 10% d'hématocrite sont mis en présence d'une quantité de 30µg de liposomes par milieu réactionnel. Les essais sont ensuite incubés pendant 4 heures à 37°C sous légère agitation du bain marie. (**Figure 12**)

### **4) Séparation des liposomes par gradient de Ficoll**

Une fois la fusion effectuée, il est nécessaire d'éliminer les liposomes libres non fusionnés aux GR. Ces liposomes pouvant fausser les résultats d'activité réductase par le WST1. Les échantillons subissent alors 3 séparations successives par gradient de Ficoll. La séparation en gradient de densité est basée sur les différences de densité existant entre les liposomes et les autres cellules plus denses telles que les érythrocytes. Ce principe est appliqué pour isoler la majorité des liposomes des globules rouges fusionnés.

Est ajouté pour cela 2 volumes de GR fusionnés sur 3 volumes de Ficoll. Le Ficoll est un polysaccharide hydrophile neutre très ramifié, de masse élevée qui se dissout facilement dans des solutions aqueuses. Il est préparé par réaction du polysaccharide avec de l'épichlorhydrine. Le Ficoll est utilisé dans les laboratoires de biologie pour séparer le sang de ses composants (érythrocytes, leucocytes) Ici les 200µl de GR+Liposomes sont déposés sur 300µl de Ficoll. On effectue ensuite une centrifugation à 400g/30min avec accélération et décélération faible (de force 1). Les globules

rouge se retrouvent au fond du tube, contrairement aux protéoliposomes non fusionnés, qui eux se retrouve dans la partie supérieure du Ficoll.

## II. Biologie moléculaire

### A) Construction de plasmides

Le but de cette construction de plasmide est d'intégrer une séquence codante pour une protéine d'intérêt, ici NOX4, dans le plasmide pLNHX qui servira par la suite à produire un rétrovirus capable de faire produire à la cellule cible la protéine d'intérêt (Nox4). Le plasmide pLNHX possède un gène de résistance à l'ampicilline, 2 sites de restrictions Bgl II et Cla II et un gène nécessaire à la production du rétrovirus, ainsi que deux séquences d'intégrations (5'LTR et 3'LTR) dans le génome de la cellule cible. (Figure 13)

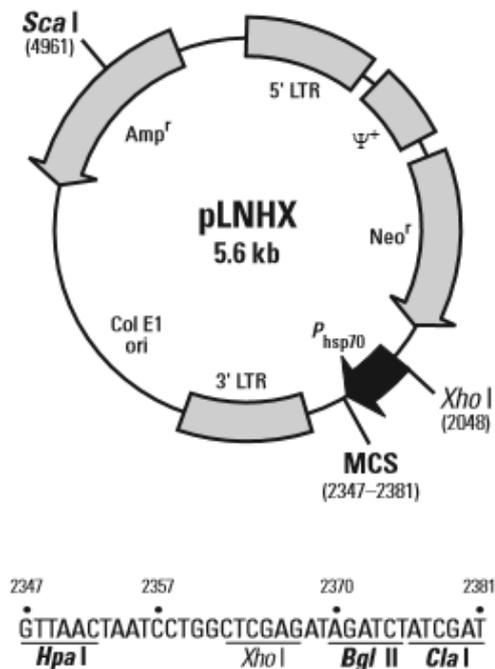


Figure 13 : Carte du plasmide pLNHX

### 1) Coupeure plasmidique

Afin de sortir la séquence codante NOX4 du vecteur pCDNA, le plasmide pLNHX vide ainsi que le plasmide pCDNA contenant Nox4 sont digérés par deux enzymes de restrictions Cla I et Bgl II à 37°C pendant 2h afin d'obtenir des extrémités cohésives. Une migration des produits de digestion sur gel d'agarose contenant du Bromure d'éthidium a été effectuée afin d'en confirmer la bonne taille. Les bandes correspondant au gène d'intérêt et au plasmide pLNHX coupé sont récupérées sous UV. L'ADN piégé dans agarose est extrait à l'aide du kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Pour cela, il est placé dans un tampon de dissolution pendant 10 min à 50°C selon les recommandations

du fabricant puis purifié sur mini colonne. L'ADN purifié est repris dans un volume de 30µL d'eau stérile distillée.

## **2) Ligation**

La séquence Nox4 a ensuite été insérée dans le plasmide pLNHX par une ligation effectuée à l'aide de la T4 DNA Ligase (Promega). L'insert est placé en concentration trois fois plus importante que le plasmide dans un milieu réactionnel contenant 20µL de tampon de ligation contenant de l'ATP ainsi que l'enzyme T4 DNA Ligase, à 14°C sur la nuit. Un contrôle est également réalisé sans insert pour vérifier que le plasmide pLNHX digéré ne se referme pas sur lui-même.

## **3) Transformation bactérienne**

Pour l'amplification du plasmide, nous utilisons des souches bactériennes d'Escherichia Coli compétentes DH5α et TOP10 (Invitrogen). Ces souches permettent après transformation l'amplification du plasmide d'intérêt. La sélection des bactéries ayant intégré le plasmide se fait par l'acquisition d'un phénotype de résistance à l'ampicilline conféré par le plasmide. Pour cela, 50 µL de bactéries DH5α ou TOP10 conservées à -80°C sont mises en contact avec le produit de ligation

Les bactéries subissent alors un premier choc thermique de 45 secondes à 42°C puis sont replacées dans la glace. Ce choc thermique permet l'entrée du plasmide dans les bactéries compétentes qui sont ensuite diluées dans 500 µL de milieu SOC (Sulfo-Oxidizing bacteria + 20 mM de glucose) et incubées pendant 45 min à 37°C sous légère agitation. Les bactéries sont ensuite étalées sur un milieu de culture solide, le LB Agar, un mélange de peptones, de levures et de NaCl (100g de Luria Broth pour 1L de solution finale), contenant un antibiotique de sélection comme l'Ampicilline (100 µg.mL<sup>-1</sup>) qui permettra la sélection des bactéries ayant intégré le plasmide. Les milieux sont incubés une nuit à 37°C, puis les colonies contenant le vecteur seront prélevées.

## **4) Mini-préparations d'ADN**

Une miniprep est une technique permettant d'extraire une petite quantité (100ng à 20µg) d'ADN sous forme de plasmide provenant de bactéries ayant subi une transformation, le plus souvent effectué sur Escherichia coli.

Un milieu de culture Luria Broth supplémenté d'Ampicilline (100µg.mL<sup>-1</sup>) estensemencé avec une colonie s'étant développée sur le milieu LB-agar antibiotique, provenant d'une bactérie transformée avec le plasmide. Après la croissance en milieux liquide, la culture est centrifugée à

13 000 g pendant 1 min. Le culot bactérien récupéré est ensuite traité selon les recommandations du fabricant du kit d'extraction plasmidique (QIAprep Spin Miniprep Kit de Qiagen). Ce protocole comprend une lyse bactérienne suivie d'une purification du plasmide sur colonne de silice. Grâce à ce kit nous pouvons récupérer jusqu'à 20µg d'ADN dans 50µL d'eau distillée stérile. La quantité de plasmide élué est ensuite dosée par utilisation du NanoDrop et peut être conservée à -20°C.

### ***B) Transfection de rétrovirus permettant l'expression de NOX4***

La transfection permet l'introduction délibérée d'acides nucléiques dans les cellules. Le mot transfection est un mélange de « transmission » et « d'infection ». Différents matériaux génétiques (tels que des plasmides ou siRNA), ou encore des protéines (anticorps), peuvent être transfectés.

La transfection de cellules animales implique généralement l'ouverture de pores transitoires dans la membrane cellulaire pour permettre l'absorption du matériel génétique. La transfection peut être effectuée en utilisant du phosphate de calcium, par électroporation, par pressage de la cellule ou par mélange d'un lipide cationique avec la substance à transférer pour produire des liposomes qui fusionnent avec la membrane cellulaire et déposent leur cargaison à l'intérieur.

Les rétrovirus représentent l'une des meilleures approches en thérapie génique. Les rétrovirus recombinants tels que le virus de la leucémie de Moloney ont la capacité d'intégrer les informations génétiques dans le génome de l'hôte de façon stable. Ils contiennent une transcriptase inverse qui permet cette intégration. En fonction du vecteur viral, la longueur maximale d'un ADN admissible pour la réplication est habituellement d'environ 8 à 10 kb. Bien que cela limite l'introduction de nombreuses séquences génomiques, la plupart des séquences d'ADNc peuvent y être logées.

Les virus sont créés à partir de cellules HEK GP2, qui sont optimisées pour cette production grâce aux gènes gag et pol qu'elles contiennent. Les cellules sont co-transfectées avec un plasmide qui contient le gène rétroviral d'intérêt, pLNHX NOX4 ou pLNHX GFP, et un plasmide d'enveloppe (pVSVg). Les GP2 vont alors produire des rétrovirus, qui contiennent le gène d'intérêt, dans le surnageant. Celui-ci est récupéré pour ensuite infecter les cellules cibles avec les virus qui permettent d'exprimer la GFP ou NOX4.

## ***C) Quantification d'ARN par RT-PCR quantitative***

### **1) Extraction d'ARN**

L'ARN total a été extrait à partir de culots dont le nombre de cellules est inférieur à 100 000 cellules pour RT-qPCR à l'aide du kit Nucleospin RNA XS (Macherey Nagel).

Dans chaque tube échantillon est ajouté un mix de TCEP (tris 2-carboxyéthyl phosphine) qui est un agent réducteur fréquemment utilisé dans la biochimie et des applications de biologie moléculaire ainsi que du tampon de lyse. Le tube est alors vigoureusement vortexé pour que l'ARN puisse être récupéré. On ajoute ensuite 5µl de Carrier RNA (4ng/µL) qui sera centrifugé quelques secondes avec une centrifugeuse de paillasse dans le but de réduire le pKa de la membrane de silice et la répulsion électrostatique entre l'ARN et la colonne, en augmentant ainsi l'adsorption de l'ARN.

Après centrifugation de quelques secondes à la centrifugeuse de paillasse, 100µL d'éthanol à 70% sont ajoutés dans la colonne en homogénéisant par pipetage afin de nettoyer le matériel génétique, l'éluat contenant l'ARN extrait est ensuite transféré dans une colonne de silice placée sur un tube collecteur. L'échantillon est centrifugé 30 secondes à 11000g.

L'échantillon est ensuite digéré avec une solution de rDNase au 1/100 (solution mère de 10 units/µl) pendant 15 min à température ambiante. La colonne est lavée 3 fois avec un tampon de lavage et l'ARN total extrait est élué dans de l'eau DEPC (diethylpyrocarbonate) (permettant l'inactivation des RNases). L'échantillon est conservé à -80°C.

### **2) Dosage des acides nucléiques**

Afin de doser les acides nucléiques ainsi que leur pureté, nous utilisons le spectrophotomètre « NanoDrop 2000c » ThermoScientific. Le NanoDrop 2000c est un spectrophotomètre UV-visible permettant de quantifier et d'évaluer la pureté des échantillons tels que les acides nucléiques à partir de volumes inférieurs à 1µl.

Les acides nucléiques ont la propriété d'absorber à 260 nm. Cette propriété permet de les doser par spectrophotométrie : 4 µl de la solution de plasmide est diluée dans 996 µl d'eau distillée dans une cuve en quartz et un spectre d'absorbance est effectué entre 240 et 340nm. La quantité d'ADN est calculée en appliquant les formules suivantes :  $D.O\ 260nm = 1$  pour  $[ARN] = 40\mu g/ml$  et  $D.O\ 260nm = 1$  pour  $[ADN] = 50\ \mu g/ml$ . La pureté de la préparation est évaluée en calculant le rapport

d'absorbance à 260nm / absorbance à 280nm caractéristique des protéines. Celui-ci doit être supérieur à 1 pour une bonne pureté.

### **3) Transcription inverse**

La transcriptase inverse ou rétrotranscriptase (en anglais reverse transcriptase) est à l'origine une enzyme utilisée par les rétrovirus et les rétrotransposons qui transcrit l'information génétique des virus à ARN en ADNc, pouvant s'intégrer dans le génome de l'hôte. La transcriptase inverse est utilisée dans le cadre d'une RT-PCR, pour quantifier l'ADNc proportionnel à la quantité d'ARN produit par la cellule dans un contexte donné.

Pour cela, 5µg d'ARN préalablement extrait et quantifié, 1.6µg d'amorce oligonucléotidique poly(dT), 20 unités de transcriptase inverse et 20 U d'inhibiteur de RNases sont placés dans un volume final de 20µl complété avec du tampon de réaction (Tris 20mM, KCL 50 mM, MgCl2 5mM, dNTP 1 mM, pH = 8.3). Le milieu réactionnel est placé dans un thermocycleur et suit le programme suivant :

<i><b>RT Etape 1</b></i>	<i><b>RT Etape 2</b></i>
10 min à 25°C	
30 min à 50°C	Ajout de 1µL de RNase H
5 min à 85°C	20 min à 37°C
+∞ à 4°C	

En fin de cycle, l'ADNc est récupéré à une concentration de 50ng/µL et dilué dans de l'eau PPI (eau pour préparation injectable) afin d'obtenir une concentration finale de 2ng/µL, concentration optimale pour effectuer la qPCR. L'ADNc est ensuite stocké à -20°C

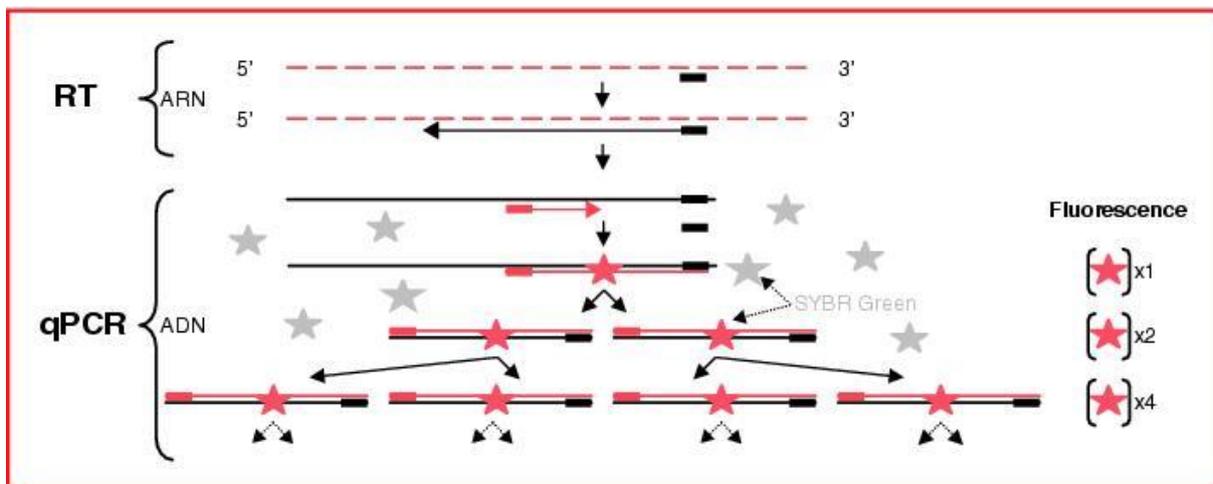
### **4) PCR quantitative**

La PCR quantitative permet de quantifier les transcrits produits par la cellule dans un contexte particulier. Cette quantification est normalisée par l'expression d'au moins 3 gènes de ménage (ici GAPDH, RPL27 et RPL22) et elle est relative à un témoin possédant le transcrit recherché. **(Figure 14)**

HUGO names	Forward sequence	Reverse sequence	Tm (°C)	Concentration nM
<b>Genes of interest</b>				
ADAMTS4	GAGGAGGAGATCGTGTTCCTCA	CCAGCTCTAGTAGCAGCGTC	60	400,00
COL2A1	TGGACGCCATGAAGGTTTTCT	GCTGCGGATGCTCTCAATCT	60	400,00
CYBA	CCCAGTGGTACTTTGGTGCC	GCGGTCATGTACTTCTGTCCC	60	400,00
CYBB	ACCGGGTTTATGATATCCACCT	GATTCGACAGACTGGCAAGA	60	<b>600,00</b>
EPAS1	GGACTTACACAGGTGGAGCTA	TCTCACGAATCTCCTCCTCATGGT	60	400,00
HMOX1	AGACTGCGTTCCTGCTCAACAT	GGGGCAGAATCTTGCACTTTGT	60	<b>600,00</b>
IL1b	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA	GTCGGAGATTCGTAGCTGGA	<b>59</b>	400,00
MMP1	GCTTACGAATTTGCCGACAGAG	TTCCTCAGAAAGAGCAGCATCG	<b>57</b>	400,00
MMP13	CCAGACTTCACGATGGCATTG	GGCATCTCCTCCATAATTTGGC	60	400,00
NOX4	CATTTACCCTCACAATGTGTCCA	GCAGAGGCTGACCTCATAGTT	60	<b>600,00</b>
TIMP1	AGAGTGTCTGCGGATACTTCC	CCAACAGTGTAGGTCTTGGTG	60	400,00
<b>House keeping genes</b>				
GAPDH	CATGAGAAGTATGACAACAGCCT	AGTCCTTCCACGATACCAAAGT	60	400,00
RPL27	TGGCTGGAATTGAC?????	CCTTGTGGGCATTAGGTGATTG	60	400,00
RPL32	TTAAGCGTAACTGGCGGAAAC	GAGCGATCTCGGCACAGTAA	60	400,00

**Figure 14 : Amorces utilisées en qRT-PCR**

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN par l'émission de fluorescence de sonde se fixant soit sur l'ADN double brin (technologie SYBR) où sur une séquence d'ADN précise (technologie Taqman et Beacon). Un seuil minimal de fluorescence est établi par le programme de la machine de PCR en temps réel. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil, le « Cycle Threshold » ou « Cycle seuil » est donné par l'automate Stratagène MxPro3005. C'est cette valeur qui est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative. (Figure 15)



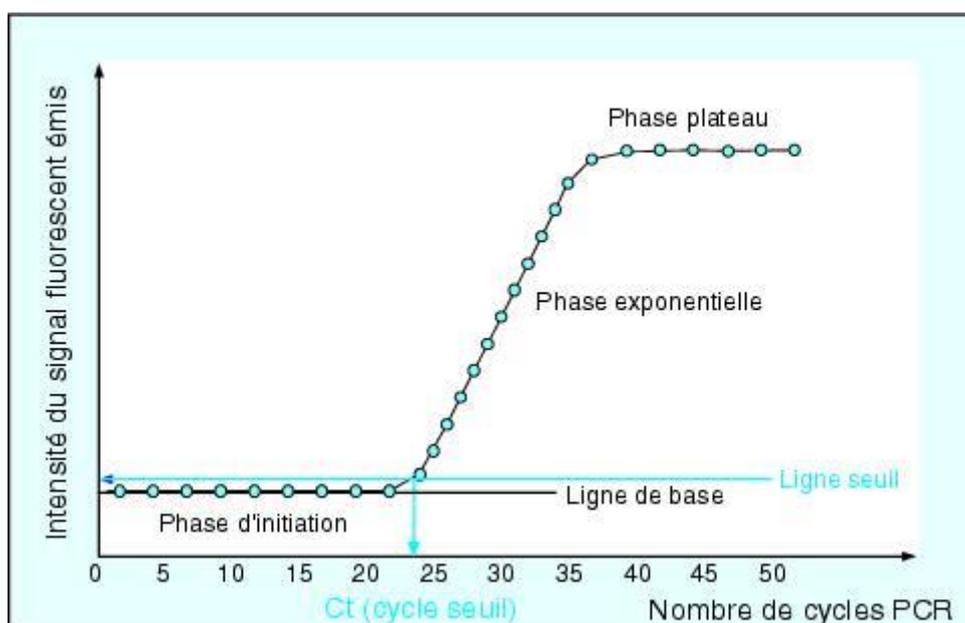
**Figure 15 : Principe de la PCR quantitative**

Dans un tube Eppendorf RNase Free, 23µL du mix du Kit SYBR Green (Qiagen) est réparti dans des micros tubes PCR (barrettes de 8 micro tubes MX3000P-5p Stratagène) et 2µL d'ADNc à 2ng/µL sont ajoutés pour avoir une concentration finale de 4ng. **(Figure 16)**

Mix pour 9 réactions	Ci	Cf	Vi (µL)	Vi (µL) dans le mix
<b>Master Mix</b>	2X	1X	12.5	112.5
<b>Amorce Forward</b>	10 µM	0.4 µM	1	9
<b>Amorce Reverse</b>	10 µM	0.4 µM	1	9
<b>RNase Free Water</b>			8.5	76.5

Le milieu réactionnel est placé dans un thermocycleur et suit le programme suivant :

<b>Profil Thermique</b>	
Activation enzyme	15 min 95°C 1X
Denaturation	15 sec 94°C 40X
hybridationExtension	30 sec 60°C 40X
Denaturation	30 sec 72°C 40X
	1 min 95°C 1X



**Figure 16 : Le suivi en temps réel d'une réaction PCR.**

### III. Biochimie

#### A- Méthodes d'analyse des protéines

##### 1) Western Blot

Un western blot, ou immunoblot, est une méthode de biochimie qui permet la détection de protéines spécifiques sur une membrane.

##### a- Solubilisation et dénaturation des protéines à analyser

Un volume de variable en fonction de la nature de chacun des échantillons est ajouté dans des tubes eppendorf de 500 $\mu$ l. 2 $\mu$ l de détergent Triton à 1% y sont ajoutés afin de solubiliser les protéines, on ajoute ensuite du SDS dans le but de les charger négativement pour permettre la migration différentielle des protéines en fonction de leurs tailles. Ces protéines sont ensuite mises en présence de 20 $\mu$ l de Sample Buffer 10X et de 2 $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoéthanol ce qui, couplé à une incubation d'une demi-heure à 60°C, les dénaturera afin de les dérouler complètement. Voici comment ont été traités les différents échantillons :

- Membranes érythrocytaires : 200  $\mu$ l de membranes reconstituées dans du PBS (concentration variable selon efficacité d'extraction)
- Chondrocytes primaires / C-20/ A4 : 50  $\mu$ l de lysat cellulaire reconstituées dans du PBS (150 pg de protéines totales)
- Surnageant cellulaire : 200  $\mu$ l du surnageant des chondrocytes primaires dénaturé. (10  $\mu$ g de protéines totales)

##### b- Préparation du gel polyacrylamide

Les différentes protéines de l'échantillon seront séparées en fonction de leur taille. Le gel confectionné ici est un des plus fréquemment utilisés ; le gel polyacrylamide. En fonction de la taille de la protéine recherchée, nous choisirons le pourcentage d'acrylamide approprié.

On utilise d'ordinaire un gel discontinu: c'est à dire qu'en haut du gel de migration (ou « running gel »), se trouve une bande plus petite d'acrylamide de composition différente, le gel de concentration ou « stacking gel ». Le stacking gel est un gel dit de « concentration », ses pores sont plus petits que ceux du gel de migration. Lorsque les protéines sont soumises au courant électrique, elles migrent dans le stacking gel et s'organisent en fonction de leur mobilité. Ce gel est composé

de 12% Acrylamide, 0.8% Bis, dH<sub>2</sub>O, 0.5M Tris pH 6.8, 10% SDS, de l'APS et 10µl TEMED pour la polymérisation.

La distance de migration dans le stacking est relativement courte. On ne peut pas parler de séparation des différentes espèces chimiques. Ces espèces ont juste le temps de s'organiser en trois bandes très proches, sous la forme d'un empilement. Le but du stacking gel est donc de concentrer les protéines en une bande fine. S'en suivra ensuite la migration proprement dite dans le « running gel » dans un tampon de migration Tris-Glycine 1X (Ultrapure Tris 25M, pH 8.6, 1.92M glycine et 1.0% SDS).

### c- Electrophorèse sur gel

Un volume spécifique à chacun des échantillons est déposé dans chaque puits du gel à l'aide d'une pipette. Les protéines des différents échantillons seront séparées selon leur taille. Dans ce gel polyacrylamide de 12%, les grosses protéines migreront relativement facilement à travers les mailles du gel et devraient être bien séparées. Un couloir est réservé à un « marqueur » ou « échelle standard », une mixture de protéines possédant des poids moléculaires avec des marques de taille de séparation définis permettant par la suite de situer la taille de la protéine d'intérêt recherchée. La migration dure 2h30.

### d- Transfert sur membrane

Une fois la migration effectuée, le gel est récupéré et la partie « stacking » est éliminée. Trois feuilles de papier Wattman imbibées de tampon de transfert (700mL d'eau distillée, 100mL de tampon Tris-Glycine 10X et 200mL d'éthanol 100%), le gel, une feuille de nitrocellulose et 3 autres papiers Wattman imbibés sont ensuite déposés dans un appareil de transfert électrophorétique. Cet ensemble est recouvert de tampon de transfert. **(Figure 17)**



Figure 17 : Organisation du transfert sur membrane de nitrocellulose

La fixation des protéines à la membrane se fait grâce à des interactions hydrophobes et ioniques entre la membrane et les protéines. La membrane de nitrocellulose est « collante », c'est-à-dire qu'elle lie toutes les protéines présentes dans l'échantillon de la même façon. L'étape de transfert à une durée de 2h30.

#### **e- Blocage et révélation**

La membrane de nitrocellulose ayant des propriétés de liaisons non spécifiques, il est important de saturer tous les sites de fixation. La membrane de nitrocellulose est pour cela trempée dans une solution de PBS Tween 1% à laquelle on ajoute 1% de lait sans matière grasse. Ainsi lors de l'ajout des anticorps primaires et secondaires, ces derniers pourront se lier uniquement aux épitopes de la protéine cible.

Après la saturation, 3 lavages de 5 min sont effectués dans du PBS Tween 1% afin d'éliminer tout excédent de protéines non liées. Les anticorps primaires sont dilués au 5000ème, ajoutés à la membrane de nitrocellulose et laissés en contact pendant une durée allant de 1h à 3h, selon l'anticorps. Les membranes sont lavés 3 fois au PBS Tween afin d'éliminer les Ac non fixés.

Une fois la membrane lavée, elle est incubée avec la solution d'ECL Enhanced Chemiluminescence) durant 3 min. En effet, les anticorps secondaires sont couplés à de la peroxydase, qui va réagir avec l'ECL et provoquer l'émission de lumière. Celle-ci est détectée par des caméras CCD qui restitueront une image numérique des bandes protéiques sur lesquelles se sont fixés les anticorps. L'image est analysée par densitométrie sur automate de lecture BioRad, permettant d'évaluer le taux relatif de marquage de la protéine d'intérêt, et la quantification des résultats en terme de densité optique.

**(Figure 18)**

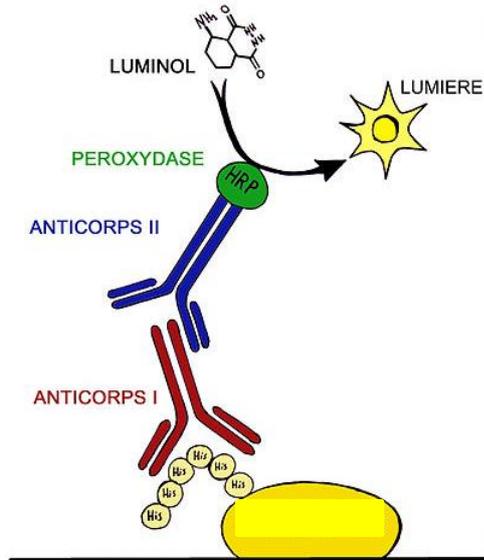


Figure 18 : Principe de révélation ECL

## **2) Quantification par méthode ELISA**

La méthode immuno-enzymatique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) correspond à un dosage immuno-enzymatique sur support solide. Cette méthode est principalement utilisée en immunologie pour détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon.

L'ELISA est une technique biochimique utilisant un ou deux anticorps. L'un de ceux-ci est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre réagit avec les complexes antigène-anticorps et est couplé à une enzyme. Cet anticorps secondaire permet, en présence d'un substrat chromogène, l'émission d'un signal par la production d'un produit coloré quantifiable.

Nous utilisons ici la méthode ELISA de type « sandwich ». Cette méthode présente de nombreux avantages comme une haute spécificité du fait que 2 anticorps sont utilisés pour capturer et détecter spécifiquement l'antigène. Cette méthode est appropriée pour les échantillons complexes, sans purification préalable. Enfin, elle permet une haute flexibilité et sensibilité car à la fois les méthodes de détection directe et indirecte peuvent être utilisées.

### **a- Récupération des membranes**

Le lysat de membranes érythrocytaires est récupéré comme décrit dans le matériel et méthode. Le lavage est répété plusieurs fois afin d'éliminer toute trace d'hémoglobine dans le surnageant. Par précaution, de l'anti protéase EDTA Free (Sigma-Aldrich cOMplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail) est ajouté au PBS et au culot de membrane afin d'éviter toute destruction des protéines d'intérêt présentes à leur surface.

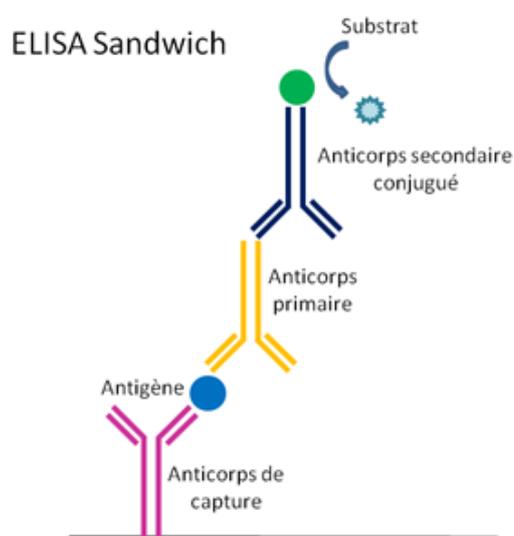
### **b- Protocole de marquage**

L'anticorps de capture anti-VDAC1 ab 28777 (Abcam) polyclonal est incubé toute la nuit à 4°C sous légère agitation dans une plaque 96 puits (Nunc 96-well plates Thermo Scientific) dans un volume de 100µl à 4µg/ml de PBS-Tween. Le lendemain, trois lavages de chaque puit avec 300µL PBS tween 1% sont effectués. Les sites non spécifiques sont saturés pendant 1h avec 300µL de Bovine Serum Albumine 1% (poids/volume) à température ambiante. Les puits sont de nouveau lavés 3 fois de suite au PBS tween.

Les protéoliposomes purifiés (gamme allant de 0 à 30µg) et les échantillons membranaires sont déposés dans la plaque et incubés 1 heure à température ambiante. Après trois nouveaux lavages, un premier anticorps primaire anti-VDAC1 ab 14734 (Abcam) monoclonal dilué au 1/1000ème est

incubé 1 heure à température ambiante, puis lavé 3 fois au PBS-Tween. Le lavage est suivi d'un second marquage d'une heure à température ambiante, à l'aide d'un anticorps secondaire anti-mouse couplé HRP (Goat anti-Mouse HRP - Thermo Fisher).

On incube à température ambiante et à l'obscurité pendant 10 minutes, une solution révélatrice contenant le substrat pour l'enzyme. L'apparition d'une coloration dans le substrat indique la présence de l'anticorps à doser. L'intensité de celle-ci est proportionnelle à la quantité d'enzyme présent et donc à la concentration d'anticorps dirigé contre la protéine recherchée. **(Figure 19)**



**Figure 19 : Principe de l'ELISA type "sandwich"**

## ***B- Mesure de l'activité oxydoréductase***

### **a- Amplex Red**

Cette technique de dosage en fluorescence permet de mesurer la production de peroxyde d'hydrogène par des cellules ayant une activité oxydase

La NADPH Oxydase 4 possède une activité constitutive et peut former des dérivés toxiques de l'oxygène (ROS). Le produit de réduction de l'oxygène par cet enzyme est l'anion superoxyde  $O_2^-$  qui peut se dismuter spontanément en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  ou par l'intermédiaire de la superoxyde dismutase SOD.

En présence de peroxydase (HRP), l'Amplex Red (10 acétyl 3,7 dihydroxyphenoxazine) réagit avec les  $H_2O_2$  formés avec une stœchiométrie de 1 :1 pour produire la résorufine, produit d'oxydation

fluorescent rouge, d'absorption maximum à 571 nm et émission maximum à 585nm. La fluorescence émise à 590nm après excitation à 530nm est proportionnelle à la quantité d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> totale formé par les cellules. On mesure ainsi la production d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des cellules par rapport à une gamme d'étalonnage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 5x10<sup>5</sup> cellules dans 20µl de PBS sont mises en présence de 100µl de milieu comun contenant 0.1U/ml de HRP et 50µM d'AmplexRed dans du PBS. La cinétique de fluorescence est suivie à raison d'une lecture par minute pendant 50 min par l'appareil FluoOmegaStar.

#### **b- Chimioluminescence**

Les ROS sont détectés à l'aide d'un dosage à base de luminol, qui permet la détection par chimioluminescence. Le dosage a été décrit à l'origine par *Kepler et al. (1989) (Albert et al, 2013)*.

La réaction se déroulant en milieu basique, les dérivés réactifs de l'oxygène (ici le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oxyde le luminol (3-aminophthalhydrazide). Le produit formé, le 3-aminophthalate, se trouve dans un niveau d'énergie excité et transfère cette énergie à un accepteur (porteur de luminescence). Ce dernier, afin de revenir à son état fondamental, libère un photon, d'où la luminescence.

Les cellules entières sont utilisées à 5x10<sup>5</sup> dans 50 µL de PBS 1X. 200 µL de milieu réactionnel sont ajoutés au culot cellulaire (Glucose 0.8M, Luminol 2mM, HRPO 500U/ml, PBS+ avec MgCl<sub>2</sub> et CaCl<sub>2</sub> 500 mM). Les échantillons sont incubés 1 minute à 37°C.

L'émission des photons est suivie pendant 1h30 avec une mesure toute les 30 secondes (500 itérations par mesure) par le luminomètre (Luminoscan Labssystem).

#### **c- Activité réductase par réduction du WST-1**

Les GR sont utilisés pour une mesure d'activité réductase avec le Water Soluble Tetrazolium-1 comme substrat. Le culot de GR est reconstitué dans 200 µl de tampon PBS afin d'obtenir une suspension d'érythrocytes à 10% d'hématocrite. 200 µl de WST1 à 10 mM, 1 µl de Para Méthyl Sulfamide (PMS) 0.25mM et 2 µl de glucose 500 mM sont ajouté à ces 200µl. Des contrôles négatifs en absence de GR, seulement avec 200 µl WST1 à 10 mM et 200 µl de tampon pour obtenir un volume final de 400 µl sont également effectués.

Après une incubation de 30 min à 37°C, le mélange réactionnel est centrifugé à 2000g/5min. 200 µl de surnageant sont récupéré et dilués au demi dans 200 µl de PBS en cuve spectrophotométrique

de 1ml pour une lecture optimale à 438 nm. Le témoin « blanc » est constitué du milieu réactionnel est traité comme un échantillon sans l'apport de globules rouges.

Ce même test a été réalisé en utilisant seulement les membranes de  $5 \times 10^5$  érythrocytes afin d'éliminer leur contenu, qui pourraient interférer dans le dosage des ROS.

## **IV. Expérimentation animale**

Les modèles animaux sont des outils indispensables dans la recherche biomédicale. Ils ont été utilisés depuis les débuts de la découverte scientifique et aujourd'hui encore, contribuent grandement à notre compréhension de la fonction des gènes individuels, les mécanismes de différentes maladies, ainsi que l'efficacité et la toxicité de divers médicaments et produits chimiques. Les génomes de plusieurs organismes modèles ont été séquencés, et de nombreux gènes sont conservés entre organismes modèles et humains.

### ***A- La souris C57/BL6***

La lignée C57BL/6, également appelée "C57Black 6", a l'avantage d'être une lignée stable et à reproduction facile. C'est aussi la première lignée de souris dont le génome a été entièrement séquencé en 2005. Les souris C57BL/6 sont utilisées dans trois domaines principaux :

- Le plus commun est de servir de modèles physiologiques ou pathologiques pour des expériences in vivo.
- Elles sont souvent utilisées pour construire des modèles de souris transgéniques.

Les souris C57BL/6 sont utilisées comme lignée de référence pour la génération de lignées congéniques avec des mutations spontanées ou induites.

Les souris C57/BL6 KO Nox4 ont été quant à elles créées au sein du laboratoire du Dr Karl Heinz Krauze.

### ***B- Objectifs scientifiques***

#### **1) Le projet**

La modulation de l'activité oxydase de Nox4 pourrait être un outil thérapeutique prometteur dans l'arthrose. Dans ce projet, nous prévoyons d'induire une arthrose par injection intra articulaire

bilatérale du genou d'iodo-acétate mono-sodium (MIA) ou d'interleukine 1 bêta, de souris C57Bl/6 et C57Bl/6-Nox4 KO. Deux groupes de huit souris C57Bl/6 seront traitées per os tous les jours par un inhibiteur spécifique de Nox4, pendant 8 semaines.

En fin de protocole, soit 8 semaines après l'injection de MIA, les souris seront euthanasiées par dislocation cérébrale.

## **2) Les animaux**

Nous utiliserons des souris adultes entre 4 et 6 semaines au début de l'expérience afin que l'âge n'interfère avec la maladie. Dans une étude récemment publiée (**Ambe K et al 2014**), les auteurs ont mis en évidence une expression importante de Nox4 dans les chondrocytes de souris âgées de 3 à 4 semaines par rapport aux souris âgées de 18 semaines. Ainsi, notre étude sera menée sur des souris adulte jeunes. L'utilisation de souris femelles pour le modèle d'arthrose permet de façon confortable l'élevage de 4-8 souris par cage donc dans un environnement social satisfaisant pour les animaux.

## **3) Points limites**

D'une manière générale, tout animal blessé ou souffrant est euthanasié. La durée des expérimentations est fixée à 8 semaines après l'injection pour toutes les souris. Cette durée limitée permet aux souris développant une arthrose de vivre avec un faible niveau de douleur ou de contrainte.

Une surveillance quotidienne des souris est réalisée et un index de souffrance est calculé selon les critères listés dans le tableau ci-dessous avec un score cumulatif limite de 3 au-delà duquel les souris sont sacrifiées de manière précoce comme indiquée. Les pesées sont hebdomadaires à partir du début de l'expérience, ainsi que le test du Rotarod, qui servira ainsi à estimer le degré de gêne fonctionnelle. (**Tableau 1**)

**Tableau 1 : Points limites adaptés**

<b><i>Modification physique</i></b>	Perte de poids de 10%	1
<b><i>Modification physique</i></b>	Perte de poids de 15%	2
<b><i>Modification physique</i></b>	Perte de poids de 20%	3

<b><i>Etat général</i></b>	Animal isolé	1
<b><i>Etat général</i></b>	Prostration	3
<b><i>Etat général</i></b>	Mobilité réduite	1
<b><i>Etat général</i></b>	Réduction des activités alimentaires et de toilette	1
<b><i>Etat général</i></b>	Plaie de léchage de la région douloureuse	2
<b><i>Phénotype arthrosique</i></b>	Temps sur le Rotarod <50% des contrôles	1
<b><i>Phénotype arthrosique</i></b>	Raideur du genou	2
<b><i>Phénotype arthrosique</i></b>	Paralysie des membres postérieurs	3

#### **4) Déclenchement de l'arthrose par injection bilatérale**

Afin d'anesthésier les souris, nous utilisons des injections i.p de kétamine 100mg/kg, et xylazine 10mg/kg, avant d'injecter les solutions de MIA et d'IL-1 $\beta$  dans les deux genoux.

Dans le cadre d'une étude pilote, nous utilisons 2 souris C57Bl/6 n'ayant subi aucune injection, afin d'obtenir la courbe normale de progrès sur le Rotarod, 2 animaux injectés avec du PBS pour vérifier l'innocuité de cette injection sous anesthésie générale et 4 animaux injectés MIA 600 $\mu$ g dans 10 $\mu$ l, ou IL1beta 2ng dans 10 $\mu$ l.

L'étude principale est organisée de manière à obtenir différents groupes de 8 souris :

- G1 : injectées avec le véhicule
- G2 : injectées avec le MIA 600 $\mu$ g, 10 $\mu$ l
- G3 : injectée avec l'IL1beta, 2ng, 10 $\mu$ l
- G5 : idem G3 et traitées per os comme G4 (IL1beta+traitement)
- G6 : Nox4 KO injectées avec le véhicule
- G7 : Nox4 KO malades (injectées avec le MIA ou IL1beta selon résultats de G5 et G5).

## 5) Surveillance des animaux

La durée des expérimentations est fixée à 8 semaines. Une semaine avant injection, les souris seront pesées et passées au Rotarod deux fois. Durant chaque semaine (8 semaines) il y aura pesée et passage au Rotarod pour suivre l'installation de la gène fonctionnelle. Les groupes G3 et G5 passeront 3 fois par semaine en raison de l'évolution rapide probable de la maladie. **(Figure 20)**

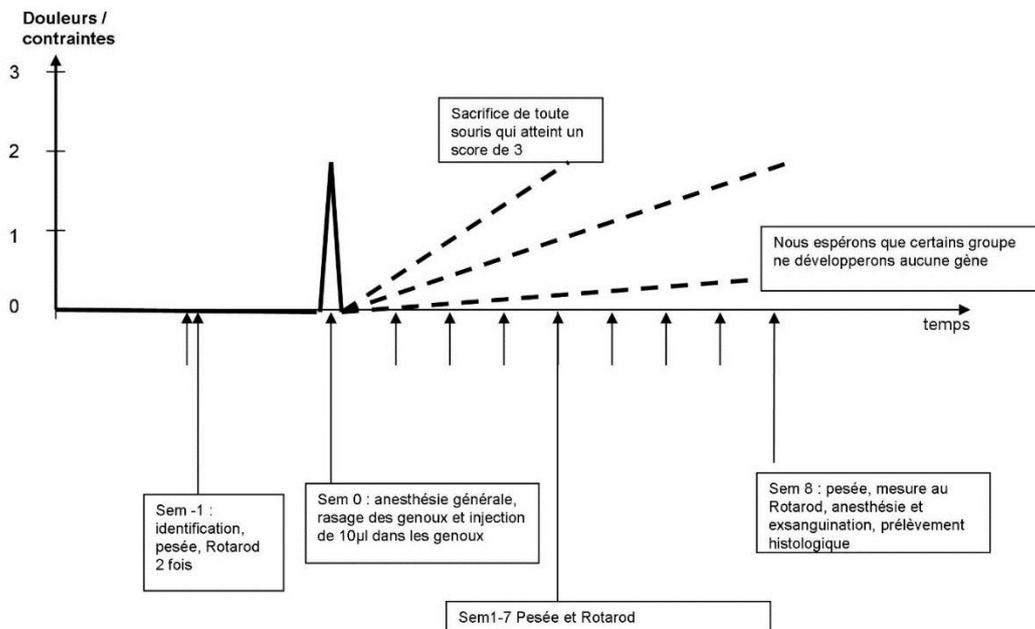
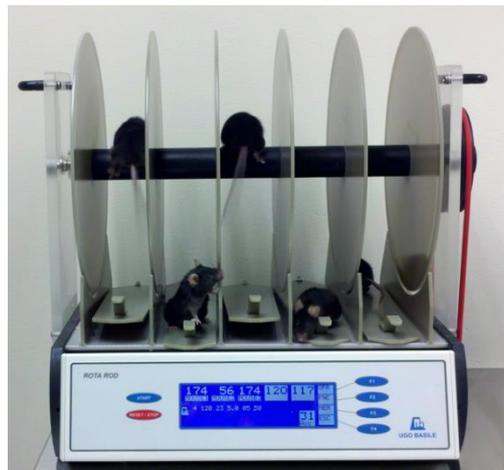


Figure 20 : Chronogramme

## 6) Test de motricité : le Rotarod

La coordination motrice est traditionnellement évaluée chez la souris et le rat par le test de la tige tournante. L'animal est placé sur une tige horizontale qui tourne autour de son axe longitudinal; l'animal doit rester en équilibre. Avant l'exécution de notre test, les souris ont été entraînées pendant plusieurs semaines deux à trois fois par semaine, afin qu'elles s'habituent à leur nouvel environnement et au Rotarod. Lors des tests finaux, 3 passages par souris ont été réalisés, et les moyennes de leurs performances (Vitesse et temps) ont été comparées. **(Figure 21)**



**Figure 21 : Test de motricité, le Rotarod**

Jusqu'à 5 animaux (rats ou souris) sont placés sur un barreau dont la vitesse et le temps de rotation est déterminé dans un programme progressif par l'expérimentateur. Le temps que met l'animal à tomber du barreau est un indice d'évaluation de l'équilibre, de la coordination sensori-motrice et d'endurance. Ce test est souvent utilisé pour mettre en évidence les effets d'une drogue ou d'une modification génétique sur la coordination motrice.

## 7) Histologie

Les prélèvements, quels qu'ils soient doivent être effectués avec le plus grand soin, car leur qualité conditionne directement les possibilités d'étude. Tout comme le cartilage humain, le cartilage murin sera détartré (Decalcifier SAKURA TDE 30, Bayer-teck Tissue), rincé dans de l'eau distillée et intégré dans de la paraffine. Des sections seront ensuite posées sur des lames de polylysine et déparaffinées par traitement au xylène. Les lames seront ensuite incubées pendant 40 min à 98 °C dans une solution d'EDTA à un pH de 8, traitées avec du peroxyde d'hydrogène à 3 % pendant 10 min à et incubées pendant une nuit avec un Anticorps mAb NOX48E9 (1/1250). Après 3 rinçages dans PBS du 1X, les lames seront incubées pendant 45 min avec un second anticorps conjugué à de

la peroxydase avant révélation. Le noyau sera coloré par l'hématoxyline. Sur le cartilage humain pour nos premiers résultats, cette étape à été réalisée en collaboration avec le Dr Corine Dupuy de l'institut Gustave Roussy.

La suite de notre projet concernant l'étude de NOX4 sur modèle murin consistera à une étude histologique de NOX4 dans les articulations des différents groupes et selon leur traitement. Les genoux des différents groupes ont d'ores et déjà été prélevés et fixés.

## **V. Analyses statistiques**

Toutes les données quantitatives ont été générées en utilisant des répliques biologiques en triple, sauf indication contraire, et sont exprimées en moyenne plus un intervalle de confiance de 95%. La normalité des données a été testée par un test Shapiro-Wilk. Pour chaque expérience, les valeurs de P ont été déterminées en utilisant un test de Student apparié. Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide de StatView (institut SAS, États-Unis).

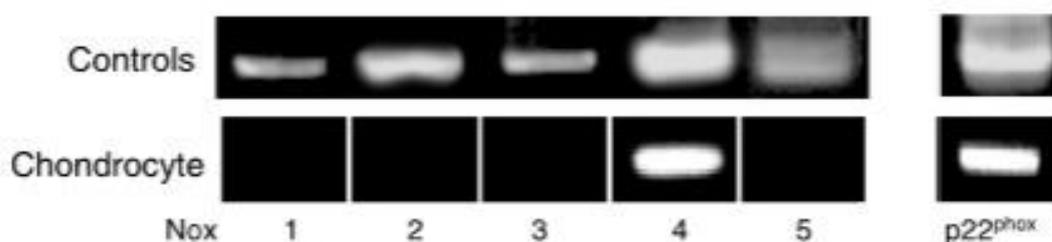
## RESULTATS : NOX4, CIBLE THERAPEUTIQUE DANS L'ARTHROSE

---

## I- NOX4 et les chondrocytes primaires

### A- Expression de l'isoforme Nox4 dans les chondrocytes primaires

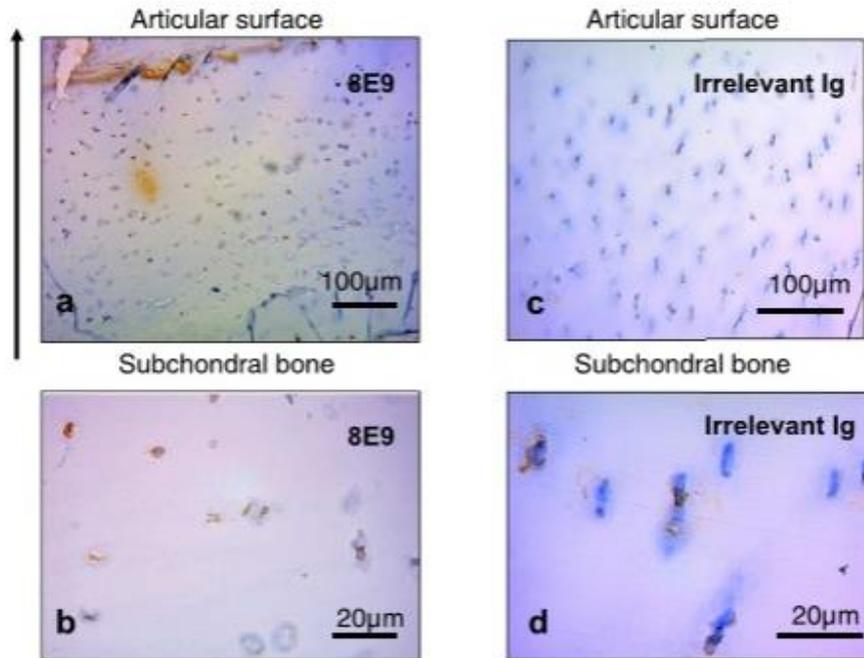
La famille des NOX, enzyme dédiées à la production de ROS, peut jouer un rôle majeur dans réponse à la stimulation par l'IL-1 $\beta$ , comme le suggère les résultats du laboratoire obtenus sur la lignée chondrocytaire C-20/A4. Pour confirmer cette hypothèse chez les patients, des chondrocytes articulaires humains (HAC) ont été isolés et cultivés après prélèvement sur têtes fémorales. L'expression de l'ARNm des différentes NADPH oxydases (NOX1 à NOX5) et de leur partenaire p22phox a été évaluée par RT-PCR. Conformément à nos données précédentes menées sur la lignée chondrocytaire C-20/A4, nous observons une expression de l'ARNm de NOX4 et de son partenaire p22phox dans les chondrocytes primaires humains. En revanche, l'ARNm des autres isoformes de NOX n'est pas détecté, désignant NOX4 comme la seule isoforme de NOX exprimée dans les HAC (**Figure 22**). L'absence de NOX2 a également été vérifiée par RT-PCR en temps réel.



**Figure 22 : Nox4 est la seule isoforme présente dans les chondrocytes primaires.**

L'ARN des HAC a été extrait (n = 3) et retro transcrit en ADNc comme décrit dans la section Matériels et Méthodes. Des amorces spécifiques ont été utilisées pour amplifier l'ADNc codant pour les NOX de 1 à 5 et leur partenaire p22phox. Des ADNc codant pour les NOX de 1 à 5 ainsi que pour p22phox ont été utilisés comme témoins positifs.

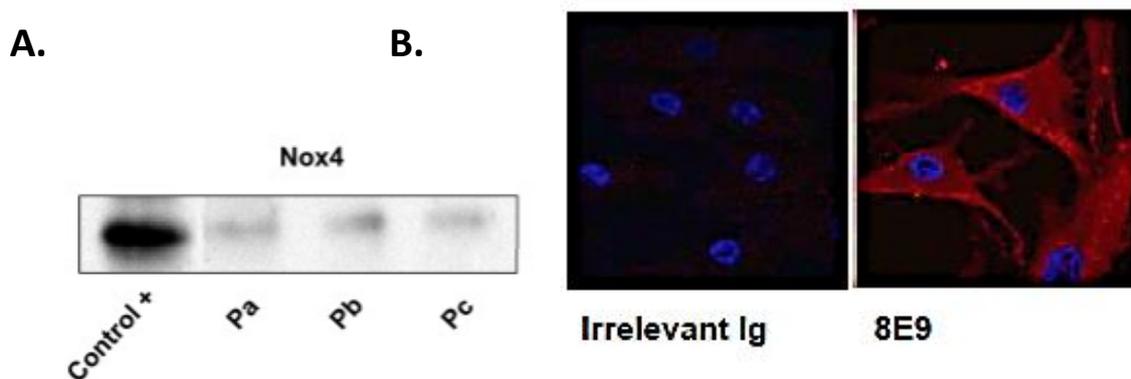
Pour confirmer l'expression de NOX4 au niveau protéique, des essais immunohistochimiques ont été réalisés sur des sections de cartilage humain de la hanche. Les résultats montrent un gradient d'expression de NOX4, faible en partant de l'os sous-chondral et plus important à la surface articulaire du cartilage (**Figure 23**). De plus, NOX4 a également été détectée ex vivo dans les chondrocytes primaires humains par Western Blot.



**Figure 23 : Expression graduelle de NOX4 in vivo dans les HAC.**

Marquage immunohistochimique de l'isoforme NOX4 sur des sections de cartilage humain par des anticorps mAb8E9 purifiés et des Ig non spécifiques. Photographié et imprimé à un grossissement final de x500 pour les images supérieures, et x1000 pour les images inférieures. NOX4 est exprimé progressivement dans le cartilage humain à partir du côté de l'os à la surface articulaire. Ce résultat est représentatif de n = 3 sections de cartilage.

Pour finir, la forte expression de NOX4 a été confirmée par microscopie confocale, notamment dans la région péri nucléaire et à côté de la membrane plasmique des HAC (**Figure 24**).



**Figure 24 : Expression protéique de NOX4 dans les HAC.**

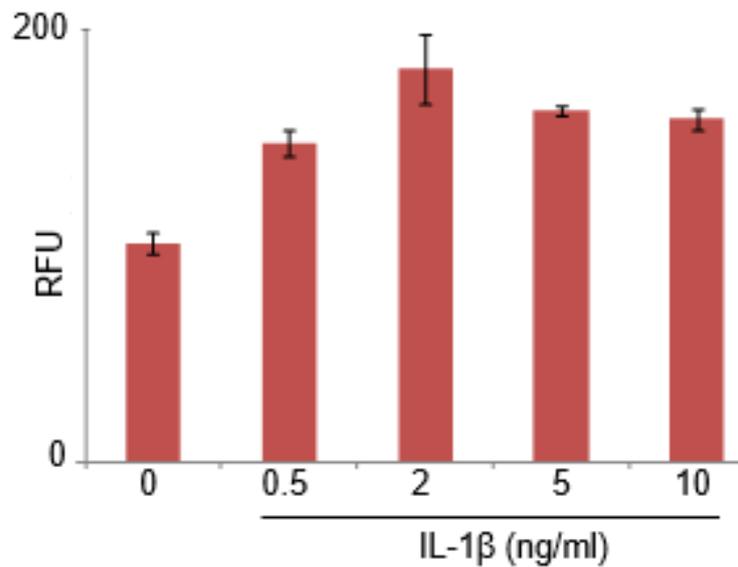
(A) L'expression et la localisation de NOX4 a été évaluée par immunoblot sur 150 µg de protéines totales humaines solubilisées dans 1% (v/v) de Triton X-100 (n = 3 patients). Le contrôle positif, a été obtenu à partir de cellules C-20/A4 NOX4. (B) Les chondrocytes primaires humains ont été cultivés ex vivo (passage 1) et fixés avec de la ParaFormaldéhyde, perméabilisés et ont été respectivement marqués s avec des IgM non spécifiques ou bien par des anticorps NOX4 8E9 (rouge). Le noyau est coloré avec du Hoechst 33256 (bleu). Ce résultat est représentatif de n = 3 patients.

Ces résultats de RT-PCR, de Western blot, d'immuno histochimie et de microscopie confocale montrent pour la première fois que NADPH Oxydase 4 est exprimée dans les chondrocytes primaires humains. Contrairement à la lignée de chondrocytes humains C-20/A4, NOX4 est la seule isoforme de NADPH oxydase à être exprimée. Dans le cartilage, NOX4 semble être plus exprimée vers la surface du cartilage. Au niveau de sa localisation sub-cellulaire NOX4 semble être plutôt exprimée de façon intracellulaire.

## II- L'Interleukine 1 Bêta et les ROS

### ***A- L'IL-1 $\beta$ module la production de ROS dans les chondrocytes humains***

L'interleukine 1 $\beta$  est l'une des principales cytokines impliquée dans l'arthrose et la plupart de ses effets biologiques sont médiés par la génération de ROS (*Poole et Howell 2001, Grange et al. 2006*). Le stress oxydatif ayant un rôle central dans l'arthrose, nous avons donc décidé d'étudier le rôle des ROS dans les chondrocytes primaires humains. Ces cellules ont été extraites de têtes fémorales après chirurgie. Nous avons d'abord évalué l'impact de l'IL-1 $\beta$  sur la production de ROS. Après 24h de stimulation par l'IL-1 $\beta$ , nous avons observé une augmentation significative de la production de ROS par les chondrocytes primaires humains avec une valeur optimale de 2 ng/ml d'IL-1 $\beta$ . (**Figure 25**)



**Figure 25 : Nox4 est une source majeure de ROS lors d'une stimulation par l'IL-1β dans les HAC.**

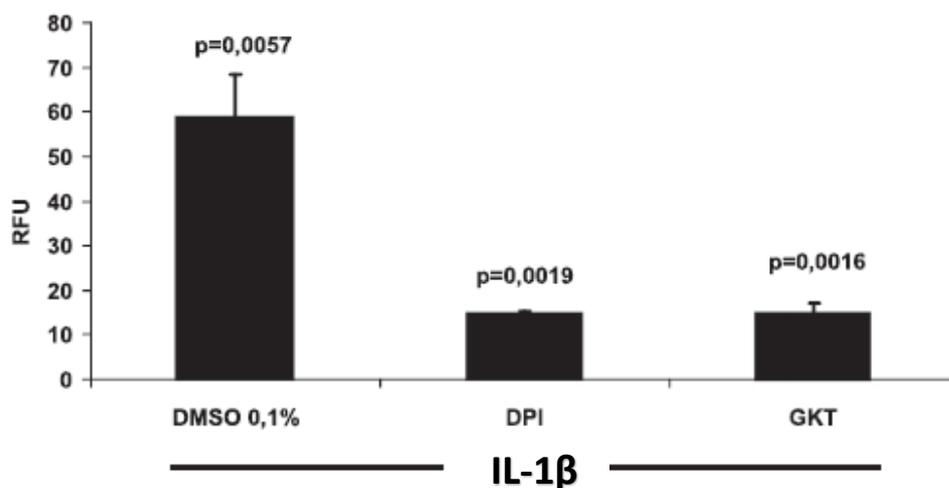
Les chondrocytes primaires humains ont été cultivés en l'absence de sérum de veau foetal et traités par l'IL-1β en quantité croissante (de 0 à 10 ng/ml) pendant 24h. Les cellules ont ensuite été recueillies et la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> totale a été évaluée par la méthode Amplex Red avec 5x10<sup>5</sup> cellules par puits. Les résultats sont exprimés en unités de fluorescence relative (RFU) et ont été acquis toutes les minutes pendant 60 min. Les valeurs représentent la moyenne +/- E.T. de trois déterminations obtenu le même jour et qui sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes

Ces résultats permettent de confirmer que non seulement l'IL-1β stimule la production de ROS dans les chondrocytes primaires humains, mais ils nous ont également permis, grâce à une gamme de concentration, d'établir le dosage optimal de 2 ng/ml d'interleukine pour laquelle la production de ROS est la plus importante.

### ***B- Modulation d'expression de Nox4 par l'IL1-β***

Nous avons ensuite étudié l'impact fonctionnel de NOX4 sur la production de ROS induite par l'IL-1β dans les chondrocytes primaires humains. Après 24h de stimulation par l'IL-1β à 2 ng/ml, nous avons observé une augmentation significative du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) produit par les HAC (**Figure 26**). Dans ces conditions expérimentales, nous constatons que l'addition de DPI, un inhibiteur des NADPH oxydases, entraîne une inhibition significative de la production de ROS provoquée par la stimulation par d'IL-1β, ce qui suggère un rôle des NOX dans la synthèse de ROS par les chondrocytes primaires humains. Sachant dorénavant que seule la NOX4 est exprimée dans

les HAC, ce résultat désigne NOX4 comme ayant un rôle dans la synthèse des ROS médiée par l'IL-1 $\beta$ .

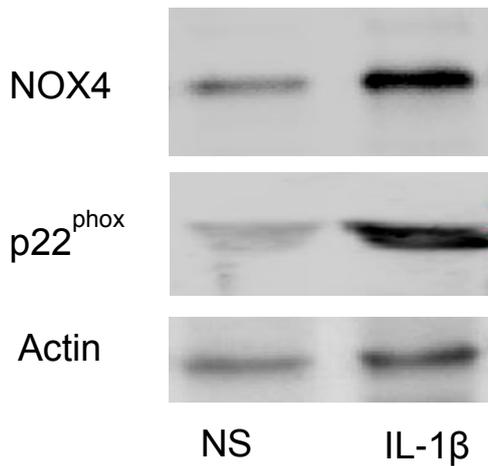
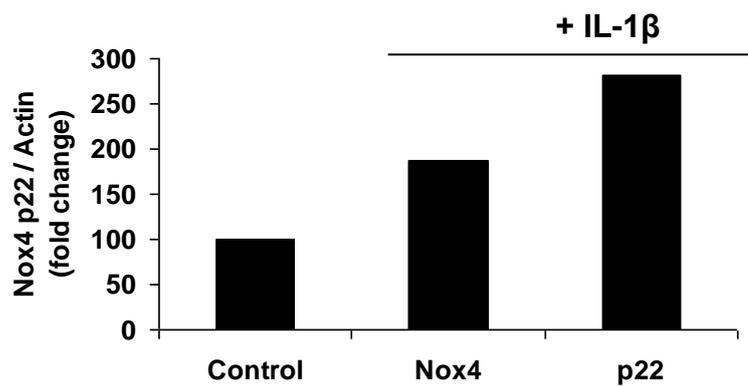


**Figure 26 : Etude de la production de ROS dans les HAC**

Les chondrocytes primaires humains ont été cultivés en l'absence de SVF pendant 24h et stimulés avec de l'IL1 $\beta$  pendant 24 heures. La production totale de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été évaluée par la méthode Amplex Red en utilisant 5x10<sup>5</sup> cellules par puits. Des inhibiteurs de NOX4: DPI, GKT 136 901 ainsi que leur vecteur, le DMSO (0,1%) ont été ajoutés dans les puits, 20 min avant de commencer l'expérience. Les résultats sont exprimés en unités relatives de fluorescence (RFU) et ont été acquis toutes les minutes pendant 60 min. Les valeurs représentent un intervalle de confiance de 95% et la moyenne de trois expériences (n = 3 patients).

En outre, l'utilisation de GKT 136901, un inhibiteur pharmacologique spécifique de NOX4, a montré un effet similaire. Le traitement avec des inhibiteurs de la NO synthase (L195 NOM) et de la chaîne respiratoire mitochondriale (comme l'azide ou encore la roténone), dans les chondrocytes primaires humains, n'a pas affecté la production de ROS mesurée détectée par la méthode de l'AmplexRed (**résultats non montrés**). Ces données renforcent l'idée que NOX4 serait la source principale de ROS lors d'une stimulation par l'IL-1 $\beta$  dans les HAC.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons évalué l'impact de l'IL-1 $\beta$  sur l'expression de NOX4 ainsi que de son partenaire p22phox. Les résultats montrent une augmentation significative des deux partenaires comme constaté par Western Blot (**Figure 27**).

**A.****B.**

### Figure 27 : Augmentation de Nox4 et de son partenaire p22phox lors d'une stimulation à l'IL1β

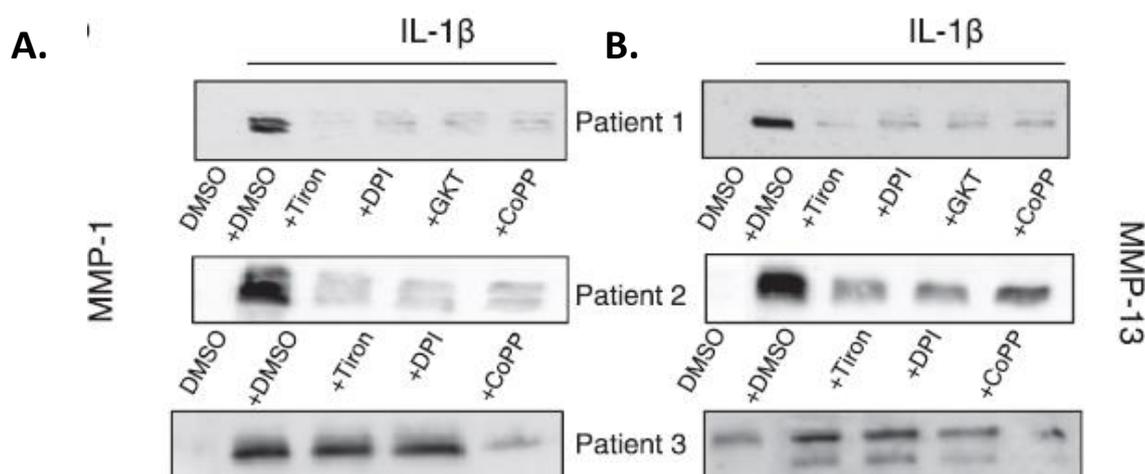
Western Blot révélant Nox4 et p22, réalisé à partir de 50 µg de de protéines d'un lysat en tampon RIPA et anti-protéases issu de chondrocytes primaires. Nox4 et p22phox sont mis en évidence par des anticorps primaires monoclonaux de lapin et de souris dirigés contre Nox4 et p22 et des anticorps secondaires anti Ig de lapin et de souris utilisés au 1/5000ème et couplé à de la peroxydase (A). L'immunodétection des bandes est issue de 5 min d'exposition à la caméra Bio-Rad avec le kit ECL. Nox4 p22 sont mis en évidence à 22 kDa et 65 KDa. Ce résultat est représentatif de n = 3 patients. (B)

Les différentes mesures d'activités ainsi que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des NADPH oxydases, de NOX4 ou d'autres sources potentielles de ROS désignent NOX4 comme étant la source principale de ROS médiée par l'IL-1b dans les HAC. Les résultats de western blot montrent une augmentation de l'expression du complexe NOX4/p22phox, ce qui suggère que le mécanisme conduisant à l'augmentation de la production de ROS par l'IL-1β dans les cellules HAC implique le complexe NOX4/p22.

### III- Conséquences de l'IL-1 $\beta$ sur l'expression des métalloprotéases

#### A- Production de MMP lors d'une stimulation à l'IL-1 $\beta$

Nous avons précédemment montré que les ROS générés par Nox4 régulaient la voie de synthèse de la métalloprotéase MMP-1 dans la lignée chondrocytaire C-20/A4 (Rousset et al, 2013). Dans cette lignée cellulaire, l'addition d'IL-1 $\beta$  par voie exogène conduit à une augmentation significative de la sécrétion de MMP-1 et MMP-13, sous la dépendance des ROS produits par NOX4. Nous avons donc voulu évaluer l'impact des ROS générés en réponse à l'IL-1 $\beta$  sur la synthèse et la libération de MMP cette fois-ci sur les chondrocytes primaires humains par deux techniques différentes, d'abord en Western blot (Figure 28) puis en RT-PCR (Figure 29).



**Figure 28 : Quantification de l'expression de MMP-1 et MMP-13 par les chondrocytes primaires suite à une stimulation à l'IL-1 $\beta$ .**

Les chondrocytes primaires humains ont été cultivés en l'absence de sérum de veau fœtal. Après un traitement de 24 heures avec de l'IL-1 $\beta$  et avec différents inhibiteurs (Tiron, DPI, COPP et GKT), les protéines ont été extraites à partir du surnageant de culture des chondrocytes (n = 3) et une analyse par Western Blot des métalloprotéases MMP-1 (A) et MMP-13 (B) a été réalisée.

D'une part, les résultats montrent une augmentation de l'expression des MMP-1 et MMP-13 significative dans les 3 patients différents analysés.

D'autre part, une forte induction de la transcription de l'ARNm de MMP-1, MMP-13 et ADAMTS4 a également été détectée par RT-PCR quantitative (Figure 29). Afin de déterminer le rôle de NOX4, nous avons traité les cellules avec différents inhibiteurs pendant 24 heures, le CoPP, le Tiron, le DPI

(inhibiteur des flavoprotéines) ou encore le GKT136901 (inhibiteur spécifique de NOX4) afin d'inhiber son activité. Nous avons pu constater que l'ajout de l'inhibiteur de NOX4, le CoPP diminuait considérablement la synthèse de MMP-1, MMP-13 stimulée par l'IL-1b. N'ayant pas l'anticorps dirigé contre ADAMTS4 au sein de notre laboratoire, nous n'avons pas pu vérifier son expression par western blot.

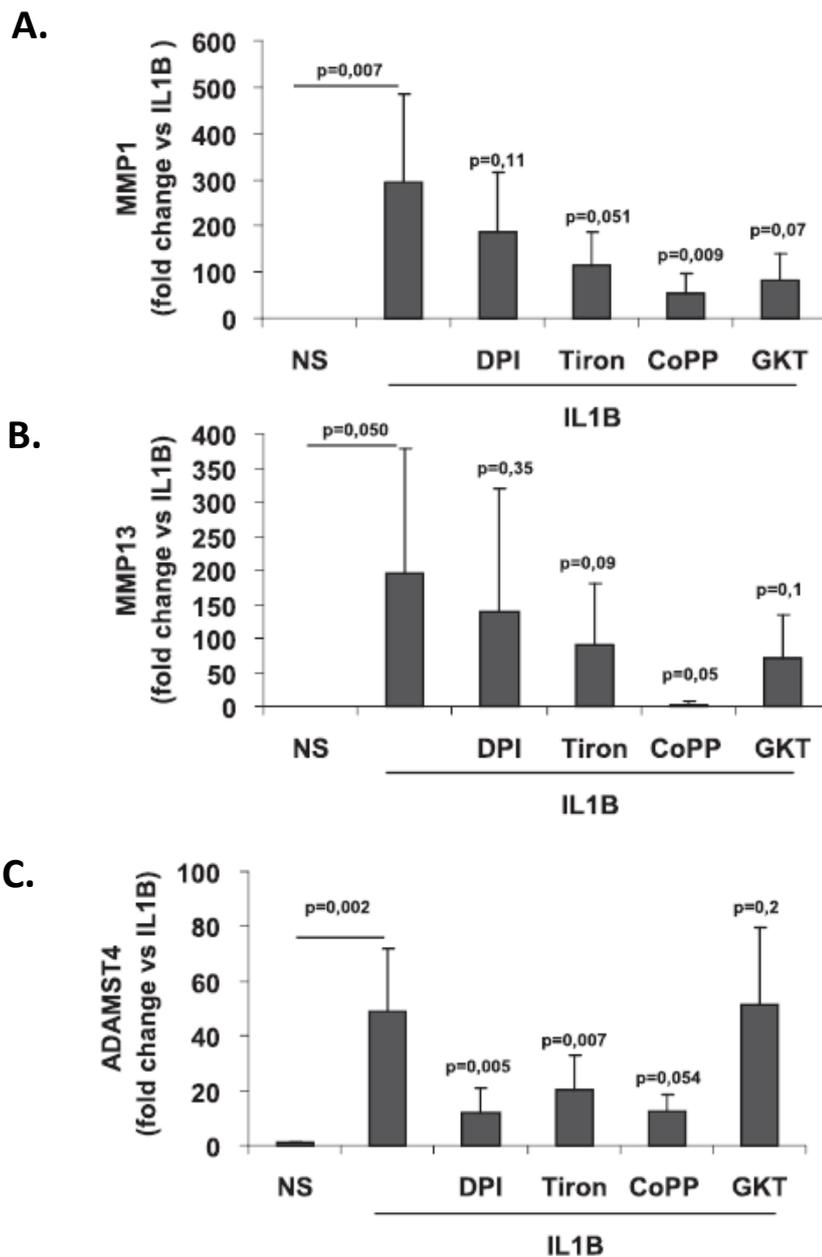


Figure 29 : Quantification des ARN de MMP-1 ADAMTS4 et MMP-13 par les HAC suite à une stimulation à l'IL-1b

Les chondrocytes primaires humains ont été cultivés en l'absence de sérum de veau fœtal. Après un traitement de 24 heures avec de l'IL-1 $\beta$  et avec différents inhibiteurs (Tiron, DPI, COPP et GKT), l'ARN total a été extrait à partir d'HAC (n = 14) et une analyse par RT-Q-PCR de l'ARN de MMP-1 **(A)** et MMP-13 **(B)** et ADAMTS4 **(C)** et ont été réalisées.

Comme pour la lignée C-20/A4, les inhibiteurs de NOX4 ont comme conséquence une diminution d'expression de MMP-1. En dépit des résultats non statistiquement significatifs, nous avons observé une tendance similaire avec le traitement par le DPI et le GKT pour MMP-13 et ADAMTS4. Cette tendance est confirmée au niveau protéique sur les chondrocytes primaires humains sur 3 patients. Cependant, alors que la transcription d'ADAMTS4 semble être diminuée par les autres inhibiteurs, aucun effet du GKT n'a été observé, ce qui suggère qu'ADAMTS4 n'est pas modulé par NOX4. Ces résultats sont à confirmer sur un plus grand nombre de patients.

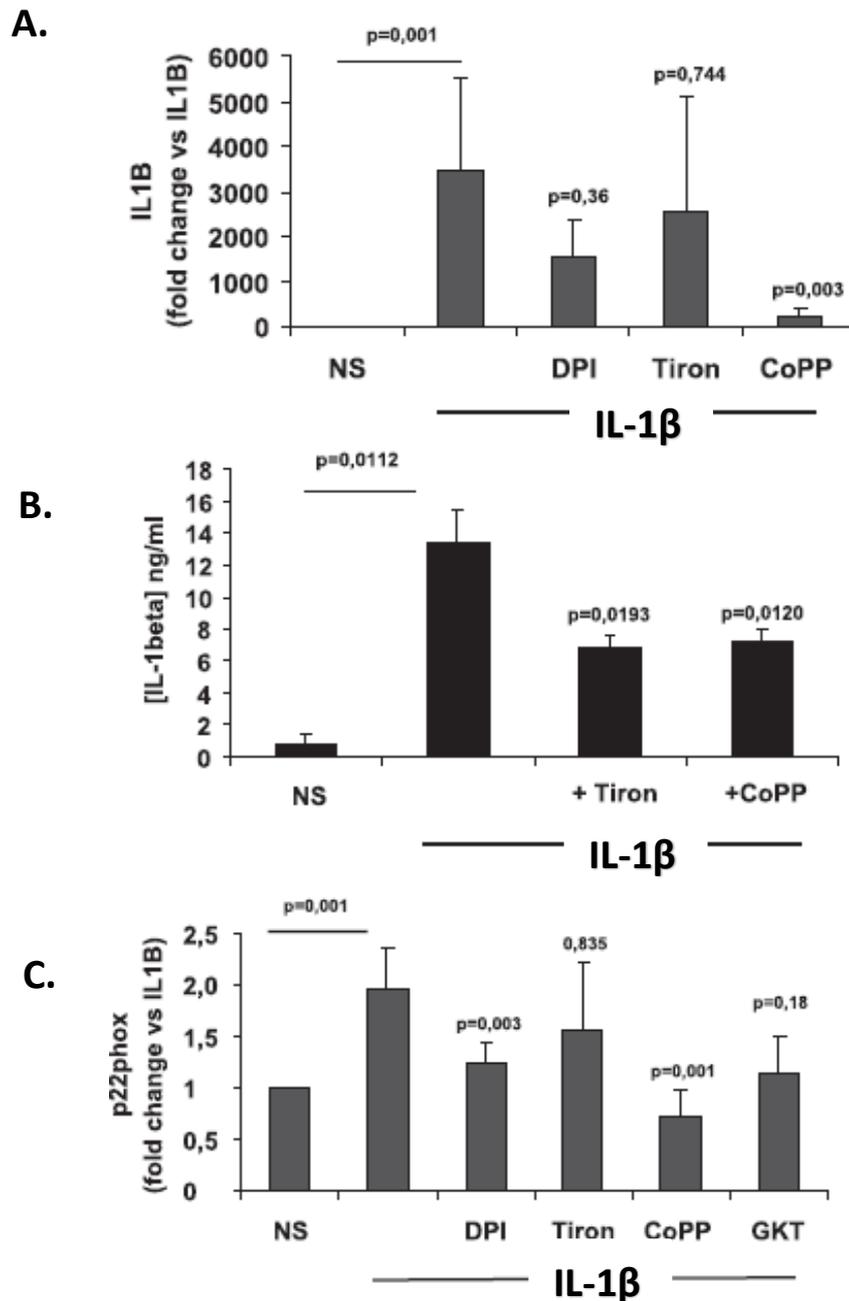
Ces résultats montrent une forte augmentation du niveau d'expression de MMP-1 et MMP-13 libérées dans le surnageant de culture des HAC après 24 heures de stimulation par l'IL-1 $\beta$ . Ce qui confirme l'effet de l'IL-1 $\beta$  sur l'augmentation de la production de métalloprotéases, elles-mêmes responsables de la dégradation cartilagineuse.

Nos données démontrent que la synthèse des métalloprotéases médiée par l'IL-1 $\beta$  est déclenchée par une production de ROS. Ces données, utilisant des inhibiteurs de NOX4, suggèrent un rôle significatif de NOX4 dans cette voie pro catabolique.

### ***B- Les ROS dans la boucle autocrine IL-1 $\beta$ / p22phox-***

Il est connu que le processus inflammatoire joue un rôle important l'arthrose. L'interleukine 1 $\beta$  interviendrait dans une boucle paracrine/autocrine et induirait sa propre néosynthèse dans les chondrocytes primaires humains, ce qui maintiendrait les voies pro-cataboliques menant à la dégradation du cartilage.

Nous avons voulu savoir si l'inhibition de NOX4 pouvait avoir un impact sur la synthèse d'IL-1 $\beta$  en quantifiant la production d'ARN codant pour l'IL-1 $\beta$  en RT-PCR et son expression protéique par les HAC par méthode quantitative ELISA. Nous avons également étudié la production d'ARN du partenaire de NOX4, p22phox afin de constater l'effet de l'IL-1 et des inhibiteurs sur sa synthèse d'ARN.

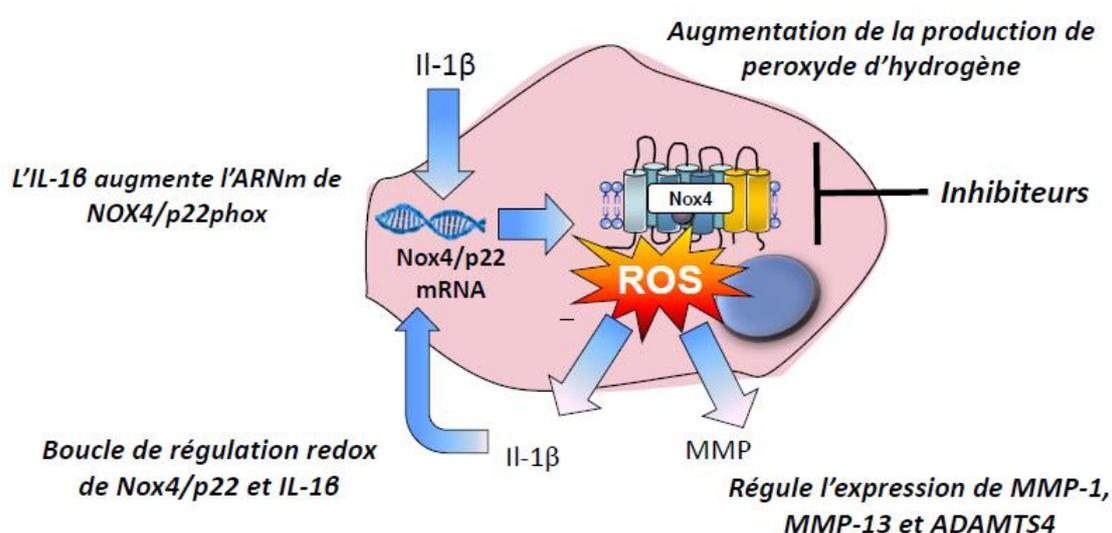


**Figure 30 : L'activité de NOX4 maintient la boucle autocrine / paracrine de l'IL-1b et la surexpression de p22phox.**

Les chondrocytes primaires humains ont été cultivés en l'absence de sérum de veau foetal. Après un traitement de 24 h par l'IL-1 $\beta$  et ajout d'inhibiteurs de NOX4 (DPI et Tiron), l'ARN total a été extrait des chondrocytes (n = 14 patients) pour l'analyse par RT-PCR quantitative de l'ARN de l'IL-1 $\beta$  (A) et p22phox (C). La lignée chondrocytaire C-20 / A4 a été traitée ou non par l'IL-1 $\beta$  et des inhibiteurs de NOX4 (Tiron et COPP). Après 24 h, les cellules sont lavées 3 fois pour éliminer l'IL-1 $\beta$  exogène. Après 24 h supplémentaires, l'IL-1 $\beta$  néo-synthétisé est évalué par méthode ELISA dans le surnageant de culture cellulaire. (B)

Évalué par RT-PCR quantitative, le traitement par l'IL-1 $\beta$  augmente de manière significative la production d'ARNm de l'IL-1 $\beta$ . L'utilisation du DPI ainsi que du CoPP (activateur de la synthèse de

HO-1) diminue de manière significative l'expression de l'ARNm de l'IL-1 $\beta$ , ce qui conduit à une réduction de libération d'IL-1 $\beta$  évalué par test ELISA dans le surnageant de culture des cellules de la lignée chondrocytaire C-20/A4. En outre, la stimulation de la transcription de p22phox par l'IL-1 $\beta$  semble également réduite par le traitement au DPI et au CoPP. De manière étrange, l'ARNm de son partenaire NOX4 diminue. Ce résultat peut paraître incohérent, sachant que l'expression de la protéine est augmentée, mais peut être expliqué par une stabilisation au niveau de la membrane par p22phox. **(Figure 30)**



**Figure 31 : La voie de signalisation de NOX4 permet la médiation du catabolisme chondrocytaire.**

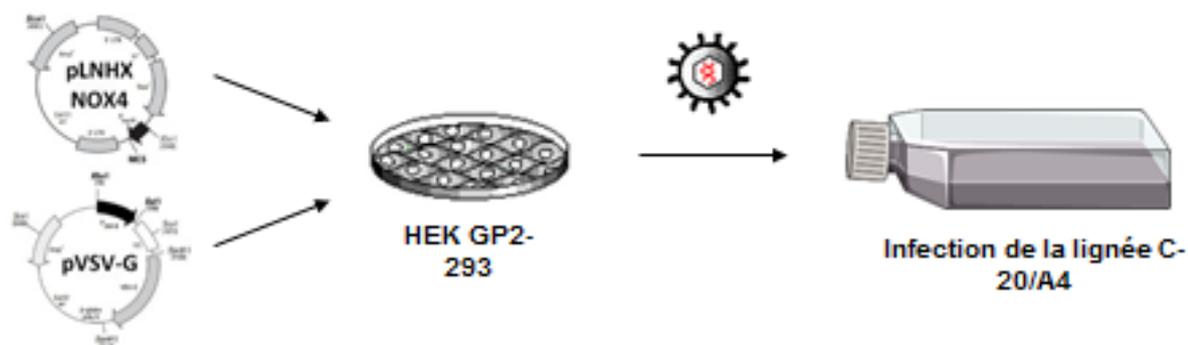
Après interprétation de nos résultats, nous pouvons proposer un modèle de système de boucle autocrine/paracrine de l'IL-1 $\beta$ . Le traitement des chondrocytes primaires par l'IL-1 $\beta$  conduit à une augmentation de synthèse de l'IL-1 $\beta$  dans les HAC. **(Figure 31)** Dans un premier temps, la surexpression de l'ARNm de p22phox augmente la stabilisation de NOX4 au niveau protéique et augmente la production du peroxyde d'hydrogène qui agit comme un médiateur de l'expression de MMP-1, MMP-13 et ADAMTS4, elles-mêmes responsables du catabolisme de la matrice extracellulaire des chondrocytes. Ces mêmes ROS viendront à leur tour augmenter la synthèse d'ARN de p22phox et ainsi alimenter cette boucle délétère qui fini par dégrader le cartilage et provoquer l'arthrose.

Ensemble, nos résultats démontrent pour la première fois que la boucle autocrine/paracrine de l'IL-1 $\beta$  dans les chondrocytes primaires humains dépend d'une production de ROS. Nos données utilisant les inhibiteurs DPI et CoPP, confirment également que NOX4 et p22phox pourrait être des médiateurs de cette boucle, augmentant la néosynthèse d'IL-1 $\beta$  ainsi que les voies cataboliques.

## IV- Nox4 dans les chondrocytes primaires arthrosiques

### A- Modèle de surexpression de Nox4 et p22phox par rétrovirus

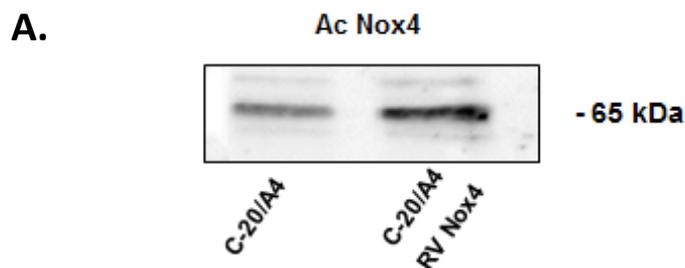
Dans le but d'étudier les conséquences d'une surexpression de NOX4 au niveau cellulaire, la transfection par rétrovirus est le moyen que nous avons choisi afin de surexprimer NOX4 dans notre lignée chondrocytaire C-20/A4 (**Figure 32**).



**Figure 32 : Création d'outil de surexpression de NOX4, les rétrovirus.**

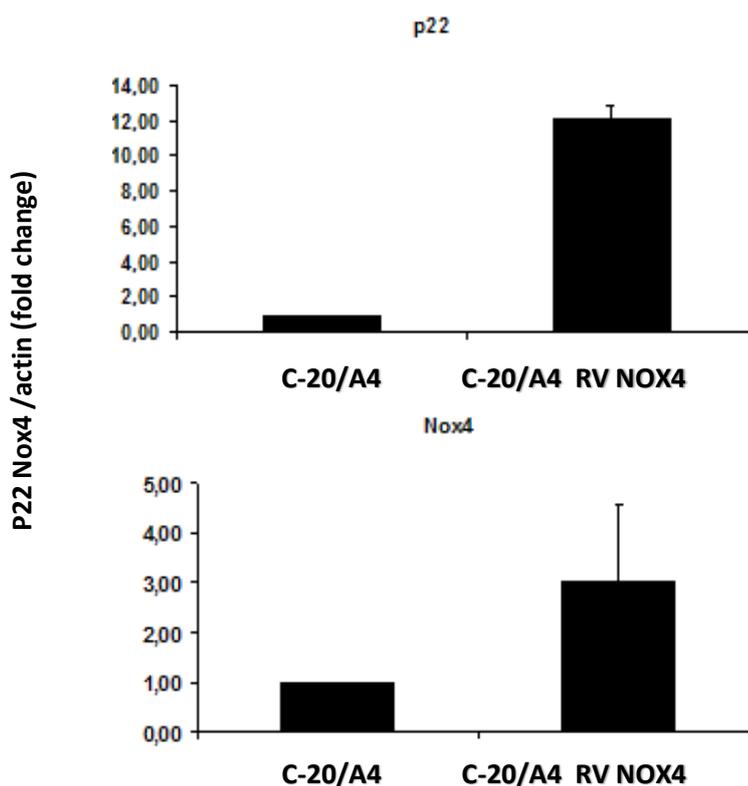
Après création du plasmide pLNHX NOX4, ce dernier est cotransfecté avec le plasmide d'enveloppe viral pVSV-G dans les cellules HEK-GP2 293 afin de produire des rétrovirus NOX4. Les cellules de la lignée chondrocytaire C-20/A4 sont ensuite infectées par les rétrovirus NOX4.

Nous avons tout d'abord vérifié l'augmentation d'expression de la protéine dans les cellules. Nos résultats montrent une augmentation significative de l'expression de NOX4 par western blot dans les cellules infectées par le rétrovirus. L'augmentation de l'ARNm de NOX4 ainsi que de son partenaire p22phox a également été démontrée par Q-RT PCR (**Figure 33**). Notre outil de surexpression est donc validé, tant au niveau de l'expression de Nox4 que de sa production d'ARNm.



Quantification CYBA et p22phox ARNm par RT-qPCR

**B.**

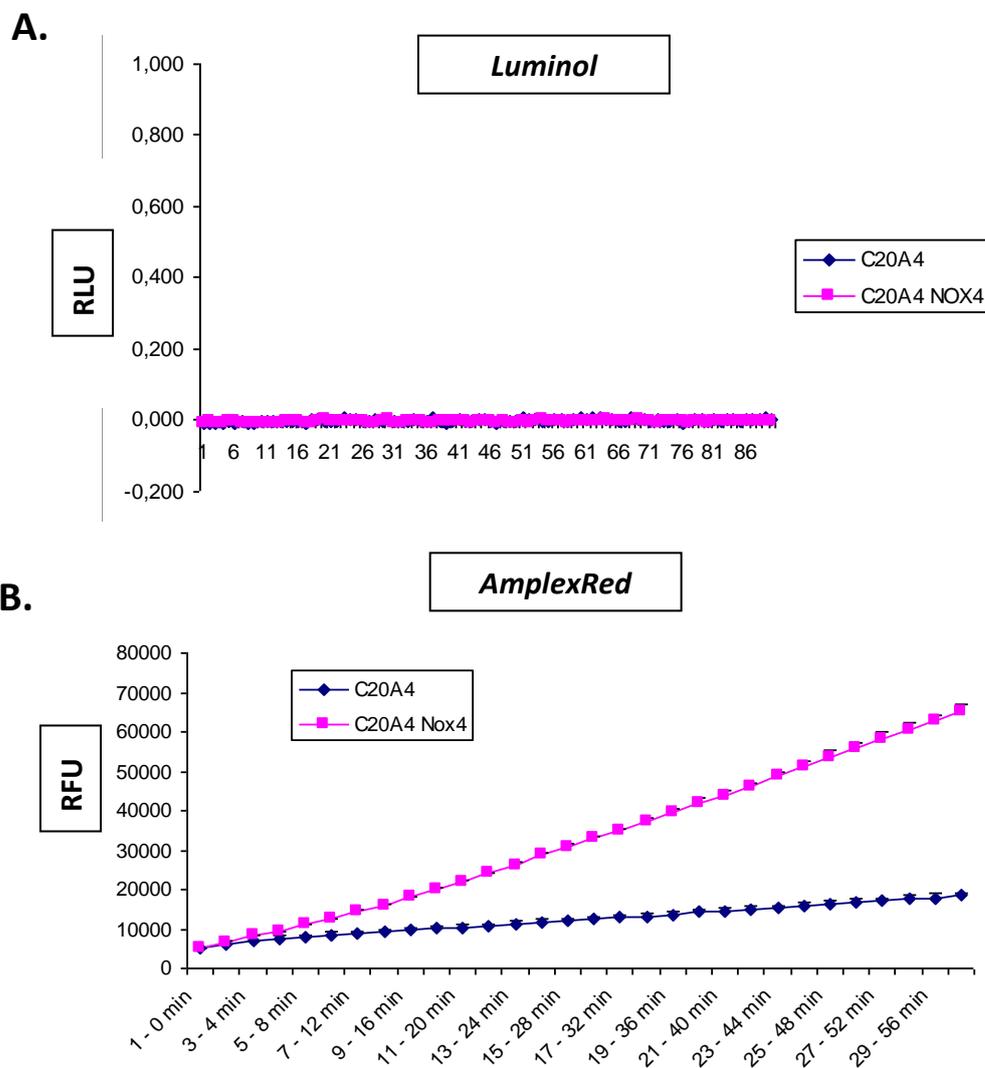


### Figure 33 : Validation du modèle de surexpression de NOX4

Les cellules de la lignée chondrocytaire C-20/A4 ont été cultivées en l'absence de serum de veau foetal après infection par les rétrovirus NOX4. Les protéines totales ont été extraites puis dosée par méthode de Bradford avant d'être déposées sur gel SDS PAGE. L'expression protéique de Nox4 a été quantifiée **(A)**. L'ARN total a été extrait des chondrocytes (n = 3) pour l'analyse par RT-PCR quantitative de l'ARN de NOX4 et p22phox **(B)**.

Afin d'étudier la fonctionnalité de NOX4 surexprimé, des tests de production de ROS par la méthode AmplexRed et Luminol ont été menés au sein du laboratoire. L'utilisation de ces deux test nous ont permis de vérifier l'activité de NOX4 surexprimée d'une part, ainsi que de caractériser les ROS produits. En effet, la méthode de quantification au Luminol ne cible que les ROS extracellulaires tandis que la méthode AmplexRed cible les H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> totaux **(Figure 34)**.

Les résultats montrent une augmentation de la production de ROS par méthode AmplexRed contrairement à la méthode au Luminol ce qui suggère que la localisation de NOX4 serait intracellulaire. (cf. Matériel et Méthodes)



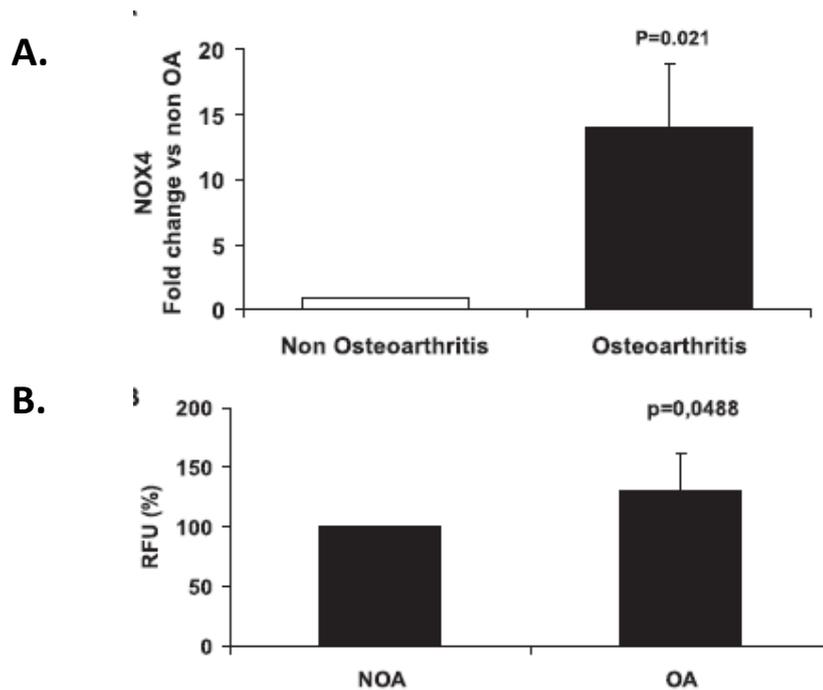
**Figure 34 : Dosage des ROS produits par les C-20/A4 RV NOX4 par AmplexRed et Luminol**

Les cellules C-20/A4 RV NOX4 ont été cultivées en l'absence de sérum de veau fœtal et traitées par l'IL-1 $\beta$  pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été recueillies et la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> totale a été évaluée par la méthode AmplexRed et Luminol à raison de 5x10<sup>5</sup> cellules par puits. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules non stimulées dans les unités de luminosité ou fluorescence relative (RLU / RFU) et ont été acquis toutes les minutes pendant 60 min (100% = 250 000 RFU). Les valeurs représentent la moyenne +/- E.T. de trois déterminations obtenu le même jour et qui sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes

Nous avons réussi à produire un rétrovirus capable d'exprimer NOX4 dans les cellules cibles. La mesure de ROS produit par les chondrocytes C-20/A4 infectés par le rétrovirus permettant de surexprimer NOX4 montre une augmentation de la production de ROS. Les deux techniques utilisées pour mesurer les ROS produits ne donnent pas les mêmes résultats. Ce qui suggère que NOX4 surexprimé ne se trouverait pas à la membrane plasmique mais plutôt dans le réticulum endoplasmique qui est la localisation subcellulaire principale de Nox4 comme décrit par de nombreux auteurs dans la bibliographie.

### ***B- Nox4 est surexprimé dans les chondrocytes primaires arthrosiques***

Les différents résultats obtenus au laboratoire sur les chondrocytes primaires humains suggèrent que NOX4 est un médiateur des voies cataboliques de la cellule induite par l'IL-1B. Pour confirmer un éventuel rôle pathologique de NOX4 dans l'arthrose, nous avons décidé de comparer le niveau d'ARNm de NOX4 dans des chondrocytes prélevés sur les parties saines et arthrosiques du cartilage dans une cohorte de 14 patients. Afin de distinguer au mieux les caractéristiques arthrosiques du cartilage, les parties prélevées ont été évaluées macroscopiquement par des pathologistes. **(Figure 35)**



**Figure 35 : NOX4 est surexprimé dans les chondrocytes primaires arthrosiques**

Les chondrocytes primaires humains ont été récoltés et les parties endommagées et saines du cartilage articulaire ont été mises en culture dans des plaques séparées. (n= 14 patients). L'ARN total a été extrait pour l'analyse par RT-PCR quantitative de l'ARN de NOX4. L'histogramme montre la comparaison du niveau d'ARNm de NOX4 **(A)** entre les chondrocytes arthrosiques et sains. En parallèle, la production de ROS a été évaluée par la méthode AmplexRed sur 3 patients **(B)**.

Ces résultats ont révélé une surexpression significative de l'ARNm de NOX4 dans les chondrocytes ostéoarthrosiques par rapport aux chondrocytes issus des parties saines. La production de ROS quant à elle, est également significativement augmentée dans les chondrocytes arthrosiques par rapport aux chondrocytes issus de partie non arthrosique.

Ces résultats nous confortent dans l'hypothèse que NOX4 aura un rôle pro arthrosique. Ce qui n'a encore jamais été décrit à ce jour. En effet, pour la première fois, une augmentation significative de NOX4 dans les chondrocytes primaires arthrosiques est prouvée sur un pool d'échantillons différents de 14 patients, désignant cette NADPH Oxydase comme une potentielle cible thérapeutique dans l'arthrose.

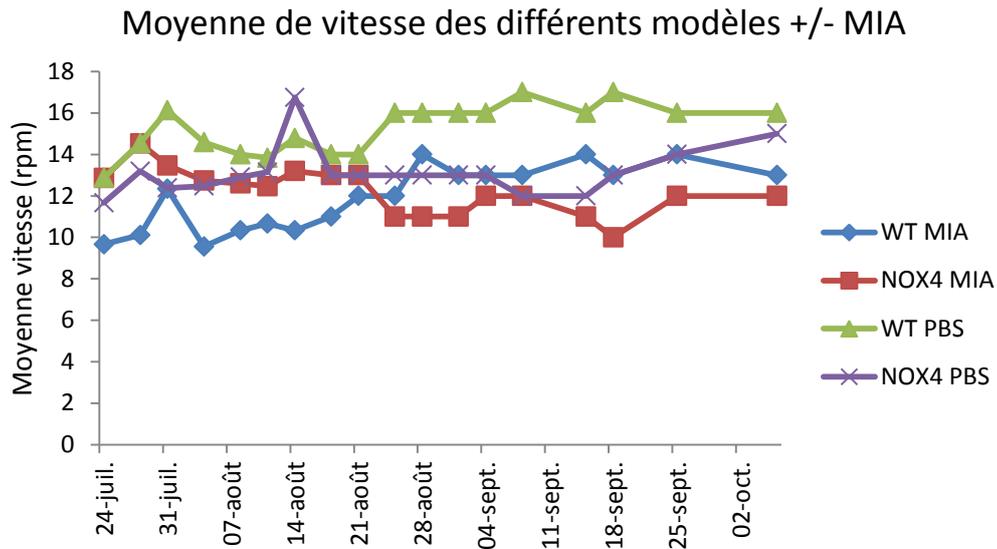
## V- Etude de Nox4 sur modèle in vivo

Parmi les modèles animaux de l'arthrose, se trouve ceux qui la développent spontanément, après intervention chirurgicale (traumatisme ou méniscectomie) ou induite chimiquement, ce qui peut donner un aperçu de l'évolution moléculaire, pathologique ou biochimique des changements dans l'articulation durant l'arthrose, ainsi que permettre l'essai de nouvelles solutions thérapeutiques. Ces différents modèles portent non seulement sur le handicap mais aussi sur la douleur chronique caractéristique de l'arthrose. La douleur est difficile à évaluer objectivement en raison de la variabilité inhérente à l'animal.

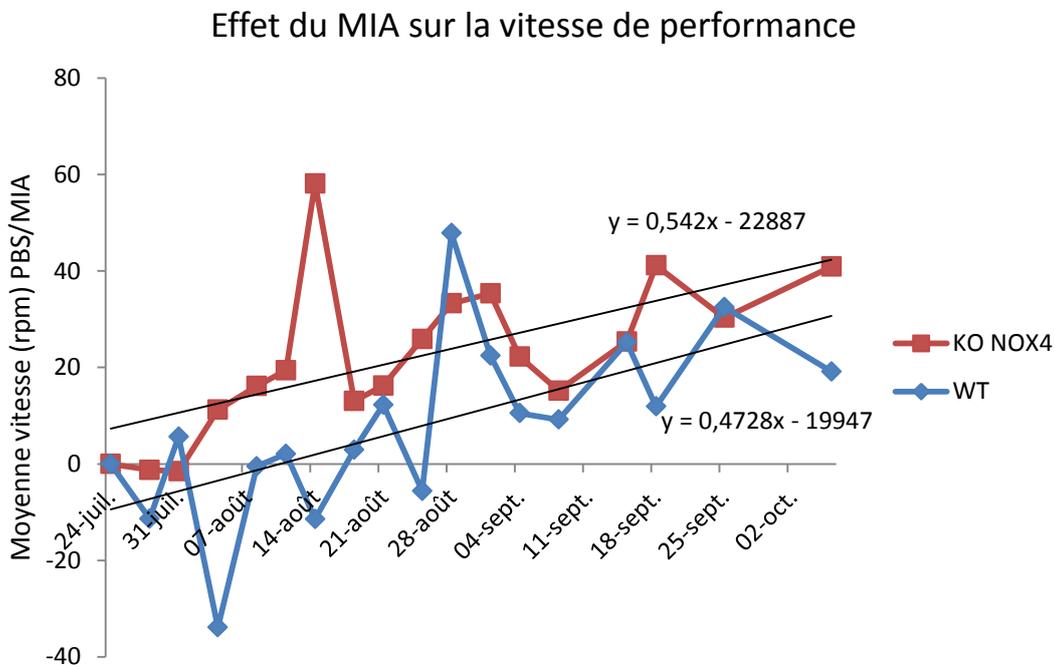
Notre projet d'expérimentation animale a débuté par une phase d'adaptation. Pendant plusieurs jours consécutifs, les souris ont été acclimatées à la pièce de test, aux manipulateurs, ainsi qu'au Rotarod. Ce dernier est nettoyé entre chaque test afin qu'aucune odeur ne puisse venir perturber les performances de l'animal. Un premier groupe test de souris C57/Bl6 a été entraîné sur le Rotarod afin de mettre au point les différents paramètres du test (durée, vitesse et intensité). En définitive, le test peut durer au maximum 5 min avec une augmentation de 1 rotation par minute (rpm) toutes les 10 secondes.

Des souris C57/Bl6, et KO NOX4 acclimatées au test ont ensuite été opérées par microchirurgie afin d'injecter dans leur genou une solution de PBS stérile (groupe contrôle), du MIA (inhibiteur de la glycolyse, déclencheur d'arthrose en 4 semaines), connu pour ses propriétés pro-cataboliques. L'expérience n'étant qu'à ses débuts, nous ne pouvons présenter ici que les premières tendances. L'évolution de leur performance en termes de vitesse et de temps a été évaluée. On peut observer que les groupes ayant subi une injection de MIA ont tendance à obtenir des performances moins satisfaisantes que le groupe contrôle. Cependant, il ne semble y avoir aucune différence entre le groupe de souris WT et KO NOX4. **(Figure 36)**

**A.**



**B.**



**Figure 36 : Performance des modèles murins arthrosiques : test ROTAROD**

Les souris BL6 et BL6 NOX4 sont placées sur un barreau dont la vitesse de rotation est contrôlée par l'expérimentateur. Le temps que met l'animal à tomber du barreau est un indice d'évaluation de l'équilibre, de la coordination sensori-motrice et d'endurance. Test effectué sur 3 mois à raison de 3 mesures/semaine. La figure (A) présente la moyenne de vitesse en rpm de performances obtenues dans chaque condition de groupes pendant 3 mois. La figure (B) présente la différence des moyennes de vitesse en rpm de performances obtenues en comparatif de l'effet du MIA sur les groupes NOX4 et WT pendant 3 mois.

Le traitement des données récoltées indique que l'ajout de MIA permet de produire une arthrose significative en terme de handicap dans la locomotion. Par contre, nous pouvons constater que la pente de dégradation des performances est identique pour les souris traitées par MIA qu'elles soient WT ou n'exprimant pas NOX4. Ainsi le modèle d'induction de l'arthrose par le MIA ne met pas en évidence un rôle de NOX4 dans l'arthrose. En ce qui concerne l'avenir de cette expérimentation, notre projet est d'infecter les souris avec des rétrovirus produisant de l'IL-1 $\beta$  de manière constante dans l'articulation. Ce nouveau modèle d'arthrose sera on l'espère plus à même de mettre en évidence le rôle de NOX4. Les virus sont en cours de production.

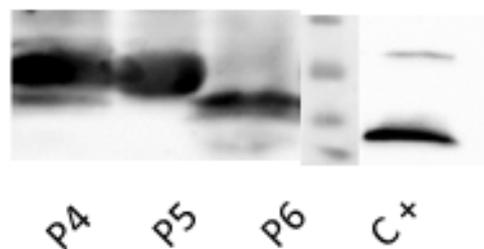
## RESULTATS : VDAC ET ACTIVITE PMOR DANS LES ERYTHROCYTES

---

## I- VDAC est présent à la membrane des érythrocytes

### A- Mise en évidence de VDAC endogène

Seulement deux articles dans la littérature décrivent VDAC comme présent dans la membrane plasmique des érythrocytes. Nous avons voulu confirmer ce fait au sein de notre laboratoire en vérifiant son expression par Western Blot à partir de membranes érythrocytaires humaines. Les membranes ont été traitées comme décrit dans le chapitre Matériel et méthodes avant d'être déposées dans un gel SDS-PAGE. La présence de la porine dans les globules rouges est confirmée sur trois patients, d'âge et de sexes différents. Le contrôle utilisé est un extrait de protéoliposomes contenant la protéine VDAC fournis par la société Synthelis. (**Figure 37**)



**Figure 37 : Expression de VDAC dans la membrane érythrocytaire par Western Blot**

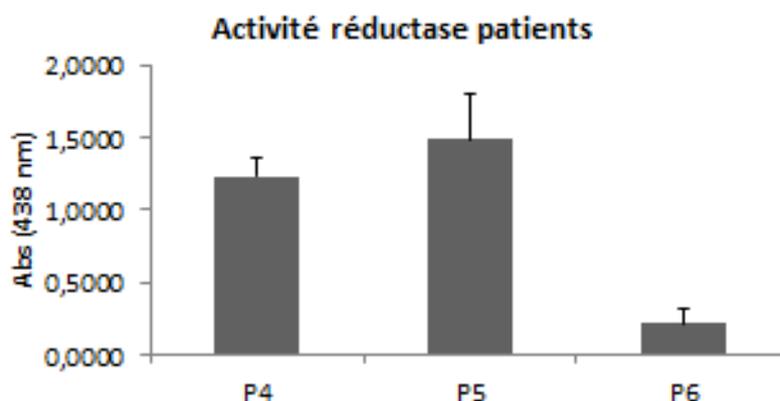
Les membranes érythrocytaires humaines ont été lysées et traitées avec des anti-protéases. Les protéines ont été extraites à partir de la solution de membranes érythrocytaires issues de trois patients P4, P5, P6 (n = 3) et une analyse par Western Blot de la protéine VDAC a été réalisée. Le contrôle positif est réalisé à partir d'un lysat de protéoliposomes enrichis en VDAC1 produits par la société Synthelis.

Ce résultat obtenu par Western Blot, nous permet de confirmer l'expression de VDAC dans les membranes érythrocytaires, mais nous permet également de constater que son expression est variable selon les patients.

### B- Lien entre VDAC et l'activité PMOR

Le Water Soluble Tetrazolium (WST-1) est réduit par les électrons générés par la cellule ce qui modifie la couleur du complexe et le rend détectable par spectrophotométrie. Toutefois le WST-1 n'est pas capable de réagir directement avec les électrons. Il faut un composé intermédiaire faisant office de transporteur d'électrons, le PMS. Dans un premier temps nous avons mesuré l'activité réductase du WST-1.

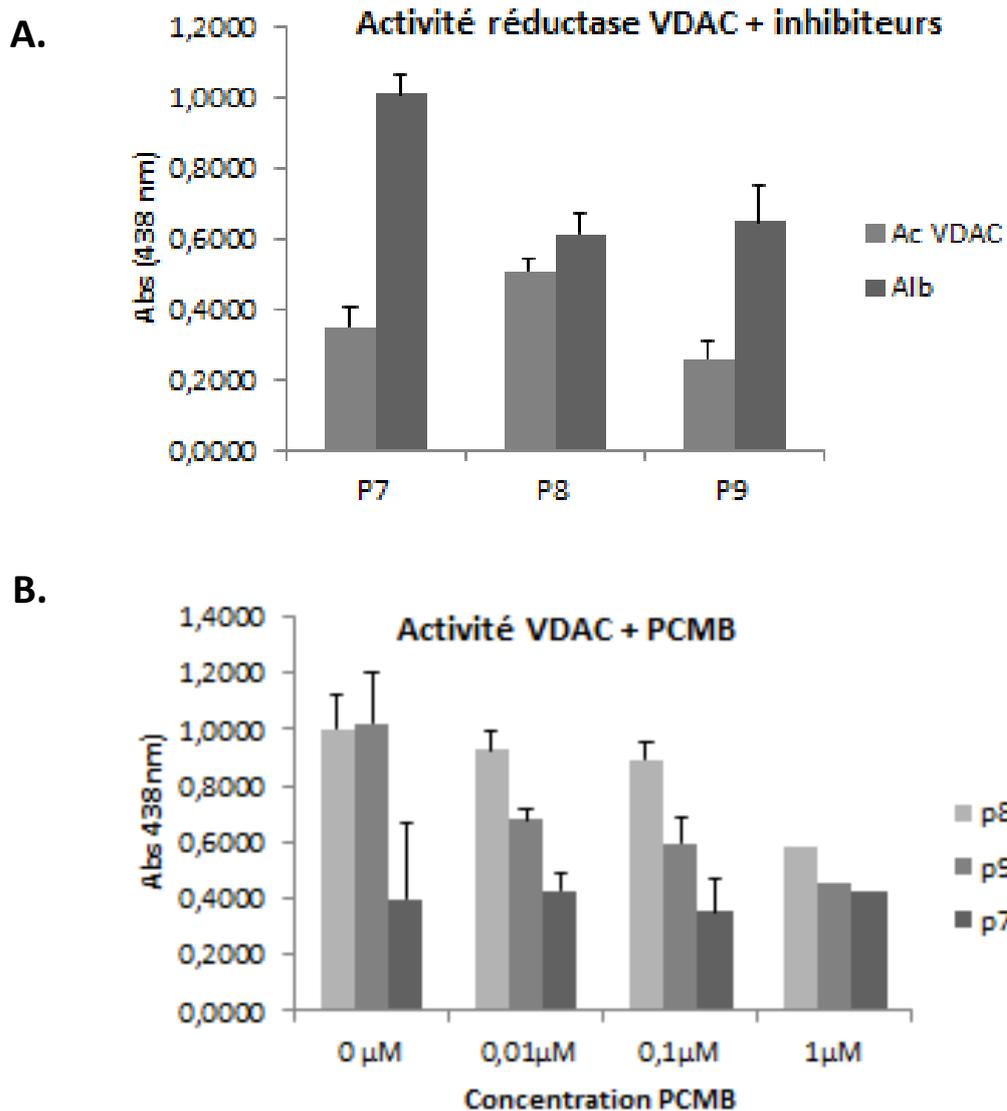
VDAC ayant été décrit comme possédant le pouvoir de réduire le Ferricyanide par **Backer et al 2004**, la suite de notre étude consiste à confirmer cette activité sur les mêmes patients que ceux testés précédemment. Nous avons donc réalisé un test de réduction du WST-1 comme décrit dans le chapitre Matériel et méthodes. Le résultat nous montre effectivement une activité réductase mesurable avec des activités qui semblent proportionnelles à la quantité de VDAC déterminée par western blot. **(Figure 38)**



**Figure 38 : Activité réductase des érythrocytes**

Réalisation d'une mesure d'activité réductase sur 3 prélèvements de sangs différents dans les mêmes conditions, avec des érythrocytes à 10% d'hématocrite incubés avec une solution de WST-1 (10 mM) pendant 30 min à 37°C. Les données représentent trois expériences indépendantes, issues de trois patients P4, P5, P6. Les valeurs sont comparées à un témoin, les globules rouges sans WST-1. Les globules rouges présentent une forte activité réductase par WST-1, variable selon les individus. Lecture effectuée au spectrophotomètre à 438nm.

Après avoir confirmé la présence de VDAC dans les érythrocytes humains ainsi que la capacité de ceux-ci à posséder une activité réductase, notre but est de relier cette activité à la présence de VDAC. Pour cela, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de VDAC : du PCMB (para chloro mercuri benzoic acid) ainsi que de l'albumine pour le témoin. Nous avons également utilisé un anticorps monoclonal anti-VDAC afin de tester d'éventuelles vertus inhibitrices. **(Figure 39)**

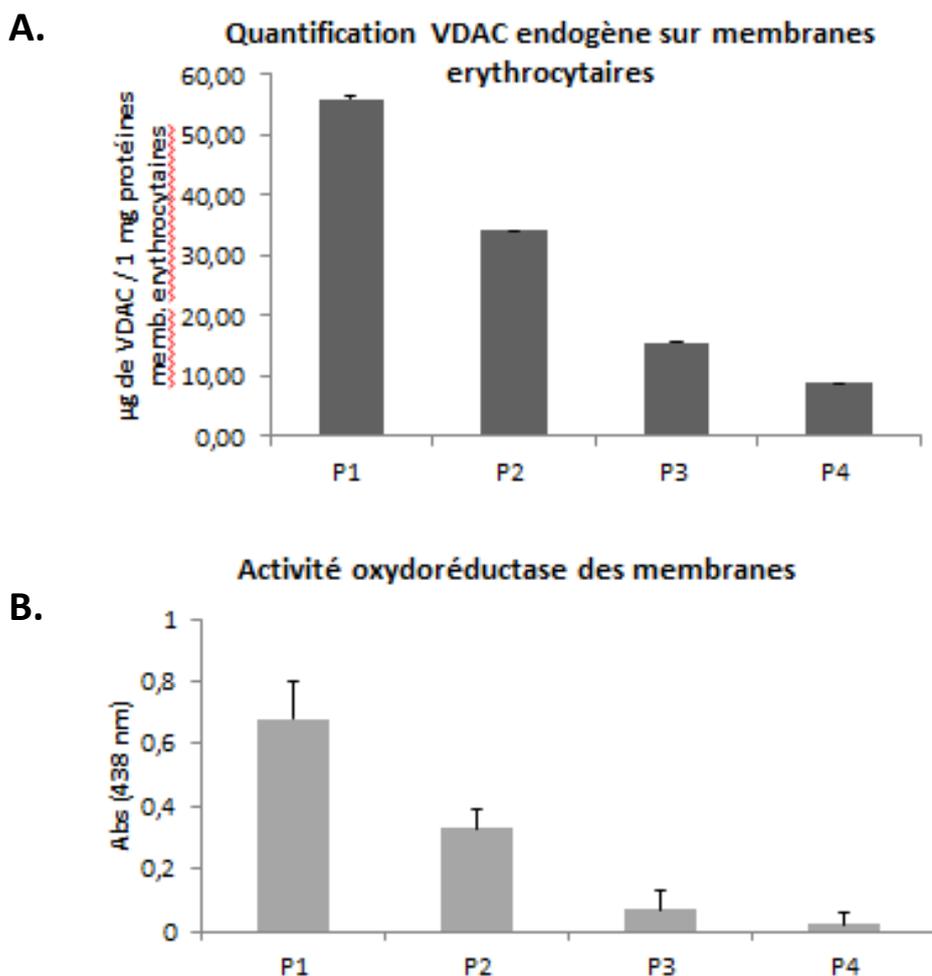


**Figure 39 : Inhibition de l'activité réductase des érythrocytes humains**

Réalisation d'une mesure d'activité réductase sur prélèvements de sangs provenant de 3 patients différents, P7, P8, et P9, dans les mêmes conditions, avec des érythrocytes à 10% d'hématocrite incubés avec une solution de WST-1 (10 mM) pendant 30 min à 37°C. L'ajout de d'anticorps anti VDAC (A) et de PCMB (B) à concentration variable ainsi qu'un contrôle négatif, l'albumine, permet de déterminer le degré d'inhibition d'activité. Les données représentent trois expériences indépendantes. Les globules rouges présentent une forte activité réductase par WST-1, variable selon les individus. Lecture effectué au spectrophotomètre à 438nm.

L'effet des inhibiteurs se traduit par une diminution de l'activité réductase, ce qui suggère que VDAC soit principalement à l'origine de cette activité. Afin de le désigner comme étant la cause la plus importante de l'activité réductase des globules rouges, nous avons relié sa quantité endogène à l'activité réductase par méthode ELISA. Une méthode plus sensible et plus reproductible pour cette quantification que le Western blot.

Les membranes érythrocytaires provenant de patients d'âge et de sexe différents ont été préparées selon le chapitre Matériel et méthodes. La quantification de VDAC endogène montre une quantité variable de VDAC d'un patient à l'autre, que nous arrivons à corrélérer avec leur activité de réduction du WST-1. Cette quantification de protéine membranaire est standardisée par une gamme de protéoliposomes contenant VDAC. **(Figure 40)**



**Figure 40 : Quantification de VDAC endogène et corrélation avec l'activité réductase**

Les érythrocytes humains sont prélevés le jour même sur tube héparine sur quatre patients P1, P2, P3 et P4. Les protéines membranaires sont extraites et dosées par méthode de Bradford avant d'être déposés sur plaque ELISA 96 PUIITS(A). L'expression protéique de VDAC endogène a été quantifiée. La mesure d'activité réductase de ces mêmes patients a été mesurée (n = 3) (B).

Ces résultats démontrent pour la première fois un lien entre la quantité endogène de VDAC et l'activité réductase de la membrane plasmique des érythrocytes (PMOR). Cette méthode de dosage quantitatif ELISA, pourra nous permettre par la suite de quantifier cette protéine chez différents patients et pathologies, afin d'en définir le rôle ainsi que l'impact ou son activité réductase.

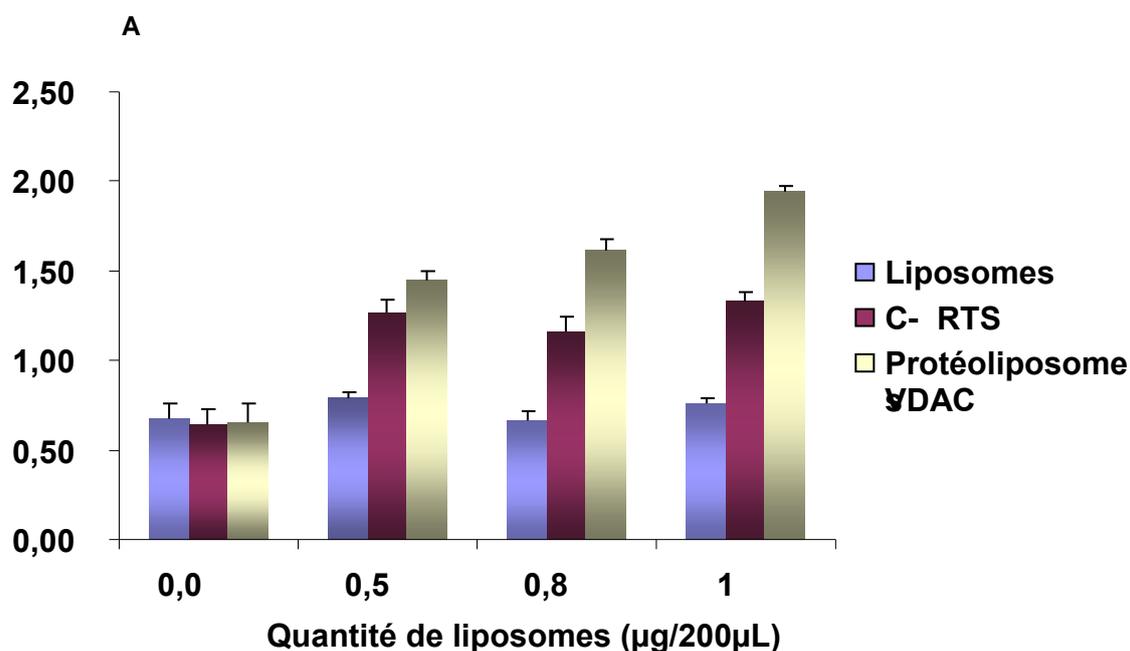
## II- Conséquences de la surexpression de VDAC dans les érythrocytes.

### ***A- Augmentation de l'activité réductase par fusion de protéoliposomes***

Une stratégie possible pour prouver que VDAC dans les globules rouges présente une activité de transfert d'électrons au travers de la membrane plasmique (PMOR), est d'enrichir ces érythrocytes avec la protéine VDAC et de mesurer une augmentation significative de l'activité PMOR.

Afin d'enrichir les érythrocytes avec la protéine VDAC, nous avons choisi d'effectuer une vectorisation par liposomes. En partenariat avec la société Synthelis, entreprise spécialisée en production de protéoliposomes, nous avons pu obtenir des préparations de liposomes contrôles (C-RTS) ainsi que de protéoliposomes contenant VDAC.

Dans le but de vérifier la qualité et la capacité à réduire le WST-1 de ces préparations, nous avons soumis chaque type d'échantillon à une mesure d'activité réductase. Nous avons également inhibé cette activité avec un inhibiteur de VDAC afin de vérifier que cette protéine est bien à l'origine de l'activité réductase des protéoliposomes.



**Figure 41 : Activité réductase des différents types de protéoliposomes fournis par Synthelis**

Réalisation d'une mesure d'activité réductase sur 3 différents types de protéoliposomes dans les mêmes conditions, incubés avec une solution de WST-1 (10 mM) pendant 30min à 37°C. Les données représentent trois expériences indépendantes. Les valeurs sont comparées à un témoin, le milieu réactionnel sans liposomes. Les protéoliposomes VDAC présentent une forte activité réductase par WST-1. Lecture effectuée au spectrophotomètre à 438nm

Ces mesures d'activité montrent que les protéoliposomes fournis par Synthelis possèdent une activité réductase. On peut également observer que les contaminants du contrôle négatif présentent une activité résiduelle.

### ***B- Recherche d'un marqueur positif de fusion dans les érythrocytes***

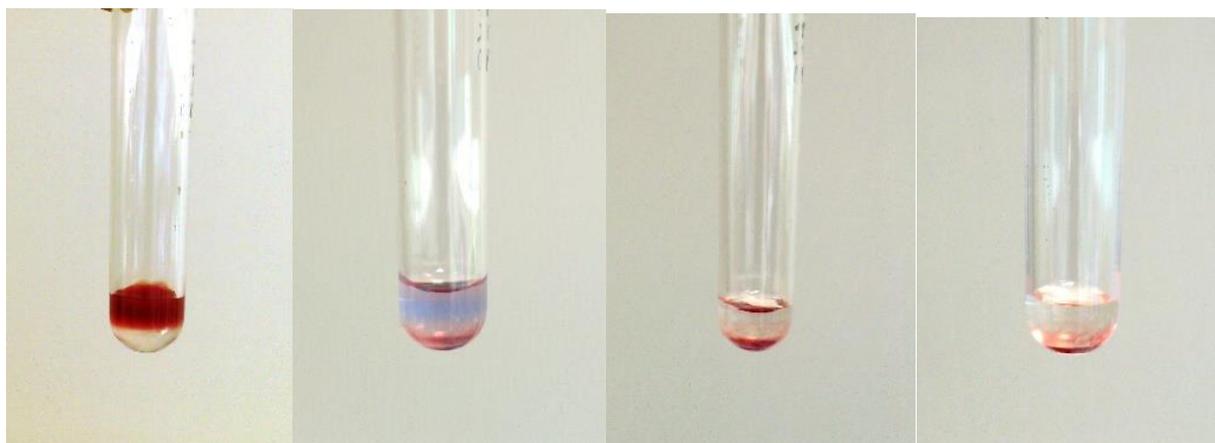
Le but ici est de prouver, grâce aux protéoliposomes remplis de Crystal violet, que la fusion est optimale entre les protéoliposomes et les érythrocytes humains.

L'objectif secondaire est d'écarter toute possibilité que d'éventuels protéoliposomes puissent rester « accrochés » aux érythrocytes ou bien seulement non fusionnés dans le milieu réactionnel.

Après l'étape de de fusion entre les protéoliposomes et les érythrocytes (GR), une séparation par gradient de Ficoll a également été réalisée sur un témoin de fusion contenant des GR fusionnés avec des liposomes vides contenant du colorant Crystal violet. En effet, le colorant n'entrant pas

spontanément dans un globule rouge non fusionné (résultats non montrés), la présence de crystal violet après lyse des membranes de globules rouges indiquera la bonne fusion des liposomes à ces derniers.

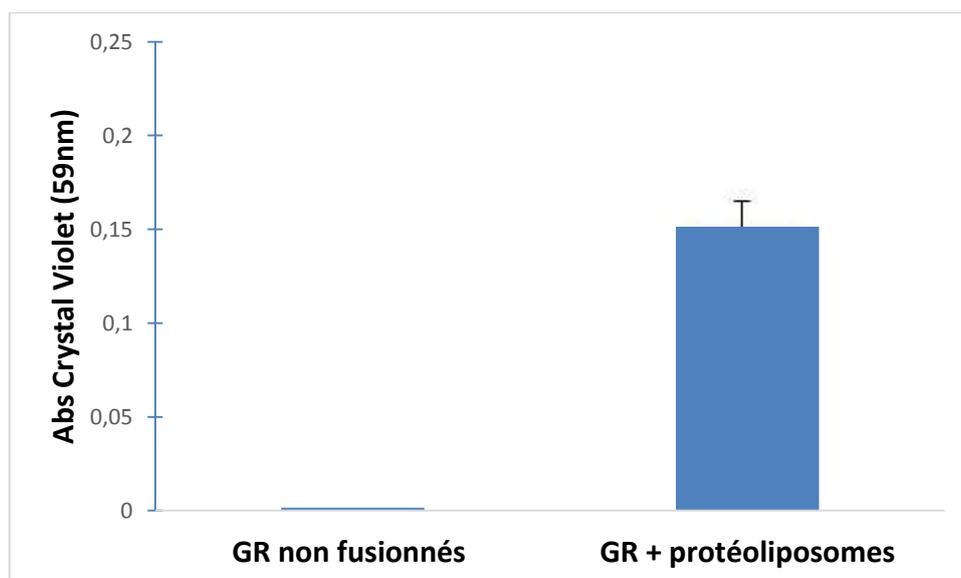
Les globules rouges (plus denses que le Ficoll) passent à travers le gradient de Ficoll et sédimentent au fond du tube alors que les liposomes libres, qui ont une densité plus faible que le Ficoll, restent à l'interface du milieu et du Ficoll. Après 3 séparations successives, on obtient un culot de GR fusionnés sans liposomes libres. **(Figure 42)**



**Figure 42 : Séparation des liposomes non fusionnés par gradient de Ficoll**

Les globules rouges à 10% Ht sont fusionnés avec des liposomes contenant du Crystal violet pendant 4h à 37°C sous légère agitation. Les érythrocytes fusionnés sont lavés successivement avec du PBS, puis ils sont séparés des éventuels liposomes non fusionnés par gradient Ficoll.

Après avoir fusionnés les érythrocytes humains avec les liposomes colorés au Crystal violet, ces derniers sont lysés par choc thermique, qui consiste en un refroidissement dans de la carboglace pendant 15 min, suivi d'une incubation à 60°C pendant 15min. Une fois les membranes lysées, le lysat est récupéré par centrifugation. Ce contenu est ensuite lu au spectrophotomètre à 605nm. Nous avons pu observer une augmentation de l'absorbance dans le surnageant des érythrocytes fusionnés. Les éventuels liposomes colorés non fusionnés ayant été éliminés par gradient de Ficoll, cette mesure d'absorbance permet de confirmer le bon fonctionnement de la méthode de fusion des liposomes aux érythrocytes. **(Figure 43)**



**Figure 43 : Mesure d'absorbance du Crystal violet**

Absorbance du Crystal violet après fusion 4h à 37°C des liposomes colorés après lyse des globules rouges à 10% d'hématocrite par 100µl de liposomes. Les essais sont lus au spectrophotomètre à 605nm. n = 3

Le laboratoire a pour projet d'effectuer des essais en microscopie confocale sur globules rouges fusionnés afin d'en savoir plus sur le fonctionnement de la fusion de liposomes et de permettre de mieux comprendre le mécanisme d'intégration de protéines à la membrane érythrocytaire.

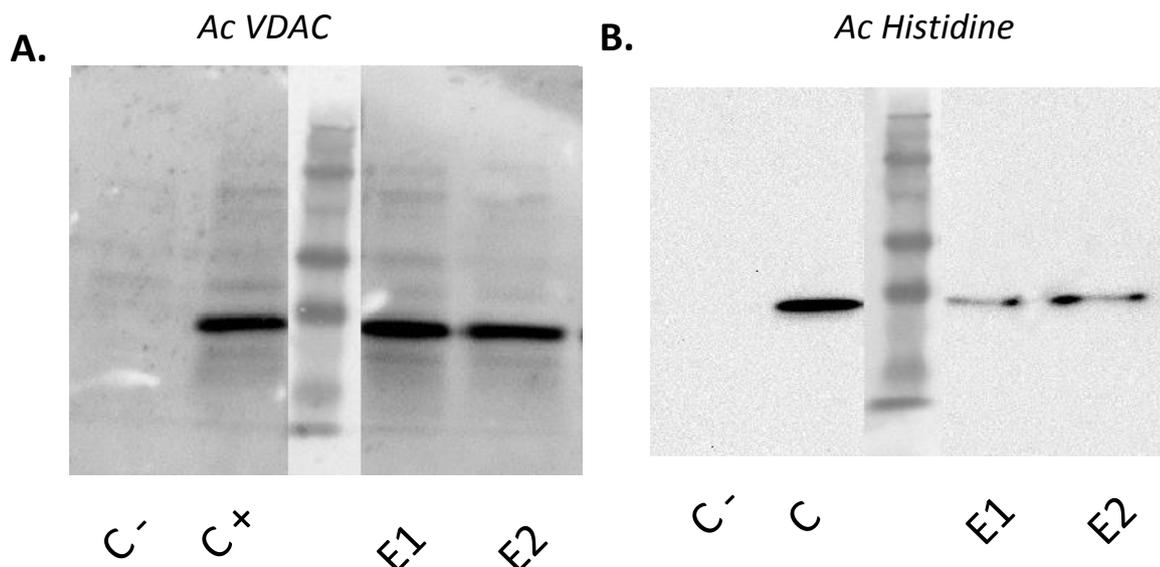
L'élaboration de liposomes contenant du Crystal violet nous a permis de valider notre méthode de fusion. Effectivement, le crystal violet étant retrouvé dans le surnageant de lysat cellulaire, cela nous permet d'affirmer que la fusion entre érythrocytes et liposomes est non seulement possible, mais que la transmission de matériel est efficace.

### ***C- Augmentation de VDAC His-Tag par Western Blot***

L'étape suivante est de savoir si VDAC exogène peut être retrouvé à la membrane plasmique des érythrocytes après fusion. Après avoir fusionnés les érythrocytes humains avec les protéoliposomes VDAC, ces derniers sont lysés par choc thermique et les protéines membranaires sont déposées sur un gel SDS PAGE. VDAC synthétique présente à sa partie N terminal une « étiquette » poly-histidine (His-Tag) qui peut être marqué avec un Ac anti-histidine. Nous pouvons ainsi observer une augmentation de la protéine VDAC après fusion avec les protéoliposomes. Nous avons effectué au

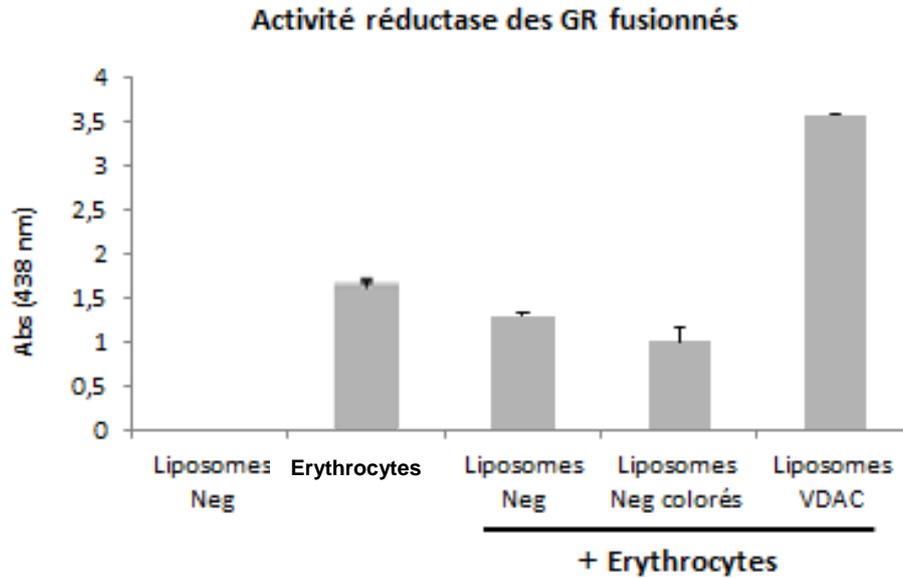
préalable une séparation par gradient Ficoll afin d'éliminer tous éventuels protéoliposomes non fusionnés. (Figure 44).

Nous avons ensuite soumis les différents produits à une mesure d'activité réductase et avons constaté que les érythrocytes fusionnés avec les protéoliposomes VDAC présentaient une activité deux fois plus importante que les érythrocytes non fusionnés. (Figure 45)



**Figure 44 : Augmentation de VDAC His-Tag et endogène après fusion dans les érythrocytes**

Révélation de VDAC des protéoliposomes avec des Ac anti-VDAC (A) et anti-histidine. (B). Ac VDAC monoclonal de souris et anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase. Le contrôle négatif est composé de liposomes sans protéine VDAC, le contrôle positif de protéoliposomes VDAC, E1 et E2 étant deux types d'érythrocytes provenant de deux patients différents.



**Figure 45 : Activité réductase des érythrocytes enrichis en VDAC**

Les globules rouges à 10% Ht sont fusionnés avec différents types de liposomes fournis par Synthelis pendant 4h à 37°C sous légère agitation. Les culots globulaires fusionnés sont ensuite soumis à une mesure d'activité réductase. Des contrôles sont également réalisés dans les mêmes conditions que les essais avec les différents types de liposomes non fusionnés.

Pris dans leur ensemble, ces résultats valident non seulement le protocole de fusion de protéoliposomes dans les érythrocytes mais que la protéine intégrée, ici VDAC, présente bien un pouvoir réductase. Ceci montre pour la première fois que VDAC est bien l'enzyme responsable de l'activité PMOR des érythrocytes.

## DISCUSSION

---

## I- NOX4, cible thérapeutique dans l'arthrose

La NADPH Oxydase 4 a été décrite pour la toute première fois comme senseur de l'oxygène dans le rein (**Geiszt et al 2000**). Depuis cette première description, son expression a été trouvée dans de nombreux organes la caractérisant comme une protéine assez ubiquitaire (**Bédard et Krauze 2007**). Dans des travaux précédents effectués au sein de notre laboratoire, le Dr Laurent Grange et son équipe ont démontré la présence du transcrite codant pour NOX4 dans une lignée de chondrocytes humains C-20/A4 (**Grange et al. 2006**). Grâce à ces travaux nous avons pu démontrer par la suite l'expression de NOX4 pour la première fois dans cette même lignée.

Le but de notre étude était d'évaluer la fonctionnalité de ces observations in vitro dans des conditions pathologiques, ici dans l'arthrose.

**Effet et sources des ROS :** Les sources potentielles de ROS ont été identifiées dans les chondrocytes (**Henrotin et al. 2005**). Parmi eux, la NO synthase, les mitochondries ou les NADPH oxydase pourrait en influencer le comportement des chondrocytes ainsi que l'homéostasie de la matrice extracellulaire. En fait, le rôle physiologique des ROS dans les chondrocytes reste encore un mystère. (**Selon Martin et al.**) La génération des ROS par les mitochondries serait nécessaire pour maintenir la production d'ATP par les chondrocytes. Les ROS générés par NOX2 et NOX4 pourraient également agir en tant que médiateur dans la chondrogenèse au cours du développement du squelette (**Kim et al. 2010**). Des études montrent également que les ROS sont impliqués dans la différenciation des chondrocytes hypertrophiques, phénomène se produisant dans l'ossification endochondrale (**Drissi et al 2005; Morita et al. 2007**). Ces études suggèrent que la génération de ROS pourrait être nécessaire pour l'homéostasie des chondrocytes, ainsi que pour leurs fonctions et leur différenciation. La production en excès de ROS à l'origine d'un stress oxydatif peut-être la cause de pathologies dégénératives et en particulier de l'arthrose (**Kaneto et al. 2009**). Par contre, la source des ROS produit par les chondrocytes à l'origine de la dégradation du cartilage au cours de l'arthrose reste à l'heure actuel inconnu.

**Expression de NOX4 :** Dans la littérature internationale seuls deux études décrivent la présence de NOX dans chondrocytes primaires de souris adulte (**Ambasta et al 2004, Martyn et al, 2005**). Les études précédemment citées montrent la présence de NOX lors de la maturation osseuse chez le fœtus ou le nouveau née (**Drissi et al 2005; Morita et al. 2007**). Notre étude démontre pour la première fois la présence de NOX4 et de son partenaire P22phox dans les chondrocytes articulaires

primaires humains. Nos résultats montrent également que NOX4 est la seule isoforme de NADPH oxydase présente dans ce type cellulaire, contrairement aux résultats trouvés pour la lignée C-20/A4 qui exprime en plus NOX2. L'expression de NOX4 dans les chondrocytes articulaires humains a été confirmée par différentes techniques : quantification par western blot, marquage par fluorescence en microscopie confocale ainsi qu'un marquage par immuno histochimie. Ces résultats nous ont permis d'observer la localisation subcellulaire de Nox4 ainsi que sa distribution au sein des HAC. En effet, nous avons pu observer un gradient d'expression de NOX4 de l'os sous-chondral à la surface osseuse.

**Activité de Nox4 :** La stimulation des chondrocytes primaires lors d'un traitement par l'IL-1 $\beta$  à concentration de 2ng/ml pendant 24 heures montre une augmentation de l'expression de NOX4 par western blot. Cette augmentation d'expression est corrélée à une augmentation de la production de dérivés réactifs de l'oxygène, vérifié par technique AmplexRed. Les résultats obtenus ont également été observés avec la lignée chondrocytaire C-20 A/4, ce qui consolide l'hypothèse que Nox4, aurait une localisation intracellulaire. L'utilisation des inhibiteurs spécifiques de NOX4 corrélée à une baisse de son activité nous permet de confirmer que cette NADPH Oxydase est la source principale des ROS produits dans ces cellules.

La pertinence de ces données dans la physiopathologie de l'arthrose est étayée par des données cliniques sur 14 patients montrant pour la première fois une augmentation significative de l'expression de NOX4 dans les chondrocytes issus de cartilage arthrosique par rapport aux cartilage non arthrosique. En effet, la stimulation par l'IL-1 $\beta$ , provoquant la production de ROS par les HAC via Nox4, ces résultats désignent cette interleukine comme un élément clef de cette pathologie.

**Rôle de NOX4 dans le phénomène arthrosique :** Ces études suggèrent que la génération de ROS pourrait être nécessaire pour l'homéostasie des chondrocytes, ainsi que pour leurs fonctions et leur différenciation. L'immunomarquage de NOX4 sur des cartilages humains a montré un gradient d'expression de NOX4 allant de l'os jusqu'à la surface articulaire où l'oxygène y est le plus abondant. Ce gradient est particulièrement pertinent étant donné la fonction catalytique des NOX, dont accepteur d'électron final est l'oxygène moléculaire. Fait intéressant, l'IL-1 $\beta$  serait un inducteur critique de l'hypertrophie et de l'apoptose des chondrocytes

Nos résultats ont montré une nette diminution de l'ARNm de NOX4 lors d'un traitement par IL-1 $\beta$  en dépit d'une augmentation significative de son expression. Ces données suggèrent que NOX4

pourrait être un médiateur de la différenciation des chondrocytes hypertrophiques en cas d'une stimulation de l'IL-1 $\beta$  au cours de l'arthrose.

Cependant, dans le contexte de notre étude des effets de l'IL-1 $\beta$  sur les chondrocytes primaires humains, les ROS pourraient jouer une fonction pro-catabolique. En effet, nos données montrent que les ROS générés par l'activité de NOX4 sont des médiateurs essentiels de la synthèse de MMP-1, MMP-13 et ADAMTS4, qui sont les principales métalloprotéases responsables de la dégradation de la matrice extra cellulaire dans l'arthrose. L'utilisation d'inhibiteurs de NOX4 tels que le DPI ou encore le CoPP empêche la synthèse et la libération de ces métalloprotéases dans le milieu extra cellulaire.

Il est déjà connu que l'IL-1 $\beta$  induit sa propre néosynthèse par les chondrocytes (**Poole et al. 1997**). Nos résultats montrent en effet une induction de l'ARNm de l'IL-1 $\beta$  après traitement par cette même interleukine des chondrocytes. Les données démontrent que cette boucle est soumise à une régulation rédox. En fait, l'augmentation de l'ARNm de p22phox lors d'une stimulation à l'IL-1 $\beta$  pourrait stabiliser la production de ROS par NOX4, qui est nécessaire pour servir à son tour de médiateur de la néosynthèse d'IL-1 $\beta$ . Les antioxydants (Tiron), les inhibiteurs de NOX (DPI ou HO-1) et l'inhibiteur pharmacologique de NOX4 (GKT) abolissent l'augmentation de l'ARNm de l'IL-1 $\beta$ , ce qui démontre l'importance du complexe Nox4-p22phox dans le maintien de voies cataboliques dans HAC.

Nos résultats démontrent pour la première fois le rôle central de NOX4/p22phox dans les chondrocytes articulaires humains dans la médiation de l'expression de MMP et de la boucle autocrine de l'IL-1 $\beta$ . Ces résultats sont soutenus par la corrélation observée entre l'IL-1 $\beta$ , p22phox et l'expression de l'ARNm de MMP dans les chondrocytes ostéoarthrosiques. Cette étude suggère également que les inhibiteurs de NOX4 pourraient ouvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques dans l'arthrose.

**Perspectives :** Nous démontrons également pour la première fois l'augmentation de l'expression de NOX4 dans des chondrocytes primaires arthrosiques, la désignant comme une cible thérapeutique potentielle dans l'arthrose.

La suite de notre projet porte sur une étude in vivo sur modèle murin KO NOX4. En effet, les premiers résultats utilisant le mono iodo acétate en injection intra articulaire ne nous ont pas

encore permis d'affirmer ce rôle clef de NOX4 dans l'arthrose. Le mécanisme d'action du MIA consiste à tuer les chondrocytes en bloquant la glycolyse, dont résulte l'essentielle de l'énergie du chondrocyte, ce dernier étant très peu exposé à l'oxygène. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'absence d'effet du MIA in vivo, notamment la destruction des chondrocytes, entraînant par conséquent la destruction de NOX4. La solution pourrait résider dans le développement d'un modèle sans apoptose chondrocytaire.

Nos perspectives s'orientent donc vers la réalisation d'une étude in vivo utilisant cette fois une infection des souris par rétrovirus IL-1 $\beta$ . La mise au point d'une infection continue des modèles murins par des rétrovirus libérant de l'IL-1 $\beta$  nous permettrait de nous rapprocher au mieux des conditions pathologiques, afin d'obtenir des résultats plus probants.

## II-VDAC et activité PMOR dans les érythrocytes

Depuis sa découverte, la fonction réductase PMOR mesurée à la membrane plasmique a été mise en évidence non seulement dans les cellules nucléées végétales et animales, mais également dans les érythrocytes. De nombreuses études ont prouvé l'implication de cette fonction dans différents mécanismes essentiels au métabolisme cellulaire et plus particulièrement au métabolisme énergétique ou encore dans la lutte contre le stress oxydant. Nos premiers résultats ont permis de confirmer la présence de cette fonction dans les érythrocytes par la mesure de son activité réductase. Cette activité réductase est facilement mesurable par réduction de dérivés du Tetrazolium (WST-1), (**Backer et al 2004**). Cependant l'enzyme ou le complexe enzymatique responsable de cette activité dans les érythrocytes n'a pour l'instant pas été décrit.

La porine VDAC1 est exprimée dans la membrane externe de la mitochondrie, mais elle est également retrouvée à la membrane plasmique d'un grand nombre de cellules. Dans la mitochondrie, la surexpression de VDAC1 augmente la production d'ions superoxydes. VDAC, possède une fonction PMOR puisqu'elle est capable de réduire le Ferricyanide. Comme l'ont montré **Shimizu et al 2001**, VDAC est exprimée à la membrane des érythrocytes.

Notre travail au sein du laboratoire a pour objectif de confirmer la présence de VDAC dans les membranes érythrocytaires humaines, et de chercher à savoir si sa fonction réductase jusqu'à présent uniquement observée dans les mitochondries est également mesurable dans les érythrocytes.

Par technique de western blot, nos résultats montrent l'expression de VDAC sur les membranes érythrocytaires de différents patients. Nous avons constaté que l'expression de VDAC pouvait varier du simple au double d'un patient à un autre, montrant ainsi que la mesure de VDAC pourrait être un biomarqueur potentiel dans certaines pathologies.

L'intérêt de notre travail était de pouvoir prouver le lien entre l'expression de VDAC et la fonction PMOR des érythrocytes. Nous avons donc mesuré l'activité réductase des membranes érythrocytaires de ces mêmes patients et avons constaté là encore une grande variabilité d'activité réductase. Lors de nos premiers essais, le western blot restant une méthode semi-quantitative, les résultats ne nous ont pas permis de relier de manière efficace la variabilité d'expression de VDAC avec celle des activités réductases. Par contre, nous pouvons néanmoins observer une tendance

encourageante qui semble nous orienter vers une corrélation entre la quantité de VDAC et l'activité PMOR des érythrocytes.

Pour conclure sur une possible corrélation entre quantité de VDAC et activité PMOR des érythrocytes, il fallait mettre au point une technique quantitative et beaucoup plus sensible. Notre choix s'est alors porté sur la technique ELISA, qui n'avait jusqu'alors jamais été utilisée pour quantifier VDAC dans les globules rouges. Grâce à une standardisation effectuée à l'aide des protéoliposomes VDAC fournis par la société Synthelis, nous avons pu montrer une corrélation entre les variations d'activité réductase avec les niveaux d'expression de VDAC à la membrane érythrocytaire.

Afin de démontrer que VDAC représente la source principale de l'activité réductase dans les érythrocytes, nous avons mesuré leur activité en présence de différents inhibiteurs spécifiques (Ac anti VDAC) et pharmacologique (PCMB). L'utilisation de ces inhibiteurs diminuant fortement l'activité réductase, nous avons pu en conclure que VDAC semble bien à l'origine de cette activité. Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence le rôle inhibiteur de notre Ac monoclonal anti-VDAC, nous donnant ainsi un indice sur le site catalytique de cette protéine.

Afin de consolider la démonstration qu'il existe un lien entre VDAC et l'activité réductase, et afin d'écartier toute autre source potentielle de cette activité, nous avons fait le choix de mettre au point une technique permettant d'enrichir les globules rouges avec la protéine VDAC, et de constater par cette occasion, les effets de cette surexpression sur l'activité PMOR. Nous avons pour cela fait appel à la société Synthelis, afin d'obtenir des protéoliposomes exprimant la protéine VDAC à leur surface.

Une partie de la validation de méthode de fusion entre les érythrocytes et les protéoliposomes consistait à s'assurer que les protéoliposomes VDAC mis au point par Synthelis exprimaient bien VDAC et que cette dernière était fonctionnelle. L'expression de VDAC a été vérifiée par western blot (à l'aide de l'anticorps anti-His). Pour l'activité enzymatique, nous avons mesuré l'activité réductase par réduction du WST-1 des différents types de protéoliposomes. La protéine VDAC synthétisée présente une activité réductase en présence de NADH, montrant ainsi pour la première fois cette activité sur un système purifié.

La démonstration qu'une fusion entre un protéoliposome et un érythrocyte était possible, a été faite en fusionnant des liposomes contenant du Crystal violet aux érythrocytes. Ce colorant nous a permis d'affirmer que le contenu des protéoliposomes est intégré de manière efficace dans le cytosol des érythrocytes, et par déduction que la membrane des liposomes était intégrée dans la membrane des globules rouges. La fusion entre protéoliposome et cellules a jusque alors seulement testée et a donné des résultats sur des cellules nucléées.

Nos résultats obtenus par Western blot montrent que la fusion a permis un enrichissement des érythrocytes en VDAC, VDAC ayant été mis en évidence par des anticorps anti-histidine et des anticorps spécifique de VDAC. Cette fusion a également augmenté l'activité PMOR initialement présente dans les globules rouges.

Nous avons confirmé que l'activité des érythrocytes enrichis n'a pas été faussée par la présence de liposomes non fusionnés, car grâce aux expériences menés avec les liposomes colorés au crystal violet, nous avons montré que les liposomes sont séparés de manière visible des cellules par 3 lavages en gradient de Ficoll.

Pour la première fois, nous avons pu prouver que non seulement VDAC est présent dans les érythrocytes humains, mais que ce dernier possède également une activité PMOR. Nous avons également mis au point une technique inédite d'enrichissement des érythrocytes avec des protéines facteurs exogènes, les protéoliposomes, ouvrant la voie à de potentielles perspectives thérapeutique.

Dans l'ensemble, nos résultats montrent l'implication de la protéine VDAC dans l'activité PMOR mesurée à la surface des érythrocytes.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

# A

**Ambasta et al. (2004)** "Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase." *J Biol Chem.* 29;279 (44):45935-41.

# B

**Babior et al. (2002)**. "The leukocyte NADPH oxidase." *Isr Med Assoc J.*;4(11):1023-4.

**Baillet A, et al. (2011)** "Coupling of 6-phosphogluconate dehydrogenase with NADPH oxidase in neutrophils: Nox2 activity regulation by NADPH availability". *Faseb J* 25(7): 2333-2343.

**Banfi et al. (2005)** "Neurohormonal activation is associated with increased levels of plasma matrix metalloproteinase-2 in human heart failure." *Eur Heart J.*;26(5):481-8.

**Beckman KB, Ames BN (1998)** "The free radical theory of aging matures". *Physiological reviews* 78(2): 547-581.

**Bedard et al. (2007)**. "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." *Physiol Rev.*;87(1):245-313.

# C

**Cadenas E, Davies KJ (2000)** "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging". *Free radical biology & medicine* 29(3-4): 222-230.

**Campion Y, et al. (2007)** "New insights into the membrane topology of the phagocyte NADPH oxidase: characterization of an anti-gp91-phox conformational monoclonal antibody". *Biochimie* 89(9): 1145-1158.

**Campion Y, et al. (2009)** "New p22-phox monoclonal antibodies: identification of a conformational probe for cytochrome b 558". *Journal of innate immunity* 1(6): 556-569.

**Cheng, Get al. (2001)** "Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5". *Gene* 269, 131–140.

**Chevalier X (2003)** « Arthritis ». *Rev Prat* 53(6): 665-673.

**Crane et al. (1978)** "Cytochemical demonstration of glutaraldehyde-resistant NADH-ferricyanide oxido-reductase activities in rat-liver plasma membranes and Golgi apparatus." *Cytobiologie.* ;18(2):213-30.

**Cross et al (1990)** "Involvement of an NAD(P)H oxidase as a pO<sub>2</sub> sensor protein in the rat carotid body." *Biochem J.*;272(3):743-7.

## D

**DeLeo FR et al. (2000)** "Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly". *The Journal of biological chemistry* 275(18): 13986-13993.

**DeLeo FR, et al. (1995)** "A domain of p47phox that interacts with human neutrophil flavocytochrome b558". *The Journal of biological chemistry* 270(44): 26246-26251.

**Dröge et al. (2002)** "Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants." *Exp Gerontol.*;37(12):1333-45.

## E

**Elinder et al. (2005)** "Opening of plasma membrane voltage-dependent anion channels (VDAC) precedes caspase activation in neuronal apoptosis induced by toxic stimuli." *Cell Death Differ.*;12(8):1134-40.

## F

**Forge et al. (1987)** 'Analysis of structural changes in the stria vascularis following chronic gentamicin treatment.' *Hear Res.*;31(3):253-65.

## G

**Gaudin et al. (1998)** "Focalized matrix proteolysis and inflammation" ;56(6):661-9.

**Geiszt et al. (2000)** « Identification of renox, and NADH oxidase in kidney. » *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(14) :8010-4.

**Genestra et al. (2007)** "Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants." *Cell Signal.*;19(9):1807-19.

**Goldring MB (2004)** "Immortalization of human articular chondrocytes for generation of stable, differentiated cell lines". *Methods in molecular medicine 100*: 23-36.

**Goldring MB et al (2008)** "Defining the roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism". *Annals of the rheumatic diseases 67 Suppl 3*: iii75-82.

**Goldring MB et al. (1994)** "Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes." *The Journal of clinical investigation 94(6)*: 2307-2316.

**Grange L, et al. (2006)** NAD(P)H oxidase activity of Nox4 in chondrocytes is both inducible and involved in collagenase expression. *Antioxidants & redox signaling 8(9-10)*: 1485-1496.

## H

**Halliwell et al. (1993)** ."Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance" *Am J Clin Nutr.* 715S-724S.

**Henrotin et al. (2005)** "Current concepts in the therapeutic management of osteoarthritis with glucosamine." *Bull Hosp Jt Dis.*;63(1-2):31-6.

**Henrotin Y, Kurz B, Aigner T (2005)** "Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes?" *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society 13(8)*: 643-654.

**Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP (2003)** "The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage." *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society 11(10)*: 747-755.

**Humphries KM, Juliano C, Taylor SS (2002)** "Regulation of cAMP-dependent protein kinase activity by glutathionylation". *The Journal of biological chemistry 277(45)*: 43505-43511.

## J

**Jung Y, Kim H, Min SH, Rhee SG, Jeong W (2008)** "Dynein light chain LC8 negatively regulates NF-kappaB through the redox-dependent interaction with IkappaBalpha." *The Journal of biological chemistry 283(35)*: 23863-23871.

## K

**Kennett et al. (2006).** "Plasma membrane oxidoreductases: effects on erythrocyte metabolism and redox homeostasis." *Antioxid Redox Signal.* 8(7-8):1241-7.

**Kim JH. et al (2010).** "The use of biodegradable PLGA nanoparticles to mediate SOX9 gene delivery in human mesenchymal stem cells (hMSCs) and induce chondrogenesis." *Biomaterials.* 2011 Jan;32(1):268-78.

**Kirkman et al. (2007)** "Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries." *Trends Biochem Sci.*;32(1):44-50.

**Krause KH (2007)** "Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases". *Experimental gerontology* 42(4): 256-262.

## L

**Lalucque H1, et al. (2003).** "NADPH oxidase: an enzyme for multicellularity?" *Trends Microbiol.* (1):9-12.

**Larm et al. (1994)** "Plasma Membrane Redox Systems and their role in Biological Stress and Disease" - *Google Livres.*

**Lassegue B, et al (2012)** "Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system." *Circulation research* 110(10): 1364-1390.

**Lawen et al. (2005)** "Voltage-dependent anion-selective channel 1 (VDAC1)--a mitochondrial protein, rediscovered as a novel enzyme in the plasma membrane." *Int J Biochem Cell Biol.*;37(2):277-82.

**Lyle AN, L et al. (2009)** "Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells." *Circulation research* 105(3): 249-259.

## M

**Martin et al. (1998)** "Effects of fibronectin on articular cartilage chondrocyte proteoglycan synthesis and response to insulin-like growth factor-I." *J Orthop Res.*;16(6):752-7.

**Morel F (2007)** "Molecular aspects of chronic granulomatous disease.the NADPH oxidase complex". *Bulletin de l'Academie nationale de medecine* 191(2): 377-390; discussion 390-372.

**Morita K. et al 2007.** "Reactive oxygen species induce chondrocyte hypertrophy in endochondral ossification." *J Exp Med.* 2007 Jul 9;204(7):1613-23. Epub 2007 Jun 18.

## N

**Nauseef et al. (2004)** ."Assembly of the phagocyte NADPH oxidase". *Histochem Cell Biol.*;122(4):277-91.

**Nguyen MV, et al. (2012)** "Recombinant Nox4 cytosolic domain produced by a cell or cell-free base systems exhibits constitutive diaphorase activity." *Biochemical and biophysical research communications* 419(3): 453-458.

**Nguyen MV, Lardy B, Rousset F, et al. (2013)** "Quinone compounds regulate the level of ROS production by the NADPH oxidase Nox4". *Biochemical pharmacology* 85(11): 1644-1654.

## P

**Paclet MH, et al (2004)** Localization of Nox2 N-terminus using polyclonal antipeptide antibodies. *The Biochemical journal* 382(Pt 3): 981-986.

**Paclet MH, Morel F (2000)** "P67-phox-mediated NADPH oxidase assembly: imaging of cytochrome b558 liposomes by atomic force microscopy." *Biochemistry* 39(31): 9302-9310.

**Poole AR (2001)** "Cartilage in health and disease". *Lippincott Williams & Wilkins.* pp. 226–284.

**Poole et al. (1997)** Cellular biology of cartilage degradation. Mechanisms and models in rheumatoid arthritis London: *Academic Press.* pp. 163–204.

**Poole et al. (1992)** Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. *Journal of cell science* 103 (Pt 4): 1101-1110.

## R

**Rossi, F et al. (1970)** “Stimulation of the respiration of polymorphonuclear leucocytes by antileucocyte antibodies.” *Experientia* 26, 491–492.

**Rousset et al. (2015).** “IL-1beta mediates MMP secretion and IL-1beta neosynthesis via upregulation of p22 (phox) and NOX4 activity in human articular chondrocytes.” *Osteoarthritis Cartilage.*;23(11):1972-80.

**Rousset F, Nguyen MV, Grange L, Morel F, Lardy B (2013)** “Heme Oxygenase-1 Regulates Matrix Metalloproteinase MMP-1 Secretion and Chondrocyte Cell Death via Nox4 NADPH Oxidase Activity in Chondrocytes”. *PloS one* 8(6): e66478.

## S

**Serrander L, Cartier L, Bedard K, Banfi B, Lardy B et al. (2007)** “NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation.” *The Biochemical journal* 406(1): 105-114.

**Shimada, H. et al. (2009)** “Paraquat toxicity induced by voltage-dependent anion channel 1 acts as an NADH-dependent oxidoreductase” *J. Biol. Chem.* 284, 28642–28649.

## T

**Tiku et al. (1998)**”Hydroxyl radical formation in chondrocytes and cartilage as detected by electron paramagnetic resonance spectroscopy using spin trapping reagents.”;29(3):177-87.

## U

**Ujwal, R. et al. (2008)** The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 17742–17747.

## V

**Vignon et al. (1980).** “[Microdurimetric and biochemical study of human articular cartilage. Comparison of different joints]. *Rev Rhum Mal Osteoartic.*;47(12):715-8.

**Volpp et al. (1988).** "Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease." *Science*. 1295-7.

**Von Löhneysen (2010).** "Structural insights into Nox4 and Nox2: motifs involved in function and cellular localization." *Mol Cell Biol.*; 30 (4):961-75.

## W

**Wientjes et al. (1993)** "p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains." *Int J Biochem Cell Biol.* 1736–1743.

## Y

**Yelin et al. (1995)** "The economic cost and social and psychological impact of musculoskeletal conditions. National Arthritis Data Work Groups." *Arthritis Rheum.*; 38 (10):1351-62.

**Yin et al. (2009)** "Oxidative stress inhibits insulin-like growth factor-I induction of chondrocyte proteoglycan synthesis through differential regulation of phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt and MEK-ERK MAPK signaling pathways." *J Biol Chem.* 13;284(46):31972-81.

**Yudoh et al. (2005)** Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis research & therapy* 7(2): R380-391.

## Z

**Zhang L et al. (2011)** "New insight into the Nox4 subcellular localization in HEK293 cells: first monoclonal antibodies against Nox4". *Biochimie* 93(3): 457-468.

**Zhang L et al. (2008)** "Positive regulation of the NADPH oxidase NOX4 promoter in vascular smooth muscle cells by E2F." *Free radical biology & medicine* 45(5): 679-685.

## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

---

### Posters:

- « Comparaison de l'impact du traitement par acide hyaluronique ou acide hyaluronique plus mannitol sur l'expression des principales protéases impliquées dans l'arthrose (MMP1, MMP13, ADAMTS5). Etude in vitro. » *C. Pinosa Zezza, F. Morel, B. Lardy, L. Grange, T. Conrozier*

**LABRHA – 27ème congrès Français de Rhumatologie (Décembre 2014)**

### Publications:

- « Impact of the addition of ginger extract and copper sulfate to glucosamine sulfate on IL-1beta stimulated C-20/A4 chondrocyte. » *F. Rousset, L. Grange, M. Nguyen, C. Pinosa Zezza, P. Gaudin, T. Conrozier, F. Morel, B. Lardy*

**J Rheum Dis Treat, JRDT-2-038, (Volume 2, Issue 3), Research Article; ISSN: 2469-5726 – September 2017**

- « IL-1 $\beta$  mediates MMP secretion and IL-1 $\beta$  neosynthesis via upregulation of p22phox and Nox4 activity in human articular chondrocytes. » *F. Rousset, F. Hazane-Puch, MVC. Nguyen, L. Grange, C. Pinosa Zezza, B. Rubens-Duval, F. Morel, B. Lardy.*

**Osteoarthritis and cartilage, (Volume 22, Supplement, Page S173) - April 2014**

- « Voltage-dependent anion-channel (VDAC) reductase activity in erythrocyte cells. » *Pinosa C, Pereira S, Liori L, Berthier S, Manet A, Cortes S, Toussaint B, Lardy B.*  
**(En préparation)**

### Présentations :

- « La NADPH Oxydase 4: Cible thérapeutique dans l'arthrose? » **9ème Club Oxydase 2015 – Université de Genève**
- « La NADPH Oxydase 4: Cible thérapeutique dans l'arthrose? » **GREPI Day 2014 & 2015 – Université Grenoble Alpes**

# Osteoarthritis and Cartilage



## IL-1beta mediates MMP secretion and IL-1beta neosynthesis via upregulation of p22<sup>phox</sup> and NOX4 activity in human articular chondrocytes



F. Rousset †, F. Hazane-Puch ‡, C. Pinosa †, M.V.C. Nguyen †, L. Grange §, A. Soldini ‡, B. Rubens-Duval ||, C. Dupuy ¶, F. Morel †, B. Lardy ††\*

† Université Joseph Fourier, GREPI AGIM FRE 3405 CNRS, Grenoble, France

‡ Département de biologie et pathologie, Centre hospitalier Universitaire, Grenoble, France

§ Service de Rhumatologie, Centre hospitalier Universitaire, Grenoble, France

|| Service d'orthopédie, Centre hospitalier Universitaire, Grenoble, France

¶ Université Paris-Sud, UMR 8200 CNRS, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 December 2014

Received in revised form

6 February 2015

Accepted 24 February 2015

#### Keywords:

Osteoarthritis

NADPH oxidase 4

ROS

IL1b

MMPs

Chondrocytes

### SUMMARY

**Objective:** Osteoarthritis (OA) is characterized by a progressive alteration of the biochemical properties of the articular cartilage. Inflammation plays a major role in OA, particularly through the cytokine interleukin-1 $\beta$ , promoting reactive oxygen species (ROS) generation and matrix metalloproteinases (MMP) synthesis by the chondrocytes, orchestrating matrix proteolysis. NADPH oxidases (NOX) are membrane enzymes dedicated to the production of ROS. Role of oxidative stress is well established in OA; however, contribution of NOX in this process is still poorly documented. In this study, we addressed the role of NOX in primary human articular chondrocytes (HAC) upon inflammatory conditions – namely IL-1 $\beta$  and OA.

**Design:** HAC were collected from patients undergoing hip surgery. Chondrocytes were treated with IL-1 $\beta$  and NOX inhibitors Diphenylene Iodonium, GKT136901, Tiron and Heme oxygenase-1 before MMP expression and NOX activity assessment. Finally, NOX4 expression was compared between OA and non OA parts of hip cartilage ( $n = 14$ ).

**Results:** This study establishes for the first time in human that NOX4 is the main NOX isoform expressed in chondrocytes. We found a significant upregulation of NOX4 mRNA in OA chondrocytes. Expression of NOX4/p22<sup>phox</sup> as well as ROS production is enhanced by IL-1 $\beta$ . On the other hand, the use of NOX4 inhibitors decreased IL-1 $\beta$ -induced collagenase synthesis by chondrocytes. Moreover, our study support the existence of a redox dependant loop sustaining pro-catabolic pathways induced by IL-1 $\beta$ .

**Conclusions:** This study points out NOX4 as a new putative target in OA and suggests that NOX-targeted therapies could be of interest for the causal treatment of the pathology.

© 2015 Osteoarthritis Research Society International. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Introduction

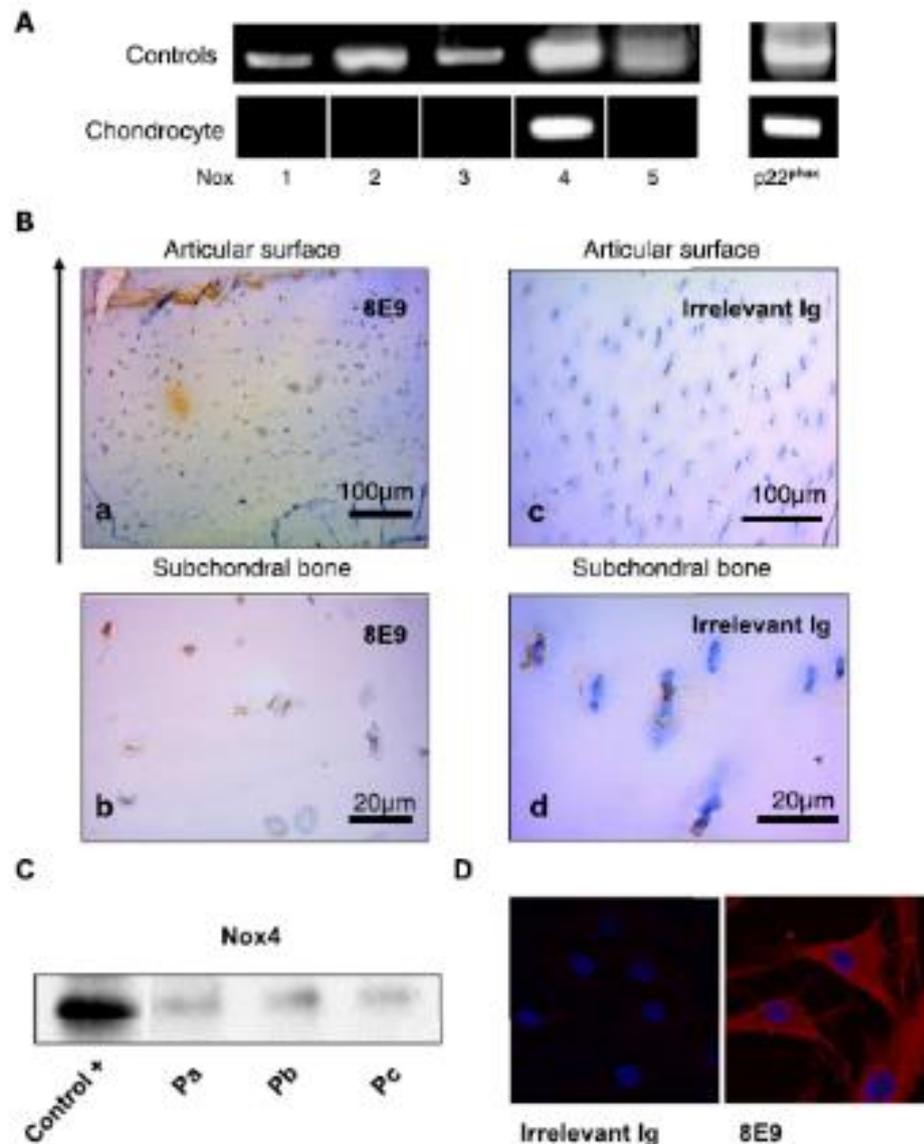
ROS are small reactive molecules derived from molecular oxygen involved in physiological processes such as innate immunity and cell signalling pathways controlling differentiation, adhesion, migration or apoptosis<sup>1</sup>. Impairment of ROS homeostasis has been associated with pathological states such as cell tumoral

transformation, fibrosis, osteoporosis or diabetes due to inappropriate cell signalling. ROS production has been suggested to be part on the ageing process<sup>2</sup>. Indeed, most of the common ageing related degenerative pathologies such as Parkinson's disease, Alzheimer, cancer, osteoporosis or osteoarthritis are linked to oxidative stress<sup>3,3</sup>.

NOX family are transmembrane proteins composed of seven members sharing specific structural homology regions<sup>4,5</sup>. NOX catalyses the transfer of electron from NADPH across biological membranes via two heme molecules to generate superoxide anion, giving rise to ROS<sup>6</sup>. NOX4 represents the major source of ROS in kidney and is widely expressed in many others tissues including the

\* Address correspondence and reprint requests to: B. Lardy, AGIM – Laboratoire GREPI FRE 3405 CNRS, EFS site de Grenoble, 29 av maquis du Grésivaudan, 38700 la Tronche, France.

E-mail address: blardy@chu-grenoble.fr (B. Lardy).



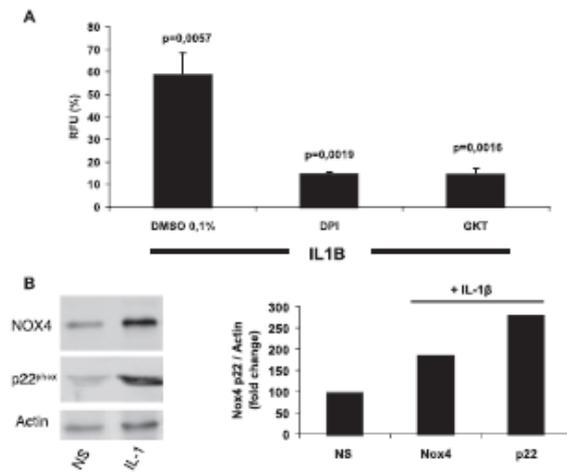
**Fig. 1.** NOX4 is the chondrocyte NADPH oxidase. (A) RNA was extracted from HAC (n = 3) and transcribed to cDNA as described in the Material and Methods section. Specific primers were used to amplify cDNA encoding for NOX1 to NOX5 and p22<sup>phox</sup> (Table 1 Supplemental Data). Plasmids encoding NOX1 to NOX5 and p22<sup>phox</sup> were used as positive controls. (B) Immunohistochemical detection of NOX4 on human cartilage sections by purified mAb8E9 (a and b) or irrelevant Ig (c and d). Photographed and printed to a final magnification of  $\times 500$  for the upper pictures, and  $\times 1000$  for the lowers. The arrow show NOX4 gradually expressed in human cartilage from the bone side to the articular surface. This result was representative of n = 3 human cartilage sections. (C) NOX4 expression was assessed by immunoblot upon SDS-PAGE on 150 µg of protein from 1% (v/v) Triton X-100 extract obtained from HAC (n = 3 patients). Protein control was obtained from C-20/A4 NOX4 cells. (D) HAC cultured *ex vivo* (passage 1) were fixed with PFA, permeabilized and were respectively stained with irrelevant IgM or the NOX4 specific 8E9 mAb antibody (red). The nucleus was coloured with Hoechst 33258 (blue). This result was representative of n = 3 patients.

hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) produced by HAC [Fig. 2(A)] with an optimum dose/response value at 2 ng/ml IL-1β (Supp. Fig. 1). Under these conditions, the addition of the DPI, an inhibitor of NADPH oxidase, led to a significant inhibition of the IL-1β-stimulated ROS production by HAC [Fig. 2(A)]. Moreover the use of GKT136901, a pharmacological inhibitor of NOX4, had a similar effect. Furthermore, treatment with inhibitors of the NO synthase (L-NAME) and of the mitochondrial respiratory chain (Azide and Rotenone), other putative sources of ROS in HAC, did not affect the measured ROS production detected by Amplex Red oxidation rate method [Supp. Fig. 1(B)]. Together, these data suggest that NOX4 is the source of ROS in HAC upon IL-1β stimulation. To confirm this data, we

assessed the impact of IL-1β on NOX4 and p22<sup>phox</sup> expression. Interestingly, results showed a significant increase of both NOX4 and p22<sup>phox</sup> as shown by immunoblot [Fig. 2(B)]. Hence, given the constitutively active state of NOX4 in complex with p22<sup>phox</sup>, these results suggest that the mechanism leading to the increase of ROS production by IL-1β in HAC cells is mediated by an upregulation of the amount of NOX4/p22<sup>phox</sup> complex.

*NOX4 activity mediates MMP synthesis by chondrocytes*

We have previously shown that ROS generated by NOX4 regulate the MMP-1 synthesis pathway in the IL-1β-stimulated C-20/A4



**Fig. 2.** NOX4 is a major source of ROS upon IL-1 $\beta$  stimulation in human articular chondrocytes. (A) HAC were cultured in absence of FBS during 24 h and stimulated with IL-1 $\beta$  for additional 24 h. Total H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was assessed by the Amplex Red method by using  $5 \times 10^5$  cells per well. NOX4 inhibitors (10  $\mu$ M): DPI, GKT136901 or DMSO (0.1%) were added in wells, 20 min before starting the experiment. Results are expressed as the percentage increase vs non stimulated cells (NS) (+DMSO 0.1%) in Relative Fluorescence Units (RFU) and were acquired every minute during 60 min. Values represent the mean and 95% confidence interval of three determinations ( $n = 3$  patients). (B) NOX4 and p22<sup>phox</sup> expression was assessed by immunoblot upon SDS-PAGE on 150  $\mu$ g of protein from 1% (v/v) Triton X-100 extract obtained from HAC (representative of  $n = 3$  patients), stimulated or not (NS) with IL-1 $\beta$  for 24 h. Immunodetection was performed by antibodies raised against NOX4 and p22<sup>phox</sup> or Actin as loading control.

chondrocyte cell line<sup>13</sup>. In this context, the induction of Heme Oxygenase-1 was potent to inhibit NOX4 activity and the subsequent MMP-1 release. We therefore assessed the impact of NOX inhibition on IL-1 $\beta$ -induced MMP synthesis and release by primary human chondrocytes. The results showed a strong increase of the transcript level and of the quantity of MMP-1 and MMP-13 proteins released in the HAC culture supernatant of after 24 h stimulation with IL-1 $\beta$  [Fig. 3(D)]. Similarly, a strong induction of the transcriptional level of MMP-1, MMP-13 and ADAMTS4 (respectively 300, 200 and 40 fold) was detected by RT-qPCR [Fig. 3(A), (B) and (C)]. To determine the role of NOX4, we treated HAC cells with CoPP for 24 h to induce the expression of HO-1 mRNA (Supp. Fig. 2) or with DPI or GKT136901 to inhibit NOX4 activity. Interestingly, induction of HO-1 expression dramatically decreased IL-1 $\beta$ -stimulated MMP-1, MMP-13 and ADAMTS4 mRNA expression [Fig. 3(A)–(C)]. In addition, despite non-statistically significant results, we observed a similar tendency of the DPI and GKT136901 treatment to reduce the MMP-1 and MMP-13 transcriptional level. This tendency was confirmed at the protein level on HAC isolated from 3 patients [Fig. 3(D)]. However, while ADAMTS4 transcription was repressed by the other inhibitors, no effect of GKT136901 was observed, suggesting that the aggrecanase is not regulated by NOX4 but rather by direct or indirect target of DPI and HO-1.

Together, our data demonstrate that IL-1 $\beta$ -mediated MMP-1 and MMP-13 synthesis and release in HAC are triggered by a production of ROS. The data also strongly suggest a role of NOX4 in this pro-catabolic pathway.

#### IL-1 $\beta$ induced ROS production is involved in inflammation persistence

It is well established that inflammatory process plays a significant role in the OA pathology<sup>25</sup>. Especially, IL-1 $\beta$  acts in an

autocrine/paracrine manner and induces its own neosynthesis by chondrocyte, sustaining pro-catabolic pathways leading to cartilage degradation<sup>26</sup>. We thus assessed whether the inhibition of NOX4 could impact the autocrine-mediated IL-1 $\beta$  synthesis. As assessed by RT-qPCR, IL-1 $\beta$  treatment strongly induced IL-1 $\beta$  mRNA (about 4000 fold increase) [Fig. 4(A)]. Interestingly, the induction of HO-1 expression significantly decreased IL-1 $\beta$  mRNA neosynthesis in HAC. Despite non-statistically significant results, the same tendency was observed with DPI treatment. These results were confirmed at the protein level as assessed by ELISA assay in the culture supernatant of C-20/A4 chondrocytes treated by CoPP or with the antioxidant tiron [Fig. 4(B)]. Moreover, IL-1 $\beta$ -induced p22<sup>phox</sup> transcription was also significantly prevented by DPI and by HO-1 induction. Similar tendency was observed with GKT136901 treatment [Fig. 4(C)]. Collectively, the results demonstrate for the first time that the autocrine/paracrine loop mediated by IL-1 $\beta$  in HAC is dependent on a production of ROS. Our data also suggest that NOX4 and p22<sup>phox</sup> could be critical mediator involved in this loop, sustaining in turn IL-1 $\beta$  neosynthesis and downstream catabolic pathways in chondrocytes.

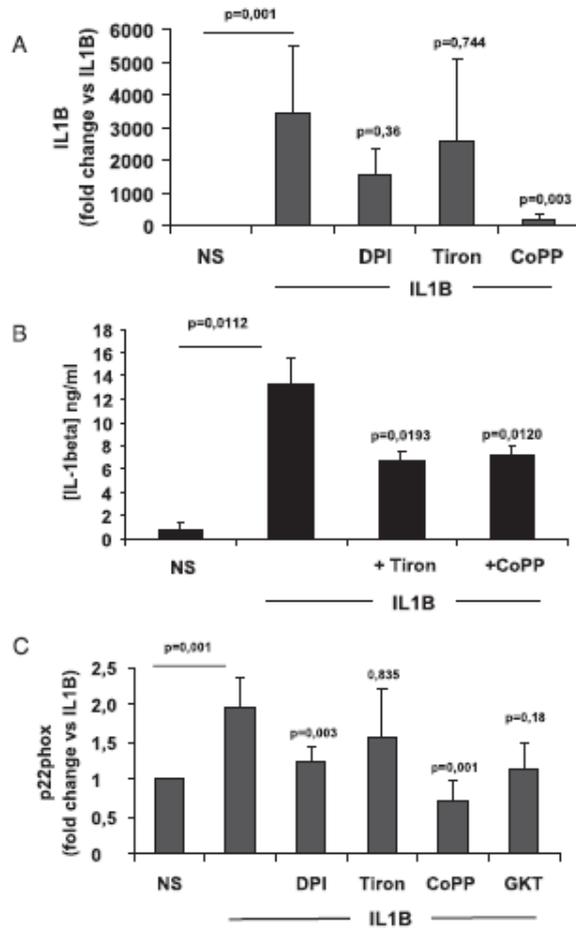
#### NOX4 is overexpressed in OA chondrocytes

As a whole, mechanistic data collected from HAC suggest that NOX4 is a mediator of IL-1 $\beta$ -induced catabolic pathways. To further confirm the possible pathological implication of NOX4 in OA, we decided to compare the level of NOX4 mRNA between chondrocytes isolated from parts of the hip cartilage of OA and of non OA in a cohort of 14 patients. OA vs non OA criteria of the parts of cartilages were evaluated by pathologists (data not shown). Interestingly, we found a significant upregulation of NOX4 mRNA in OA chondrocytes (fold increase =  $13.98 \pm 9.7$ ;  $P = 0.021$  vs non OA patients) [Fig. 5(A)]. Moreover, the basal production of ROS was significantly enhanced in OA chondrocytes ( $P = 0.048$ ) [Fig. 5(B)]. These clinical data are consistent with our previous observation on IL-1 $\beta$  treated chondrocytes and support the idea that NOX4 may participate to OA pathogenesis. Hence, we propose a mechanistic model in which IL-1 $\beta$  mediates the expression of pro-catabolic players – namely MMP-1 and MMP-13 – by a NOX4/p22<sup>phox</sup> depend fashion [Fig. 6].

#### Discussion

We have previously shown the direct relation between NOX4 activity and MMP synthesis by the C-20/A4 chondrocytes cell line<sup>13</sup>. The aim of the present study was to assess the functional relevance of these *in vitro* observation in human pathological conditions, namely in OA. Given the documented role of oxidative stress in degenerative pathologies and especially in OA<sup>27</sup>, it is of importance to note that only two recent studies describe the presence of NOX in mice primary chondrocytes<sup>21,28</sup>. To our knowledge, this study demonstrates for the first time the presence of the NOX4 complex (NOX4 and p22<sup>phox</sup>) in human articular chondrocyte. Moreover, at the functional aspect, the increase of NOX4 expression observed upon IL-1 $\beta$  treatment could mediate and sustain pro-catabolic pathways. The relevance of these data in the pathophysiology of osteoarthritis is supported by preliminary clinical data on 14 patients.

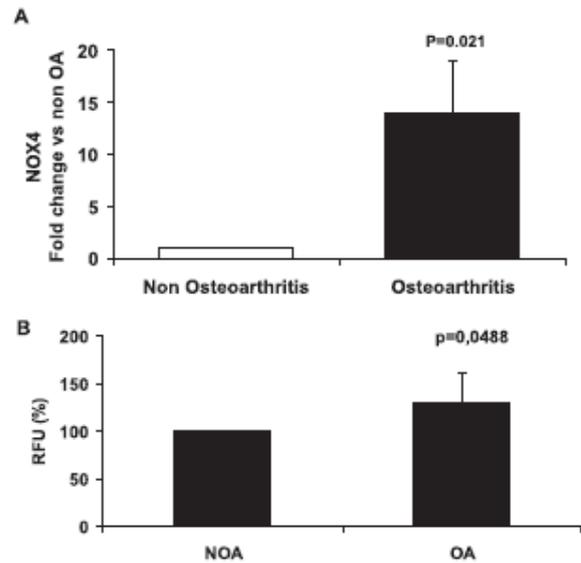
Potential sources of ROS have been identified in chondrocytes<sup>3</sup>. Among them, uncoupled NO synthase, mitochondria respiratory chain or NADPH oxidase could modulate chondrocyte behaviour and extracellular matrix homeostasis. In fact, physiological role of ROS in chondrocytes is not well understood. Indeed, according to Martin *et al.* mitochondria dependent generation of ROS is necessary to maintain glycolytic ATP production by chondrocytes<sup>29</sup>. ROS



**Fig. 4.** NOX4 activity sustains IL-1 autocrine/paracrine loop and p22<sup>phox</sup> upregulation. (A–C) HAC were cultured in absence of FBS and induced or not for HO-1 expression by CoPP. After 24 h treatment with IL-1 $\beta$  and NOX4 inhibitors (DPI and tiron), total RNA was extracted from HAC (n = 14 patients) for RT-qPCR analysis of IL-1 $\beta$  (A) and CYBA (p22<sup>phox</sup>) (C). (B) C-20/A4 chondrocytes were treated or not with IL-1 $\beta$  and NOX4 inhibitors (tiron and CoPP). After 24 h, cell were washed 3 times to eliminate exogenous IL-1 $\beta$  and medium was replaced. After additional 24 h neo-synthesized IL-1 $\beta$  was assessed by ELISA method in the cell culture supernatant – 3 patients.

generated by NOX2 and NOX4 have also been suggested to act as chondrogenesis mediator during the skeletal system development<sup>21</sup>. Moreover, evidences show that ROS are involved in chondrocyte hypertrophic differentiation occurring in endochondral ossification<sup>30,31</sup>. NOX4 immunostaining on human cartilage slides showed a clear gradient of NOX4 expression from the bone side to the articular surface where oxygen is the most abundant. This gradient is particularly relevant given catalytic function of NOX, whose final electron acceptor is molecular oxygen. Hence, it is likely that in physiological conditions, especially during endochondral ossification, NOX4 could play a role in chondrogenesis or in chondrocytes differentiation<sup>21,28</sup>.

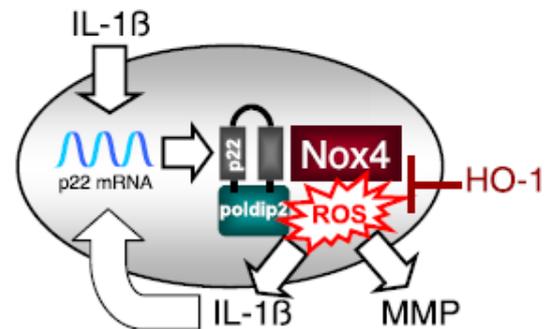
However, in the inflammatory context, mimicked in our study by the effects of IL-1 $\beta$  or in OA, ROS may play deleterious and pro-catabolic functions in HAC. In the present study and upon IL-1 $\beta$  stimulus, a role of NO synthase and mitochondria respiratory chain was excluded [Supp. Fig. 1(B)]. Indeed, our data showed that ROS



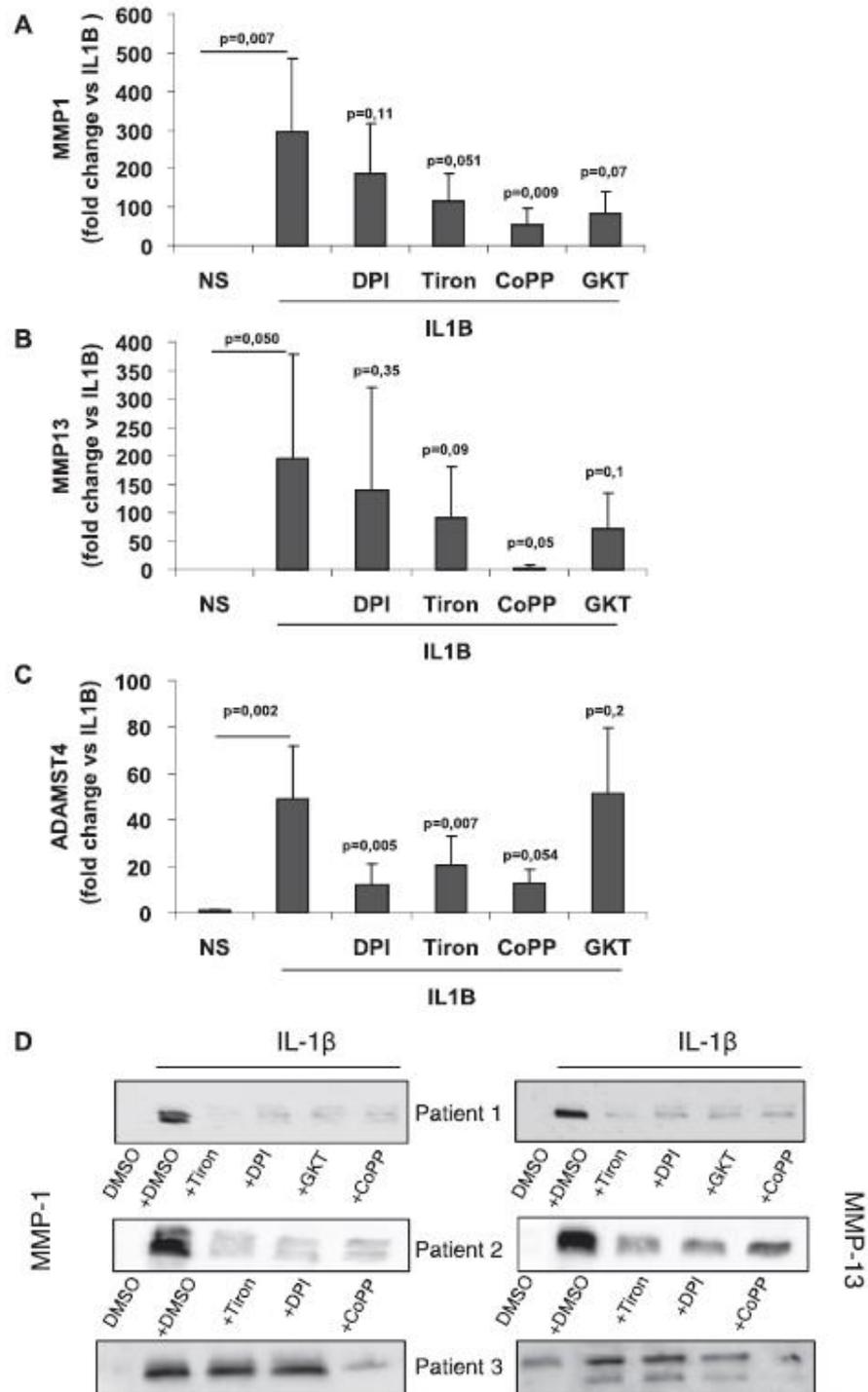
**Fig. 5.** NOX4 is overexpressed in OA chondrocytes. (A) HAC were extracted and cultured from damaged vs undamaged parts of articular cartilage (n = 14 patients). At passage 1, total RNA was extracted from HAC for RT-qPCR analysis of NOX4. Histogram shows the comparison of NOX4 mRNA level between OA and non OA chondrocytes. (B) In parallel, basal production of ROS was assessed by the Amplex Red method on 3 patients.

generated and NOX4-increased expression are critical mediators of MMP-1, MMP-13 and ADAMTS4 synthesis and release by HAC. Interestingly, the use of NOX inhibitors such as DPI, GKT136901 or HO-1 was able to prevent this release.

It is well documented that IL-1 $\beta$  acts in an autocrine/paracrine manner and induces its own neosynthesis by chondrocytes<sup>26</sup>. Our results show indeed a clear induction of IL-1 $\beta$  mRNA upon IL-1 $\beta$  stimulation of HAC. In addition, we bring in this study the first evidence that this loop is mediated by redox pathways in human chondrocytes. In fact, both p22<sup>phox</sup> and NOX4 expression increase upon IL-1 $\beta$  treatment probably contributing to sustain the production of ROS and IL-1 $\beta$  neosynthesis. Interestingly, NOX



**Fig. 6.** The NOX4 pathway promote catabolism in human chondrocytes upon inflammatory condition. IL-1 $\beta$  treatment of HAC leads to an upregulation of p22<sup>phox</sup> mRNA, stabilization of NOX4 at the protein level and an increased production of hydrogen peroxide which acts as a crucial mediator of MMP-1, MMP-13 and ADAMTS4 expressions themselves responsible for chondrocyte extracellular matrix catabolism. This work also point out the redox regulation loop of p22<sup>phox</sup> and IL-1 $\beta$  suggesting that NOX4 activity sustains catabolic pathways in HAC.



**Fig. 3.** NOX4 activity regulates MMP synthesis. HAC ( $n = 14$  patients) were cultured in absence of FBS and induced or not for HO-1 expression by CoPP. After 24 h treatment with IL-1 $\beta$  and NOX4 inhibitors (Tiron, DPI or GKT136901), total RNA was extracted from HAC for RT-qPCR analysis of MMP-1 (A), MMP-13 (B) and ADAMTS4 (C) (D) in parallel, supernatant was recovered and 10  $\mu$ g of proteins were loaded for MMP-1 and MMP-13 immunodetection by Western Blot. Experiments were performed on  $n = 3$  patients.

inhibitors (GKT, DPI and HO-1) also abolished the increase in p22<sup>phox</sup> mRNA, disrupting this autocrine catabolic pathway. Such transcriptional regulation of p22<sup>phox</sup> was also shown in EaHy926 endothelial cell line<sup>32</sup>. As a general observation, we notice that HO-1 have a slightly better effect than NOX inhibitor on the expression of MMP and on IL-1 $\beta$  neosynthesis. In fact, HO-1 is a multipotent heat shock protein<sup>33</sup>. The multiple effects of HO-1 are all related to the degradation of heme in bioactive compounds, namely bilirubin, iron and carbon monoxide. As HO-1 has been shown to act as a powerful anti-inflammatory agent in the context of OA<sup>34,35</sup>, it is likely that the whole effects of HO-1 are not all related to NOX4 inhibition in chondrocytes, by example considering ADAMTS4 transcription.

As a whole, the present study strongly suggests a significant contribution of NOX4/p22<sup>phox</sup> the IL-1 $\beta$ -mediated expression of MMP and IL-1 $\beta$  autocrine loop in human articular chondrocytes. These results are supported by the significant overexpression of NOX4 mRNA and increased production of ROS observed in OA compared to non OA condition in a cohort of 14 patients.

Nowadays, no available causal treatments are able to slow the degenerative condition of articular cartilage during OA<sup>36</sup>. On the other hand, many dietary supplements also displaying antioxidant capacities have been assessed in OA<sup>37</sup>. Among them, the most widely used compounds include proteoglycans such as chondroitin or glucosamine sulfate and polyphenols such as resveratrol or green tea extracts<sup>38</sup>. Some of these compounds seem to display modest benefits on the disease progression, however, antioxidant therapies are often disappointing *in vivo*, mainly because of the highly instable nature of ROS and their subsequent short half-life<sup>39</sup>. Indeed, it would expect that scavengers are bioavailable in sufficient concentration and in very close proximity of the site of production of the ROS. In this respect, we believe that pharmacological inhibitors of NOX4 as well as HO-1 agonists might be a sound strategy in the causal treatment of the disease. Further work, especially using *in vivo* models, should be done to confirm the potential of this strategy.

#### Author contributions

Conceived and designed the experiments: FR BL FM. Provision of study materials: BRD LG. Performed the experiments: FR CP AS FHP CD. Analysed the data: FR FHP CP BL. Wrote the paper: FR MVCN FHP BL FM.

#### Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist.

#### Acknowledgements

The authors thank Monique Talbot for his support for immunohistological experiments, Pr. Mary Goldring for the generous gift of the C-20/A4 cell line. The authors are grateful to Julie Pouget Soladis for her precious help in statistical analysis. The authors thank also Pr Xavier Ronot, Pr Bertrand Toussaint, Pr François Rannou, Dr Marie Hélène Paclet and Pr Philippe Gaudin for helpful discussions.

This work was supported by grants from the « Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et Technologie, Paris, the « UFR de Médecine, Université Joseph Fourier, Grenoble, the « Société Française de Rhumatologie and the « Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation, Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble. FR is supported by grants from the Fondation Arthritis Courtin and the LABHRA Company.

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

#### Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2015.02.167>.

#### References

- Krause KH. Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. *Exp Gerontol* 2007;42:256–62.
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11:298–300.
- Henrotin Y, Kurz B, Aigner T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthr Cartil* 2005;13:643–54.
- Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *Febs J* 2008;275:3249–77.
- Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004;4:181–9.
- Lassegue B, San Martin A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res* 2012;110:1364–90.
- Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL. Identification of nox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8010–4.
- Yang S, Zhang Y, Ries W, Key L. Expression of Nox4 in osteoclasts. *J Cell Biochem* 2004;92:238–48.
- Mandal CC, Ganapathy S, Gorin Y, Mahadev K, Block K, Abboud HE, et al. Reactive oxygen species derived from Nox4 mediate BMP2 gene transcription and osteoblast differentiation. *Biochem J* 2012;433:393–402.
- Edderkaoui M, Nitsche C, Zheng L, Pandolfi SJ, Gukovskaya AS. NADPH oxidase activation in pancreatic cancer cells is mediated through Akt-dependent up-regulation of p22<sup>phox</sup>. *J Biol Chem* 2010;285:7779–87.
- Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, Schmidt HH, Busse R, Brandes RP. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22<sup>phox</sup> is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2004;279:45935–41.
- Nguyen MV, Lardy B, Rousset F, Hazane-Puch F, Zhang L, Trocme C, et al. Quinone compounds regulate the level of ROS production by the NADPH oxidase Nox4. *Biochem Pharmacol* 2013;85:1644–54.
- Rousset F, Nguyen MV, Grange L, Morel F, Lardy B. Heme oxygenase-1 regulates matrix metalloproteinase MMP-1 secretion and chondrocyte cell death via Nox4 NADPH oxidase activity in chondrocytes. *PLoS One* 2013;8:e66478.
- Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthr Cartilage* OARS Osteoarthr Res Soc 2013;21:16–21.
- Loeser RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthr Cartil* 2009;17:971–9.
- Kim J, Xu M, Xo R, Mates A, Wilson GL, Pearsall AW, et al. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes. *Osteoarthr Cartil* 2009;18:424–32.
- Poole AR, Howell DS. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Moskowitz RW, Howell DS, Altman RD, Buckwalter JA, Goldberg VM, Eds. *Osteoarthritis: Diagnosis/Surgical Management*. Philadelphia: WB Saunders; 2001:29–47.
- Grange L, Nguyen MV, Lardy B, Derouazi M, Campion Y, Trocme C, et al. NAD(P)H oxidase activity of Nox4 in

- chondrocytes is both inducible and involved in collagenase expression. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1485–96.
19. Martin G, Andriamanalijaona R, Mathy-Hartert M, Henrotin Y, Pujol JP. Comparative effects of IL-1beta and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on catabolic and anabolic gene expression in juvenile bovine chondrocytes. *Osteoarthr Cartil* 2005;13:915–24.
  20. Goldring MB. immortalization of human articular chondrocytes for generation of stable, differentiated cell lines. *Methods Mol Med* 2004;100:23–36.
  21. Kim KS, Choi HW, Yoon HE, Kim IY. Reactive oxygen species generated by NADPH oxidase 2 and 4 are required for chondrogenic differentiation. *J Biol Chem* 2010;285:40294–302.
  22. Zhang L, Nguyen MV, Lardy B, Jesaitis AJ, Grichine A, Rousset F, et al. New insight into the Nox4 subcellular localization in HEK293 cells: first monoclonal antibodies against Nox4. *Biochimie* 2011;93:457–68.
  23. Campion Y, Jesaitis AJ, Nguyen MV, Grichine A, Herenger Y, Baillet A, et al. New p22-phox monoclonal antibodies: identification of a conformational probe for cytochrome b 558. *J Innate Immun* 2009;1:556–69.
  24. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthr Cartil* 2006;14:13–29.
  25. Goldring MB, Otero M, Tsuchimochi K, Ijiri K, Li Y. Defining the roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism. *Ann Rheum Dis* 2008;67(Suppl 3):iii75–82.
  26. Poole AR, Alini M, Hollander AR. Cellular biology of cartilage degradation. In: *Mechanisms and Models in Rheumatoid Arthritis*.
  27. Liu-Bryan R, Terkeltaub R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2015;11:35–44.
  28. Ambe K, Watanabe H, Takahashi S, Nakagawa T. Immunohistochemical localization of Nox1, Nox4 and Mn-SOD in mouse femur during endochondral ossification. *Tissue Cell* 2014;44:170–81.
  29. Martin JA, Martini A, Molinari A, Morgan W, Ramalingam W, Buckwalter JA, et al. Mitochondrial electron transport and glycolysis are coupled in articular cartilage. *Osteoarthr Cartil* 2013;20:323–9.
  30. Drissi H, Zuscik M, Rosier R, O’Keefe R. Transcriptional regulation of chondrocyte maturation: potential involvement of transcription factors in OA pathogenesis. *Mol Aspects Med* 2005;26:169–79.
  31. Morita K, Miyamoto T, Fujita N, Kubota Y, Ito K, Takubo K, et al. Reactive oxygen species induce chondrocyte hypertrophy in endochondral ossification. *J Exp Med* 2007;204:1613–23.
  32. Djordjevic T, Pogrebniak A, BelAiba RS, Bonello S, Wotzlaw C, Acker H, et al. The expression of the NADPH oxidase subunit p22phox is regulated by a redox-sensitive pathway in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2005;38:616–30.
  33. Ryter SW, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;41:251–60.
  34. Alcaraz MJ, Megias J, Garcia-Armandis I, Clerigues V, Guillen MI. New molecular targets for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol* 2010;80:13–21.
  35. Megias J, Guillen MI, Clerigues V, Rojo AI, Cuadrado A, Castejon MA, et al. Heme oxygenase-1 induction modulates microsomal prostaglandin E synthase-1 expression and prostaglandin E(2) production in osteoarthritic chondrocytes. *Biochem Pharmacol* 2009;77:1806–13.
  36. Hunter DJ. Pharmacologic therapy for osteoarthritis – the era of disease modification. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:13–22.
  37. Henrotin Y, Kurz B. Antioxidant to treat osteoarthritis: dream or reality? *Curr Drug Targets* 2007;8:347–57.
  38. Shen CL, Smith BJ, Lo DF, Chyu MC, Dunn DM, Chen CH, et al. Dietary polyphenols and mechanisms of osteoarthritis. *J Nutr Biochem* 2012;23:1367–77.
  39. Sorce S, Krause KH, Jaquet V. Targeting NOX enzymes in the central nervous system: therapeutic opportunities. *Cell Mol life Sci CMLS* 2012;69:2387–407.



## Impact of the Addition of Ginger Extract and Copper Sulphate to Glucosamine Sulphate on IL-1 $\beta$ -Stimulated Chondrocytes

Francis Rousset<sup>1</sup>, Laurent Grange<sup>2</sup>, Minh Vu Chuong Nguyen<sup>1</sup>, Clara Pinosa-Zezza<sup>1</sup>, Philippe Gaudin<sup>2</sup>, Thierry Conrozier<sup>3</sup>, Françoise Morel<sup>1</sup> and Bernard Lardy<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Université Grenoble Alpes, GREPI EA 7408, Grenoble, France

<sup>2</sup>Rheumatology Department, University Hospital A. Michallon, Grenoble, France

<sup>3</sup>Service de Rhumatologie, Hopital Nord Franche Comté, Belfort, France

<sup>4</sup>Biochemical Enzymology and protein laboratory, University hospital A. Michallon, Grenoble, France

\*Corresponding author: Bernard Lardy, Biochemical Enzymology and protein laboratory, University hospital A. Michallon, Grenoble, France, E-mail: [blardy@chu-grenoble.fr](mailto:blardy@chu-grenoble.fr)

### Abstract

**Introduction:** Oxidative stress is an important component of the pathogenesis of osteoarthritis. NADPH oxidase Nox4 is a reactive oxygen species (ROS) producing enzyme highly expressed in chondrocytes and may be a key contributor of this oxidative component by regulating Matrix metalloproteinases (MMPs) expression. In order to optimize the Glucosamine sulphate (G<sub>s</sub>) efficacy against osteoarthritis, a new therapeutic association (Glucosamine Copper Ginger) has been developed (G<sub>s</sub>CG). In this study, we compared the effects of G<sub>s</sub>CG and G<sub>s</sub> on Nox4 activity, MMPs expression in IL-1 $\beta$ -stimulated C-20/A4 chondrocytes.

**Methods:** C-20/A4 chondrocytes were pre-treated with G<sub>s</sub>CG or G<sub>s</sub>. After IL-1 $\beta$  stimulation, we assessed MMPs expression by Western blot or apoptosis using the activation of caspase 3 as marker. Impact of compounds on Nox4 activity was measured by chemiluminescence on the inducible Nox4 expressing cells line HEK293 T-REx™.

**Results:** ROS production and related MMP1 expression were significantly decreased (respectively by 30% and 40%) after pre-incubation with G<sub>s</sub>CG. On the other hand, no significant effect was observed after G<sub>s</sub> treatment. ADAMTS5 expression was markedly decreased by G<sub>s</sub> and G<sub>s</sub>CG. Moreover, results reported a significant decrease in the IL-1 $\beta$ -induced caspase 3 activation in presence of G<sub>s</sub> and G<sub>s</sub>CG.

**Conclusions:** This study provided experimental evidence that glucosamine sulfate decreases ADAMTS5 expression and apoptosis. In addition, ginger root and copper sulphate decreased pro-MMP1 expression by regulating NOX4 activity. Our data suggest the implication of Heme Oxygenase-1 in the molecular mechanisms. These findings emphasize *in vitro* the potential beneficial effects of therapeutic association of Glucosamine, copper sulphate and Ginger extract.

### Keywords

Chondrocyte, NADPH oxidase 4, Interleukin-1, Metalloproteinases, Glucosamine sulphate

### Abbreviations

Cu: Copper Sulphate; G<sub>s</sub>CG: Glucosamine-Copper-Ginger; GR: Ginger Root Extract; G<sub>s</sub>: Glucosamine Sulphate; HO-1: Heme Oxygenase-1; IL: Interleukin; MMP: Matrix Metalloproteinases; Nox: NADPH Oxidase; OA: Osteoarthritis; ROS: Reactive Oxygen Species

### Introduction

Osteoarthritis (OA) is a common disorder characterized by loss of articular cartilage as a result of degenerative changes in the joint. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) is the main cytokine involved in OA progression leading to an increase in MMP release by chondrocytes and a decrease in synthesis of extracellular matrix component such as proteoglycans or type II collagen [1]. In response to IL-1 $\beta$ , chondrocytes actively produce reactive oxygen species (ROS) which could play a central role in this matrix homeostasis breakdown [2-4].

The NADPH oxidase enzymes constitute a large enzyme family which function is solely dedicated to the production of cellular ROS. Nox4 is one of the 7 ROS generating Nox members expressed in human [5]. Our recent work showed that Nox4 represents the major source of ROS production in human primary chondrocytes [4,6] and in the C-20/A4 human chondrocyte cell line [3]. In this cell line, Nox4-derived ROS regulate collagenase 1 (MMP-1) expression and chondrocyte death consecutive to IL-1 $\beta$  stimulation [3,4]. In this context, an induction of heme oxygenase-1 (HO-1) expression was shown to prevent MMP1 expression and chondrocyte DNA fragmentation by down regulating Nox4 activity [4]. Therefore, the balance between Nox4 and HO-1 activities in chondrocyte may contribute to cartilage homeostasis.

OA represents a major socio-economic burden in developed countries and available treatments are largely palliative or display weak benefits on the progression of the pathology [7,8]. Glucosamine sulphate (G<sub>s</sub>), a basic structural element that composes cartilage proteoglycans is a dietary supplement approved as a symptomatic slow-acting drug for osteoarthritis (SYSADOA). This compound showed significant anti-inflammatory and anti-catabolic effects on chondrocyte, *in vitro* [9]. The anabolic effects of G<sub>s</sub> were primarily thought to be attributable to its capacity to provide building blocks for the synthesis of glycosaminoglycans (GAGs) by chondrocytes but various additional G<sub>s</sub> properties were also demonstrated. *In vitro*, G<sub>s</sub> has been shown to inhibit expression and/or activity of proteolytic enzymes such as metalloproteinase [10] or aggrecanase [11] and to reverse the effects of IL-1 $\beta$  on the Nuclear Factor Kappa B (NFkB)

**Citation:** Rousset F, Grange L, Nguyen MVU, Pinosa-Zezza C, Gaudin P, et al. (2016) Impact of the Addition of Ginger Extract and Copper Sulphate to Glucosamine Sulphate on IL-1 $\beta$ -Stimulated Chondrocytes. J Rheum Dis Treat 2:038

**Received:** May 27, 2016; **Accepted:** August 31, 2016; **Published:** September 02, 2016

**Copyright:** © 2016 Rousset F, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

activation, relaying pro-inflammatory and pro-catabolic processes in articular chondrocytes. However, impact of  $G_5$  on structural features of OA is still difficult to evidence. This lack of clear proofs is illustrated by discrepancies in  $G_5$  recommendations by the main OA management institutions. Indeed, Osteoarthritis Research Society International (OARSI) and European League Against Rheumatism (EULAR) have recommended the use of  $G_5$  for hip and knee OA management while American College of Rheumatology (ACR) and National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) estimate this recommendation too premature [9].

Beside  $G_5$ , some other natural compounds less well-known may also display an anti-arthritis activity. For example, ginger root extract (GR) was shown to decrease pro-inflammatory mediators like Prostaglandin E2 and Nitric oxide (NO) production in arthritic and normal human cartilage slides [12]. Also, copper sulphate promotes collagen synthesis by human articular chondrocytes *in vitro* [13]. In order to optimize Glucosamine sulphate ( $G_5$ ) efficacy, a new therapeutic association ( $G_5$ CG) of  $G_5$  (78.9%), copper sulphate (0.105%) and ginger root extract (5.26%) was developed [Cuivramine<sup>®</sup>, Laboratoire Labhra, Lyon, France] and tested on C-20/A4 chondrocytes and HEK293 T-REx<sup>™</sup>, a commonly used cell line to study basic feature of Nox4 activity [14,15]. Therefore, the aim of the study was to compare *in vitro* the potential additional effects of the association of Glucosamine-Copper-Ginger versus Glucosamine alone on the level of ROS production, the MMP expression and chondrocyte apoptosis upon IL-1 $\beta$  stimulation.

## Methods

### Material

Human C-20/A4 chondrocyte cell line immortalized by SV40 is a generous gift from Dr M.B. Goldring (Harvard Institute of Medicine, Boston, MA, USA). HEK293 Nox4 T-REx<sup>™</sup> cells were kindly provided by PATIM laboratory, (Pr KH. Krause, Geneva University, Switzerland). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) and geneticin (G418) were purchased from life technologies (Saint Aubin, France); blasticidin was from Funakoshi Co (Tokyo, Japan); ECL Western Blotting detection reagents and second antibodies-HRP were purchased from GE healthcare (Buckinghamshire, England); complete mini EDTA-free protease inhibitor EASYpack,  $Na_2P_2O_7$ ,  $Na_3VO_4$ , Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), luminol, Horseradish Peroxidase (HRPO), Triton X-100, protoporphyrin-IX cobalt chloride (CoPP-IX) were purchased from SIGMA (Saint Quentin Fallavier, France); leupeptin, pepstatin, trypsin inhibitor, Tosyl-L-lysine-chloromethyl-ketone (TLCK) and human interleukin-1 $\beta$  were purchased from Roche (Meylan, France); Diisopropylfluoro-phosphate (DFP) was purchased from Acros Organics (Halluin, France); goat antibodies directed against HO-1 and actin were purchased from Santa Cruz Biotechnologies (Heidelberg, Germany); Pro-MMP1 monoclonal antibody was obtained from R&D Systems (Lille, France); rabbit polyclonal antibodies directed against the metalloproteinase with thrombospondin motifs 5 (ADAMTS5) (RP1-ADAMTS5) and active caspase 3 were respectively from Biovalley (Illkirch, France) and Abcam (Paris, France).

### Cell culture

All cells were cultured in DMEM containing 4.5 g/L glucose and 0.11 g/L sodium pyruvate, supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 2 mM glutamine at 37°C in atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> [16]. Selecting antibiotics, blasticidin (5  $\mu$ g/ml) and geneticin (400  $\mu$ g/ml) were used for HEK293 Nox4 T-REx<sup>™</sup> cells. Expression of Nox4 by HEK293 Nox4 T-REx<sup>™</sup> cells were induced by the addition of 1  $\mu$ g/ml tetracycline in the culture media [14]. All experiments were performed within cell passages 3 to 10 at 60-90% confluence.

### Experimental conditions

For experiments, C-20/A4 chondrocytes and HEK293 T-REx<sup>™</sup>

were pre-incubated 96 h with 100 or 500  $\mu$ g/ml of glucosamine sulphate ( $G_5$ ) or of the therapeutic association ( $G_5$ CG) composed by glucosamine sulphate 93.75% (w/w) Ginger roots extract 5.26% (w/w) copper sulphate 0.1% (w/w). Cells were also pre-incubated with 5.26  $\mu$ g/ml, 26.3  $\mu$ g/ml or 52.6  $\mu$ g/ml Ginger roots extract (GR) or 0.105  $\mu$ g/ml, 0.52  $\mu$ g/ml or 1.04  $\mu$ g/ml copper sulphate (Cu). For GR and Cu, the concentrations used correspond respectively to the amount contained in 100  $\mu$ g/ml, 500  $\mu$ g/ml or 1,000  $\mu$ g/ml of therapeutic association. After the 96 h of pre-incubation, tetracycline-induced HEK293 Nox4 T-REx<sup>™</sup> cells were used for NADPH oxidase activity assessment by chemiluminescence. For the C-20/A4 chondrocytes experiments, after the 96 h of pre-incubation, the cells were incubated in serum free DMEM in presence of the experimental doses of  $G_5$ ,  $G_5$ CG, GR or Cu and stimulated or not with 2 ng/ml IL-1 $\beta$  during 24 h for MMP1 and ADAMTS5 assessment or 96 h for HO-1 expression and active caspase 3 assay.

### Measurement of NADPH oxidase activity in intact cells by luminescence assay

ROS production was measured as described by Grange, et al. [3]. Briefly, cells were detached with trypsin, washed twice with PBS and collected by centrifugation (400 g, 8 min, room temperature). The viability of the suspended cells was over 90%, as determined by the trypan blue exclusion method. In a 96-well plate,  $5 \times 10^5$  living cells suspended in 50  $\mu$ l were added per well. Before the start of the assay, 200  $\mu$ l of a PBS solution containing 20  $\mu$ M luminol, and 10 units/ml of horseradish peroxidase was added in each well. Relative luminescence unit (RLU) counts were recorded every 30 s for a total of 45 min at 37°C using a Luminoscan<sup>®</sup> luminometer (Labsystems, Helsinki, Finland).

### Cells extract preparation for intracellular protein immunodetection

Cells were treated with 3 mM DFP and lysed in Triton X-100 lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl pH7.4, 1% (v/v) Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2  $\mu$ g/ml leupeptin, 2  $\mu$ g/ml pepstatin, 10  $\mu$ g/ml trypsin inhibitor, 44  $\mu$ g/ml PMSF, 10  $\mu$ M TLCK and complete mini EDTA-free protease inhibitor. After 10 min incubation on ice, the mixture was centrifuged at 1,000 g for 10 min at 4°C. The supernatant was then used for SDS-PAGE and Western blot detection of active caspase-3, HO-1 or Actin.

### Secreted protein detection

After incubation under the conditions described above in experimental conditions section, the culture medium was removed, 10 times concentrated with centricon 3 kDa (Merck Millipore, Billerica, USA) then secretion of pro-MMP1 or ADAMTS5 by chondrocytes was assessed by Western blot.

### SDS/PAGE and western blotting

Triton X-100 cell extract or centricon 10X concentrated cell culture supernatant was denatured at 60°C for 30 min and loaded on a 10% or 12.5% (p/v) SDS-PAGE for migration and then electro-transfer to nitrocellulose. Immunodetection was performed using primary mAb against pro-MMP1 (1:500), pro-MMP13 (1:1,000) or polyclonal rabbit antibody against the metalloproteinase ADAMTS5 (1:1,000) or active caspase 3 (1:1,000) or goat antibody directed against HO-1 (dilution 1:500) or actin (1:500). Secondary antibody was conjugated to peroxidase (1:5,000). Peroxidase activity was detected using ECL reagents (GE Healthcare). After revelation, densitometry of the bands corresponding to proteins of interest was assessed with the Scion Image software.

### Cell survival assay

After the 96 h pre-incubation with therapeutic compounds, C-20/A4 chondrocytes were incubated for 7 days in DMEM without foetal bovine serum, with or without 2 ng/ml IL-1 $\beta$  and  $G_5$ ,  $G_5$ CG, GR and Cu at the experimental amount. Medium and floating cells were then removed and replaced with complete DMEM (supplemented with

10% foetal bovine serum) allowing alive cell to grow for 7 additional days. Finally chondrocytes are detached with trypsin and living cells were counted by trypan blue assay.

#### Statistical data

Data are presented as means  $\pm$  S.D., significance levels were assessed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by appropriate *post hoc* analysis. A p-value of 0.05 or less between groups was considered to indicate a statistically significant difference.

#### Results

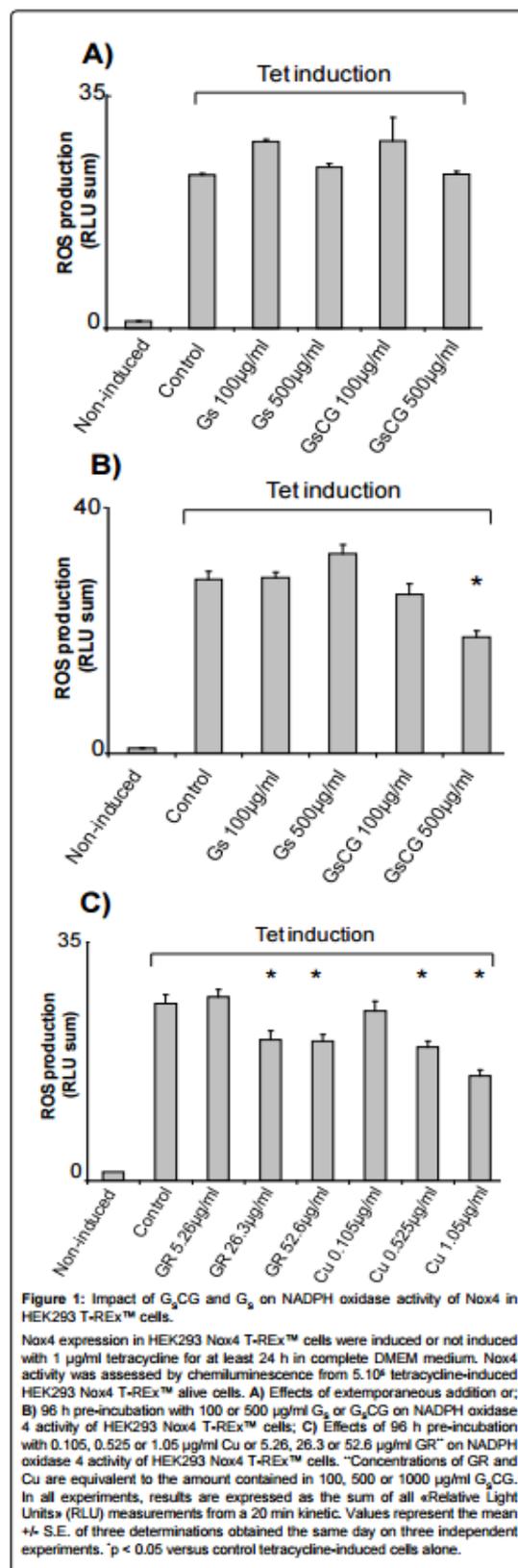
##### Differential impact of the therapeutic association and glucosamine sulphate on NADPH oxidase activity in HEK293 T-REx™ cells

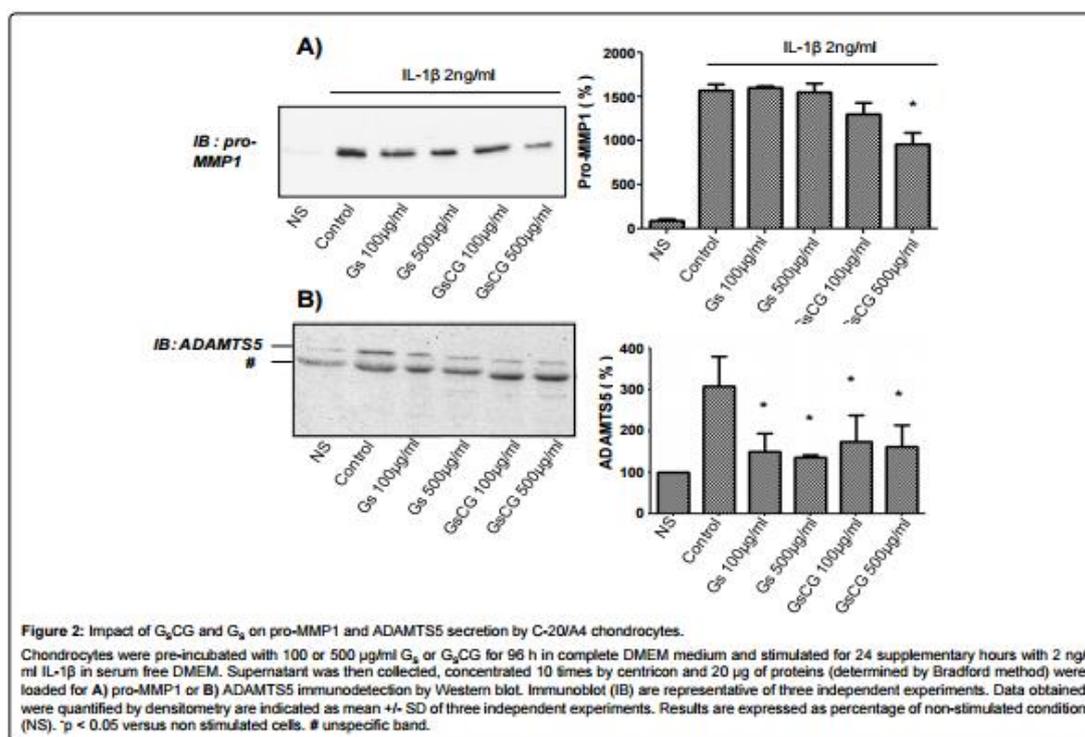
The antioxidant effects glucosamine sulphate ( $G_s$ ) and a therapeutic association ( $G_sCG$ ) were investigated on HEK293 T-REx™ cells, a reproducible and reliable cell line model to study Nox4. In this cell line Nox4 expression can be induced upon the addition of tetracycline leading to a 20 fold increase in the ROS production (Figure 1) [14]. When 100  $\mu$ g/ml or of  $G_sCG$  or 500  $\mu$ g/ml of  $G_s$  were extemporaneously added to the cells right before the ROS production measurement, no significant impact on Nox4 activity was noticeable showing that  $G_s$  and  $G_sCG$  do not have a direct antioxidant properties (Figure 1A). However, Nox4 activity decreased significantly about 30% after 96 h pre-incubation with 500  $\mu$ g/ml  $G_sCG$  but not with  $G_s$  (Figure 1B). To investigate which compound composing the  $G_sCG$  was responsible for this effect, T-REx™ cells were pre-incubated for 96 h with 5.26, 26.3 or 52.6  $\mu$ g/ml of ginger root (GR); or with 0.105, 0.525 or 1.05  $\mu$ g/ml of copper sulphate (Cu) (the equivalent amount contained in 100, 500 or 1,000  $\mu$ g/ml  $G_sCG$ ) (Figure 1C). Results showed a dose dependant decrease of Nox4 activity in the presence of GR and Cu for the slighter doses. Interestingly, this inhibition was not significant after 48 h, suggesting that the time necessary for the GR- and Cu- induced inhibition of Nox4 activity required more than 48h to be effective (Supplementary Figure 1). Together, our data indicate that the inhibition of Nox4 activity by  $G_sCG$  is triggered by GR and Cu rather than by  $G_s$ .

##### Impact of the therapeutic association and glucosamine sulphate on IL-1 $\beta$ stimulated pro-MMP1 and ADAMTS5 secretion

We have previously reported that while the pro-MMP1 secretion is regulated by Nox4 activity, the regulation of ADAMTS5 secretion is not redox dependent in C-20/A4 chondrocytes [3,4]. To assess the impact of  $G_sCG$  and  $G_s$  on the secretion pattern of these proteases, C-20/A4 chondrocytes were pre-incubated with 100 or 500  $\mu$ g/ml of  $G_sCG$  or of  $G_s$  respectively for 96 h in complete DMEM medium (see section experimental conditions). Medium was then replaced by serum free DMEM and cells were stimulated (24 h) or not with 2 ng/ml IL-1 $\beta$  in presence or not of  $G_sCG$  or of  $G_s$ . Results showed an important increase in both pro-MMP1 and ADAMTS5 secretion in the cell culture medium after chondrocyte stimulation by IL-1 $\beta$  (Figure 2A and Figure 2B). Interestingly, under these conditions,  $G_sCG$  at 500  $\mu$ g/ml was able to reduce significantly IL-1 $\beta$ -induced pro-MMP1 secretion (50%) while GS had not any significant effects (Figure 2A). On the other hand, both  $G_s$  and  $G_sCG$  neutralized IL-1 $\beta$  induced ADAMTS5 secretion (Figure 2B). Based on these data, we can assume that impact of  $G_sCG$  on MMP1 depends on Cu and/or GR while effects on ADAMTS5 are dependent on  $G_s$ .

In order to evaluate whether GR and/or Cu mediates the effects observed for  $G_sCG$ , similar experiments were performed with a 96 h pre-incubation with only 5.26 mg/ml or 26.3 mg/ml ginger root (GR); or 0.105 mg/ml or 0.52 mg/ml copper sulphate (Cu) in complete medium (the equivalent amount contained in 100, 500 or 1,000  $\mu$ g/ml  $G_sCG$ ). We observed that both GR and Cu were able to decrease IL-1 $\beta$ -stimulated pro-MMP1 secretion (Figure 3A) in a dose dependent manner reaching  $\sim$ 40% decreases with the highest dose of GR and Cu studied. These results confirm that the inhibition of  $G_sCG$  on pro-





MMP1 secretion comes from GR and Cu compounds. In contrast, we do not observed significant decrease in ADAMTS5 secretion with both compounds suggesting that G<sub>5</sub> alone can mediate the inhibition of G<sub>5</sub>CG on IL-1β-induced ADAMTS5 secretion (Figure 3B).

#### Effect of the therapeutic association and its components on C-20/A4 chondrocytes viability and apoptosis

IL-1β-induced chondrocyte death is a leading cause of osteoarthritis [17]. Nox4 plays a key role in this phenomenon in the C-20/A4 cell line [4]. We therefore next assessed the impact of G<sub>5</sub>CG and its components on chondrocytes survival and apoptosis in presence of IL-1β (Figure 4). Our results showed a dramatic decrease in chondrocyte survival in presence of IL-1β (Figure 4A). Interestingly, survival was improved in a dose dependant fashion with G<sub>5</sub>CG and G<sub>5</sub> treatments but not by GR nor by Cu. To confirm these data, we evaluated the caspase 3 activation by Western blot (Figure 4B). IL-1β-induced caspase 3 activation was significantly prevented by G<sub>5</sub>CG and G<sub>5</sub> at 500 µg/ml. In contrast effects of GR and Cu were not statistically significant compared to IL-1β-stimulated cells. Together, these data show that G<sub>5</sub>CG is able to prevent IL-1β induced chondrocyte death via G<sub>5</sub>. GR and Cu do not play a similar role despite the fact that they can reduce Nox4-derived ROS generation.

#### Impact of the therapeutic association and glucosamine sulphate on HO-1 induction

The right balance between NOX4 and Heme Oxygenase-1 activities may contribute to cartilage extracellular matrix homeostasis [4]. Since HO-1 has been shown to be upregulated in chondrocytes upon G<sub>5</sub> treatment [18], we assessed the impact of G<sub>5</sub>CG and its components on HO-1 expression in the C-20/A4 cell line. Chondrocytes were cultured 96 h in presence of the compounds and submitted to a Triton X-100 extraction protocol for Western Blotting. As positive control, HO-1 expression was induced by cobalt protoporphyrin-IX (CoPP-IX) in the C-20/A4 cell line (Figure 5 lower panel). We observed an increase of HO-1 expression in C-20/A4 chondrocytes in a dose dependent manner with a G<sub>5</sub> or with a

G<sub>5</sub>CG treatment (x3.5 with 500 µg/ml). The effect is approximately two times stronger with G<sub>5</sub>CG suggesting that this increase may be the sum of the effects of G<sub>5</sub> and Cu given the fact that each one of these compounds led approximately to a 2 fold increase of HO-1 expression. In contrast, there was no upregulation of HO-1 protein when the C-20/A4 cells were treated with GR.

#### Discussion and Conclusion

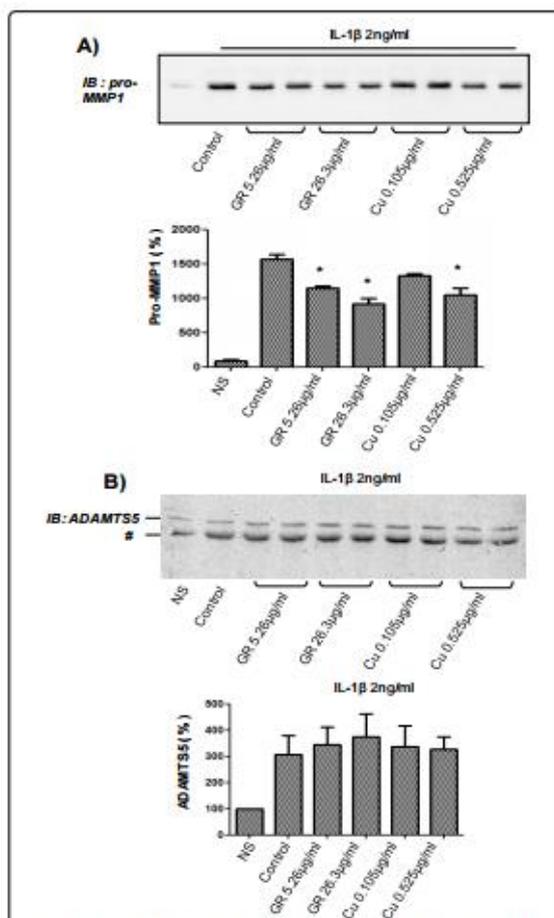
Various anti-inflammatory properties have been demonstrated for glucosamine in the three main tissues involved in OA: cartilage, synovial membrane and subchondral bone [9,19]. Particularly glucosamine was able to reverse the pro-catabolic and pro-inflammatory effects of IL-1β in articular chondrocytes [10]. IL-1β activates the production of reactive oxygen species (ROS) and secretion of MMPs as well as chondrocyte apoptosis. Those events lead to matrix breakdown and are key features of osteoarthritis (OA). In human C-20/A4 chondrocytes the NADPH oxidase Nox4 is the main source of ROS production upon IL-1β stimulation [3]. Since heme molecules are essential for the NADPH oxidase maturation and activity, induction of HO-1 expression decreased dramatically Nox4 activity in C-20/A4 and HEK293 T-REx<sup>™</sup> Nox4 cell lines. In this context, HO-1 led to a significant decrease of the expression of the MMP1, DNA fragmentation and cell death [4].

This study compared properties of glucosamine to that of copper sulphate (Cu) or of Ginger roots (GR) extract and showed that these compounds induced different effects on protein expression or activation when tested alone or in combination (G<sub>5</sub>CG). A summarized table 1, the increased expression of ADAMTS5 and MMP1 observed upon IL-1β activation was reversed in the presence of G<sub>5</sub> as well as of G<sub>5</sub>CG. Interestingly, copper sulphate and Ginger roots extract have a significant effect on MMP1 expression which explain a superior impact of G<sub>5</sub>CG compared to G<sub>5</sub>. In contrast, copper sulphate and Ginger roots extract have no effect on the expression of ADAMTS5; this implies that the negative impact of G<sub>5</sub>CG on ADAMTS5 expression after IL-1β activation results only on G<sub>5</sub> properties.

**Table 1:** Summary of the effects of G<sub>2</sub>CG and its components on the IL-1 $\beta$  stimulated C-20A4 chondrocyte cell line.

	G <sub>2</sub> CG	G <sub>2</sub>	GR	Cu
NOX4 activity	++	-	++	++
ADAMTS5 pro-MMP1	++	++	-	-
Viability	++	++	-	-
Caspase 3	++	++	-	++
HO-1	++	++	-	++

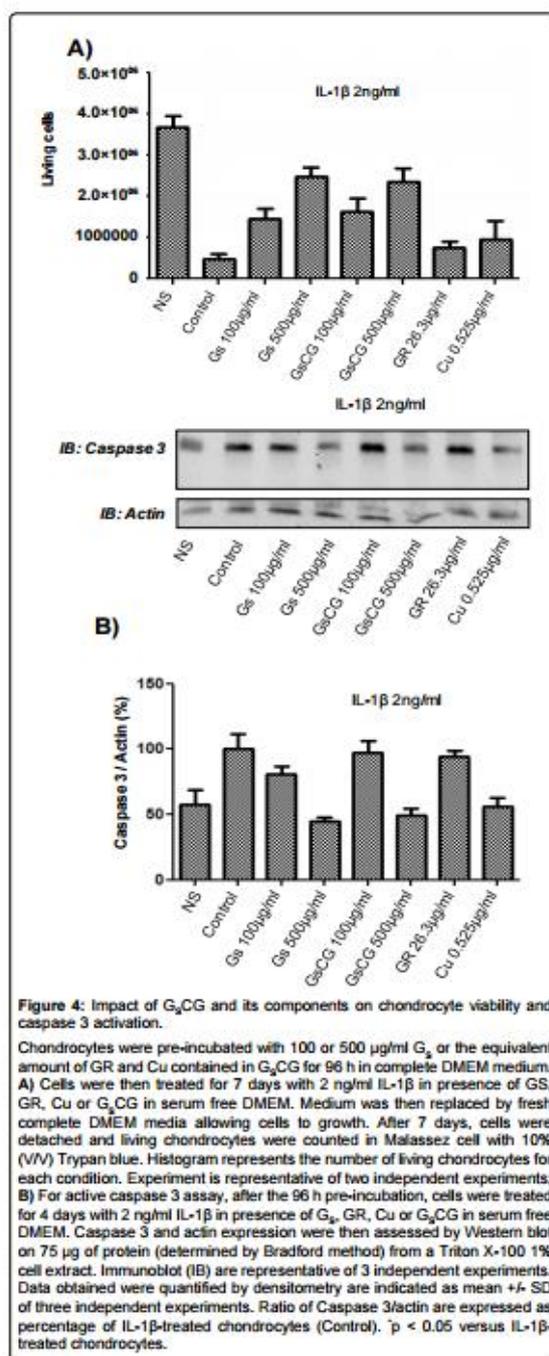
++ Significant impact; + Potential impact; - No impact



**Figure 3:** Impact of Cu and GR on pro-MMP1 and ADAMTS5 secretion by C-20A4 chondrocytes.

**A)** Chondrocytes were pre-incubated with 0.105 or 0.525  $\mu$ g/ml Cu or 5.26, or 26.3  $\mu$ g/ml GR\* for 96 h in complete DMEM medium and stimulated for 24 supplementary hours with 2 ng/ml IL-1 $\beta$  in serum free DMEM. Supernatant was then collected, concentrated 10 times by centricon and 20  $\mu$ g of proteins (determined by Bradford method) were loaded for **A)** pro-MMP1 or **B)** ADAMTS5 immunodetection by Western blot. \*Concentrations of GR and Cu are equivalent to the amount contained in 100 or 500  $\mu$ g/ml G<sub>2</sub>CG. Immunoblot (IB) are representative of three independent experiments. Data obtained were quantified by densitometry are indicated as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Results are expressed as percentage of non-stimulated condition (NS). \*p < 0.05 versus non stimulated cells. # unspecific band.

While ADAMTS5 expression is not linked to an oxidative stress [20], one possible mechanism driving MMP1 expression could be dependent on redox sensitive AP-1 elements present in its promoter [21]. Thus, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent modification of AP-1 DNA binding activity may have profound effects on the extracellular matrix of cartilage by up-regulating metalloproteinases and reducing synthesis of the tissue-specific components [21,22]. In this context, restoring

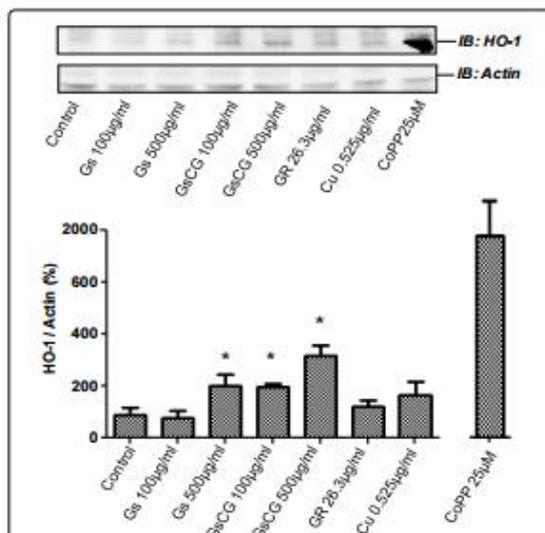


**Figure 4:** Impact of G<sub>2</sub>CG and its components on chondrocyte viability and caspase 3 activation.

Chondrocytes were pre-incubated with 100 or 500  $\mu$ g/ml G<sub>2</sub> or the equivalent amount of GR and Cu contained in G<sub>2</sub>CG for 96 h in complete DMEM medium. **A)** Cells were then treated for 7 days with 2 ng/ml IL-1 $\beta$  in presence of GS, GR, Cu or G<sub>2</sub>CG in serum free DMEM. Medium was then replaced by fresh complete DMEM media allowing cells to grow. After 7 days, cells were detached and living chondrocytes were counted in Malassez cell with 10% (V/V) Trypan blue. Histogram represents the number of living chondrocytes for each condition. Experiment is representative of two independent experiments; **B)** For active caspase 3 assay, after the 96 h pre-incubation, cells were treated for 4 days with 2 ng/ml IL-1 $\beta$  in presence of G<sub>2</sub>, GR, Cu or G<sub>2</sub>CG in serum free DMEM. Caspase 3 and actin expression were then assessed by Western blot on 75  $\mu$ g of protein (determined by Bradford method) from a Triton X-100 1% cell extract. Immunoblot (IB) are representative of 3 independent experiments. Data obtained were quantified by densitometry are indicated as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Ratio of Caspase 3/actin are expressed as percentage of IL-1 $\beta$ -treated chondrocytes (Control). \*p < 0.05 versus IL-1 $\beta$ -treated chondrocytes.

redox homeostasis in joint might be of crucial interest to prevent cartilage degradation in articular diseases.

While neither G<sub>2</sub>CG nor its components displayed direct antioxidant effects in our hands, copper sulphate and Ginger roots extract required at least 48 hours' time delay to significantly down regulate NOX4 activity. Similar observation has been reported in the literature where phenolic extract from GR inhibited lipopolysaccharide (LPS)-stimulated nitric oxide (NO), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and ROS production in murine macrophage cells RAW 264.7 [23]. These anti-inflammatory effects of GR were associated with its strong inhibition of NF- $\kappa$ B nuclear translocation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The mechanism whereby Cu decreases the quantity of



**Figure 5:** Impact of G<sub>5</sub>CG and its components depends on HO-1 induction. C-20/A4 chondrocytes were pre-incubated with 100 or 500 µg/ml G<sub>5</sub> or G<sub>5</sub>CG or the equivalent amount of GR and Cu contained in 500 µg/ml G<sub>5</sub>CG for 96 h in complete DMEM medium. The positive control for HO-1 induction was performed by a 24 h incubation with 25 µg/ml CoPP-IX. Cells were then lysed in a buffer containing 1% Triton X-100. HO-1 and actin were detected by Western blot on 50 µg protein (determined by Bradford method). Immunoblot (IB) are representative of 3 independent experiments. Data obtained were quantified by densitometry and are indicated as mean ± SD of three independent experiments. Ratio of HO-1/actin are expressed as percentage of non-stimulated cells (Control). \*p < 0.05 versus non treated chondrocytes.

ROS is not well understood yet. Cu is known to provoke an oxidative stress which could possibly lead to lethal consequences. Metal accumulation causes an increase in ROS production, such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> and OH<sup>-</sup>, that leads to oxidative stress [24]. Cu related oxidative stress is followed by a phase of stimulation of antioxidant pathways, including SOD, CAT and thioredoxine [25]. Our data indeed show an increase in the ROS production by the HEK293 T-REx<sup>™</sup> cell line after 48 h treatment with Cu alone (Supplementary Figure 1). However, after 96 h incubation with Cu, we observed a significant antioxidant effect. Thus we assume that Cu may stimulate antioxidant pathways of chondrocytes, including induction of HO-1.

The enzymatic activity of HO-1 results in decreased oxidative stress, attenuated inflammatory response, and a lower rate of apoptosis [26,27]. In addition, HO-1 exerts anti-inflammatory effects by inhibition of tumour necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1), or by upregulation of interleukin-10 (IL-10) [28]. Nuclear related Factor 2 (Nrf2) binds to the antioxidant response element in the promoter region of numerous genes encoding antioxidant and phase 2 enzymes, including HO-1, NADPH: quinone oxidoreductase 1, glutathione reductase and glutathione peroxidase. Phase 2 enzymes play a major role in the detoxification of ROS during ischemia reperfusion events [29,30]. In primary human chondrocyte cells it was found that the incubation with IL-1 causes an inhibition of HO-1 gene expression [18,31]. Moreover, treatment with 10 mmol/l of G<sub>5</sub> restores the expression of HO-1 gene with a maximal effect after 48 h. These results are in agreement with our data showing an increase of the expression of HO-1 upon G<sub>5</sub> and slightly upon Cu incubations. The additive effect of G<sub>5</sub> and Cu may explain the greater efficacy of the G<sub>5</sub>CG compared to G<sub>5</sub> alone on HO-1 expression. HO-1 was also shown to protect chondrocyte cells from apoptosis induced by IL-1 [4,32]. Therefore, G<sub>5</sub> and Cu may reverse the deleterious effect of IL-1 on caspase 3 activation via HO-1 activation in the chondrocyte cells lines C-20/A4.

In summary, our data confirm *in vitro* the potency of glucosamine to prevent pro-catabolic action of IL-1. In addition Copper sulphate and Ginger root extract, could contribute to restore the redox balance

by inhibiting Nox4 activity via an upregulation of HO-1 expression in the human chondrocyte cell line C20/A4. In conclusion, G<sub>5</sub>CG displays supplementary beneficial effect compared to G<sub>5</sub> and addition of Copper sulphate and Ginger root extract could improve G<sub>5</sub> therapeutic efficiency in osteoarthritic patients.

## Acknowledgments

The authors thank Pr. Mary Goldring for the generous gift of the C-20/A4 cell line. The authors thank also Pr Xavier Ronot, Pr Bertrand Toussaint, Pr. François Rannou, Dr. Corinne Dupuy, Dr Marie Hélène Paquet, Pr Philippe Gaudin and Pr Françoise Morel for helpful discussion.

This work was funded by LABRHA SAS and supported by grants from the Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et Technologie, Paris, the UFR de Médecine, Université Joseph Fourier, Grenoble the roupelement des Entreprises Françaises dans la lutte contre le Cancer, délégation de Grenoble, the Société Française de Rhumatologie and the Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation, from the university hospital, Grenoble. We tanks the Etablissement français du sang (EFS) for his support. FR is supported by grants from the Foundation Arthritis Courtin. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## References

- Goldring MB, Otero M, Tsuchimochi K, Ijiri K, Li Y (2008) Defining the roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism. *Ann Rheum Dis* 67: iii75-82.
- Henrotin Y, Kurz B, Aigner T (2005) Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis Cartilage* 13: 643-654.
- Grange L, Nguyen MV, Lardy B, Derouazi M, Campion Y, et al. (2006) NAD(P)H oxidase activity of Nox4 in chondrocytes is both inducible and involved in collagenase expression. *Antioxid Redox Signal* 8: 1485-1496.
- Roussel F, Nguyen MV, Grange L, Morel F, Lardy B (2013) Heme oxygenase-1 regulates matrix metalloproteinase MMP-1 secretion and chondrocyte cell death via Nox4 NADPH oxidase activity in chondrocytes. *PLoS One* 8: e66478.
- Bedard K, Krause KH (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245-313.
- Roussel F, Hazane-Puch F, Pinoso C, Nguyen MV, Grange L, et al. (2015) IL-1beta mediates MMP secretion and IL-1beta neosynthesis via upregulation of p22 (phox) and NOX4 activity in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 23: 1972-1980.
- Hunter DJ (2011) Osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 25: 801-814.
- Conrozier T (2016) Optimizing the effectiveness of viscosupplementation in non-knee osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 83: 1-2.
- Henrotin Y, Mobasher A, Marly M (2012) Is there any scientific evidence for the use of glucosamine in the management of human osteoarthritis? *Arthritis Res Ther* 30: 201.
- Gouze JN, Gouze E, Popp MP, Bush ML, Dacanay EA, et al. (2006) Exogenous glucosamine globally protects chondrocytes from the arthritogenic effects of IL-1beta. *Arthritis Res Ther* 8: R173.
- McCulloch DR, Wylie JD, Longpre JM, Leduc R, Apte SS (2010) 10mM glucosamine prevents activation of proADAMTS5 (aggrecanase-2) in transfected cells by interference with post-translational modification of furin. *Osteoarthritis Cartilage* 18: 455-463.
- Shen CL, Hong KJ, Kim SW (2005) Comparative effects of ginger root (*Zingiber officinale* Rosc.) on the production of inflammatory mediators in normal and osteoarthrotic sow chondrocytes. *J Med Food* 8: 149-153.
- Héraud F, Savineau C, Harmand MF (2002) Copper modulation of extracellular matrix synthesis by human articular chondrocytes. *Scand J Rheumatol* 31: 279-284.
- Serrander L, Cartier L, Bedard K, Banfi B, Lardy B, et al. (2007) NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem J* 406: 105-114.
- Nguyen MV, Lardy B, Roussel F, Hazane-Puch F, Zhang L, et al. (2013) Quinone compounds regulate the level of ROS production by the NADPH oxidase Nox4. *Biochem Pharmacol* 85: 1644-1654.
- Zhang L, Nguyen MV, Lardy B, Jesaitis AJ, Grichine A, et al. (2011) New insight into the Nox4 subcellular localization in HEK293 cells: first monoclonal antibodies against Nox4. *Biochimie* 93: 457-468.

- 
17. Dozin B, Malpeli M, Camardella L, Cancedda R, Pietrangelo A (2002) Response of young, aged and osteoarthritic human articular chondrocytes to inflammatory cytokines: molecular and cellular aspects. *Matrix Biol* 21: 449-459.
  18. Valvason C, Musacchio E, Pozzuoli A, Ramonda R, Aldegheri R, et al. (2008) 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.
  19. Tiraloche G, Girard C, Chouinard L, Sampalis J, Moquin L, et al. (2005) Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 52: 1118-1128.
  20. Vo NV, Hartman RA, Yurube T, Jacobs LJ, Sowa GA, et al. (2013) Expression and regulation of metalloproteinases and their inhibitors in intervertebral disc aging and degeneration. *Spine J* 13: 331-341.
  21. Martin G, Andriamanalijaona R, Mally-Hartert M, Henrotin Y, Pujol JP (2005) Comparative effects of IL-1beta and hydrogen peroxide (H2O2) on catabolic and anabolic gene expression in juvenile bovine chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 13: 915-924.
  22. Mendes AF, Caramona MM, Carvalho AP, Lopes MC (2003) Hydrogen peroxide mediates interleukin-1beta-induced AP-1 activation in articular chondrocytes: implications for the regulation of iNOS expression. *Cell Biol Toxicol* 19: 203-214.
  23. Yu YS, Hsu CL, Yen GC (2009) Anti-inflammatory effects of the roots of *Alpinia pricei* Hayata and its phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 57: 7673-7680.
  24. Sampaio FG, Bojink Cde L, dos Santos LR, Oba ET, Kalinin AL, et al. (2012) Antioxidant defences and biochemical changes in the neotropical fish pacu, *Piaractus mesopotamicus*: responses to single and combined copper and hypercarbia exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 156: 178-186.
  25. Dautrempuits C, Betoulle S, Vernet G (2002) Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Biochim Biophys Acta* 1573: 4-8.
  26. Ryter SW, Choi AM (2009) Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41: 251-260.
  27. Basuroy S1, Tcheranova D, Bhattacharya S, Leffler CW, Parfenova H (2011) Nox4 NADPH oxidase-derived reactive oxygen species, via endogenous carbon monoxide, promote survival of brain endothelial cells during TNF- $\alpha$ -induced apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C256-265.
  28. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, et al. (2000) Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 6: 422-428.
  29. Leonard MO, Kieran NE, Howell K (2006) Reoxygenation-specific activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 mediates cytoprotective gene expression in ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 20: 2624-2626.
  30. Datta SR, Dusting GJ, Mori TA, Taylor CJ, Croft KD, et al. (2007) Induction of heme oxygenase-1 in vivo suppresses NADPH oxidase derived oxidative stress. *Hypertension* 50: 636-642.
  31. Guillén MI, Megias J, Clérigues V, Gomar F, Alcaraz MJ (2008) The CO-releasing molecule CORM-2 is a novel regulator of the inflammatory process in osteoarthritic chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)* 47: 1323-1328.
  32. Huser CAM, Davies ME (2008) Effect of a glucosamine derivative on impact-induced chondrocyte apoptosis *in vitro*. A preliminary report. *Osteoarthritis Cartilage* 16: 125-128.

Supplementary Figure 1

