

# Thèse de Doctorat

Elodie LE TILLY

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Biologie - Santé*

Discipline : *Sciences de la vie et de la santé*

Spécialité : *Biologie cellulaire et moléculaire*

Unité de recherche : *INSERM UMRS1229 – RMeS « Regenerative Medicine and Skeleton »*

Soutenue le *20 décembre 2017*

Thèse N° :

## Homéostasie du cartilage articulaire lors de l'arthrose liée au vieillissement :

étude des rôles de la protéine Klotho et d'un cocktail de molécules anti-oxydantes

### JURY

Rapporteurs : **Georges CARLE**, Directeur de Recherche CNRS, Université de Nice-Sophia Antipolis  
**Jean-Marc BRONDELLO**, Chargé de Recherche INSERM, Université de Montpellier

Examineurs : **Marjolaine GOSSET**, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris-Descartes  
**Jérôme GUICHEUX**, Directeur de Recherche INSERM, Université de Nantes

Directeur de Thèse : **Laurent BECK**, Chargé de Recherche INSERM, Université de Nantes

Encadrante de thèse : **Claire VINATIER**, Maître de Conférences des Universités, Université de Nantes

*« Le succès, c'est se promener d'échecs en échecs tout en restant motivé »*

Winston Churchill

*« La logique vous mènera de A à B. L'imagination vous mènera partout »*

Albert Einstein



## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement MM. Jérôme Guicheux et Pierre Weiss pour leur accueil au sein du laboratoire INSERM U791/1229, ainsi que pour la confiance qu'ils m'ont témoignée en me permettant de réaliser ma thèse dans ce laboratoire.

Mes remerciements vont tout particulièrement à mon directeur de thèse, M. Laurent Beck, ainsi qu'à mon encadrante de thèse, Mme Claire Vinatier, pour leur confiance, leurs conseils et leur soutien. J'ai beaucoup appris à vos côtés.

Mes remerciements les plus sincères vont également à :

M. Georges Carle et M. Jean-Marc Brondello pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Mme Marjolaine Gosset et M. Jérôme Guicheux pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant qu'examinateur.

Je tiens également à remercier MM. Pascal Reboul et Ramarason Andriantsitohaina, membres de mon comité de suivi de thèse, pour leurs remarques et encouragements qui m'ont permis d'avancer dans mon travail de thèse.

Enfin, merci à tous les membres du laboratoire, passés et présents, pour leur sympathie, leurs conseils, leur amitié et leur bonne humeur, pendant ces cinq années au laboratoire.

# TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES .....	1
LISTE DES TABLEAUX .....	3
ANNEXE .....	3
LISTE DES ABREVIATIONS.....	4
AVANT-PROPOS.....	7
PARTIE 1 : BIOLOGIE DU CARTILAGE ARTICULAIRE ET PHYSIO-PATHOLOGIE DE L'ARTHROSE LIEE AU VIEILLISSEMENT .....	8
1. Le cartilage articulaire .....	8
1.1 Généralités.....	8
1.2 Les constituants du cartilage articulaire .....	9
1.2.1 Composition moléculaire.....	9
1.2.2 Les chondrocytes.....	9
1.2.3 La Matrice Extra-Cellulaire (MEC) .....	10
a) Les Protéoglycanes (PG) et Glycosaminoglycanes (GAG) .....	10
b) Les collagènes .....	11
c) Les autres constituants de la MEC .....	13
1.3 Le remodelage de la matrice extracellulaire.....	15
1.3.1 Les cytokines.....	15
1.3.2 Les molécules pro-inflammatoires .....	16
1.3.3 Les protéinases .....	17
1.3.4 Les facteurs de croissance .....	18
1.4 Organisation histologique du cartilage articulaire.....	20
2. Vieillessement articulaire et physiopathologie de l'arthrose .....	22
2.1 Le remodelage de l'os sous-chondral .....	23
2.2 L'inflammation de la membrane synoviale .....	24
2.3 Les atteintes de la matrice cartilagineuse .....	24
2.3.1 Influence des cytokines pro-inflammatoires dans l'arthrose.....	24
2.3.2 Rôle du stress oxydant .....	25
2.3.3 Mécanismes de dégradation de la matrice cartilagineuse .....	26

2.4 Le rôle des chondrocytes .....	27
2.4.1 Les modifications du phénotype chondrocytaire .....	27
2.4.2 La mort des chondrocytes.....	30
a) L'apoptose.....	32
Généralités sur l'apoptose .....	32
Morphologie des cellules apoptotiques .....	33
Voies de signalisation de l'apoptose .....	33
L'apoptose des chondrocytes au cours de l'arthrose .....	36
b) La nécrose .....	39
Généralités sur la nécrose .....	40
La nécroptose .....	41
La nécrose des chondrocytes .....	41
c) L'autophagie.....	42
Généralités sur l'autophagie .....	42
Les différentes étapes de l'autophagie .....	44
L'autophagie au cours de l'arthrose .....	47
L'autophagie : un mécanisme de mort cellulaire ? .....	49
d) La chondroptose.....	50
 PARTIE 2 : ROLE DES MOLECULES ANTI-OXYDANTES ET DE $\alpha$ -KLOTHO DANS LE TRAITEMENT DE L'ARTHROSE.....	 51
1. Les traitements actuels de l'arthrose.....	51
1.1 Traitements non pharmacologiques .....	51
1.2 Traitements pharmacologiques .....	52
1.3 Traitements chirurgicaux.....	53
2. L'apport des molécules naturelles dans le traitement de l'arthrose .....	54
2.1 Le curcumin .....	55
2.2 Le resvératrol .....	56
2.3 L'épigallocatechine gallate .....	57
2.4 Le collagène hydrolysé .....	58
3. La protéine anti-vieillessement $\alpha$ -Klotho.....	60
3.1 Structure, expression et régulation de la protéine $\alpha$ -Klotho .....	61
3.2 Les différentes fonctions de la protéine $\alpha$ -Klotho .....	62
3.2.1 La régulation du métabolisme phosphocalcique .....	62

3.2.2 La régulation de canaux ioniques .....	63
3.2.3 La régulation de différentes voies impliquées dans le vieillissement .....	64
a) La voie de signalisation insuline/IGF-1 et le stress oxydant .....	64
b) La voie Wnt et la senescence cellulaire .....	65
c) L'inflammation et la voie NF- $\kappa$ B .....	66
d) L'autophagie et l'apoptose .....	66
OBJECTIFS DE LA THESE.....	69
RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	70
ARTICLE 1 : Assessment of osteoarthritic damages in aging mice following nutraceutical supplementation using a combination of gait and radiographic analyses .....	70
ARTICLE 2 : Involvement of the anti-aging protein Klotho in chondrocyte autophagy and apoptosis during osteoarthritis.....	75
CONCLUSION.....	82
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS .....	85
ANNEXE : TRAVAUX COLLABORATIFS .....	88
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	89

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie de l'articulation du genou.....	8
Figure 2 : Composition moléculaire du cartilage articulaire .....	9
Figure 3 : Image en microscopie électronique d'un chondrocyte articulaire et coupe histologique de cartilage articulaire humain.....	9
Figure 4 : Organisation moléculaire de la MEC du cartilage articulaire normal .....	10
Figure 5 : Structure de l'agrécan. ....	11
Figure 6 : Représentation schématique de l'organisation des fibrilles de collagène..	12
Figure 7 : Schéma d'une articulation saine et arthrosique .....	22
Figure 8 : Déséquilibre entre processus anaboliques et processus cataboliques impliqué dans l'arthrose.....	22
Figure 9 : Physiopathogénie des espèces réactives de l'oxygène (ROS) au cours de l'arthros.....	26
Figure 10 : La senescence cellulaire. ....	29
Figure 11 : Schéma représentant les 3 voies majeures de mort cellulaire (apoptose, autophagie et nécrose).....	31
Figure 12 : Rôles physiologiques de l'apoptose au cours du développement. ....	32
Figure 13 : Morphologie des cellules apoptotiques.....	33
Figure 14 : Ultrastructure des cellules apoptotiques .....	33
Figure 15 : Voies de signalisation impliquées au cours de l'apoptose cellulaire : voie intrinsèque et voie extrinsèque .....	34
Figure 16 : Schéma de la voie apoptotique intrinsèque, ou voie mitochondriale .....	35
Figure 17 : Mécanismes d'activation des caspases.....	36
Figure 18 : Voie apoptotique d'exécution .....	36
Figure 19 : Morphologie des cellules apoptotiques et nécrotiques .....	40
Figure 20 : Mort cellulaire par nécrose et déclenchement de l'inflammation. ....	40
Figure 21 : Les différents types d'autophagie .....	42
Figure 22 : Le processus autophagique. ....	43
Figure 23 : Morphologie des cellules autophagiques.....	43
Figure 24 : Régulation des différentes étapes du processus autophagique. ....	44
Figure 25 : L'élongation de l'autophagosome au cours du processus autophagique	45

Figure 26 : Fusion de l'autophagosome avec le lysosome .....	47
Figure 27 : Morphologie de la chondroptose. ....	50
Figure 28 : Différence entre chondroptose et apoptose classique.....	50
Figure 29 : Traitements chirurgicaux de l'arthrose du genou.....	53
Figure 30 : Phénotype des souris transgéniques kl/kl .....	60
Figure 31 : Représentation schématique des différents transcrits codés par le gène $\alpha$ -Klotho chez l'homme .....	61
Figure 32 : Représentation schématique des différentes formes de la protéine $\alpha$ -Klotho .....	61
Figure 33 : Métabolisme de la vitamine D.....	63
Figure 34 : Représentation schématique du complexe binaire $\alpha$ -Klotho-FGFR1c....	63
Figure 35 : Activité sialidase de $\alpha$ -Klotho.....	64
Figure 36 : Courbe de survie des souris C57BL/6 traitées ou non par le cocktail de molécules naturelles composé d'un extrait de thé vert, de collagène hydrolysé et de chondroïtine sulfate. ....	72
Figure 37 : Induction de l'expression de l'enzyme Sirtuin-1 par le cocktail de molécules dans des chondrocytes articulaires de lapin. ....	72
Figure 38 : Induction de l'expression de $\alpha$ -Klotho par l'EGCG. ....	72
Figure 39 : Profil d'expression de $\alpha$ -Klotho dans le tissu cartilagineux.....	77
Figure 40 : Expression de $\alpha$ -Klotho et des marqueurs de différenciation au cours de la différenciation chondrocytaire à partir d'une lignée ATDC5.....	78
Figure 41 : Expression de $\alpha$ -Klotho dans le cartilage articulaire humain arthrosique	79
Figure 42 : Expression du ratio Bax/Bcl-2 dans des chondrocytes murins .....	80
Figure 43 : Régulation de l'expression de $\alpha$ -Klotho par la rapamycine.....	81

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des cytokines exprimées dans le cartilage articulaire .....	15
Tableau 2 : Principales matrix metalloproteinases (MMPs) impliquées dans le catabolisme du cartilage articulaire. ....	18
Tableau 3 : Organisation histologique en 4 couches du cartilage articulaire .....	20
Tableau 4 : Protéines qui ont un rôle à la fois dans l'autophagie et l'apoptose .....	49

## ANNEXE :

### **Interleukin-33 and RANK-L Interplay in the Alveolar Bone Loss Associated to Periodontitis - *Publié dans la revue PLoS ONE (2016)***

Olivier Lapérine, Alexandra Cloitre, Jocelyne Caillon, Olivier Huck, Isaac Maximiliano Bugueno, Paul Pilet, Sophie Sourice, Elodie Le Tilly, Gaby Palmer, Jean-Luc Davideau, Valérie Geoffroy, Jérôme Guicheux, Sarah Beck-Cormier, Philippe Lesclous .....88

## LISTE DES ABREVIATIONS

AASALs	Anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente
ADAM	A Disintegrin and Metalloproteinase
ADAMTS	A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs
AGEs	Advanced glycation end-products
AH	Acide Hyaluronique
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
ALP	Phosphatase alcaline
AMPK	Adenosine monophosphate-activated protein kinase
ATG	AuTophagy-related gene
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Beclin-1	Coiled-coil, myosin-like BCL2-interacting protein
BMP	Bone morphogenetic protein
CAD	Caspase-activated DNase
CAT	Catalase
CMA	Chaperone-mediated autophagy
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
CH	Collagène hydrolysé
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
COX-2	Cyclooxygenase-2
CYP	Cytochrome P450
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DAPK	Death-associated protein kinase
DISC	Death-inducing signaling complex
DMM	Déstabilisation du ménisque médial
EGCG	Epigallocatechine gallate
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLIP	FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-inhibitory protein
FOXOs	Forkhead box O transcription factors
GAG	Glycosaminoglycanes
GSH	Glutathion



HSPs	Heat-shock proteins
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IL	Interleukin
iMACs	Immature murine articular chondrocytes
iNos	Inducible Nitric Oxide Synthase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KLm	$\alpha$ -Klotho membranaire
KLs	$\alpha$ -Klotho secrété
LC3b	Microtubule-associated protein 1 light chain 3B (MAP1LC3B)
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MMP	Matrix Metalloproteinase
MOMP	Major outer membrane protein
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC	Mammalian target of rapamycin complex
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa B
NO	Nitric Oxide
OA	Osteoarthritis/Arthrose
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PE	Phosphatidyl-ethanolamine
PG	Protéoglycanes
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E2
PI3KC3	Class III phosphatidyl-inositol-3-kinase
PI3P	Phosphatidylinositol 3-phosphate
RANK-L	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RE	Réticulum Endoplasmique
RIP	Receptor interacting protein
ROMK1	Renal outer medullary potassium channel
ROS	Reactive Oxygen Species
SA- $\beta$ -gal	Senescence-associated beta-galactosidase
SASP	Senescence-associated secretory phenotype
SOD	Superoxide dismutase
SZP	Superficial Zone Protein
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$

TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TRVP5	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 5
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
ULK1	Unc-51-like autophagy activating kinase 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z-VAD-FMK	Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp.fluoromethylketone

## **AVANT-PROPOS**

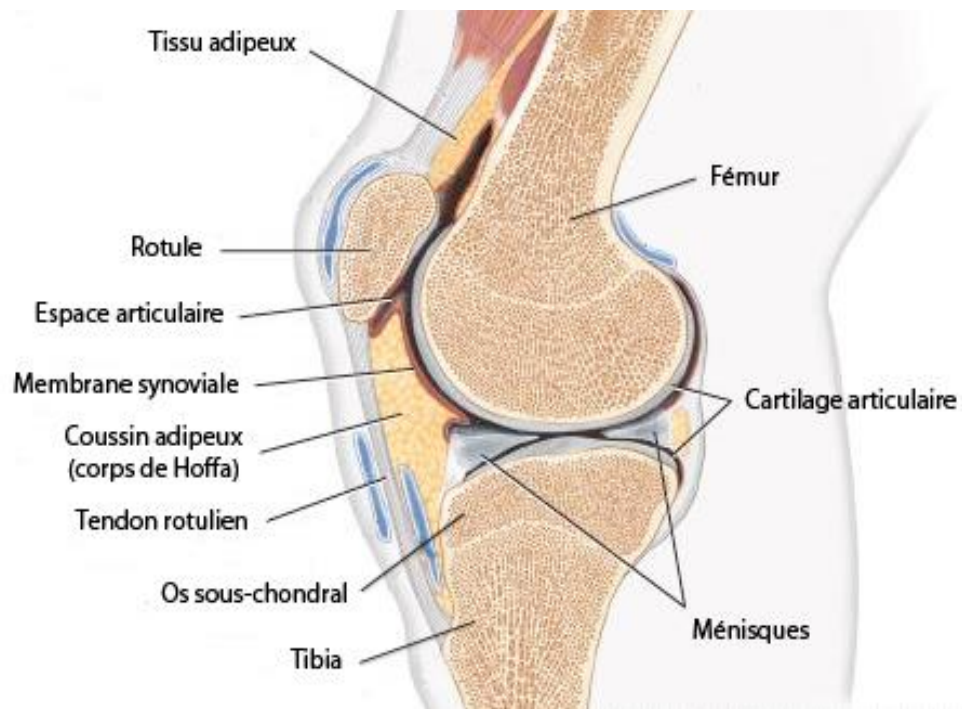
L'arthrose est une maladie dégénérative de l'articulation qui affecte des millions de personnes au monde. Elle touche différentes articulations, comme la main, la hanche, la colonne vertébrale ou le genou. Elle devient de plus en plus un problème de santé publique avec le vieillissement de la population. Longtemps uniquement considérée comme une maladie du cartilage, il est maintenant admis qu'elle touche les différents tissus constituant l'articulation. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit l'arthrose comme « la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral ». Son étiologie n'est pas totalement élucidée, mais des facteurs mécaniques, comme des traumatismes ou l'obésité, semblent initier le développement d'arthrose, et certains facteurs de risque ont été décrits, comme l'âge, le sexe ou des facteurs génétiques (Buckwalter et al., 2006). Le vieillissement, qui peut se définir comme une « détérioration des fonctions physiologiques nécessaires à la survie et à la fertilité d'un organisme avec l'âge » est également un facteur de risque de l'arthrose (Loeser, 2011). En effet, au cours du vieillissement articulaire, de nombreuses voies de signalisation sont dérégulées, entraînant des altérations de l'homéostasie du cartilage. Celles-ci sont notamment associées à la mort des chondrocytes, par apoptose et autophagie, ou à la différenciation aberrante des chondrocytes qui entrent en sénescence (Lotz et al., 2012).

Parmi les thérapeutiques actuelles, aucune ne permet de soigner l'arthrose. Les traitements, pharmacologiques ou non, ne font que réduire les symptômes, comme l'inflammation et la douleur, et sont responsables d'effets secondaires qui peuvent être handicapants. En dernier recours, la chirurgie de remplacement peut être envisagée. Il y a donc un intérêt considérable à développer des thérapeutiques permettant de stopper ou reverser la progression de l'arthrose, notamment grâce au développement de molécules anti-vieillessement.

Ce projet s'est centré sur le rôle du vieillissement au cours de l'arthrose, et s'est articulé autour de 2 axes : évaluer les effets de molécules naturelles anti-oxydantes et anti-inflammatoires dans la prévention de l'arthrose, et comprendre le rôle de la molécule anti-vieillessement  $\alpha$ -Klotho dans les phénomènes de mort cellulaire dans le cartilage articulaire.

**PARTIE 1 :**

**BIOLOGIE DU CARTILAGE ARTICULAIRE ET PHYSIO-  
PATHOLOGIE DE L'ARTHROSE LIEE AU VIEILLISSEMENT**



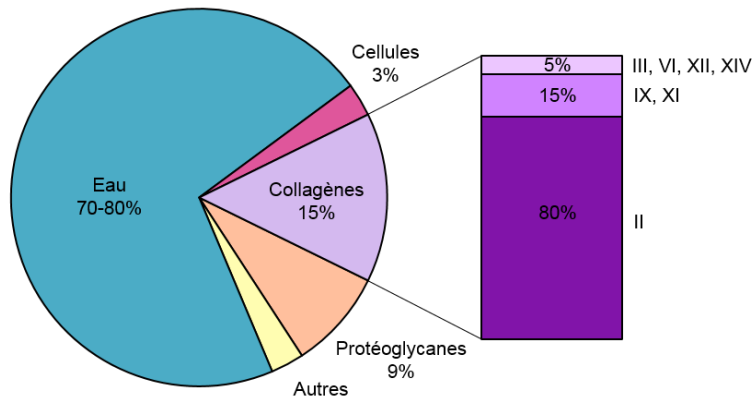
**Figure 1 : Anatomie de l'articulation du genou.** Les différents tissus de l'articulation sont représentés : le cartilage artriculaire, situé juste au-dessus de l'os sous-chondral, et la membrane synoviale qui entoure l'articulation. Les ménisques sont localisés entre le tibia et le fémur et épousent la forme des 2 surfaces osseuses. Le tissu adipeux de Hoffa est localisé en arrière de la rotule contre la membrane synoviale et libère différents médiateurs dans l'articulation (©2011 Encyclopaedia Britannica, Inc).

## 1. LE CARTILAGE ARTICULAIRE

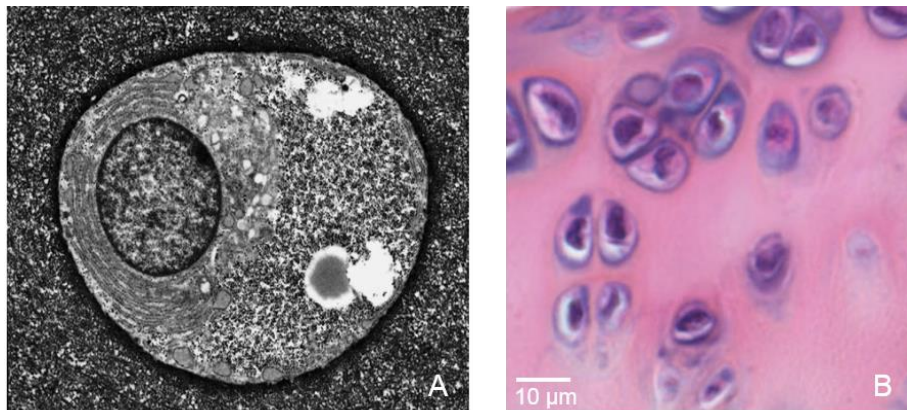
### 1.1 Généralités

Le cartilage est un tissu conjonctif non vascularisé, alymphatique et non innervé composé d'un seul type cellulaire, le chondrocyte, qui permet la synthèse des principaux constituants de la matrice extra-cellulaire (MEC), les fibres de collagène et les protéoglycanes. L'articulation du genou est composée de trois tissus principaux ayant un rôle majeur dans le développement de l'arthrose : le cartilage articulaire, l'os sous-chondral et la membrane synoviale (Glyn-Jones et al., 2015). Les deux pièces osseuses (le tibia et le fémur) sont enchâssées dans une capsule articulaire délimitée dans sa face interne par la membrane synoviale, dont les cellules, les synoviocytes, secrètent le liquide synovial baignant l'articulation. Le maintien de la capsule articulaire est assuré par différents ligaments, muscles et tendons. Deux autres tissus impliqués dans l'arthrose s'ajoutent à cette structure : le coussin adipeux de Hoffa (ou coussinet adipeux infra-patellaire), un petit corps adipeux situé derrière le tendon rotulien produisant différents médiateurs (cytokines, adipokines, dérivés lipidiques, cellules stromales mésenchymateuses et cellules inflammatoires) qui interagissent avec les autres tissus de l'articulation (Ioan-Facsinay et al., 2013) ; ainsi que les ménisques, des petites structures fibrocartilagineuses situées entre le tibia et le fémur qui jouent un rôle de cale entre les 2 structures osseuses (Fox et al., 2014) (**Figure 1**).

Les articulations porteuses, comme le genou, sont continuellement soumises à une charge mécanique. Pour supporter ces contraintes mécaniques, le cartilage articulaire se caractérise par un faible coefficient de friction, une forte capacité en charge et une faculté de diffusion des chocs vers l'os sous-chondral. Cependant, un traumatisme ou une charge mécanique excessive, se traduisant par des symptômes douloureux et handicapants, entraînent le développement d'une arthrose précoce (Chen et al., 2013). Le cartilage articulaire peut être le siège de nombreuses atteintes responsables d'une diminution de la cellularité et d'une dégradation de la MEC. De plus, l'absence de vascularisation du tissu et la faible capacité de prolifération des chondrocytes rendent toute réparation spontanée du cartilage articulaire quasi impossible.



**Figure 2 : Composition moléculaire du cartilage artériel** (adapté de Aigner et al., 2003).



**Figure 3 : Image en microscopie électronique d'un chondrocyte artériel (A) et coupe histologique de cartilage artériel humain, colorée à l'Hématocylline-Eosine-Safran (HES) (B)** (adapté de Archer et al., 2003).



## 1.2 Les constituants du cartilage articulaire

### 1.2.1 Composition moléculaire

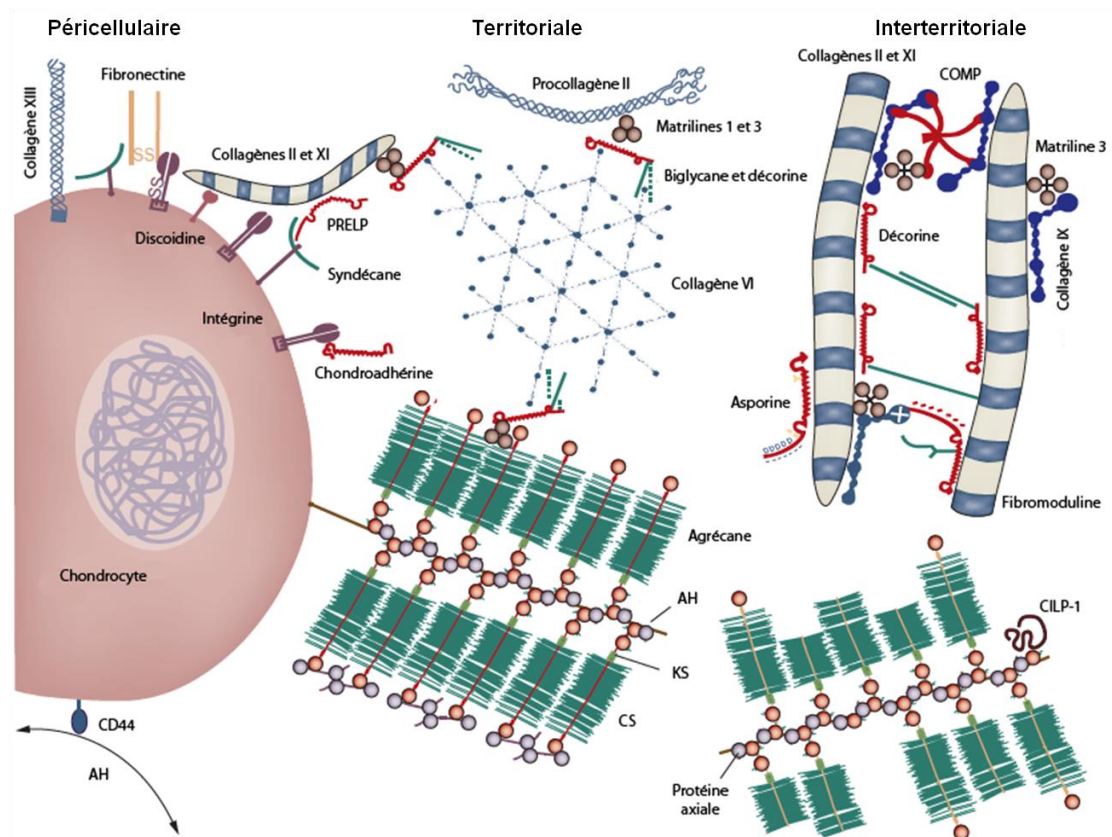
Le cartilage articulaire, d'une épaisseur de 2 à 4 mm chez l'homme, est composé majoritairement d'eau (70 à 80%), de 3% de cellules et de environ 25% de protéines de la MEC (protéoglycanes (PG) et collagènes majoritairement) (**Figure 2**) (Aigner et al., 2003). La MEC permet le maintien de la structure du cartilage, les PG lui conférant sa capacité de résistance à la compression, alors que les collagènes permettent la résistance aux tensions.

### 1.2.2 Les chondrocytes

Le chondrocyte est l'unique type cellulaire constituant le cartilage. D'une taille comprise entre 10 et 40  $\mu\text{m}$ , les chondrocytes sont des cellules arrondies ou polygonales (**Figure 3**) (Archer et al., 2003) et dérivent d'un précurseur mésenchymateux. Le rôle principal des chondrocytes est de synthétiser et maintenir une MEC capable de supporter les contraintes mécaniques et les déformations. Ils ont, de plus, un rôle prépondérant dans le maintien de la balance entre anabolisme et catabolisme au sein du cartilage.

Les chondrocytes sont des cellules métaboliquement actives synthétisant des cytokines, des facteurs de croissance ainsi que les molécules de la matrice extracellulaire tels que les collagènes, les glycoprotéines et PG, et les hyaluronanes. Elles ont de plus un rôle dans la résorption du cartilage grâce à l'action d'enzymes du catabolisme : les cathepsines, métalloprotéinases (MMP) et agrécanases (Troeborg et al., 2011).

Du fait de l'absence de vascularisation du cartilage articulaire, les nutriments et métabolites diffusent jusqu'aux chondrocytes à travers la surface articulaire grâce au liquide synovial qui irrigue la capsule articulaire. De plus, le métabolisme de la cellule s'opère à tension en oxygène basse (de 10% d' $\text{O}_2$  en surface à moins de 1% dans les couches profondes) par glycolyse anaérobie (Archer et al., 2003).



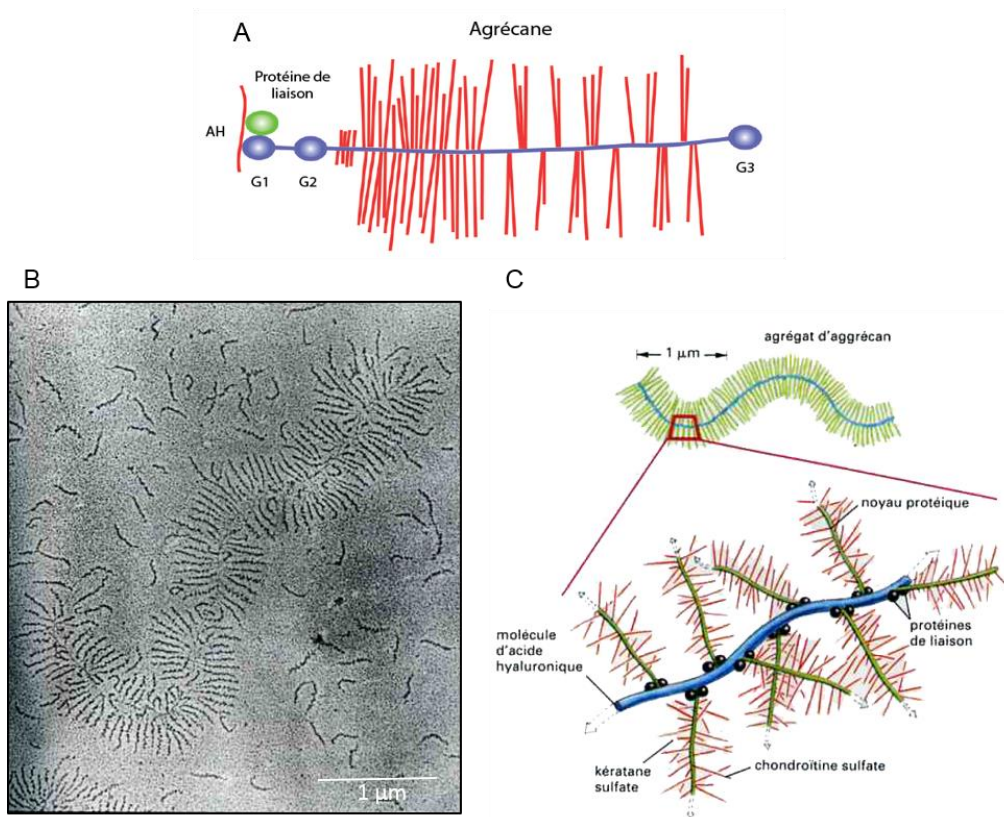
**Figure 4 : Organisation moléculaire de la MEC du cartilage articulaire normal.** La MEC est organisée en trois zones : péricellulaire (le chondron), territoriale (composée de collagène de type VI) et interterritoriale (riche en fibres de collagène II) (adapté de Heinegård et al., 2011).

### 1.2.3 La Matrice Extra-Cellulaire (MEC)

La MEC du cartilage articulaire se compose d'un réseau dense de fibres de collagène, qui constitue la trame fibrillaire, entouré de substance fondamentale composée essentiellement d'eau et de protéoglycanes, qui, grâce à leur charge nette négative, attirent les ions sodium positifs, et donc les molécules d'eau par osmose, permettant la formation d'un gel hydraté baignant les cellules (Gao et al., 2014). La matrice contient également des protéines non collagéniques et non PG, comme la COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein), la fibronectine ou les matrilines. La MEC spécialisée du cartilage hyalin a deux fonctions : elle permet d'absorber les chocs, du fait de sa souplesse et de son élasticité, et fournit une surface lubrifiée aux articulations mobiles. Elle est organisée en différents compartiments autour des cellules, selon leur proximité par rapport aux chondrocytes, la zone péricellulaire (la plus proche des chondrocytes, et qui forme avec ceux-ci une structure appelée le « chondron »), la zone territoriale et la zone interterritoriale (la plus éloignée) (Heinegård et al., 2011) (Figure 4).

#### a) Les Protéoglycanes (PG) et Glycosaminoglycanes (GAG)

Les PG sont composés d'une protéine axiale (« core protein ») liée de façon covalente à une ou plusieurs chaînes polysaccharidiques de glycosaminoglycanes (Dudhia, 2005). Ils sont chargés négativement de par la présence de groupements sulfates et carboxyliques portés sur les unités osidiques. On distingue 2 groupes de GAG selon le sucre aminé qu'ils contiennent : d'une part les glucosaminoglycanes tels que l'héparane sulfate et le kératane sulfate, et d'autre part les galactosaminoglycanes que sont la chondroïtine sulfate et le dermatane sulfate. L'acide hyaluronique (AH) est un GAG particulier non sulfaté et non lié à une protéine axiale. Le cartilage articulaire est constitué d'un grand nombre de PG différents. Ceux-ci interagissent fortement les uns avec les autres, procurant à la matrice ses propriétés mécaniques, et permettant la formation d'un tissu cartilagineux mature (Knudson & Knudson, 2001).



**Figure 5 : Structure de l'agrécan.** (A) Représentation schématique des trois domaines globulaires constituant l'agrécan (G1 à G3) et du domaine central qui lie les différentes chaînes de GAG (d'après Aspberg, 2012) ; (B) micrographie électronique d'un agrégat d'agrécan ; (C) représentation schématique d'un agrégat d'agrécan, constitué par une chaîne d'acide hyaluronique substituée par de nombreuses molécules d'agrécan (adapté de Alberts et al., 2014).

L'agrécan : C'est le PG majoritaire du cartilage, dans lequel il est présent à très forte concentration sous forme d'agrégats. Il est composé d'une protéine axiale de 225 à 250 kDa, associée de façon covalente à une centaine de chaînes de chondroïtine sulfate et une trentaine de kératane sulfate. Il s'associe à l'acide hyaluronique et à une petite glycoprotéine de liaison de façon non covalente, pour former des agrégats de haut poids moléculaire (Dudhia, 2005).

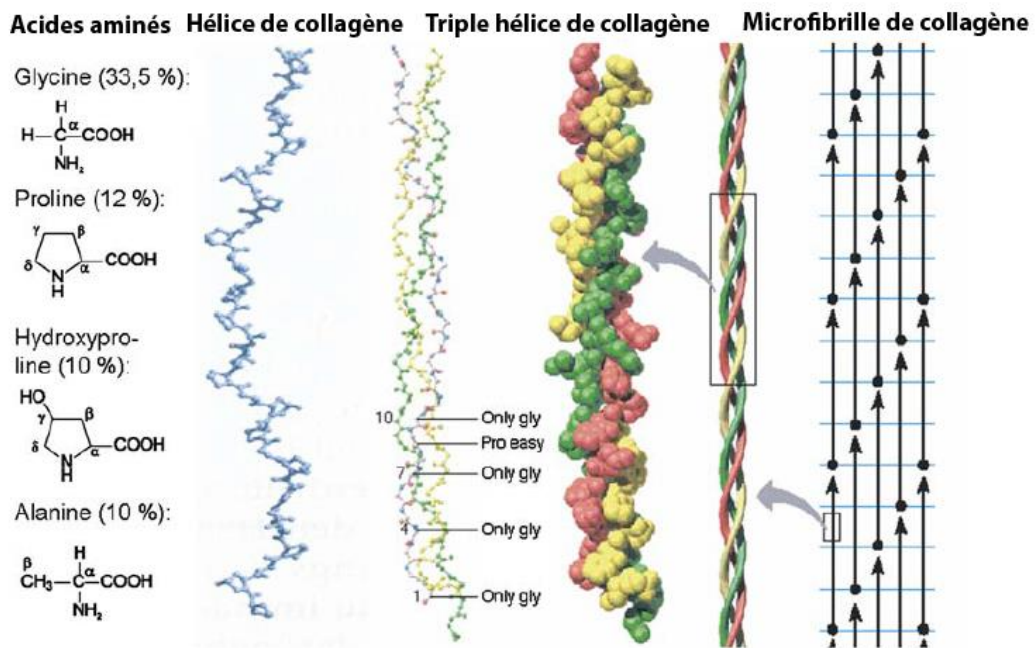
Sa structure est divisée en 3 domaines dits globulaires (G1 à G3) et un domaine central correspondant à la zone substituée par les chaînes de GAG (**Figure 5**) :

- un domaine G1 en N-terminal, permettant l'interaction de l'agrécan avec l'acide hyaluronique et la protéine de liaison pour former des agrégats
- un domaine G2, dont le rôle est peu connu
- un domaine G3 en C-terminal, comprenant un domaine de type Epidermal Growth Factor, un domaine de type protéine régulatrice du complément et un domaine de type lectine. Le rôle de ces 2 premiers domaines sont peu connus ; le domaine de type lectine semble lui interagir avec différentes protéines de la matrice, et aurait un rôle dans la formation des agrégats d'agrécan et d'acide hyaluronique (Aspberg, 2012)

## b) Les collagènes

Les collagènes représentent les protéines de structure principales des divers tissus connectifs chez le mammifère. Actuellement, 28 types de collagènes différents ont été identifiés, et sont présents dans tous les organes du corps humain. Ils représentent environ 30% du contenu protéique du corps, soit 5% de son poids, et deux tiers du poids sec du cartilage articulaire adulte. Ce sont des protéines fibreuses qui ont un rôle central dans la formation de la MEC, et permettent le maintien de l'intégrité et la stabilité de tous les organes. Au sein du cartilage, ils sont responsables des propriétés biomécaniques telles que la résistance aux torsions et tensions subies par le tissu (Gelse et al., 2003; Canty et al., 2005).

Les molécules de collagène ont une structure caractéristique : elles sont formées d'une répétition de triplets de type Gly-X-Y et ont une structure unique en triple hélice



**Figure 6 : Représentation schématique de l'organisation des fibrilles de collagène.** Les différents acides aminés (glycine, proline, hydroxyproline et alanine) forment les hélices  $\alpha$  de collagène, qui s'assemblent en triple hélice, qui elles-mêmes s'organisent en microfibrille de collagène (adapté de Schulz et al., 2007).



d'une longueur de 300 nm. L'assemblage des différentes chaînes  $\alpha$  ne peut se faire qu'en la présence de résidus glycine (Gly) tous les trois acides aminés au sein des chaînes, résultant en des répétitions en tandem de domaines  $(\text{Gly-X-Y})_n$ , où X et Y sont généralement des résidus proline ou hydroxyproline (**Figure 6**) (van der Rest et al., 1991; Gelse et al., 2003; Canty et al., 2005). La triple hélice de pas droit est composée de 3 chaînes polypeptidiques, de type hélice  $\alpha$  de pas gauche. Certains collagènes sont composés d'un homotrimère, c'est-à-dire de 3 chaînes  $\alpha$  identiques (par exemple, les collagènes de type II et III), ou bien d'un hétérodimère de différentes chaînes  $\alpha$  (le collagène de type I par exemple). Les fibrilles de collagène sont usuellement hétérotypiques, c'est-à-dire qu'ils peuvent contenir plus d'un type de collagène. Par exemple, les fibrilles du cartilage sont constituées par des collagènes de type II et XI. Le collagène de type II est le composant principal du cartilage articulaire adulte, alors que le collagène de type X est essentiellement exprimé dans la plaque de croissance par les chondrocytes hypertrophiques.

#### Le collagène de type II :

Il représente 80% des collagènes totaux du cartilage hyalin fœtal, puis 95% à l'âge adulte et est composé de 3 chaînes  $\alpha 1(\text{II})$  identiques. Il existe deux formes de transcrits pour le gène codant pour le collagène de type II : les types IIA et IIB, qui diffèrent par la présence ou non de l'exon 2. L'isoforme IIA est exprimée au cours du développement fœtal lors de la chondrogenèse, alors que l'isoforme IIB est exprimée dans le tissu cartilagineux adulte (Ng et al., 1993; McAlinden et al., 2008). Il a un rôle fondamental dans la formation et les fonctions du tissu cartilagineux. En effet, une mutation du gène codant pour le collagène de type II peut entraîner différentes pathologies au niveau du cartilage articulaire ou de la plaque de croissance, telles que des achondrogénèses, hypochondrogénèses, différentes dysplasies ainsi que certaines formes d'arthroses familiales (Li et al., 1995). Les fibrilles de collagène du cartilage sont majoritairement assemblées en hétérofibrilles de collagène de type II et XI, associées à des fibres de type IX, XII et XIV, ainsi qu'à différentes protéines non-collagéniques. On les retrouve entremêlées dans un réseau microfibrillaire de collagène de type VI (Seibel et al., 2006).

### Le collagène de type X :

Le collagène de type X est essentiellement exprimé au niveau de la plaque de croissance par les chondrocytes hypertrophiques, où ils représentent 45% des collagènes totaux. Il possède une affinité importante avec les fibres de collagène de type II et les PG de la MEC. Il joue de plus un rôle primordial dans le processus d'ossification endochondrale (Shen, 2005). Il aurait la propriété de faciliter les processus de minéralisation via des modifications de l'organisation de la matrice. Le collagène de type X est faiblement exprimé dans le cartilage articulaire normal, mais on le retrouve dans le cartilage arthrosique (Thomas et al., 1991; Girkontaite et al., 1996).

#### c) Les autres constituants de la MEC

La MEC du cartilage articulaire contient, de plus, de nombreuses protéines qui ne sont ni des collagènes, ni des PG, et qui ont un rôle structurel important au sein de la matrice. Ces protéines ont un rôle dans la régulation de l'assemblage de la matrice, la reconnaissance et l'adhésion cellulaire, et auraient un rôle dans la dégradation et la réparation du cartilage (Neame et al., 1999; Roughley, 2001).

Les intégrines : Les intégrines sont des protéines transmembranaires hétéro-dimériques constituées de 2 sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  ainsi que de larges domaines extracellulaires qui permettent la liaison des protéines de la MEC, et de courts domaines cytoplasmiques qui interagissent avec des protéines kinases et du cytosquelette (Wiesner et al., 2005). Elles ont donc un rôle important dans la prolifération, la différenciation, la survie et la migration cellulaire, ainsi que la morphogénèse et le remodelage de la matrice. Les chondrocytes articulaires adultes normaux expriment les intégrines  $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha3\beta1$ ,  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha10$ ,  $\alphaV\beta1$ ,  $\alphaV\beta3$  et  $\alphaV\beta5$  (Woods Jr. et al., 1994). Dans le cartilage arthrosique, on note l'augmentation de l'expression des intégrines  $\alpha1\beta1$  et  $\alpha3\beta1$ , ainsi que l'apparition des intégrines  $\alpha2\beta1$ ,  $\alpha4\beta1$  et  $\alpha6\beta1$ . Elles auraient un rôle dans la réponse aux stimuli mécaniques, ainsi que dans la destruction de la MEC, notamment en situations pathologiques comme lors de l'arthrose (Loeser, 2014).



La fibronectine : La fibronectine est une glycoprotéine présente dans le cartilage articulaire (Burton-Wurster et al., 1997). Elle a un rôle dans la signalisation cellulaire via sa liaison aux intégrines, et interagit avec les autres molécules de la MEC. Lors du développement de l'arthrose, la dégradation de la matrice entraîne la production de fragments protéolytiques de fibronectine, qui entraîneraient une augmentation de la production de cytokines (interleukin-1 beta (IL1- $\beta$ ) et Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ )) et d'enzymes de dégradation de la matrice (MMP) par les chondrocytes (Homandberg et al., 1992, 1997).

La thrombospondine-5 ou COMP : Les thrombospondines sont des glycoprotéines matricielles dont on dénombre actuellement 5 membres. La plus étudiée dans le cartilage articulaire est la Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) ou thrombospondine-5 (Hedbom et al., 1992). Cette protéine se lie aux fibres de collagène II et stabilise le réseau de collagène du cartilage. Suite à une dégradation du cartilage, la COMP est libérée dans le liquide synovial puis dans le sérum. La concentration sérique normale de la protéine COMP est de 5  $\mu$ g/ml. On observe une augmentation de ce marqueur lors de l'arthrose, qui servirait de marqueur de diagnostic du développement des pathologies dégénératives du cartilage (Vilím et al., 2002; Wisłowska et al., 2004).

Les matrilines : La famille des matrilines comprend 4 membres, les types 1 (ou cartilage matrix protein) et 3 sont fortement exprimés dans le cartilage, alors que les types 2 et 4 ont un profil d'expression plus large. Elles permettent l'assemblage de la MEC grâce à leur interaction avec les chaînes chondroïtine sulfate de l'agrécane, ainsi qu'avec les fibres de collagène de type II, XI et IX. De plus, elles ont un site de liaison aux PG biglycane et décorine, eux-mêmes liés au collagène de type VI, ainsi qu'avec COMP, le tout formant un réseau dans la MEC (Klatt et al., 2010).

La lubricine et la superficial zone protein (SZP) : La lubricine et la SZP sont des glycoprotéines issues du même gène proteoglycan-4 (PRG4). La SZP est synthétisée par les chondrocytes de la zone superficielle du cartilage et sécrétée dans le liquide

CATABOLIQUES	ANTI-CATABOLIQUES	ANABOLIQUES	MODULATRICES
IL-1, 17, 18	IL-4, 10, 13	TGF- $\beta$ 1, 2, 3	IL-6, 11
TNF- $\alpha$	IL-1ra	BMP-2, 4, 6, 7, 9, 13	LIF
OSM		Activine	
		CTGF (ou CCN2)	

**Tableau 1 : Classification des cytokines exprimées dans le cartilage articulaire** (Goldring & Goldring, 2004; Sofat, 2009) IL : interleukin ; TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor alpha ; OSM : Oncostatin M ; IL-1ra : interleukin-1 receptor antagonist ; TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor beta ; BMP : Bone Morphogenetic Protein ; CTGF ou CCN2 : Connective Tissue Growth Factor ; LIF : Leukemia Inhibitory Factor.

synovial. Ce fluide lubrifiant possédant un faible coefficient de friction est composé d'acide hyaluronique (AH), un polysaccharide de haut poids moléculaire, associé à une protéine glycosylée, la lubricine, et différents lipides (phosphatidylcholines) et glycosaminoglycanes (GAG) (Das et al., 2013). La lubricine est produite en quantité abondante par les synoviocytes constituant la membrane synoviale. Ces deux protéines ont un rôle dans la lubrification de l'articulation ainsi que dans la prolifération cellulaire, la cytoprotection et la formation de la matrice (Rhee et al., 2005). Une diminution de la production de la lubricine et la SZP a été détectée lors du développement de l'arthrose, suggérant une corrélation entre la perte des capacités de lubrification du liquide synovial et la dégradation du cartilage (Lee et al., 2008).

### 1.3 Le remodelage de la matrice extracellulaire

Le renouvellement de la MEC est assuré par les chondrocytes qui en synthétisent les constituants, ainsi que les enzymes responsables de sa dégradation. Dans les conditions physiologiques, il existe un équilibre entre les processus anaboliques et cataboliques qui permet le maintien de l'intégrité et des fonctions de la MEC du cartilage. En absence d'inflammation ou d'une autre anomalie, le remodelage de la matrice est très faible. Lors d'une contrainte mécanique anormale, on note une perte du contenu en PG, ainsi que des dommages au réseau de collagène (Kurz et al., 2005). De nombreux facteurs sont impliqués dans le maintien de cette balance anabolisme/catabolisme, dont différentes cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), des molécules pro-inflammatoires (NO, PGE<sub>2</sub>), des enzymes (MMP, agrécanases) et des facteurs de croissance (TGF- $\beta$ , BMP, IGF-1, FGF) (Mueller et al., 2011).

#### 1.3.1 Les cytokines

Les cytokines ont un rôle prépondérant dans le remodelage de la MEC du cartilage. On peut classer les différentes cytokines interagissant avec les chondrocytes en 4 classes, rassemblées dans le **Tableau 1** (Goldring & Goldring, 2004) :

- les cytokines cataboliques, qui sont associées à la dégradation de la matrice

- les cytokines anti-cataboliques ou inhibitrices, qui inhibent ou antagonisent l'activité des cytokines cataboliques
- les cytokines anaboliques, qui jouent le rôle de facteurs de croissance ou de différenciation sur les chondrocytes, afin d'augmenter leur activité de synthèse
- les cytokines ayant un rôle de modulation de l'activité des autres cytokines

L'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , particulièrement, ont un rôle primordial dans le remodelage de la matrice du cartilage articulaire. En effet, ces cytokines pro-inflammatoires sont des molécules initiatrices de la dégradation du cartilage, et leur implication dans la pathologie arthrosique sera développée plus loin.

### 1.3.2 Les molécules pro-inflammatoires

Le monoxyde d'azote (NO) : Le NO est synthétisé lors de la conversion de la L-arginine en L-citrulline. Cette réaction est catalysée par 3 isoformes de la NO synthase (NOS) : les NOS endothéliale (eNOS), neuronale (nNOS) et inducible (iNOS). Les 2 premières produisent constitutivement peu de NO, alors que iNos est activée de façon prolongée par différents facteurs (cytokines inflammatoires notamment) (Abramson, 2008). Son expression se voit augmentée lors de l'arthrose. En effet, l'expression de iNos est induite par des facteurs mécaniques et par des cytokines pro-inflammatoires libérées au cours de l'arthrose. Le NO diffuse alors vers les cellules environnantes, où il peut activer le cGMP (guanosine monophosphate cyclique), permettant l'activation de différentes protéines kinases, canaux ioniques et phosphodiesterases. Parallèlement, le NO possède aussi une action cGMP-indépendante, et participe à l'oxydation des protéines et lipides (Murad, 2006). Il est aussi impliqué dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), conduisant à une dégradation de l'ADN et à une mort cellulaire (Stamler et al., 2001).

Le NO est présent dans le cartilage sain dans des quantités de l'ordre du picogramme. Il a de nombreux effets sur l'homéostasie du cartilage. De manière physiologique, il participe notamment à la différenciation terminale des chondrocytes, via la régulation de l'expression du collagène X et de la phosphatase alcaline (ALP) (Teixeira et al., 2005). Mais il est aussi décrit comme une molécule catabolique dans

le cartilage. En effet, les chondrocytes arthrosiques expriment iNos (Melchiorri et al., 1998), et des études ont montré que le NO a un rôle inhibiteur de la biosynthèse de PG et de collagène, et inducteur des MMPs qui dégradent le cartilage (Taskiran et al., 1994; Sasaki et al., 1998). De façon intéressante, l'administration d'un inhibiteur de iNos dans un modèle d'arthrose chez le chien a permis de diminuer les dommages cartilagineux (Pelletier et al., 1998). De plus, le NO interagit avec les espèces réactives de l'oxygène (ROS), induisant notamment la mort des chondrocytes par apoptose (cf paragraphe 2.3.2.a) (Blanco et al., 1995).

Le NO a longtemps été décrit comme un médiateur proinflammatoire et catabolique, mais des études ont aussi montré que les effets du NO variaient en fonction de sa concentration et du temps d'action, et qu'il pouvait ainsi avoir un rôle protecteur dans l'arthrose dans certaines conditions (Stefanovic-Racic et al., 1997; Häuselmann et al., 1998).

La prostaglandine E2 : Le PGE<sub>2</sub> est lui-aussi un médiateur de l'inflammation, mais aussi de la douleur, et est présent dans le cartilage normal en quantités très faibles. Sa production nécessite l'action de 2 enzymes : la cyclooxygénase-2 (COX-2) et la prostaglandin-E synthase, toutes les deux induites par l'IL-1 $\beta$ . Son action dans l'arthrose est moins connue que celle du NO, notamment car il agit via divers récepteurs et donc exerce des effets variés sur le métabolisme des chondrocytes. En effet, il a été décrit à la fois des effets anaboliques et cataboliques du PGE<sub>2</sub> dans le cartilage articulaire (Goldring & Berenbaum, 2004; Haversath et al., 2012).

### 1.3.3 Les protéinases

Les matrix metalloproteinases (MMPs) : Les MMPs sont des endopeptidases à zinc impliquées dans la dégradation des composants de toutes les MEC (Nagase et al., 1999). Elles sont divisées en 3 classes, selon les substrats de la matrice qu'elles clivent : les stromélysines, les collagénases et les gélatinases. Toutes les métalloprotéinases actives sont inhibées par des protéases appelées « tissue inhibitor of matrix metalloproteinase » (TIMPs) afin de maintenir l'intégrité de la MEC. Les principales MMPs impliquées dans la dégradation du cartilage sont rassemblées dans

CLASSE	TYPE	SUBSTRAT
Stromélysines	MMP-3 (stromelysin-1)	PG, fibronectine, laminine
	MMP-10 (stromelysin-2)	
Collagénases	MMP-1 (collagenase-1)	Collagènes de types I et III
	MMP-8 (collagenase-2)	
	MMP-13 (collagenase-3)	Collagène de type II
Gélatinases	MMP-2 (gelatinase A)	Collagène dénaturé, collagènes de types IV et V, élastine
	MMP-9 (gelatinase B)	

**Tableau 2 : Principales matrix metalloproteinases (MMPs) impliquées dans le catabolisme du cartilage articulaire.**

le **Tableau 2** (Cawston et al., 2010). Parmi ces endopeptidases, la MMP-13 possède un rôle critique dans l'arthrose, car elle dégrade le collagène de type II et car son activité est régulée de façon positive par de nombreux stimuli cataboliques, tels que l'IL-1 $\beta$  ou le TNF- $\alpha$  (Kobayashi et al., 2005).

Les agrécanases ou ADAMTS (A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin motifs) : Les agrécanases sont des métalloprotéases à zinc, et sont responsables de la dégradation de l'agrécane de la MEC (Sandy et al., 1991). Ce sont les premières protéinases mises en jeu dans les processus de remodelage du cartilage ; elles sont donc considérées comme des marqueurs précoces de la dégradation du cartilage lors de l'arthrose (Little et al., 1999). Il existe 19 membres dans la famille des ADAMTS, dont deux sont exprimés au sein du cartilage, l'agrécane-1 (ou ADAMTS-4) et l'agrécane-2 (ou ADAMTS-5). A l'état physiologique, une régulation fine de l'activité des agrécanases est nécessaire pour maintenir une balance entre anabolisme et catabolisme. Cette balance est notamment perturbée lors du développement de l'arthrose en faveur d'une activité catabolique (Verma et al., 2011). A l'instar des MMPs, l'activité des agrécanases est régulée par les TIMPs.

#### 1.3.4 Les facteurs de croissance

Le Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) : Le TGF- $\beta$  (1 et 3 principalement) a un rôle indispensable dans le maintien de l'homéostasie du cartilage, mais aussi de l'os sous-chondral (Redini et al., 1988). Il permet la condensation, la prolifération ainsi que la différenciation des cellules chondroprogénitrices en chondrocytes matures (Leonard et al., 1991). La MEC du cartilage contient une quantité importante de TGF- $\beta$  sous forme non active qui permet le maintien de la structure de la matrice (Zhen et al., 2014). Le rôle du TGF- $\beta$  dans l'arthrose est contradictoire car des études lui attribuent à la fois des propriétés protectrices et cataboliques (Bush et al., 2013). En effet, une perte de la signalisation du TGF- $\beta$  induit l'hypertrophie des chondrocytes et la dégénérescence du cartilage (Serra et al., 1997).

Toutefois, lors de l'arthrose, l'expression du TGF- $\beta$  est augmentée de façon aberrante dans l'os sous-chondral (Zhen et al., 2013). Ainsi, Zhen et al. montrent que

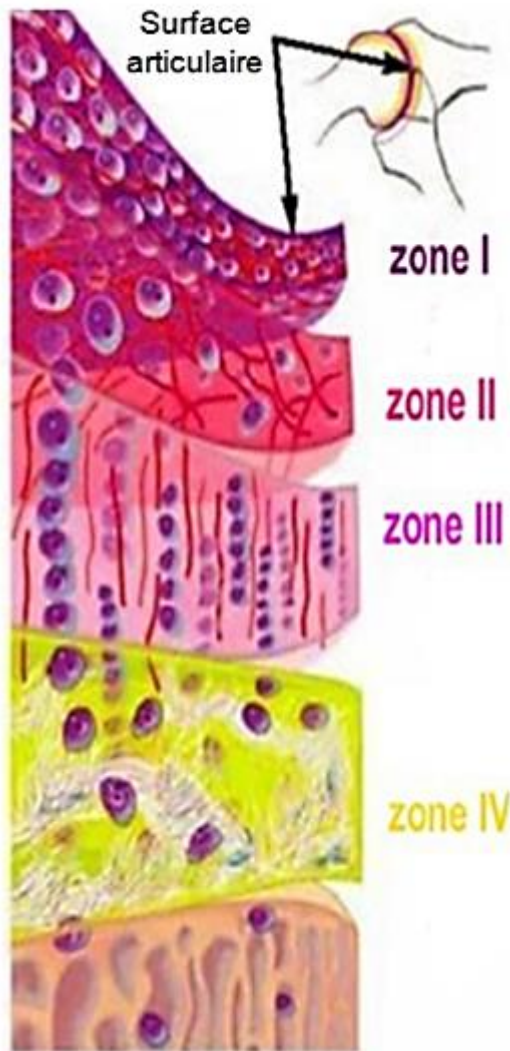
l'utilisation d'un inhibiteur du récepteur au TGF- $\beta$  (T $\beta$ RI) induit une diminution de la destruction du cartilage.

Les Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) : Les BMPs sont des membres de la superfamille du TGF- $\beta$  et sont impliquées dans le maintien de l'intégrité du cartilage articulaire. La BMP-2 est régulée positivement par l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  dans les chondrocytes arthrosiques et stimule la production de collagène de type II (Fukui et al., 2003). La BMP-7 quant à elle, est régulée négativement lors de l'arthrose et possède un effet anabolique dans le cartilage (Gavenis et al., 2011).

L'Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) : L'IGF-1 est un facteur de croissance circulant qui atteint le cartilage articulaire via le liquide synovial. Il possède un fort pouvoir anabolique dans le cartilage, en stimulant la production de PG et en s'opposant en parallèle à leur destruction (Schalkwijk et al., 1989). Son expression est fortement augmentée dans l'arthrose, cependant les chondrocytes perdent leur sensibilité à l'IGF-1, notamment avec l'âge (Loeser et al., 2000). De manière plus globale, un lien fort a été établi entre la concentration d'IGF-1 plasmatique et la longévité. En effet, l'IGF-1 contrôle la croissance et le développement, notamment via son interaction avec l'hormone de croissance (GH). Des études ont montré qu'une diminution de l'expression d'IGF-1 serait associée à un prolongement de la durée de vie (Holzenberger et al., 2003; Bartke et al., 2016).

Le Fibroblast Growth Factor (FGF) : Le FGF-2 est produit de manière endogène par le cartilage (Vincent et al., 2007) ; il est libéré lors de dommages subis par le tissu. Son rôle dans l'homéostasie du cartilage articulaire est controversé. En effet, le FGF-2 possède des propriétés opposées selon l'espèce étudiée. Bien qu'ayant un rôle anabolique chez la souris (Chia et al., 2009), son implication serait plutôt catabolique chez l'homme (Im et al., 2007). Il inhiberait l'accumulation de PG, ainsi qu'antagoniserait l'action anabolique de la BMP-7 et de l'IGF-1 ; il induirait l'expression de la MMP-13 et réduirait l'expression de l'agrécane, tout en stimulant l'expression des agrécanases (Ellman et al., 2013).





Couches	Organisation	Collagènes	Protéoglycanes	Eau
Superficielle (5-10%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chondrocytes aplatis verticalement</li> <li>- Fibrilles de collagène parallèles à la surface articulaire</li> <li>- Riche en fibronectine</li> </ul>	I, II et III		
Moyenne (40-45%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chondrocytes volumineux et sphériques</li> <li>- Fibres de collagènes s'entrecroisent pour former un réseau</li> </ul>	II, VI, IX et XI		
Profonde (40-45%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chondrocytes et fibres de collagène disposées en colonnes perpendiculaires à la surface articulaire</li> </ul>	II, IX et XI		
Calcifiée (5-10%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Repose sur l'os sous-chondral</li> <li>- Tidemark entre cette couche et la précédente</li> <li>- Chondrocytes hypertrophiques moins nombreux exprimant le collagène X</li> </ul>	II, X et XI		

Tableau 3 : Organisation histologique en 4 couches du cartilage artulaire (adapté de Clouet et al., 2009).

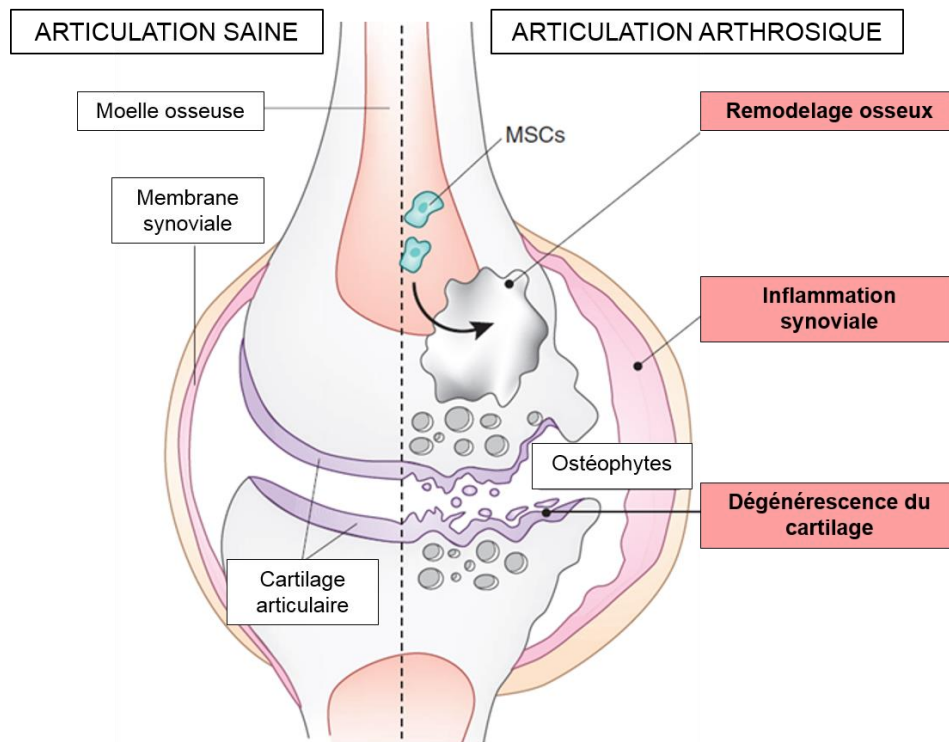
## 1.4 Organisation histologique du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est organisé en 4 couches qui diffèrent selon la forme et l'activité des chondrocytes, le type et l'orientation des fibres de collagène, ainsi que le contenu en PG et en eau (Clouet et al., 2009). On distingue (**Tableau 3**) :

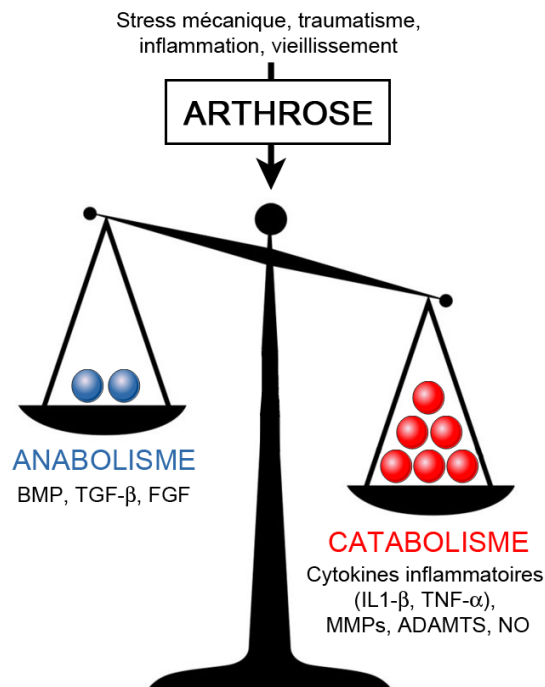
- la couche superficielle ou tangentielle : cette couche est en contact direct avec le liquide synovial et constitue la surface de glissement de l'articulation. Elle représente 5 à 10% de l'épaisseur du cartilage et est divisée en 2 sous-couches. La couche la plus superficielle ne contient pas de cellules, peu de PG et est essentiellement constituée de fibres de collagène de types I, II et III. Elle est recouverte de macromolécules, telles que l'AH, qui permettent la lubrification de la surface articulaire. La zone plus profonde contient des chondrocytes aplatis verticalement synthétisant des couches de collagènes orientées parallèlement à la surface de l'articulation. Cette couche est également riche en eau et en fibronectine, qui, associée aux fibres de collagène, confère au cartilage une résistance importante aux forces de cisaillement. Les cellules constituant cette couche superficielle sont considérées comme des cellules progénitrices capables d'auto-renouvellement et de générer des chondrocytes (Li et al., 2017 a).
- la couche moyenne ou de transition : celle-ci représente 40 à 45% de l'épaisseur du cartilage, et est composée de fibres de collagènes de types II, VI, IX et XI, qui s'enchevêtrent en un réseau moins dense et orienté que dans les couches supérieures. Les chondrocytes sont volumineux et arrondis, et dispersés dans la MEC. Ils ont une forte activité de synthèse de PG et collagènes. Cette organisation permet la répartition et l'absorption des contraintes compressives.
- la couche profonde ou radiale : cette couche constitue 40% à 45% de l'épaisseur du cartilage articulaire, et se compose de fibres de collagènes II, IX et XI, organisées de manière perpendiculaire à la surface articulaire. Les

chondrocytes sont disposés en colonnes alignées avec les fibres de collagène. Cette zone est très riche en PG et très pauvre en eau, et confère au cartilage articulaire ses propriétés de résistance aux forces de compression.

- la couche calcifiée : elle représente 5 à 10% de l'épaisseur du cartilage. Elle est séparée de la couche profonde par une ligne dense appelée « tidemark » qui sépare le cartilage non calcifié du cartilage calcifié. Cette couche est en contact avec l'os sous-chondral, et contient un nombre limité de chondrocytes dits « hypertrophiques », qui sont caractérisés par leur volume important et par leur capacité de synthèse de collagène de type X. La calcification des fibres de collagène permet l'ancrage du cartilage à l'os sous-chondral.



**Figure 7 : Schéma d'une articulation saine (gauche) et arthrosique (droite), caractérisée par la dégradation du cartilage, une inflammation de la membrane synoviale, ainsi qu'un remodelage de l'os sous-chondral (adapté de Bush et al., 2013).**



**Figure 8 : Déséquilibre entre processus anaboliques et processus cataboliques impliqué dans l'arthrose. Lors d'une situation de stress (mécanique ou inflammatoire), la balance entre synthèse et dégradation du cartilage est perturbée, conduisant à la destruction de la MEC (adapté de Clouet et al., 2009).**

## 2. VIEILLISSEMENT ARTICULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ARTHROSE

L'arthrose est une pathologie de l'ensemble des tissus de l'articulation. D'un point de vue moléculaire, elle se caractérise par la dégradation et la perte de cartilage articulaire, un remodelage de l'os sous-chondral avec formation d'ostéophytes (excroissances osseuses au niveau de l'articulation), ainsi qu'une inflammation chronique de la membrane synoviale (**Figure 7**). Son étiologie reste mal connue, mais paraît résulter d'un déséquilibre métabolique entre différents stimuli mécaniques et biochimiques, aboutissant à l'échec des chondrocytes à maintenir la balance entre synthèse et dégradation du cartilage, en faveur de la dégénérescence des tissus articulaires (**Figure 8**). S'associe à ce processus une inflammation de la membrane synoviale qui produit des médiateurs pro-inflammatoires, qui interagissent avec les chondrocytes et leur matrice ([Martel-Pelletier et al., 2008](#)).

L'arthrose est une des pathologies articulaires les plus communes et les plus invalidantes. Environ 10 millions de français seraient touchés par la maladie (soit 17% de la population). Elle touche principalement les articulations du rachis, du genou, des mains et de la hanche. La gonarthrose (arthrose du genou) touche en France 4,7% des hommes et 6,6% des femmes ([Mazières, 2011](#)). L'âge est un facteur de risque prédominant dans l'arthrose. En effet, il existe une forte corrélation entre le développement de la pathologie et le vieillissement ([Lotz et al., 2012](#)). De moins de 5% des patients âgés de 15 à 44 ans touchés par une arthrose d'au moins une articulation, le pourcentage passe de 15 à 30% à l'âge de 45 à 64 ans, et de 60 à 90% des plus de 65 ans dans certaines populations ([Le Pen et al., 2005](#)).

Effectivement, de nombreuses voies de signalisation sont dérégulées à la fois au cours du vieillissement et au cours de l'arthrose. Ces phénomènes résultent en une perturbation de l'homéostasie de la MEC et des propriétés biomécaniques du cartilage. De plus, le nombre de chondrocytes diminue avec l'âge ([Mitrovic et al., 1983](#); [Hui et al., 2016](#)), les tissus perdent leur capacité de régénération ([Eltawil et al., 2009](#)), et les cellules entrent en sénescence ([Loeser, 2009](#)). A ces manifestations s'associe une inflammation chronique à bas bruit connue sous le nom d'« inflamm-aging » ([Franceschi et al., 2000](#); [Greene et al., 2015](#)), qui s'accompagne d'anomalies de l'autophagie et de l'apoptose, ainsi qu'un environnement pro-oxydatif, qui participent à

la destruction du cartilage articulaire ([Rahmati et al., 2017](#)).

## 2.1 Le remodelage de l'os sous-chondral

Le rôle de l'os sous-chondral dans l'articulation est de distribuer les forces et amortir les chocs, en minimisant le stress mécanique du tissu cartilagineux. La perte progressive du cartilage articulaire est associée à une sclérose de l'os sous-chondral, un épaissement des trabécules osseuses et à la formation de nouveaux tissus osseux, les ostéophytes, à la surface de l'articulation ([Burr et al., 2012](#)). En effet, les premiers signes d'arthrose sont associés à une augmentation du remodelage osseux se traduisant par une réduction de l'épaisseur de l'os sous-chondral ([Intema et al., 2010](#)). Les causes de ce remodelage ne sont pas clairement établies, mais semblent être multiples. Une charge mécanique répétitive, même normale, entraîne la formation de microfractures dans l'os, causant une augmentation de la production de différents médiateurs qui stimulent le remodelage de l'os, comme le TGF- $\beta$  ([Zhen et al., 2013](#)), les cytokines IL-1 et 6 et le PGE<sub>2</sub> ([Massicotte et al., 2002](#)). Ces microfractures entraînent, de plus, la libération de facteurs qui augmentent la résorption osseuse. En effet, l'expression du RANKL (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ -B ligand) est stimulée alors que celle de l'ostéoprotégérine (OPG) est inhibée, induisant la résorption osseuse ([Nakashima et al., 2011](#); [Kennedy et al., 2012](#)). Ces phénomènes sont associés à une invasion vasculaire dans les couches profondes du cartilage articulaire, due à la stimulation par des facteurs angiogéniques, comme le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) que l'on retrouve élevé dans le liquide synovial des patients arthrosiques ([Brown et al., 1983](#)), permettant l'accès au cartilage articulaire d'agents cataboliques (comme les MMPs et les ADAMTS). Enfin, des études montrent qu'il existe une communication entre l'os sous-chondral et le cartilage via des pores creusés dans l'os, permettant l'échange de différents médiateurs ([Pan et al., 2012](#)).

A l'inverse, une augmentation du volume osseux ainsi qu'une sclérose de l'os sous-chondral sont observés dans les stades plus avancés d'arthrose ([Li et al., 1997](#)). Ces anomalies entraînent une altération des propriétés biomécaniques de l'os sous-chondral, qui devient plus dense, et ne permet plus au cartilage de répartir les chocs entraînant la dégénérescence du cartilage articulaire.

## 2.2 L'inflammation de la membrane synoviale

Bien que longtemps considérée comme une pathologie non inflammatoire causée par la combinaison d'un stress mécanique et d'une dégradation enzymatique du cartilage, il est maintenant communément admis que l'inflammation à la fois de la membrane synoviale et au sein même du cartilage articulaire est une des caractéristiques de l'arthrose (Sellam et al., 2010). Il ne faut cependant pas confondre arthrose, dans laquelle l'inflammation est secondaire à la destruction du cartilage, et arthrite dont l'origine est inflammatoire (Berenbaum, 2013; Sokolove et al., 2013). La membrane synoviale permet à la fois la nutrition des chondrocytes via le liquide synovial, et l'évacuation des déchets métaboliques et des produits de dégradation de la MEC. Lors du développement de l'arthrose, on remarque une hypertrophie et une hyperplasie de la membrane synoviale (Myers et al., 1990; Smith et al., 1997), associées à une infiltration de cellules mononucléées (lymphocytes T et B, macrophages) (Nakamura et al., 1999; Haywood et al., 2003). Parallèlement, on observe une néo-vascularisation sous l'action du VEGF, qui facilite l'accès aux cellules inflammatoires (Walsh et al., 2007), ainsi qu'une augmentation de la production de différentes cytokines pro-inflammatoires (Furuzawa-Carballeda et al., 2008). Le tissu synovial contient de plus différentes adipokines secrétées par le tissu adipeux (visfatine, adiponectine, leptine), qui sont impliquées dans la dégradation et l'inflammation du cartilage (Presle et al., 2006).

## 2.3 Les atteintes de la matrice cartilagineuse

### 2.3.1 Influence des cytokines pro-inflammatoires dans l'arthrose

Parmi les cytokines impliquées dans le développement de la pathologie arthrosique, l'IL1- $\beta$  et le TNF- $\alpha$  ont un rôle pro-inflammatoire prédominant. Chez les patients arthrosiques, la production de ces deux cytokines est augmentée dans le liquide synovial, la membrane synoviale, l'os sous-chondral et le cartilage (Kapoor et al., 2010). Celles-ci sont secrétées par le chondrocyte lui-même (mais aussi par les macrophages synoviaux), affectent son métabolisme et activent différentes voies cataboliques. L'IL1- $\beta$  semble associée à la destruction du cartilage (Clements et al.,



2003), alors que le TNF- $\alpha$  entretiendrait la réaction inflammatoire. Ils régulent négativement la synthèse des différents constituants de la MEC, dont le collagène de type II et l'agrécan (Nietfeld et al., 1990; Séguin et al., 2003). Tous deux augmentent de plus la libération d'enzymes protéolytiques, telles que les MMP-1, 3 et 13, et les ADAMTS-4 et 5. Parallèlement, elles induisent la production d'autres cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-6, ou de chimiokines, comme l'IL-8, ainsi que la libération de NO et PGE<sub>2</sub> (Lefebvre et al., 1990). Tous ces phénomènes entraînent la dégradation du cartilage, mais entretiennent aussi la réaction inflammatoire dans l'articulation.

### 2.3.2 Rôle du stress oxydant

L'intérêt pour le rôle du stress oxydant dans l'arthrose s'est affirmé depuis les années 2000. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des espèces chimiques contenant des molécules d'oxygène, tels que des radicaux libres, des ions oxygénés et des peroxydes, tels que le NO, le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), l'anion superoxyde (O<sup>2-</sup>) ou le radical hydroxyl (OH<sup>·</sup>). La présence d'électrons de valence non appariée leur confère une courte demi-vie, une instabilité et une haute réactivité (Droge, 2002). La source principale de ROS est la mitochondrie. Des systèmes anti-oxydants se sont progressivement mis en place pour éliminer ces ROS, tels que la superoxide dismutase (SOD), la catalase (CAT) ou le glutathion (GSH). Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre la production de ROS et les systèmes anti-oxydants. En fonction de l'intensité, la durée et le contexte du signal, ainsi que status redox de la cellule, celle-ci répondra différemment : quand le niveau de ROS ne dépasse pas la capacité anti-oxydante de la cellule, les ROS régulent différents processus physiologiques, alors qu'en cas de dépassement des systèmes anti-oxydants, les ROS interagissent avec l'ADN, les protéines et les lipides et modifient leurs fonctions (Thannickal et al., 2000).

Dans le cartilage sain, on ne retrouve que peu de ROS, car ils expriment constitutivement les enzymes anti-oxydantes SOD, CAT et GSH (Deahl et al., 1992). Cependant, au cours de l'arthrose, ils sont retrouvés en quantité élevée et contribuent



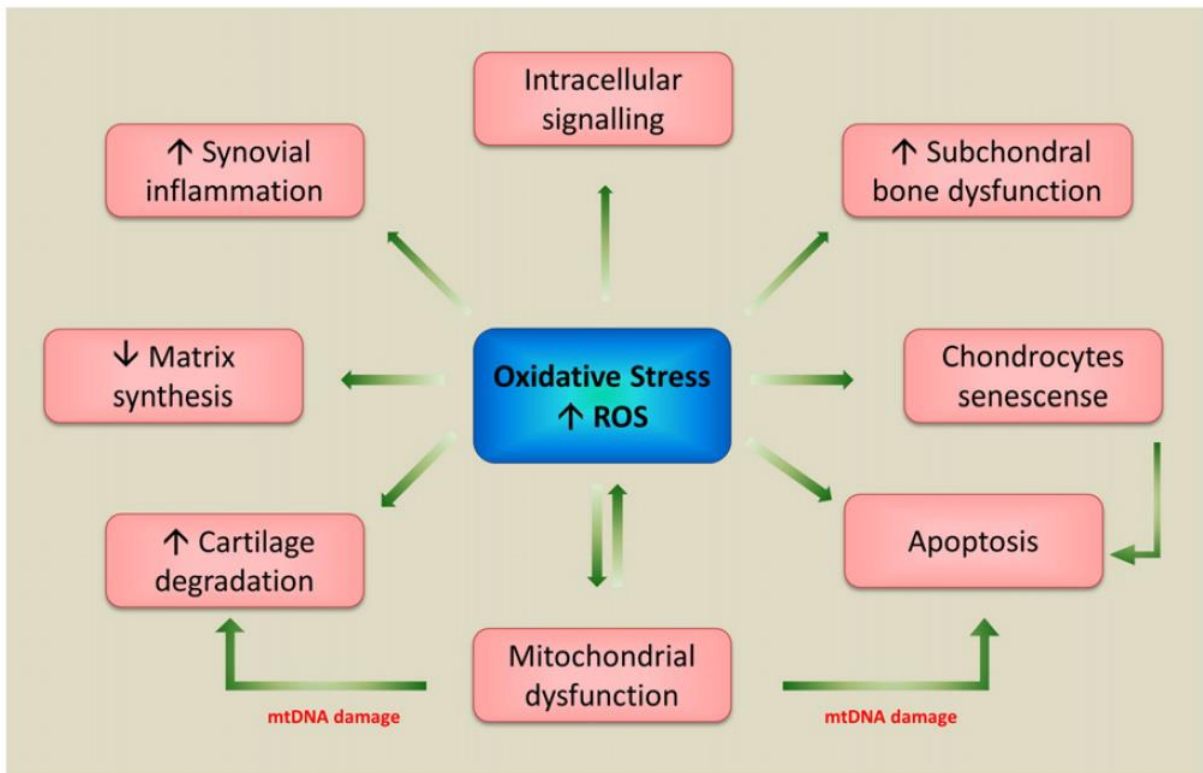


Figure 9 : Physiopathogénie des espèces réactives de l'oxygène (ROS) au cours de l'arthrose (Lepetsos et al., 2016).

au développement de la maladie arthrosique (Henrotin et al., 2005). Les ROS régulent le métabolisme des chondrocytes par différents moyens : ils activent différentes voies de signalisation (notamment la voie NF- $\kappa$ B, qui module la transcription des gènes pro-inflammatoires tels que l'IL1- $\beta$  et le TNF- $\alpha$ ), induisent l'apoptose et la senescence cellulaire (cf paragraphes 2.4.1 et 2.4.2a), participent à la destruction de la MEC, ainsi qu'à la sclérose de l'os sous-chondral et l'inflammation de la membrane synoviale (**Figure 9**) (Hui et al., 2016; Lepetsos et al., 2016). Le rôle des ROS semble donc critique dans l'arthrose, et l'utilisation de molécules anti-oxydantes pourrait représenter une alternative thérapeutique intéressante, notamment grâce à l'utilisation de molécules naturelles anti-oxydantes possédant peu d'effets indésirables (cf partie 2 paragraphe 1).

### 2.3.3 Mécanismes de dégradation de la matrice cartilagineuse

Dans l'articulation du genou, la dégradation de la matrice cartilagineuse est presque systématiquement due à une charge mécanique anormale subie par l'articulation, associée à une inflammation de la membrane synoviale. Dans les stades précoces, les enzymes de dégradation de la MEC sont surexprimées, causant une dégradation des PG et du collagène de type II, et une augmentation du contenu en eau, résultant en une perte des propriétés mécaniques de l'articulation (Umlauf et al., 2010). Pour tenter de réparer les dommages causés à la matrice, les chondrocytes prolifèrent et néosynthétisent des protéines de matrice de façon réactionnelle (collagène de type II et PG). Cependant, la matrice nouvellement synthétisée n'a pas la même composition dans la couche superficielle que dans les couches profondes, rendant le cartilage superficiel plus enclin à une érosion. A terme, les tentatives de réparation sont inefficaces et le cartilage articulaire disparaît totalement.

Différentes enzymes protéolytiques sont impliquées dans la pathologie, dont principalement :

- les MMPs qui dégradent majoritairement les collagènes (surtout le collagène de type II). Parmi les MMPs dont l'expression augmente lors de l'arthrose, les principales effectrices sont les MMP-1, 3, 8 et 13
- les agrécanases qui dégradent l'agrécane (ADAMTS-4 et 5)

Parallèlement à cette perte de constituants de la MEC, les produits de dégradation de différentes molécules, comme le collagène de type II et l'acide hyaluronique (AH), ont aussi un rôle pro-inflammatoire et protéolytique. En effet, la dégradation du collagène de type II entraîne la libération de différents peptides, un peptide C-terminal retrouvé dans l'urine et le liquide synovial, utilisé comme marqueur de diagnostic de l'arthrose, et un peptide N-terminal qui stimule la production de MMPs, de cathepsines (enzymes protéolytiques qui clivent le collagène II), et de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , 6 et 8). Les fragments d'AH induisent eux-aussi la dégradation et l'inflammation du cartilage, alors que l'AH non clivé présent dans le liquide synovial aurait un rôle chondroprotecteur, d'où l'utilisation d'injection intra-articulaire d'AH pour réduire la douleur et l'inflammation (Sofat, 2009).

## 2.4 Le rôle des chondrocytes

### 2.4.1 Les modifications du phénotype chondrocytaire

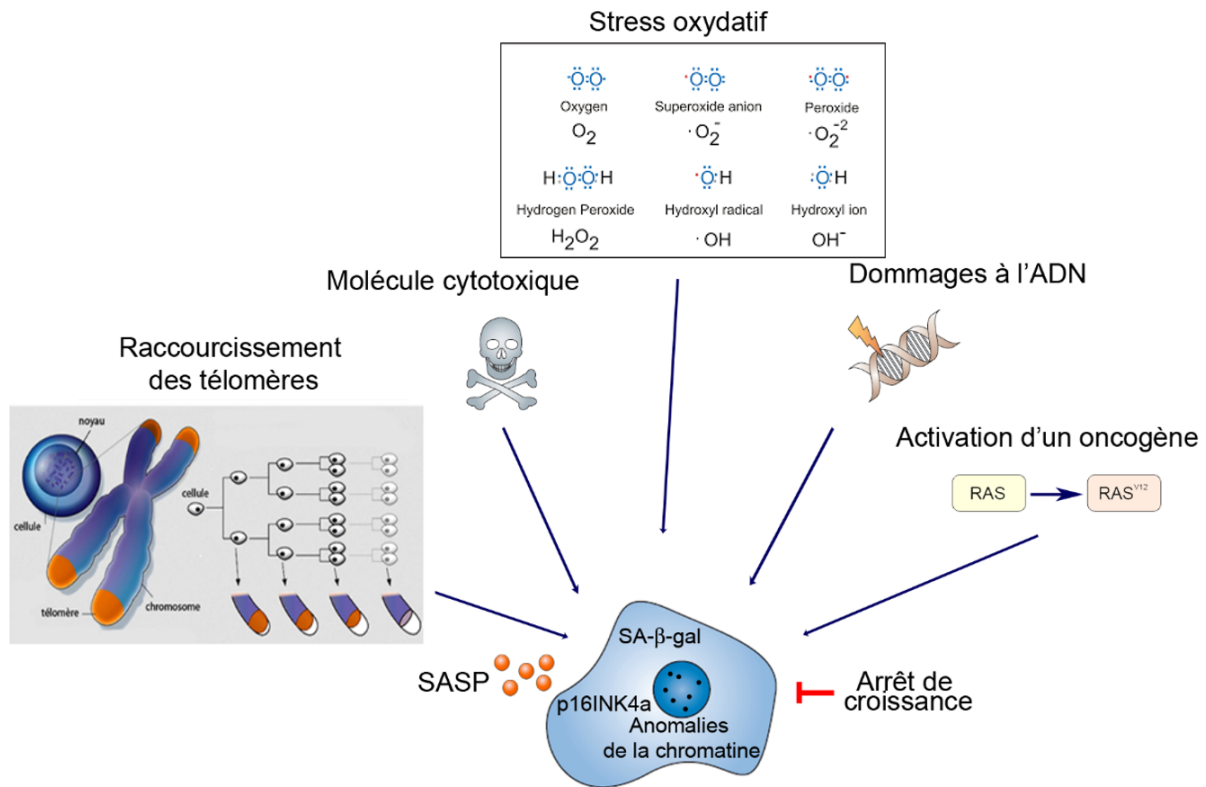
Au cours du développement de l'arthrose, le phénotype des chondrocytes va progressivement être altéré. Trois phénomènes principaux vont alors se mettre en place : l'hypertrophie, la dédifférenciation et la sénescence des chondrocytes.

L'hypertrophie des chondrocytes est un phénomène physiologique ayant lieu pendant le processus d'ossification endochondrale qui permet la formation des os longs (Mackie et al., 2008; Yang et al., 2014). Ce processus débute à partir d'une ébauche embryonnaire cartilagineuse envahie par son centre, puis à chaque extrémité, par des centres d'ossification primaire et secondaire qui vont remplacer le cartilage par du tissu osseux (sauf à la surface des os pour former le cartilage articulaire). Ce procédé se caractérise par une réorganisation et une différenciation progressive des chondrocytes qui vont s'aligner dans le sens de la croissance de l'os et vont proliférer. On distingue alors 4 stades de différenciation des chondrocytes : les chondrocytes restants, prolifératifs, pré-hypertrophiques et hypertrophiques. Ces derniers représentent le stade ultime de différenciation des chondrocytes, leur volume augmente et ils sécrètent de la matrice qui va minéraliser, avant de mourir en laissant

place à des travées qui vont être envahies par des vaisseaux sanguins, des ostéoclastes et ostéoblastes et des cellules de la moelle osseuse, permettant la formation du tissu osseux. Ce phénomène n'a, en situation normale, lieu que lors de la formation de l'os. Cependant, lors du développement de l'arthrose, les chondrocytes rentrent de nouveau en phase de différenciation terminale, expriment les différents marqueurs de l'hypertrophie (MMP13, collagène de type X et ALP), entraînant la minéralisation de la matrice environnante (Fuerst et al., 2009; Bertrand et al., 2010).

Une dédifférenciation des chondrocytes a lieu dans le cartilage articulaire. Les chondrocytes n'expriment plus l'agrécan et le collagène de type II, mais restent métaboliquement actifs et produisent des collagènes de types I, III et V (Benya et al., 1978). Le cartilage arthrosique se caractérise de plus par la formation de clusters de chondrocytes (Kouri et al., 1998), dans lesquels on retrouve des cellules qui expriment des marqueurs de prolifération (Proliférating cell nuclear antigen PCNA et Ki67) (Pfander et al., 2001; Hoshiyama et al., 2015), et qui présentent un phénotype de cellules progénitrices, exprimant notamment les marqueurs Stro-1 et Notch (Grogan et al., 2009). A ces altérations du phénotype des chondrocytes sont associées des anomalies de l'expression des protéines HMGB2 (high-mobility group box 2) et ALK1/ALK5 (Activin receptor-Like Kinases, qui régulent l'activité du TGF- $\beta$ ) au cours du vieillissement articulaire, induisant une dédifférenciation des chondrocytes et une diminution de la cellularité du cartilage (Taniguchi et al., 2009; van Caam et al., 2016).

La senescence peut se définir comme un arrêt irréversible du cycle cellulaire ayant lieu lorsqu'une cellule en division se trouve en situation de stress (Campisi et al., 2007). La cellule reste malgré tout vivante et métaboliquement active. Ce processus a été décrit il y a une cinquantaine d'année par Hayflick *et al.* (Hayflick et al., 1961), qui remarqua que les cellules primaires perdaient leurs capacités de prolifération en culture. Deux observations ont alors découlé de la découverte de ce processus : les cellules cancéreuses proliférant indéfiniment en culture, la senescence pourrait avoir un rôle bénéfique anti-cancéreux ; l'association systématique de l'augmentation de la senescence et la perte de capacité de régénération des tissus au cours du



**Figure 10 : La senescence cellulaire.** La senescence peut être induite suite à différents stimuli : le raccourcissement des télomères, on parle de senescence réplivative ; une agression par des cytotoxiques, le stress oxydatif ou des dommages à l'ADN, on parle alors de senescence induite par le stress ; et enfin la senescence induite par un oncogène. Ces différentes agressions conduisent à un arrêt de la croissance cellulaire, ainsi que des modifications de la morphologie des cellules, qui s'aplatissent et s'agrandissent. Elles se caractérisent par un SASP (senescence-associated secretory phenotype), des anomalies de la chromatine, et expriment la senescence-associated-β-galactosidase (SA-β-gal) et la protéine p16<sup>INK4a</sup>.

vieillessement pourrait suggérer un rôle délétère de la senescence dans le vieillissement cellulaire (Campisi et al., 2007).

Différents types de senescence ont été décrits (Kuilman et al., 2010). Elle peut être causée par un raccourcissement des télomères, on parle alors de senescence réplivative. Lorsque la longueur des télomères atteint une valeur critique (limite de Hayflick), le cycle cellulaire de la cellule est stoppé et un système de réparation de l'ADN est activé, le DDR (DNA damage response) (d'Adda di Fagagna, 2008). Une senescence prématurée peut aussi être induite sans anomalies des télomères, suite à différents stimuli, tels que l'activation d'un oncogène, on parle de senescence induite par un oncogène (Serrano et al., 1997), ou des dommages à l'ADN, un stress oxydatif, les UV ou une inflammation, entraînant une senescence induite par le stress (Toussaint et al., 2000). L'arrêt de croissance induit au cours de la senescence est contrôlé par les voies de signalisation des protéines suppresseurs de tumeur p53 et p16<sup>INK4a</sup>, qui sont des protéines régulatrices du cycle cellulaire (Di Leonardo et al., 1994; Alcorta et al., 1996).

La senescence cellulaire implique de multiples effecteurs, et aucun marqueur spécifique de l'état de senescence n'a pour le moment pu être identifié. Cependant, certaines de ses caractéristiques ont été décrites (**Figure 10**) (Rodier et al., 2011). Les cellules sénescents :

- s'aplatissent et leur taille augmente
- expriment deux inhibiteurs des cyclin-dépendent kinases (CDKi) p16<sup>INK4a</sup> et p21<sup>CIP1</sup> (qui régulent le cycle cellulaire)
- expriment la senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal), une enzyme lysosomale qui s'accumule spécifiquement dans les cellules sénescents
- présentent des anomalies dans la structure de la chromatine (DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence DNA-SCARS et senescence-associated heterochromatin foci SAHF)
- expriment un phénotype sécrétoire particulier, le SASP (senescence-associated secretory phenotype), qui se caractérise par la sécrétion de différents facteurs de croissance, protéases, cytokines qui ont une activité autocrine et paracrine, dont l'IL6, l'IL8, l'IL1 ou les MMPs

La senescence a de plus été associée à des mécanismes de mort cellulaire, comme l'apoptose et l'autophagie. Notamment, la senescence serait associée à une résistance à l'apoptose dans certains types cellulaires (Wang, 1995; Hampel et al., 2004). Ces deux processus semblent communiquer, et même si les mécanismes impliqués sont peu connus, la protéine p53, qui est aussi impliquée dans l'apoptose, semble avoir un rôle clé (Seluanov et al., 2001). L'autophagie et la senescence possèdent aussi des caractéristiques communes (Gewirtz, 2013). En effet, une augmentation de l'autophagie a été associée à la présence de cellules sénescents (Gerland et al., 2003; Gosselin et al., 2009), de même que l'inhibition de l'autophagie ralentit la senescence cellulaire (Young et al., 2009).

Les chondrocytes du cartilage articulaire se divisant très peu, l'origine de leur senescence n'implique vraisemblablement pas le raccourcissement des télomères faisant suite à de multiples divisions cellulaires, mais est davantage susceptible d'intervenir suite à un stress. En effet, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) a un rôle direct sur l'entrée en senescence des cellules puisqu'ils entraînent des dommages à l'ADN conduisant eux-aussi à un raccourcissement des télomères (Musumeci et al., 2015). Le vieillissement, une charge mécanique anormale ou la production de cytokines pro-inflammatoires comme lors de l'arthrose, sont notamment des sources de production des ROS. On observe donc une augmentation de la senescence des chondrocytes lors du développement de l'arthrose (Dai et al., 2006). De façon intéressante, une étude récente de Jeon *et al.* démontre que le nombre de cellules sénescents augmente au cours de l'arthrose chez la souris, et que l'élimination sélective de ces cellules atténue le développement de l'arthrose, diminue la douleur et crée un environnement pro-chondrogénique (Jeon et al., 2017).

#### 2.4.2 La mort des chondrocytes

Comme décrit précédemment, le chondrocyte est l'unique cellule du tissu cartilagineux, et est responsable du maintien de l'homéostasie de ce tissu. La mort des chondrocytes constitue alors un événement central au cours du développement de l'arthrose, car les chondrocytes ne se divisant plus, ils ne pourront être remplacés.



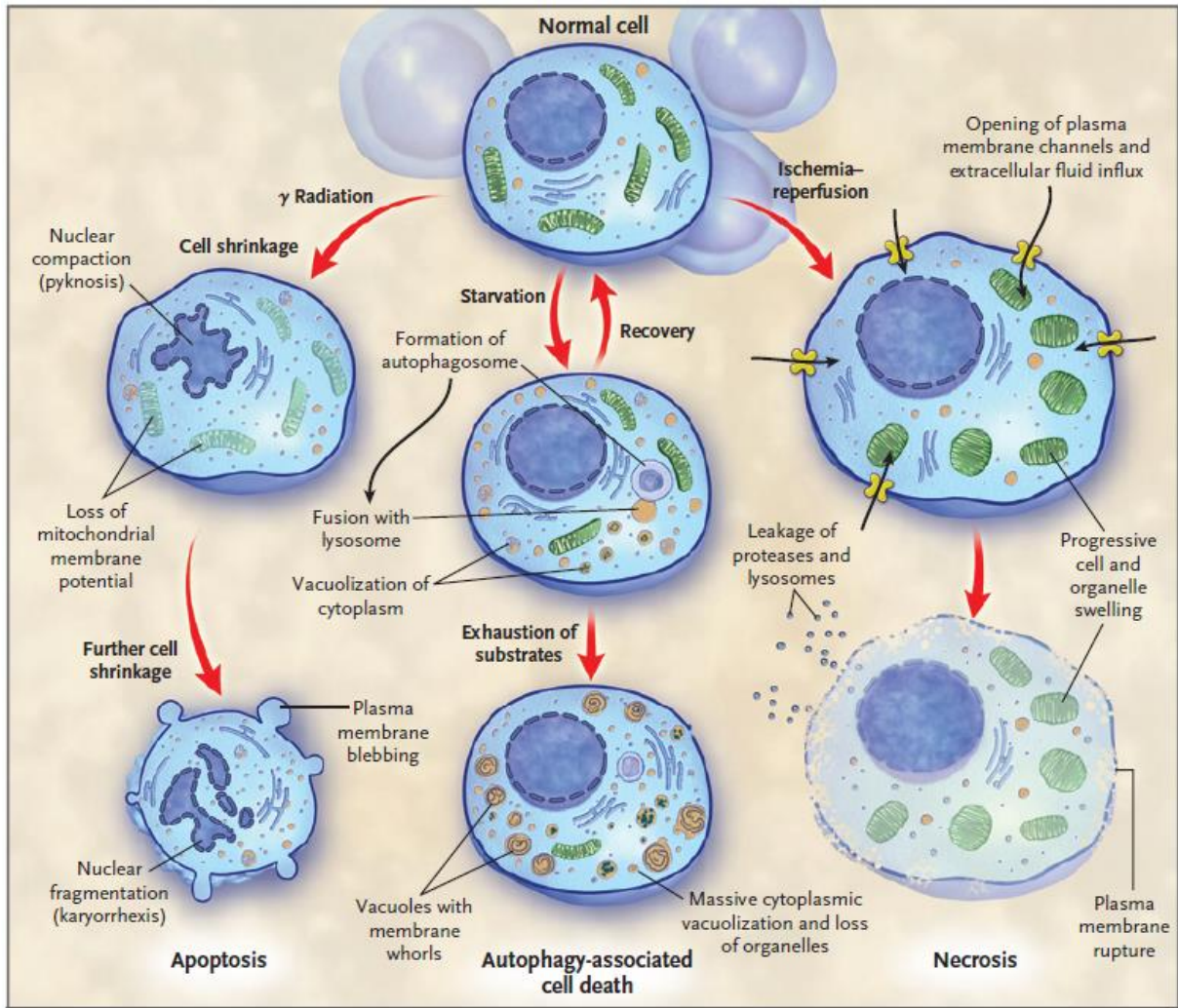
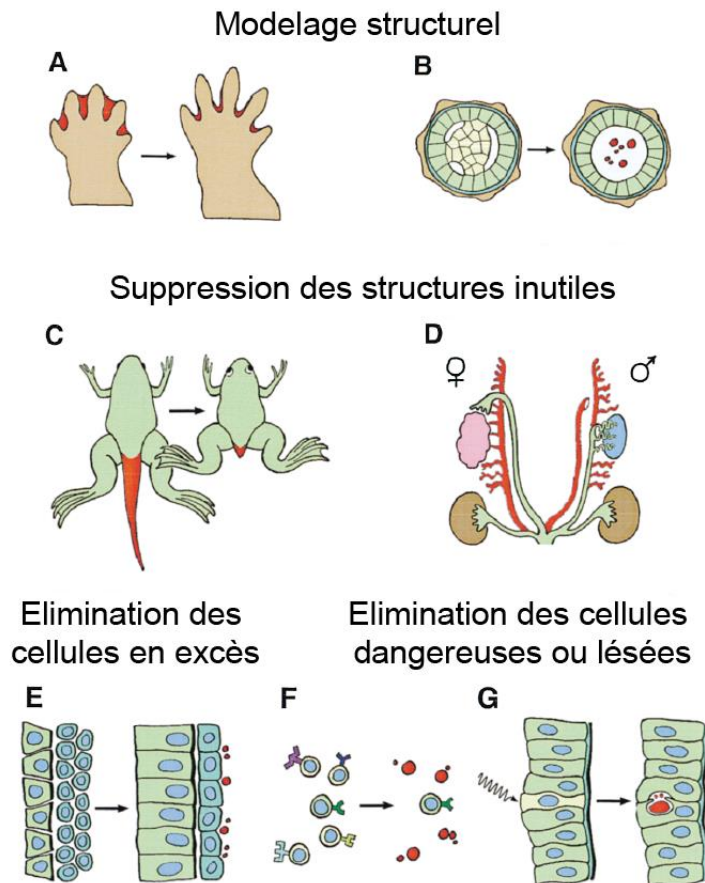


Figure 11 : Schéma représentant les 3 voies majeures de mort cellulaire (apoptose, autophagie et nécrose) (Hotchkiss et al., 2009).



Les mécanismes de mort des chondrocytes sont variés, et les séquences d'évènements mis en jeu restent pour le moment non totalement élucidées (Kühn et al., 2004). D'une façon globale, la mort cellulaire est un évènement indispensable au cours du développement. Elle permet par exemple de se débarrasser des tissus ou cellules produits en excès, telles que les cellules de la moelle osseuse, les cellules immunitaires et les cellules de l'intestin (Hotchkiss et al., 2009). Une classification a été développée pour décrire les différents types de mort cellulaire : la mort cellulaire programmée de type I = apoptose, de type II = autophagie, et de type III = nécrose (**Figure 11**) (Galluzzi et al., 2007). L'apoptose et la nécrose sont les mécanismes de mort cellulaire les plus décrits, le premier étant un mécanisme pré-programmé, et le second étant considéré comme une forme de mort accidentelle. Il a été montré, de plus, que la nécrose pouvait dans certaines situations, être régulée par un mécanisme pré-programmé (Zong et al., 2006). L'autophagie, quant à elle, est un processus d'autodigestion de la cellule par elle-même via la machinerie lysosomale (Mizushima, 2007). Elle est considérée comme un processus de survie en situation de stress, permettant de réutiliser le contenu intracellulaire non lésé. Cependant, l'autophagie prolongée ou intense peut aussi enclencher un processus de mort cellulaire (« autophagy-associated cell death ») (Levine et al., 2005).

Des études de plus en plus nombreuses montrent que ces différents processus pouvant conduire à une mort cellulaire peuvent avoir lieu au sein de la même cellule. En effet, l'apoptose, l'autophagie et la nécrose ont été détectés dans les chondrocytes du cartilage arthrosique (Charlier et al., 2016). Le cartilage articulaire ayant la particularité de ne pas être vascularisé, les phagocytes ne peuvent donc pas éliminer les cellules dégradées (par apoptose ou par autophagie). Une nécrose secondaire peut alors être déclenchée. Ainsi, certains auteurs décrivent alors un type de mort cellulaire ayant des caractéristiques à la fois d'apoptose, d'autophagie et de nécrose, appelé la chondroptose (Roach et al., 2004).



**Figure 12 : Rôles physiologiques de l'apoptose au cours du développement.** L'apoptose est impliquée dans la formation des espaces interdigitaux (A), ainsi que dans la formation de la lumière des vaisseaux (B). Elle conduit aussi à la disparition des structures vestigiales telles que la queue des amphibiens (C) ou des structures appartenant exclusivement à un sexe (les canaux de Müller qui forment l'utérus et les oviductes vont régresser chez le mâle, et les canaux de Wolff qui forment l'épididyme et le canal déférent régressent chez la femelle) (D). Enfin, l'apoptose permet l'élimination des cellules produites en excès (E), ainsi que les cellules dangereuses ou lésées (F et G) ([adapté de Jacobson et al., 1997](#)).

## a) L'apoptose

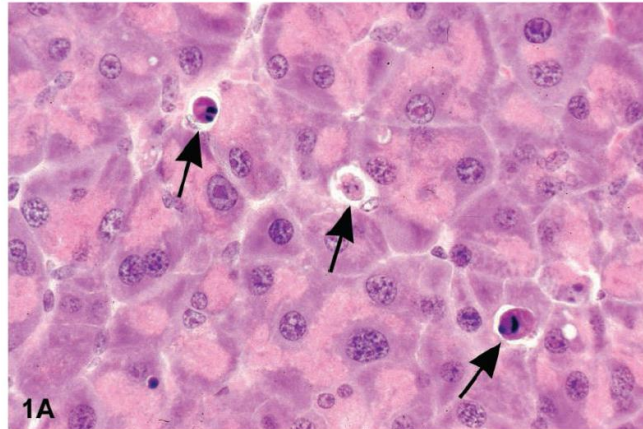
Généralités sur l'apoptose :

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, a pour la première fois été décrite par l'équipe de Kerr ([Kerr et al., 1972](#)). Ce mécanisme de mort cellulaire a à la fois un rôle physiologique au cours du développement, et peut aussi être activé de façon anormale en situation de stress.

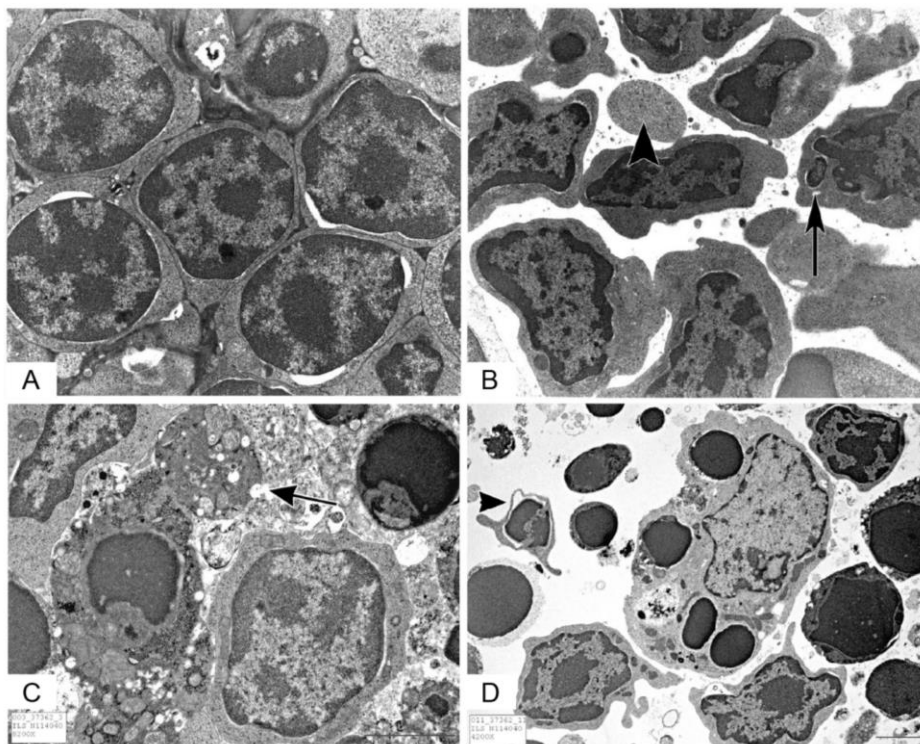
Le terme mort cellulaire « programmée » a été utilisé car ce mécanisme a d'abord été décrit à des moments et des endroits définis au cours du développement. En effet, l'apoptose a un rôle essentiel dans la structuration des tissus (**Figure 12**), notamment dans la formation des doigts et de la lumière des vaisseaux, la suppression d'organes inutiles tels que les structures vestigiales (queue des amphibiens, appendice caudal chez l'homme) ou les structures nécessaires à un sexe mais pas à l'autre. Elle sert aussi à éliminer les cellules qui sont produites en excès (les neurones par exemple) et les cellules potentiellement dangereuses (certains lymphocytes B ou T) ou lésées (suite à des dommages à l'ADN par exemple) ([Jacobson et al., 1997](#)). D'un point de vue moléculaire, l'apoptose consiste en des étapes séquentielles et programmées : l'initiation, l'exécution et la phase de dégradation.

L'apoptose est notamment impliquée dans le processus d'ossification endochondrale, au cours duquel le tissu cartilagineux de la plaque de croissance est remplacé par du tissu osseux ([Mackie et al., 2008](#)). Au terme de cette différenciation, les chondrocytes hypertrophiques disparaissent, et malgré les décennies de recherche sur le sujet, leur devenir n'est pas toujours pas clair ([Shapiro et al., 2005](#)). Ceux-ci soit meurent par apoptose ([Gibson, 1998](#)), soit se transdifférencient en cellules osseuses (c'est-à-dire que les chondrocytes hypertrophiques se différencient puis se redifférencient en ostéoblastes) ([Yang et al., 2014](#)).

Cependant, en situation pathologique, l'apoptose peut être activée de façon aberrante et entraîner la mort de cellules, et contribuer au développement de différentes maladies, telles que cancer, diabète, maladies neurodégénératives ou auto-immunes. L'apoptose peut être induite par une multitude de stress, tels que des dommages à l'ADN, une irradiation, une déprivation en facteurs de croissance.



**Figure 13 : Morphologie des cellules apoptotiques.** Coupe de pancréas murin montrant des cellules apoptotiques (flèches) qui ont une taille réduite avec un cytoplasme condensé, ainsi qu'un noyau pycnotique et fragmenté (Elmore, 2007).



**Figure 14 : Ultrastructure des cellules apoptotiques** (en microscopie électronique à transmission). (A) Coupe de thymus de rat montrant des lymphocytes normaux. (B) Lymphocytes en phase précoce d'apoptose. Le cytoplasme se condense, les contours cellulaires sont irréguliers, le noyau se fragmente (tête de flèche) et des corps apoptotiques apparaissent (flèche). (C) Lymphocytes apoptotiques qui bourgeonnent pour former un corps apoptotique (flèche). (D) Corps apoptotiques phagocytés par un macrophage (adapté de Elmore, 2007).

En situation physiologique, l'homéostasie cellulaire est le résultat de l'équilibre entre prolifération et mort cellulaire. Une diminution de l'apoptose résulte alors en une accumulation de cellules, qui peut être délétère, notamment dans le cas des cancers. A l'inverse, une augmentation de l'apoptose peut entraîner une perte cellulaire, qui est néfaste dans le système nerveux par exemple, participant alors au développement de maladie neurodégénératives (Thompson, 1995).

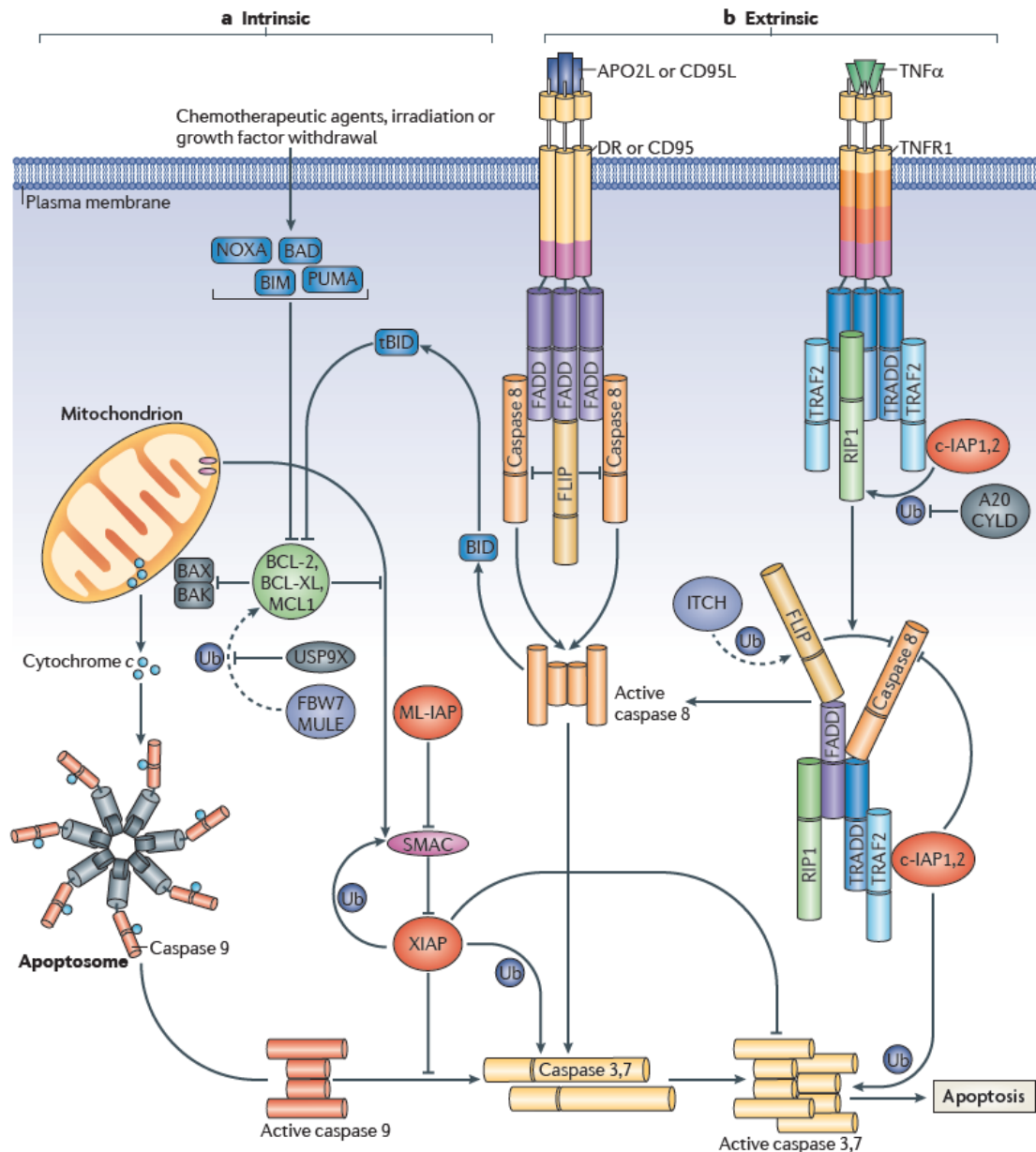
Morphologie des cellules apoptotiques :

L'apoptose se caractérise par un rétrécissement de la taille de la cellule ainsi qu'une altération du noyau lors de la condensation de la chromatine conduisant à un noyau condensé (pycnose), qui peut être aussi fragmenté (caryorrhexis). La taille de la cellule diminuant, le cytoplasme de la cellule se densifie et les organelles se compactent (**Figure 13**). La membrane plasmique va ensuite bourgeonner et le noyau va se fragmenter pour former de petits corps cellulaires entourés d'une membrane plasmique intacte. Ces « corps apoptotiques » sont alors éliminés par les cellules phagocytaires (**Figure 14**). Tout ce processus n'induit pas de réaction inflammatoire, comme au cours de la nécrose, car les corps apoptotiques ne libèrent pas leur contenu cytoplasmique et sont rapidement phagocytés (Elmore, 2007).

Voies de signalisation de l'apoptose :

Les voies de l'apoptose sont classiquement divisées en 2 voies : la voie extrinsèque, ou voie des récepteurs de mort et la voie intrinsèque, ou voie mitochondriale (Fulda et al., 2006). Ces différentes voies convergent toutes vers l'activation des caspases (cysteine-dependent aspartate-directed proteases) effectrices (voie d'exécution) (caspases 3, 6 et 7).



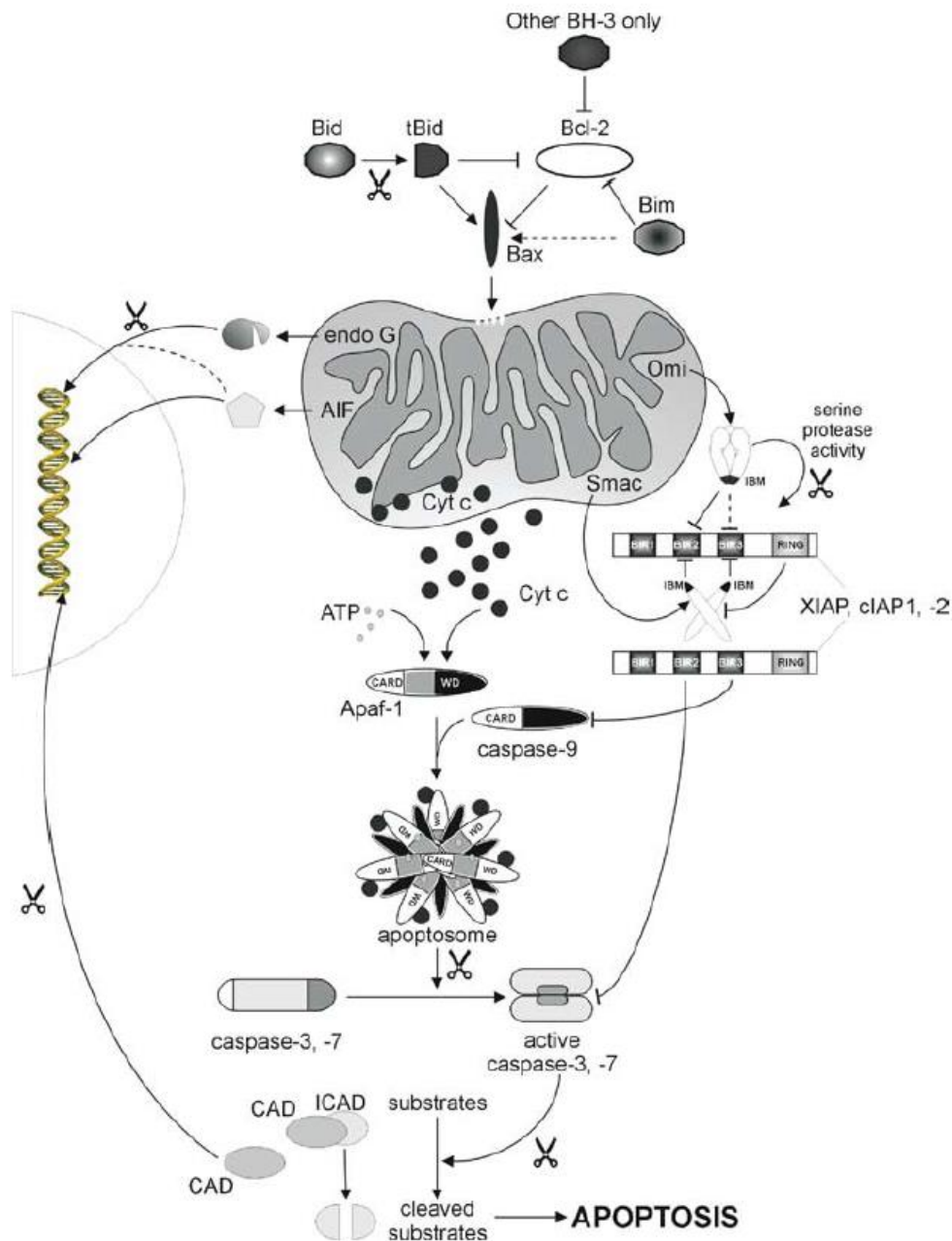


**Figure 15 : Voies de signalisation impliquées au cours de l'apoptose cellulaire : voie intrinsèque et voie extrinsèque.** Ces deux voies d'activation de l'apoptose résultent en l'activation des caspases effectrices (caspases 3 et 7). La voie intrinsèque, ou voie mitochondriale, est activée suite à un signal intracellulaire et résulte en l'activation des protéines de la famille Bcl-2 et la libération de cytochrome c qui va activer la caspase 9 via la formation de l'apoptosome, et de différentes protéines intra-mitochondriales résultant en l'activation des caspases effectrices. La voie extrinsèque, ou voie des récepteurs de mort, va, elle, être activée par un ligand extracellulaire sur un récepteur de la famille du TNF pour former un complexe DISC (death-inducing signaling complex). Celui-ci va induire l'activation de la caspase 8, qui va elle-même activer les caspases effectrice (Vucic et al., 2011).

La voie extrinsèque, ou voie des récepteurs de mort : Cette voie apoptotique est activée par la fixation d'un ligand extracellulaire à la surface des cellules via un récepteur de la famille des récepteurs au TNF (TNFR) (Locksley et al., 2001). Les différents membres de cette famille possèdent un domaine extracellulaire similaire riche en cystéines, ainsi qu'un domaine cytoplasmique de 80 acides aminés appelé « domaine de mort » qui permet la transmission du signal de mort et donc l'activation des voies de signalisation impliquées (Ashkenazi et al., 1998). Les récepteurs de mort impliqués dans la voie extrinsèque sont TNFR1/2, Fas (ou CD95, ou apoptosis antigen 1/APO-1), et DR3/4/5/6 et leurs ligands associés sont TNF- $\alpha$ , FasL, TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) et TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis) (Wajant, 2003). Les deux récepteurs activant cette voie de signalisation les mieux décrits sont Fas et TNFR1 (**Figure 15**).

Quand un ligand se fixe au récepteur, celui-ci se trimérise, ce qui va entraîner son activation. Une fois le ligand fixé, des protéines adaptatrices possédant elles aussi des domaines de mort sont recrutées et se fixent au récepteur. Dans le cas du récepteur FasR, la protéine adaptatrice FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) se fixe au récepteur, alors que pour TNFR1, c'est la protéine TRADD (TNFR1-Associated Death Domain protein) qui va être recrutée et qui va ensuite fixer les protéines FADD et RIP (Receptor-interacting protein). FADD va ensuite s'associer à la procaspase-8 pour former un complexe appelé DISC (death-inducing signaling complex), entraînant dans un premier temps l'activation de la caspase-8 puis l'activation des caspases effectrices (Kischkel et al., 1995; Walczak et al., 2000).

Dans certains cas, les protéines impliquées dans la voie extrinsèque peuvent interagir avec les protéines de la voie intrinsèque. C'est le cas notamment dans les hépatocytes (Yin et al., 1999), où la caspase-8 va activer la protéine pro-apoptotique Bid, qui va transloquer à la mitochondrie et activer la voie mitochondriale.

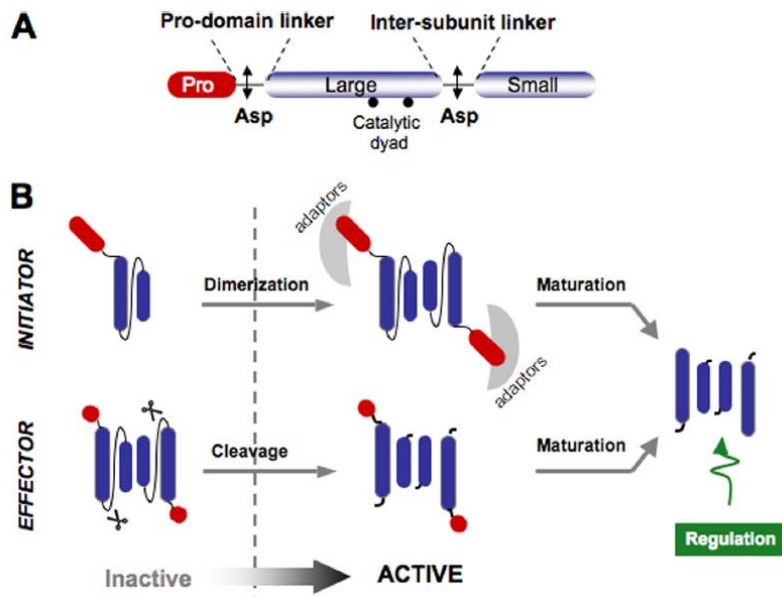


**Figure 16 : Schéma de la voie apoptotique intrinsèque, ou voie mitochondriale.** Suite à un stress intracellulaire, les protéines de la famille Bcl-2 sont activées, résultant en l'activation de la protéine Bax. Celle-ci va entraîner la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la libération des protéines apoptotiques, telles que le cytochrome c qui va former l'apoptosome avec les protéines Apaf-1 et la caspase-9, et ainsi induire l'activation des caspases effectrices 3 et 7. Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) empêchent l'activation de la caspase-9, et sont elles-mêmes inhibées par Smac et Omi. L'inhibiteur de CAD (ICAD) est clivé par les caspases-3 et -7, libérant la protéine CAD, qui comme les protéines AIF et l'endonucléase G vont être responsables de la fragmentation de l'ADN (Saelens et al., 2004).

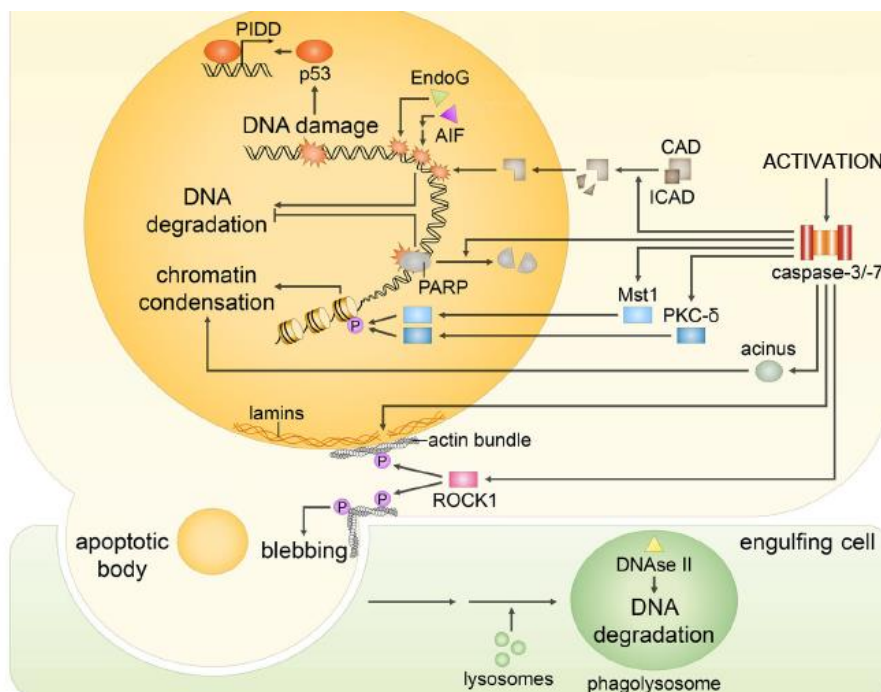


La voie intrinsèque, ou voie mitochondriale : Cette voie est activée lors d'une agression intracellulaire, notamment suite à des dommages à l'ADN, à l'activation d'oncogènes, à une hypoxie, à une infection virale ou à la présence de radicaux libres (ROS). La réception de ce signal va mettre en jeu les protéines de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) (**Figure 16**) (Cory et al., 2002). Cette famille de 25 gènes possède un à quatre domaines BH (Bcl-2 homology domains) (BH1 à BH4) qui permettent de classer ses différents membres selon leur activité anti- ou pro-apoptotique. Classiquement, les membres de la famille Bcl-2 sont classés en 3 catégories : les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl1, A1) qui inhibent les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak), et les protéines BH3-only (Bad, Bik, Bid, Hrk, Bim, Bmf, Noxa, Puma) qui possèdent toutes un domaine BH3 conservé (Youle et al., 2008). Les protéines BH3-only ont deux modes d'action : ils inhibent Bcl-2 ou Bcl-xl ce qui entraîne la dérégulation de Bax et Bak, ou bien interagissent directement avec Bax et Bak pour activer l'apoptose (Willis et al., 2007). Les protéines Bax et Bak sont responsables de la perméabilisation de la membrane externe des mitochondries, ce qui va entraîner la libération de molécules apoptotiques (Saelens et al., 2004). Celles-ci sont divisées en 2 groupes :

- le cytochrome c, Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspases), et Omi/HtrA2 (High temperature requirement protein A2).  
Le cytochrome c va se lier à la protéine Apaf-1 (Apoptotic peptidase activating factor 1) et à la procaspase-9 pour former l'apoptosome, qui va activer les caspases effectrices. Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 vont, elles, inhiber les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) et donc induire l'apoptose. De façon anecdotique, Smac et Omi ont aussi une activité indépendante des caspases
- les protéines AIF (Apoptosis inducing factor), endonucléase G et CAD (Caspase-activated DNase) qui vont être transloquées vers le noyau dans les phases tardives, une fois que le processus de mort est enclenché, et qui vont induire la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN. AIF et l'endonucléase G vont agir de façon caspase-indépendante, alors que CAD est activé par les caspases effectrices



**Figure 17 : Mécanismes d'activation des caspases.** (A) Les caspases sont composées d'un prodomaine N-terminal, d'un domaine catalytique composé de 2 sous-unités liées de façon covalente et contenant des sites d'auto-protéolyse sur des résidus Asparagine, ainsi que 2 domaines qui, après clivage, donneront les grandes et petites sous-unités (aussi appelées p20 et p10, respectivement). (B) Les caspases initiatrices (2, 8, 9, 10) sont activées par dimérisation via des molécules adaptatrices, alors que les caspases effectrices (3, 6, 7) sont des dimères qui sont activés suite à leur clivage entre les 2 sous-unités (Pop et al., 2009).



**Figure 18 : Voie apoptotique d'exécution.** L'activation des caspases effectrices conduit à la dégradation de l'ADN, la condensation de la chromatine et le bourgeonnement de la cellule, conduisant à la formation des corps apoptotiques, qui vont finalement être phagocytés et être détruits (adapté de Prokhorova et al., 2015).

La voie d'exécution : Les voies intrinsèque et extrinsèque convergent toutes les deux vers la phase d'exécution, qui se caractérise par l'activation des caspases effectrices, les caspases-3, -6 et -7, avec un rôle prépondérant de la caspase-3. Les mécanismes d'activation des caspases effectrices diffèrent de ceux des caspases initiatrices (**Figure 17**). Ces dernières sont activées par dimérisation grâce à des protéines adaptatrices, alors que les caspases effectrices sont des dimères clivés par des enzymes initiatrices (Pop et al., 2009). Celles-ci vont être responsables d'une cascade de protéolyse conduisant à la destruction de la cellule (Prokhorova et al., 2015). D'autres protéines sont aussi capables d'induire les caspases effectrices comme les cathepsines, calpaines, et granzymes (Vandenabeele et al., 2005). Au cours de cette cascade protéolytique, les caspases effectrices activent la protéine ROCK1 (rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1) responsable de la contraction du cytosquelette d'actine-myosine et clivent les lamines nucléaires, entraînant la rupture de la membrane nucléaire et le bourgeonnement de la membrane plasmique. Elles activent de plus les protéines Mst1 (Mammalian Sterile 20-like kinase 1), PKC- $\delta$  (Protein kinase C *delta*) et acinus responsables de la condensation de la chromatine. Les caspases sont aussi responsables du clivage de la protéine PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) qui est impliquée dans la réparation de l'ADN (**Figure 18**). Tous ces événements vont conduire à la formation des corps apoptotiques, ceux-ci se caractérisent notamment par l'externalisation de leurs phosphatidylsérines membranaires à la surface, et qui sont reconnues par les phagocytes afin de les éliminer (Fadok et al., 2001).

L'apoptose des chondrocytes au cours de l'arthrose :

La présence d'apoptose dans le cartilage a été suggérée suite à la détection de lacunes vides au sein de la MEC (Mitrovic et al., 1983; Blanco et al., 1998). De nombreuses études ont alors montré la présence d'apoptose au sein du cartilage articulaire chez l'homme (Blanco et al., 1998; Hashimoto et al., 1998 b) et chez la souris (Adams et al., 1998). Cependant, la fréquence d'apparition des cellules apoptotiques au sein du cartilage arthrosique varie énormément parmi les différentes études : 3-15% (Sharif et al., 2004), moins de 10% (Blanco et al., 1998), autour de

20% (Hashimoto et al., 1998 b; Héraud et al., 2000), voire seulement quelques cellules (Aigner et al., 2001). De façon intéressante, le nombre de lacunes vides est particulièrement important dans la couche de cartilage calcifié (sous le cartilage articulaire), ce qui peut être particulièrement délétère dans les stades avancés, car la couche de cartilage articulaire superficielle disparaît à mesure que l'arthrose progresse, le cartilage calcifié devient alors le seul réservoir de chondrocytes (Aigner et al., 2004).

La séquence d'évènements au cours de l'arthrose est mal connue, et il n'existe pour le moment pas de consensus sur le rôle de l'apoptose dans le développement de l'arthrose. Bien qu'il soit généralement admis que l'arthrose soit associée à une augmentation de l'apoptose, des auteurs suggèrent que l'apoptose est une cause de l'arthrose, alors que d'autres suggèrent qu'elle en est une conséquence (Zamli et al., 2011). Plusieurs études ont, en tous les cas, montré que l'injection intra-articulaire d'inhibiteur des caspases protège le cartilage articulaire de la mort des chondrocytes par apoptose (D'Lima et al., 2006; Dang et al., 2006). Au cours de l'arthrose, différents stimuli peuvent induire l'apoptose, dont notamment les composants de la MEC (comme les fragments de fibronectine par exemple), le stress mécanique, le NO et le stress oxydant, les récepteurs de mort (Fas) ou les cytokines inflammatoires (IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) (Kühn et al., 2004).

La diminution de la cellularité et la **dégradation de la MEC cartilagineuse** sont des évènements centraux dans le développement de l'arthrose (Thomas et al., 2007). Parallèlement, il est reconnu que la plupart des cellules ont besoin d'être attachées à d'autres cellules ou à la MEC pour proliférer, fonctionner et survivre. Ce phénomène est appelé dépendance d'ancrage (Ruoslahti, 1997). La perte de PG ainsi que l'altération des fibrilles de collagène peuvent alors entraîner des anomalies de l'ancrage des chondrocytes dans la matrice et une activation de l'apoptose (Kim et al., 2001). En effet, le cartilage des souris déficientes en collagène de type II présente les caractéristiques typiques d'apoptose (Yang et al., 1997). De la même façon, les souris invalidées pour différentes intégrines, qui régulent l'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice, présentent des signes d'apoptose dans le cartilage articulaire (Pulai et al., 2002; Zemmyo et al., 2003).

Les traumatismes articulaires dus à des **contraintes mécaniques excessives** sont un facteur de risque prépondérant dans le déclenchement de l'arthrose. De nombreuses études ont montré qu'une lésion due à une charge mécanique importante déclenche l'apoptose *in vitro* (Clements et al., 2001; D'Lima et al., 2001 a; Kim et al., 2002), et *in vivo* (Colwell Jr. et al., 2001; D'Lima et al., 2001 b). En effet, ce stress mécanique va induire la production de molécules pro-inflammatoires (IL1- $\beta$  et NO), ainsi que des molécules cataboliques (MMPs) qui vont contribuer à la dégradation de la MEC et à la mort cellulaire (Honda et al., 2000).

L'expression du **récepteur de mort Fas/CD95** a été reportée dans le cartilage articulaire arthrosique (Hashimoto et al., 1997; Todd Allen et al., 2004; Wei et al., 2006), particulièrement dans les zones superficielles et moyennes. L'étude de Wei et al. montre que la stimulation de la voie du récepteur Fas induit à la fois l'apoptose et la nécrose, et augmente la production du FasL par les chondrocytes, signant une boucle d'amplification du signal apoptotique (Wei et al., 2006). Le FasL proviendrait du liquide synovial, qui, chez le patient arthrosique, en contient en quantité importante (Hashimoto et al., 1998 a).

Le rôle du **NO** dans l'arthrose et la mort des chondrocytes a été abondamment étudié. Son mécanisme d'action reste néanmoins controversé. L'équipe de Blanco a été la première à démontrer que l'utilisation d'une molécule donneuse de NO, le sodium nitroprusside (SNP), à dose élevée induit une mort cellulaire par apoptose dans des chondrocytes articulaires humains (Blanco et al., 1995). Il a ensuite été établi une corrélation forte entre apoptose des chondrocytes, production de NO et grade d'arthrose (Hashimoto et al., 1998 c). Les mécanismes impliqués ne sont pas encore totalement élucidés, mais l'interaction du NO avec les **espèces réactives de l'oxygène (ROS)** semble centrale dans les mécanismes d'induction de l'apoptose.

L'étude de Blanco *et al.* montre que seul le NO peut induire l'apoptose, alors que les ROS induisent la nécrose (Blanco et al., 1995). L'auteur démontre de plus que la cytokine **IL1- $\beta$** , qui induit la production de NO et de ROS, n'induit pas l'apoptose quand elle est utilisée seule, mais nécessite la présence de « scavengers » de ROS (molécules anti-oxydantes). Il note aussi qu'en bloquant la production de NO cet effet

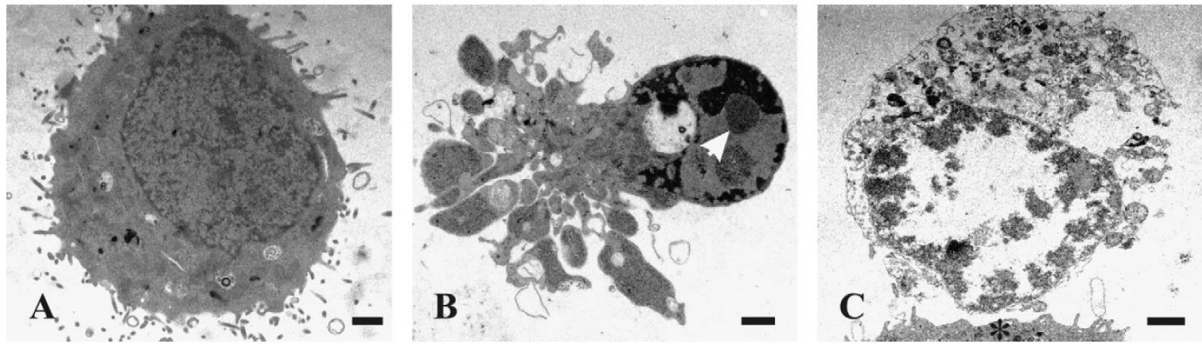
était abrogé, suggérant que l'effet pro-apoptotique de l'IL1- $\beta$  dépend du NO, et que les ROS induits par l'IL1- $\beta$  réagissent avec le NO synthétisé, et l'empêchent d'avoir une activité biologique. En parallèle, une étude montre que l'IL1- $\beta$  et le TNF- $\alpha$  induisent des dommages mitochondriaux NO-dépendants responsables de l'induction de l'apoptose des chondrocytes (Kim et al., 2010), alors qu'une autre étude montre des effets anti-apoptotiques de l'IL1- $\beta$ , non médiés par le NO (Kühn et al., 2000).

D'autre part, bien que la production de NO induite par le SNP déclenche l'apoptose, plusieurs études montrent que, dans le cartilage, cet effet nécessite la présence de ROS (Del Carlo et al., 2002; Liang et al., 2014). Le rôle du NO dans l'apoptose des chondrocytes reste donc très controversé. L'étude de Del Carlo *et al.* a par exemple montré que dans certaines conditions, le NO pouvait être cytoprotecteur, et que cet effet est dépendant du statut redox au sein de la cellule (Del Carlo et al., 2002). Finalement, il est probable que la cytotoxicité du NO ne soit pas uniquement due au NO lui-même, mais aussi aux ROS auxquels il peut s'associer. De façon intéressante, une autre étude montre que le SNP induit une mort cellulaire qui n'est pas de l'apoptose classique, et semble être à la fois de l'apoptose et de la nécrose (Kühn et al., 2003). La balance entre NO et ROS intracellulaires semble donc déterminer le type de mort cellulaire impliqué ; en présence d'une quantité de ROS faible, le NO induirait l'apoptose, alors qu'en présence de forte concentration de ROS, il induirait la nécrose.

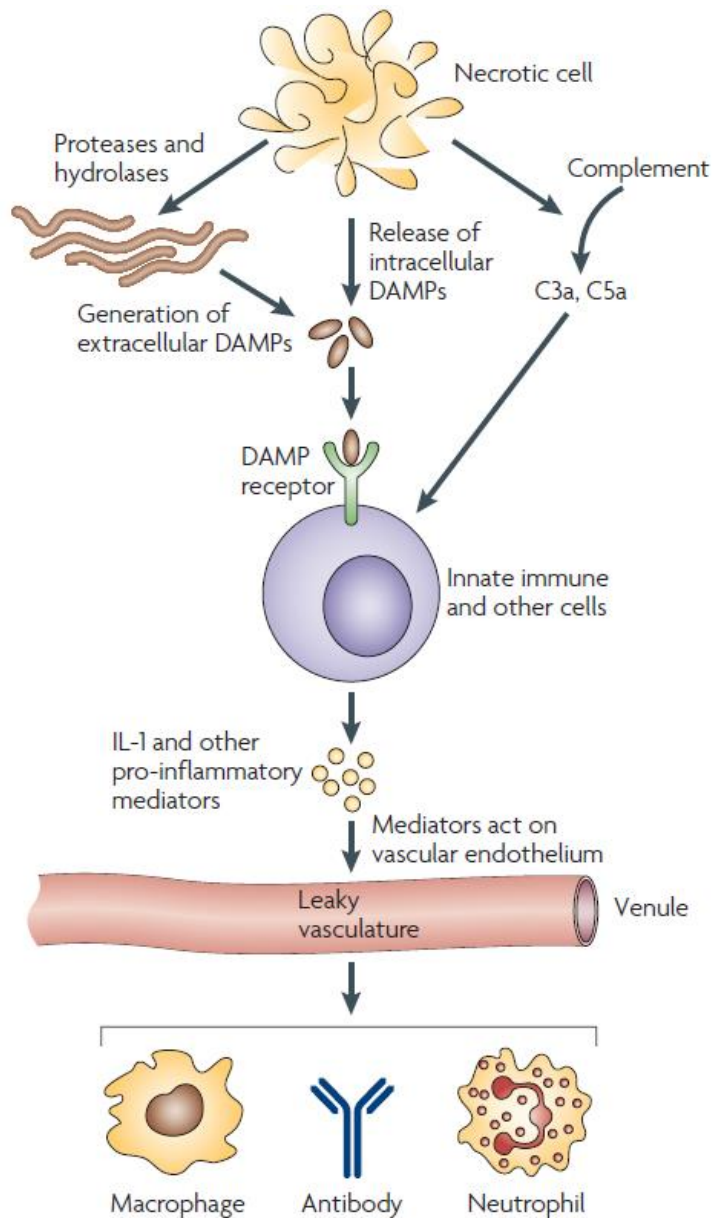
## b) La nécrose

La nécrose a tout d'abord été décrite comme un mécanisme de mort accidentelle, déclenché suite à un stimulus externe à la cellule, comme une infection, un traumatisme, une ischémie, des températures extrêmes, et dont elle ne peut se remettre. Elle a longtemps été considérée comme un processus de mort qui n'est ni de l'apoptose ni de l'autophagie. La nécrose peut aussi être physiologique, et des études montrent qu'elle peut être induite afin d'éliminer des cellules indésirables.





**Figure 19 : Morphologie des cellules apoptotiques et nécrotiques par microscopie électronique à transmission.** (A) Cellule de lignée de fibrosarcome en condition normale. (B) Cellule en apoptose : la chromatine se condense et les corps apoptotiques apparaissent. (C) Cellule en nécrose (près d'un macrophage (astérisque)) : les contours de la cellule sont mal définis, les mitochondries gonflent et l'intégrité de la membrane plasmique est altérée (échelle 1  $\mu\text{m}$ ) (adapté de Krysko et al., 2008).



**Figure 20 : Mort cellulaire par nécrose et déclenchement de l'inflammation.** Les cellules nécrotiques activent le complément et relarguent des DAMPs (Damage-associated molecular patterns), ainsi que des protéases et hydrolases. Les DAMPs sont reconnus par les cellules de l'immunité et vont induire la production de médiateurs pro-inflammatoires. Ceux-ci vont agir sur l'endothélium vasculaire et induire le recrutement de macrophages et neutrophiles et la production d'anticorps qui vont neutraliser les agents responsables des dommages, éliminer les cellules mortes, et stimuler la réparation tissulaire (adapté de Kono et al., 2008).

### Généralités sur la nécrose :

La nécrose se caractérise par une augmentation du volume de la cellule, appelée « oncose » (œdème), un gonflement des organelles, ainsi qu'une rupture de la membrane plasmique, entraînant la libération du contenu intracellulaire (**Figure 19**) (Kroemer et al., 2009). La séquence d'évènements mis en jeu au cours de la nécrose n'est pas claire, mais des études ont montré que les cellules nécrotiques pouvaient se caractériser par : des signes précoces de dysfonction des mitochondries, avec production de ROS et gonflement des mitochondries ; déplétion en ATP (Adénosine triphosphate) ; anomalies dans l'homéostasie du calcium ; regroupement des organelles en périphérie du noyau ; activation de protéases (calpaïnes et cathepsines) ; rupture des lysosomes ; rupture de la membrane plasmique (Golstein et al., 2007).

Une fois que la membrane plasmique s'est rompue, des molécules endogènes sont relarguées, les DAMPs (Damage-associated molecular patterns) ou alarmines (**Figure 20**). Ces protéines ont des propriétés proches des cytokines et ne sont pas relarguées par des cellules saines. Elles vont activer les cellules de l'immunité innée et induire une réaction inflammatoire. Parmi les DAMPs, la plus décrite est l'HMGB1 (High-mobility group box 1 protein), mais aussi l'acide urique, les HSPs (Heat-shock proteins), les nucléosomes, les purines telles que l'ATP et l'adénosine, etc. (Kono et al., 2008). Celles-ci vont se lier à des récepteurs sur les cellules phagocytaires (Toll like receptors TLRs et receptor for advanced glycation endproducts RAGE), et stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-1, 6 et 8). D'autres molécules vont aussi être libérées par la cellule nécrotique, telles que des protéases et hydrolases, ainsi que des protéines activant le complément, qui vont alors participer à la réaction inflammatoire. Toute cette cascade conduit au recrutement de macrophages/neutrophiles qui vont phagocyter les cellules mortes.

Comme nous l'avons vu précédemment, et à la différence de la nécrose, les cellules apoptotiques sont éliminées par phagocytose sans induire d'inflammation. Cependant, des études ont démontré qu'une nécrose secondaire pouvait avoir lieu dans des cellules apoptotiques, lorsque le processus de phagocytose est incomplet ou inexistant (on parle de cellules en apoptose tardive). L'accumulation de ces cellules



en nécrose secondaire va donc induire une réponse immunitaire adaptative, et une inflammation chronique (à la différence de la nécrose primaire qui induit plutôt une inflammation aigue) (Sachet et al., 2017).

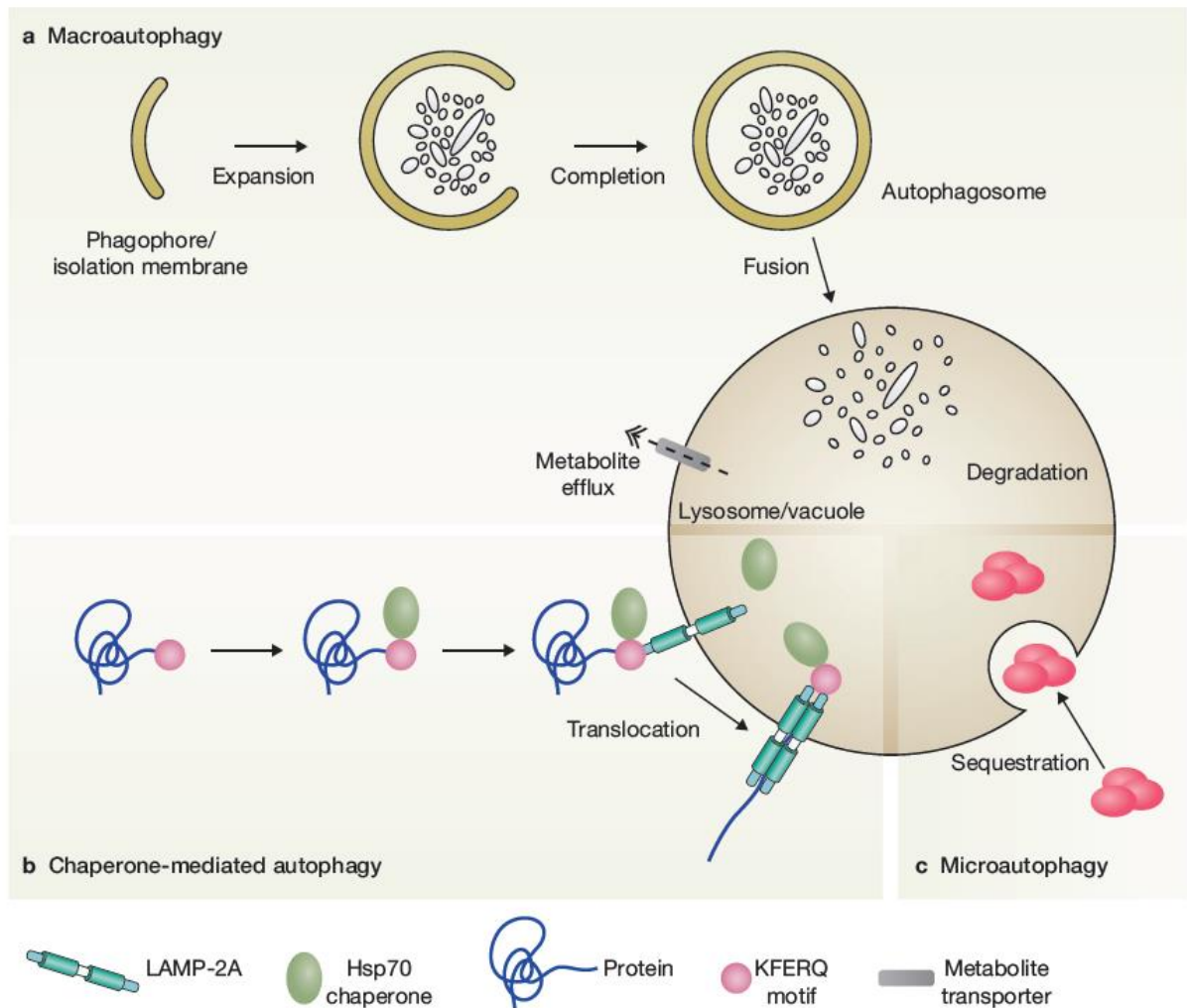
La nécroptose :

Bien que décrite comme étant accidentelle, la nécrose peut aussi être programmée. Notamment, lorsque l'apoptose est altérée, de façon surprenante, la survie cellulaire n'est pas augmentée, mais un switch de l'apoptose vers la nécrose se met en place (Lemaire et al., 1998). De manière intéressante, l'inhibition des caspases au cours du développement embryonnaire (lors de la formation des espaces interdigitaux) se traduit par une activation de la nécrose, qui remplace alors l'apoptose, et aboutit à la formation des doigts de façon identique (Chautan et al., 1999).

Cette mort cellulaire programmée qui a les caractéristiques des cellules en nécrose a été dénommée « nécroptose » (Degterev et al., 2005). En effet, cette voie fait intervenir des constituants de la voie extrinsèque d'apoptose. Les ligands FasL, TNF- $\alpha$  et TRAIL, par exemple, induisent une mort cellulaire proche de la nécrose en présence d'un inhibiteur des caspases (Holler et al., 2000). Les voies de signalisation mises en jeu impliquent les protéines kinases RIP1 (Holler et al., 2000) et RIP3 (Cho et al., 2009; He et al., 2009; Zhang et al., 2009 a) qui vont former un complexe appelé le nécrosome. Celui-ci va ensuite induire la phosphorylation de la protéine MLKL (Mixed lineage kinase domain-like protein) qui va alors induire la formation de pores dans la membrane et déclencher la mort de la cellule par nécrose (Wang et al., 2014).

La nécrose des chondrocytes :

La nécrose dans le contexte arthrosique reste un phénomène très peu décrit, notamment du fait de la difficulté à identifier et quantifier la nécrose que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Plusieurs études ont montré qu'un stress mécanique appliqué sur le cartilage articulaire entraînait la mort des chondrocytes (Lucchinetti et al., 2002; Lewis et al., 2003), et notamment pouvait déclencher la nécrose. Une étude réalisée par



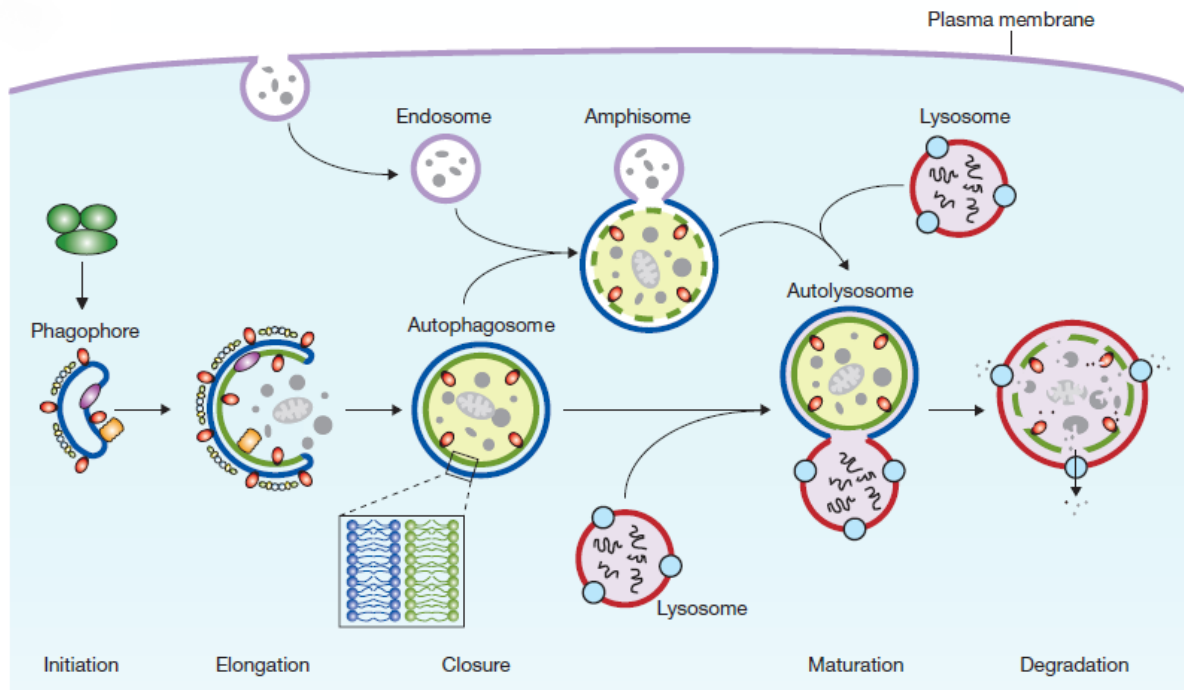
**Figure 21 : Les différents types d'autophagie.** (a) La macroautophagie se caractérise par la formation d'une vésicule à double membrane, appelée l'autophagosome, qui va séquestrer le contenu cytoplasmique endommagé. Il va ensuite fusionner avec le lysosome puis être hydrolysé. Les métabolites seront alors réutilisés soit pour synthétiser de nouvelles protéines, soit comme source d'énergie. (b) L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes va permettre la translocation de peptides possédant une séquence particulière (motif KFERQ) via la protéine chaperonne Hsp70. La protéine membranaire lysosomale LAMP-2A va alors s'oligomériser et permettre l'entrée de la protéine dans le lysosome. (c) La microautophagie permet la séquestration directe de composants localisés près des lysosomes, via une invagination de la membrane lysosomale (Boya et al., 2013).

Chen *et al.* suggère que la nécrose est déclenchée en premier suite à des impacts répétés, même si des cellules apoptotiques sont aussi détectées (Chen *et al.*, 2001). De plus, une autre étude démontre que l'induction de l'apoptose (via l'activation de la voie CD95) déclenche aussi une nécrose des chondrocytes (Wei *et al.*, 2006).

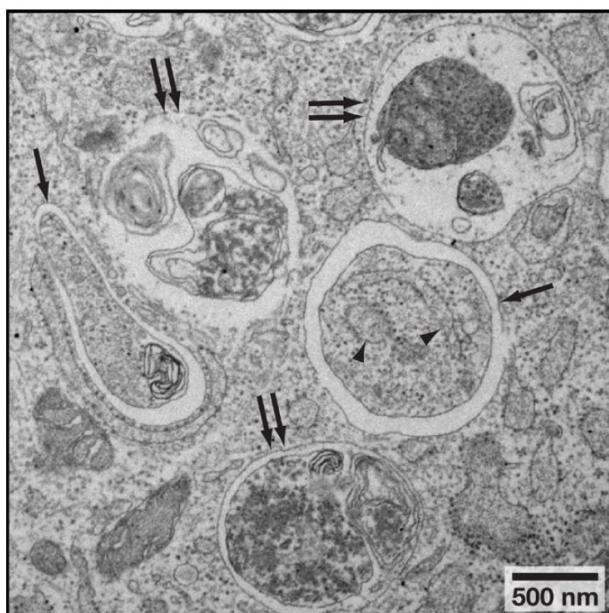
### c) L'autophagie

Généralités sur l'autophagie :

L'autophagie, qui signifie « se manger soi-même », a été décrite pour la première fois en 1963 par Christian De Duve (De Duve, 1963). Puis, en 2016, le prix Nobel de physiologie ou médecine a été attribué à Yoshinori Ohsumi pour ses travaux portant sur l'autophagie. Ce processus a été amplement étudié chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, et les différentes études montrent que ce phénomène est bien conservé entre les espèces (Takeshige *et al.*, 1992). L'autophagie est un processus d'autodigestion par la cellule elle-même d'organelles et macromolécules endommagées, via la machinerie lysosomale, permettant le recyclage de ses propres constituants (Bento *et al.*, 2016). Elle est régulée par la famille des gènes codant pour les protéines ATG (« AuTophagy-related » gene) (Klionsky *et al.*, 2003). Contrairement à l'apoptose et à la nécrose, l'autophagie est considérée comme un processus de survie. Cependant, des études actuelles tendent à montrer qu'il existe une mort qui serait due à l'autophagie. Il existe différents types d'autophagie : la macro-autophagie, l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes et la micro-autophagie (**Figure 21**). Les substrats pris en charge lors de l'autophagie incluent : des agrégats de protéines, des mitochondries endommagées, des péroxisomes ou ribosomes en excès, des endosomes ou du réticulum endoplasmique (RE), des gouttelettes lipidiques ou bien des pathogènes intracellulaires (Shaid *et al.*, 2013).



**Figure 22 : Le processus autophagique.** La macro-autophagie débute par la formation du phagophore (structure à double membrane), puis se poursuit par des phases d'élongation et de fermeture du phagophore, aboutissant à la formation de l'autophagosome entourant une portion du cytoplasme. S'ensuit une étape de maturation via la fusion à un endosome ou un lysosome, et une étape de dégradation de la membrane interne de l'autolysosome et du contenu cytoplasmique via des hydrolases acides. Le contenu digéré est ensuite relargué via des perméases pour être réutilisé (Yang et al., 2010).

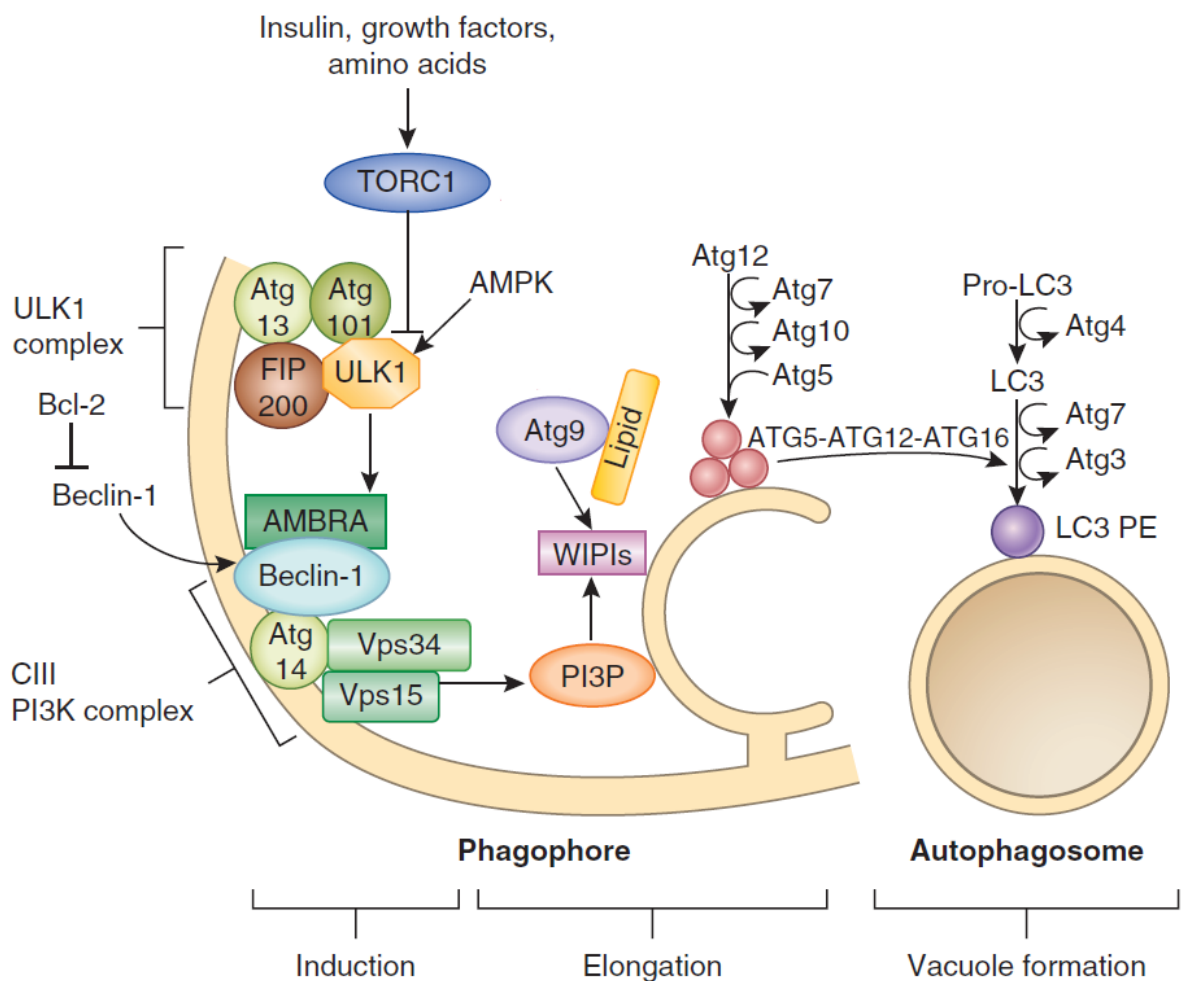


**Figure 23 : Morphologie des cellules autophagiques.** Images en microscopie électronique à transmission de fibroblastes embryonnaires murins en condition de stress nutritionnel. Les flèches indiquent les autophagosomes ; les doubles flèches les autolysosomes ; et les triangles les fragments de RE (Mizushima et al., 2010).

L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (CMA ; Chaperone-mediated autophagy) concerne des substrats cytosoliques particuliers possédant un motif peptidique « KFERQ » (Lysine-Phénylalanine-Acide glutamique-Arginine-Glutamine) (soit environ 30% des protéines cytosoliques). Ces substrats sont reconnues par la protéine chaperonne Hsp70 (heat-shock protein of 70 kDa), qui en présence de protéines co-chaperonnes (Hsp40 et Hsp90 notamment), va se fixer à un récepteur de la membrane lysosomale, LAMP-2A (Lysosome-associated membrane protein type 2A). Celui-ci va se multimériser pour former un complexe de translocation. Grâce aux protéines chaperonnes, le substrat d'intérêt va être déplié et va traverser la membrane lysosomale pour être dégradé par les protéases lysosomales (Dice, 2007; Cuervo et al., 2014). Une diminution de l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes est observée au cours du vieillissement, principalement due à une diminution de l'expression de LAMP-2A (Cuervo et al., 2000; Zhang et al., 2008 a). Ce type d'autophagie est aussi particulièrement réduit au cours de maladies neurodégénératives, telles que la maladie de Parkinson (Cuervo, 2004), et augmenté dans les cellules cancéreuses (Kon et al., 2011).

La micro-autophagie est un processus de dégradation non sélectif via les lysosomes. Elle est bien moins décrite que la macroautophagie et la CMA. Au cours de ce processus, la membrane du lysosome s'invagine de façon aléatoire, et forme une vésicule qui bourgeonne à l'intérieur du lysosome (Li et al., 2012).

Enfin, la macro-autophagie (que l'on appellera autophagie) consiste en la formation d'une structure à double membrane, appelé phagophore qui va séquestrer le matériel cytoplasmique à dégrader et va fusionner pour former l'autophagosome. Celui-ci va ensuite fusionner avec le lysosome pour former l'autolysosome, contenant des enzymes lysosomales, les hydrolases qui vont dégrader les substrats à éliminer, et les relarguer dans le cytosol pour être recyclés (**Figures 22 et 23**) (Xie et al., 2007).



**Figure 24 : Régulation des différentes étapes du processus autophagique.** Le processus autophagique est initié par l'inhibition de mTOR ou l'activation de l'AMPK. ULK1 est alors phosphorylé, et va alors catalyser la phosphorylation des autres composants du complexe ULK1 (ULK1, ULK2, ATG13, FIP200 et ATG101) ainsi que la protéine AMBRA, permettant ainsi le recrutement du complexe Beclin-1-PI3KC3 (Beclin1, ATG14L, p150/Vps15 et PI3KC3/Vps34) au niveau de la membrane d'isolation. La PI3KC3 génère alors le phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P), qui se fixe spécifiquement aux protéines WIPIs. Ces dernières sont nécessaires au recrutement des 2 complexes d'élongation ATG12-ATG5-ATG16L1 et LC3b-PE, qui vont permettre la formation de l'autophagosome mature. La protéine ATG9, quant à elle, permettrait l'apport en lipides pour former l'autophagosome (Nixon, 2013).



Les différentes étapes de l'autophagie :

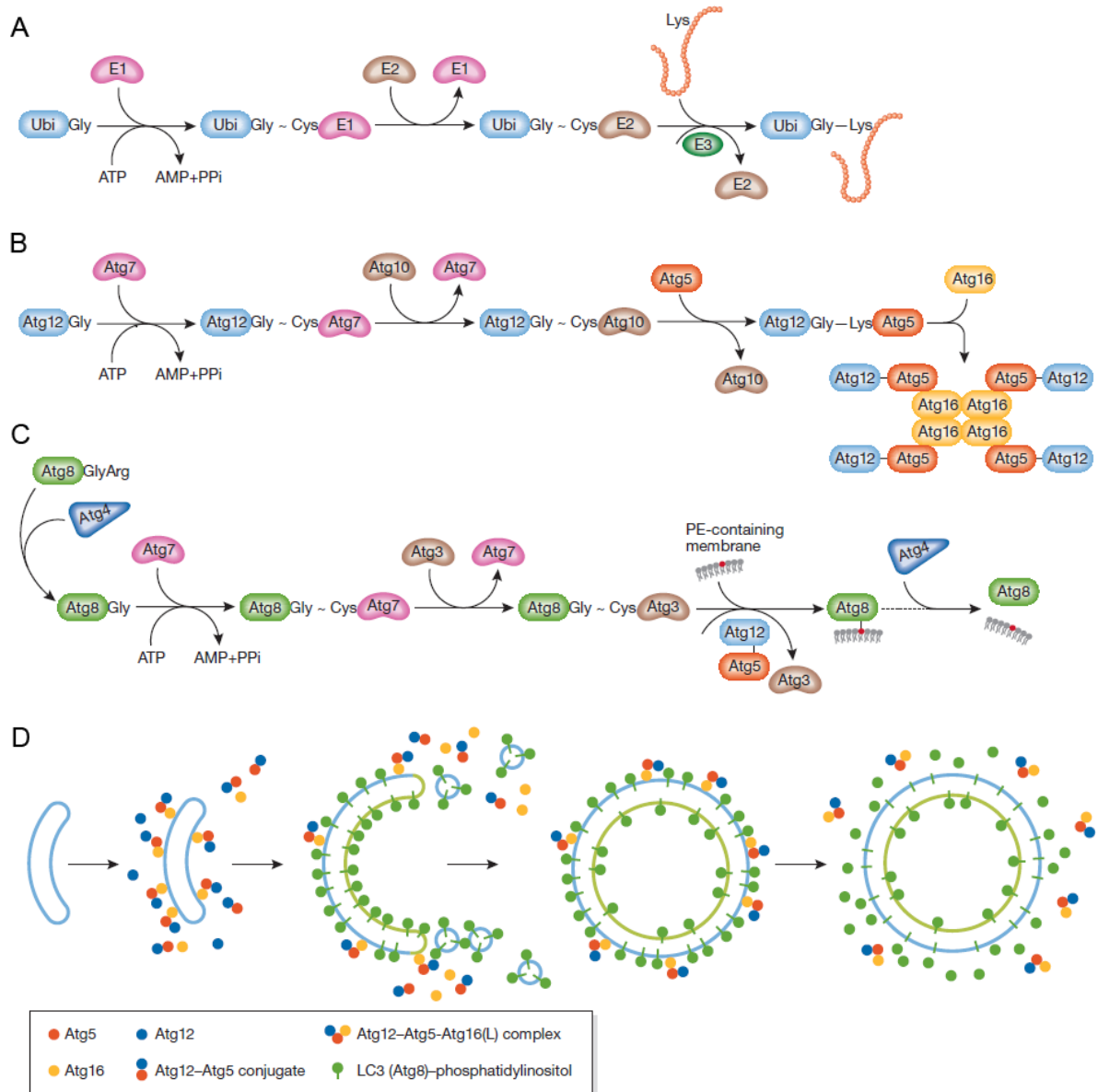
Le processus autophagique se déroule en différentes étapes : (i) l'initiation, (ii) la nucléation, (iii) l'élongation et (iv) la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (**Figure 24**).

*L'étape d'initiation :*

L'autophagie débute par la formation du phagophore, ou membrane d'isolation, dont l'origine reste controversée (Lamb et al., 2013). Elle proviendrait du RE (Hayashi-Nishino et al., 2009), de l'appareil de Golgi (Yen et al., 2010), des mitochondries (Hailey et al., 2010), ou de la membrane plasmique (Ravikumar et al., 2010). Les mécanismes précis de formation de ce phagophore ne sont pas connus et des études suggèrent une origine multiple à ces structures à double membrane (Biazik et al., 2015).

Le niveau d'autophagie basal est faible en conditions normales. Il est régulé négativement par la protéine mTOR (mammalian target of rapamycin) de manière constitutive. mTOR possède une activité sérine/thréonine kinase, et constitue 2 complexes distincts, mTORC1 et mTORC2. Le complexe mTORC2, moins bien décrit, est impliqué dans la régulation du métabolisme cellulaire et l'organisation du cytosquelette (Sarbasov et al., 2004), alors que mTORC1 stimule la croissance cellulaire et la prolifération en stimulant la synthèse protéique, la lipogénèse et le métabolisme, ainsi qu'en diminuant l'autophagie (Laplante et al., 2013). L'étape d'initiation met en jeu 2 complexes majeurs : le complexe ULK1 (unc-51-like autophagy activating kinase 1) et le complexe Beclin1-PI3KC3 (coiled-coil, myosin-like BCL2-interacting protein ; class III phosphatidylinositol-3-kinase).

Le **complexe ULK1** est formé des protéines ULK1/2 (l'action de ULK2 dans l'autophagie étant beaucoup moins bien décrite), ATG13, ATG101 et FIP200 (FAK (focal adhesion kinase) family-interacting protein of 200 kDa) (Mizushima, 2010). En condition basale, mTORC1 inhibe la formation du complexe ULK1 en phosphorylant



**Figure 25 : L'élongation de l'autophagosome au cours du processus autophagique.**

L'élongation du phagophore met en jeu 2 systèmes de conjugaison « ubiquitine-like » : les complexes ATG12-ATG5-ATG16L1 et LC3b(ATg8)-PE. **(A)** Processus d'ubiquitination des protéines, mettant en jeu différentes enzymes E1, E2 et E3. **(B-C)** Conjugaison des complexes ATG12-ATG5-ATG16L1 et LC3b-PE. **(D)** Formation de l'autophagosome : ATG12-ATG5-ATG16L1 est tout d'abord recruté au niveau du phagophore, puis entraîne le recrutement de LC3b-PE nécessaire à son expansion (adapté de Geng et al., 2008 a).



ATG13 et ULK1/2 ; en situation de déprivation en nutriments, mTORC1 est inhibé, ULK1/2 sont alors activés et phosphorylent ATG13 et FIP200 (Ganley et al., 2009; Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009). Ce processus est de plus régulé par la protéine AMPK (Adenosine monophosphate-activated protein kinase), qui est une sorte de capteur énergétique de la cellule, et qui va activer l'autophagie en cas de stress nutritif. L'AMPK va à la fois inhiber mTORC1 et activer le complexe ULK1. La phosphorylation de ULK1 par mTORC1 a un rôle inhibiteur sur l'activation de ULK1, alors que sa phosphorylation par l'AMPK entraîne son activation (Kim et al., 2011). Ce complexe ULK1 va se lier à la membrane du phagophore et phosphoryler la protéine AMBRA (Activating molecule in Beclin1-regulated autophagy), permettant alors le recrutement du second complexe Beclin-1-PI3KC3 (Fimia et al., 2007; Di Bartolomeo et al., 2010).

Le **complexe Beclin-1-PI3KC3** est composé des protéines Beclin1, ATG14L, p150/Vps15 et PI3KC3/Vps34 (Vacuolar protein sorting 15 et 34) (Funderburk et al., 2010; Fan et al., 2011). La formation de ce complexe va générer le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P), lipide indispensable à la formation de l'autophagosome (Nascimbeni et al., 2017). Le rôle primordial de la PI3KC3 dans l'autophagie a été démontré lors de l'utilisation d'inhibiteurs de la PI3K, tels que la 3-méthyladenine, la wortmannin ou LY294002 qui se traduit par une inhibition de l'autophagie (Seglen et al., 1982; Blommaert et al., 1997).

La formation de ce complexe est régulée par différentes protéines, dont la protéine anti-apoptotique Bcl-2. En effet, en condition normale, Bcl-2 séquestre Beclin-1, et leur dissociation est indispensable pour l'activation de l'autophagie (Pattingre et al., 2005).

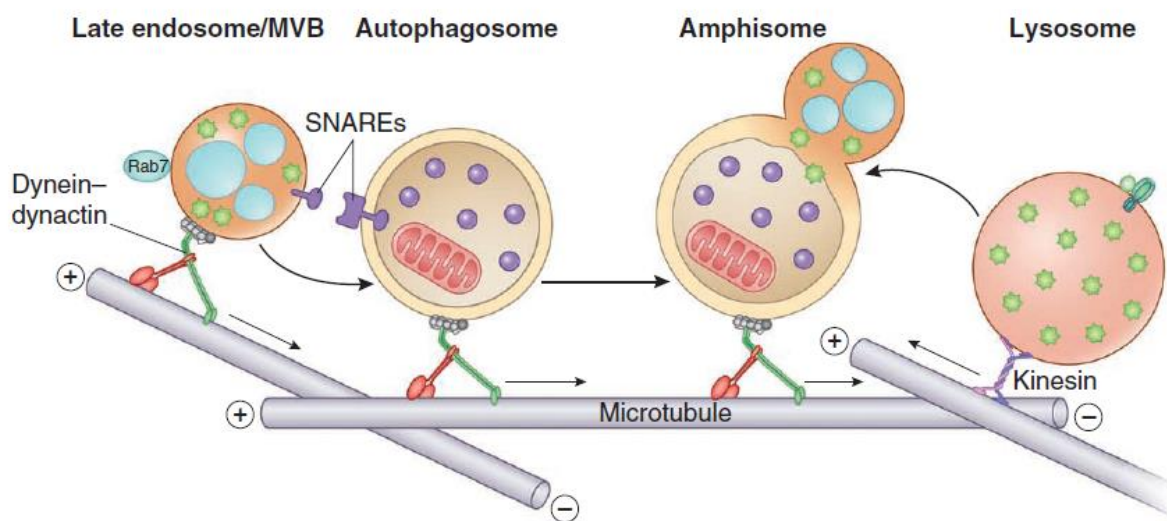
#### *L'étape d'élongation :*

L'élongation de la membrane du phagophore met en jeu deux systèmes de conjugaison connexes « ubiquitine-like » : le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 et le complexe LC3b-PE (Phosphatidyl-ethanolamine) (**Figure 25**) (Geng et al., 2008 b).

Au cours du processus d'ubiquitination, l'ubiquitine est synthétisée sous la forme d'un précurseur possédant un résidu glycine en C-terminal. Suite à l'action d'une enzyme E1, l'ubiquitine est transférée à une seconde enzyme E2 et forme une liaison thioester. Une troisième enzyme ligase E3 reconnaît ensuite la protéine d'intérêt et transfère l'ubiquitine de l'enzyme E2 à un résidu lysine de la protéine cible (**Figure 25A**). Au cours de l'élongation, ATG12 et LC3b représentent les protéines ubiquitine-like, tandis que différentes protéines ATG jouent le rôle des enzymes E1, E2 et E3.

La formation du complexe **ATG12-ATG5-ATG16L1** se déroule de la façon suivante (**Figure 25B**) : la protéine ATG7 (enzyme E1) forme une liaison thioester, de façon ATP-dépendante entre la glycine C-terminale de ATG12 et une cystéine de ATG7 (Tanida et al., 1999). ATG12 est alors transférée à ATG10 (Shintani et al., 1999), puis conjuguée à ATG5 par une liaison covalente (Mizushima et al., 1998) pour former le complexe ATG12-ATG5. ATG5 interagit alors avec ATG16L1 pour former un complexe multimérique d'environ 800 kDa.

Au cours de la formation du second complexe **LC3b-PE** (**Figure 25C**), une étape supplémentaire de protéolyse du pro-LC3b par ATG4 est nécessaire pour exposer le résidu glycine de LC3b-I à l'action de ATG7 pour être transféré à ATG3 via une liaison thioester (Kirisako et al., 2000). LC3b-I est finalement conjugué au PE des membranes via une liaison amide pour former LC3b-II, qui est membranaire (Kabeya et al., 2000). La conversion de LC3b-I en LC3b-II sert alors de marqueur d'induction de l'autophagie. Bien qu'une enzyme ligase E3 ne soit pas nécessaire à la formation du premier complexe, il a été montré que le dimère ATG12-ATG5 jouait le rôle d'enzyme E3 pour la formation du complexe LC3b-PE (**Figure 25D**) (Hanada et al., 2007). LC3b-II est nécessaire à l'expansion de l'autophagosome (Xie et al., 2008) ; il est distribué de façon symétrique des deux côtés du phagophore, et une partie du pool du LC3b-II reste séquestré dans l'autophagosome. A la différence du précédent complexe qui est formé de manière irréversible, LC3b-PE peut être clivé par ATG4 et libérer LC3b-I dans le cytosol.



**Figure 26 : Fusion de l'autophagosome avec le lysosome.** Les autophagosomes sont transportés vers le centrosome, réservoir de lysosomes, grâce aux microtubules et aux complexes dynéine-dynactine dans un mouvement linéaire. La fusion des autophagosomes avec les endosomes (amphisomes) ou les autophagosomes/amphisomes avec les lysosomes (autolysosomes) est médiée par les protéines SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor). Le contenu intralysosomal est alors dégradé, puis peut être recyclé (Nixon, 2013).

Au cours de l'élongation du phagophore, un apport en lipides pour former la membrane de l'autophagosome est indispensable, et les mécanismes impliqués ne sont pas encore totalement élucidés. Cependant, la protéine ATG9 semble être impliquée ; celle-ci formerait des vésicules cytoplasmiques qui seraient recrutées au moment de la formation de l'autophagosome (Yamamoto et al., 2012).

#### *La fusion de l'autophagosome avec le lysosome :*

Une fois les autophagosomes formés, ils sont rapidement transportés vers le centrosome (ou centre cellulaire organisateur des microtubules, COMT), car c'est une zone riche en lysosomes, selon un mouvement rapide et linéaire grâce aux microtubules et au complexe dynéine-dynactine (**Figure 26**) (Kimura et al., 2008). La fusion de l'autophagosome avec le lysosome aboutit à la formation de l'autophagolysosome (ou autolysosome). Les autophagosomes peuvent également fusionner avec des endosomes pour former des vésicules appelées amphisomes, qui fusionneront ensuite avec les lysosomes (Berg et al., 1998). Cette fusion membranaire avec les lysosomes met en jeu des protéines SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) (Stroupe, 2011).

Enfin, l'étape ultime du processus autophagique est la dégradation du contenu cytoplasmique par des hydrolases acides lysosomales, telles que des protéases, phosphatases, nucléases, glycosidases, sulfatases, et lipases. Les produits de dégradation libérés (protéines, lipides, sucres) pourront alors être relargués dans le cytosol soit par diffusion à travers la membrane lysosomale, soit grâce à des transporteurs lysosomaux et pourront être réutilisés par la cellule (Appelqvist et al., 2013).

#### L'autophagie au cours de l'arthrose

Bien que l'autophagie ait été décrite depuis une cinquantaine d'années, son rôle dans le cartilage n'a été que récemment étudié. Caramés *et al.* ont été les premiers à montrer une diminution de l'autophagie au cours de l'arthrose et du vieillissement

(Caramés et al., 2010, 2015). Récemment, des études chez des souris invalidées pour le gène ATG5 ont démontré une accélération de la progression de l'arthrose liée à l'âge (Bouderlique et al., 2016), alors que l'inactivation de mTOR protège du développement de l'arthrose (Zhang et al., 2015). De la même façon, l'activation de l'autophagie par la rapamycine (qui inhibe mTOR, et donc active l'autophagie) a un effet chondroprotecteur *in vitro* (Caramés et al., 2012 a), et son injection intra-articulaire ou intra-péritonéale réduit la sévérité de l'arthrose *in vivo* (Caramés et al., 2012 b; Takayama et al., 2014). Ces différentes études mettent en lumière l'effet protecteur de l'autophagie sur le développement de l'arthrose, suggérant l'utilisation de molécules pro-autophagiques comme approche thérapeutique pour prévenir l'arthrose.

En revanche, plusieurs études décrivent une augmentation de l'autophagie chez la souris vieillissante (Bohensky et al., 2009) et dans le cartilage humain arthrosique (Bohensky et al., 2009; Sasaki et al., 2012; Chang et al., 2013). L'expression des marqueurs d'autophagie a, de plus, été décrite plus particulièrement dans les zones superficielle et moyenne dans un modèle d'arthrose induite chez le rat (Almonte-Becerril et al., 2010). Sasaki *et al.* montrent de plus que l'IL1- $\beta$  et le NO activent l'autophagie dans des chondrocytes articulaires humains, ainsi que l'apoptose et la production de ROS (Sasaki et al., 2012). Comme décrit précédemment, la production de ROS augmente au cours du vieillissement, notamment du fait d'un dysfonctionnement des mitochondries qui est aussi associé au développement d'arthrose (Blanco et al., 2011). L'autophagie diminuant au cours du vieillissement, les organelles et macromolécules endommagées s'accumulent, notamment les mitochondries. De façon intéressante, il a été démontré qu'une augmentation de l'autophagie permet de protéger les chondrocytes de ce dysfonctionnement des mitochondries (Lopez De Figueroa et al., 2015). Certains auteurs suggèrent alors que dans les phases précoces de l'arthrose, l'autophagie augmente en réaction à un stress cellulaire dans une tentative de réparation des dommages (Bohensky et al., 2009; Lopez De Figueroa et al., 2015). A l'inverse toutefois, certaines études montrent qu'une induction excessive du processus autophagique peut entraîner la mort des chondrocytes, notamment par apoptose (Almonte-Becerril et al., 2010; Chang et al., 2013).

<b>PROTEINES</b>	<b>FONCTIONS</b>	<b>REFERENCES</b>
DAPK	Phosphoryle Beclin-1 ; active le DISC	(Zalckvar et al., 2009)
RIP	Active la mort cellulaire indépendante des caspases ; pourrait activer la mort par autophagie	(Yu et al., 2006; Bonapace et al., 2010)
NF-κB	Régule les voies de signalisation de la survie cellulaire ; inhibe l'apoptose et active l'autophagie	(Naugler et al., 2008)
JNK	Régule positivement l'apoptose et l'autophagie	(Lorin et al., 2010)
p62	Cruciale pour l'activation de la caspase-8 ; régule l'autophagie	(Moscat et al., 2009)
Beclin-1	Active l'autophagie ; régulé par Bcl-2	(He et al., 2010)
Bcl-2	Inhibe l'autophagie et l'apoptose en se liant à Beclin-1 et Bax/Bak/Bad	(Erlich et al., 2007)
Caspase-8	Active la voie extrinsèque de l'apoptose ; clive p62 au cours de l'apoptose	(Norman et al., 2010)
Caspase-3	Cliverait Beclin-1 pour inhiber l'autophagie au cours des stades terminaux d'apoptose	(Rohn et al., 2011)
p53	Induit MOMP en réponse au stress ; régule l'autophagie	(Crighton et al., 2006; Levine et al., 2008; Tasdemir et al., 2008)
Atg5	Crucial à l'autophagie ; active l'apoptose via FADD et MOMP suite au clivage par les calpaïnes	(Pyo et al., 2005; Yousefi et al., 2006; Bell et al., 2008)
FLIP	Inhibe l'autophagie via l'inhibition de la conjugaison de Atg3-LC3	(Lee et al., 2009)
Atg12-Atg3	Régule les mitochondries et l'apoptose ; sans rôle connu dans l'autophagie	(Radoshevich et al., 2010)

**Tableau 4 : Protéines qui ont un rôle à la fois dans l'autophagie et l'apoptose (adapté de Gump et al., 2011)**

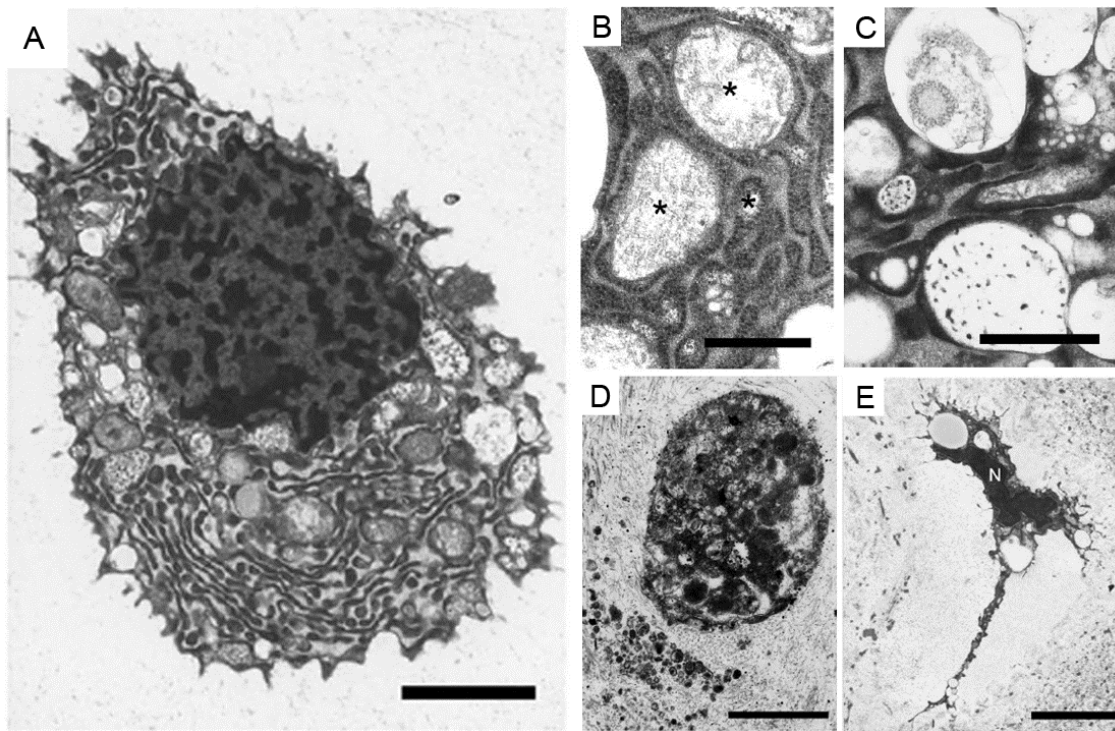
## L'autophagie : un mécanisme de mort cellulaire ?

Il a été reporté qu'au cours du processus de mort cellulaire, des vacuoles autophagiques pouvaient être présentes. Il n'a cependant pour le moment pas été établi la séquence d'évènements mis en jeu. On ne sait pour le moment pas si la mort cellulaire est accompagnée d'autophagie, ou si elle est directement due à l'autophagie (Lockshin et al., 2004). Plusieurs études montrent qu'une inhibition de l'autophagie protège de la mort cellulaire. En effet, l'invalidation des gènes Atg7 ou Beclin-1 dans des lignées fibroblastiques traitées par un inhibiteur des caspases (Yu et al., 2004), ainsi que l'invalidation de Atg5 ou Beclin-1 dans des fibroblastes murins embryonnaires déficients en Bax et Bak (Shimizu et al., 2004) inhibe la mort cellulaire.

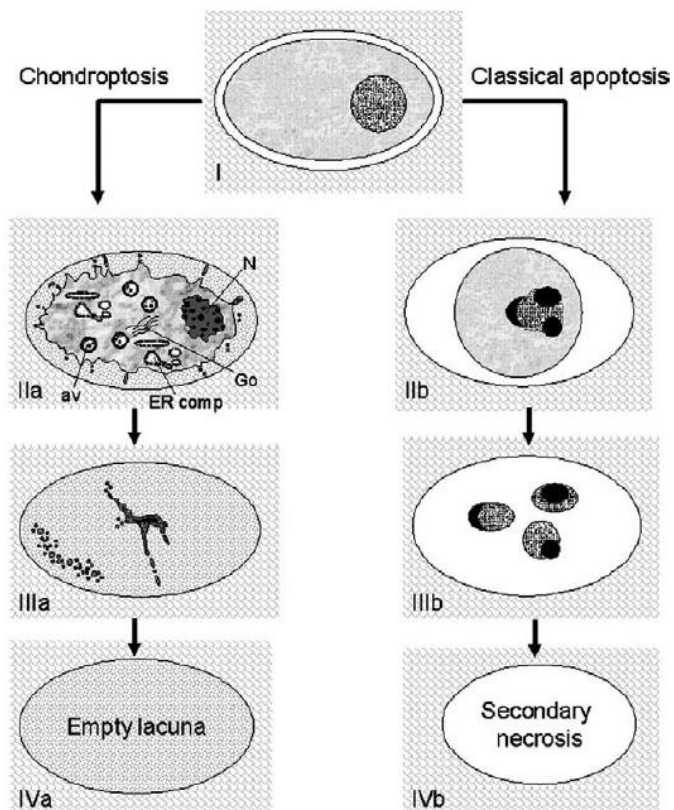
De nombreuses études récentes, suggèrent un dialogue complexe entre autophagie et apoptose (Maiuri et al., 2007 a; Marino et al., 2014), basé sur le fait que ces deux mécanismes sont régulés par des protéines communes (**Tableau 4**). Plusieurs protéines impliquées dans l'autophagie, dont Beclin-1 et Atg5, régulent aussi l'apoptose. En effet, pour induire l'apoptose, les protéines BH3-only interagissent directement avec les protéines de la famille Bcl-2, neutralisant alors leur activité anti-apoptotique (Chen et al., 2005). De façon intéressante, la protéine Beclin-1 interagit aussi avec Bcl-2 via son domaine BH3 (Liang et al., 1998; Maiuri et al., 2007 b), empêchant l'interaction de Beclin-1 avec la PI3KC3 et donc l'induction de l'autophagie (Patingre et al., 2005). La protéine Bcl-2 possède donc à la fois des propriétés anti-apoptotiques et anti-autophagiques. De même, la protéine Atg5 interagit avec FADD pour provoquer la mort cellulaire (Pyo et al., 2005). De plus, Atg5 peut être clivée par des calpaïnes, puis être transférée aux mitochondries et induire la libération de cytochrome c et l'activation des caspases (Yousefi et al., 2006). Inversement les caspases peuvent aussi réguler l'autophagie (Tsapras et al., 2017). En effet, Zhu et al. montrent, par exemple, que la caspase-3 est capable de cliver Beclin-1, conduisant à une diminution de l'autophagie et une exacerbation de l'apoptose (Zhu et al., 2010).

L'ensemble de ces données montre que l'autophagie possède vraisemblablement à la fois un rôle dans la survie cellulaire mais également dans la mort cellulaire.





**Figure 27 : Morphologie de la chondroptose.** (A) Le noyau est convoluté, la chromatine est condensée et diffuse, le RE et les vacuoles autophagiques sont nombreux. (B) Les membranes du RE entourent et isolent une partie du cytoplasme pour dégrader son contenu (\*). (C) Les vacuoles autophagiques permettent aussi de dégrader le matériel cellulaire. (D) La cellule se désintègre alors et des vésicules s'accumulent dans la matrice, puis la cellule est progressivement éliminée (E) (adapté de Roach et al., 2004).



**Figure 28 : Différence entre chondroptose et apoptose classique.** Lors de la chondroptose, le Golgi et le RE sont élargis, la membrane plasmique est irrégulière et la chromatine est condensée et dispersée dans le noyau. Le matériel est éliminé par le RE et via la formation de vacuoles autophagiques (Roach et al., 2004).



#### d) La chondroptose

Même si l'apoptose, l'autophagie et la nécrose ont été décrits dans le cartilage arthrosique, les mécanismes de mort des chondrocytes impliqués ne sont pour le moment pas clairement établis. Roach *et al.* ont suggéré que les chondrocytes meurent par un mécanisme qui n'est pas tout à fait de l'apoptose classique, ce qui expliquerait pourquoi les chondrocytes présentant les caractéristiques spécifiques d'une cellule apoptotique classique sont rares dans le cartilage (Roach *et al.*, 2004).

Au cours de la chondroptose, la cellule rétrécit et la chromatine se condense, comme lors de l'apoptose classique, mais au lieu de former une large masse dans le noyau, la chromatine y est dispersée et le noyau est convoluté. Le RE rugueux et l'appareil de Golgi sont anormalement élargis dans les phases précoces, des vacuoles autophagiques sont fréquentes, et on observe, de façon similaire à la nécrose, une extrusion du matériel cytoplasmique dans l'espace extracellulaire. L'élimination de la cellule se fait alors par digestion dans le RE et dans les vacuoles autophagiques (**Figures 27 et 28**).

De façon intéressante, la présence de chondroptose a aussi été décrite dans le disque intervertébral (DIV), à la fois dans le noyau pulpeux et dans l'anneau fibreux (Sitte *et al.*, 2009, 2012; Jiang *et al.*, 2017). En effet, la biologie du DIV ressemble à celle du cartilage articulaire, et les processus de mort des cellules du DIV sont tout aussi mal connus (Zhao *et al.*, 2007).

## **PARTIE 2 :**

# **ROLE DES MOLECULES ANTI-OXYDANTES ET DE $\alpha$ -KLOTHO DANS LE TRAITEMENT DE L'ARTHROSE**

Nous avons vu au cours de cette première partie que le développement de l'arthrose est étroitement lié aux voies du vieillissement. En effet, les différents phénomènes de stress oxydant, mort des chondrocytes, inflammation et destruction de l'articulation sont des évènements se produisant au cours du vieillissement du cartilage articulaire. L'objectif de cette seconde partie est de décrire le rôle de différentes molécules décrites comme anti-vieillescence : les molécules naturelles anti-oxydantes qui ont aussi des propriétés anti-vieillescence et protectrices du cartilage articulaire, et la protéine  $\alpha$ -Klotho qui interagit avec diverses voies liées au vieillissement.

## **1. LES TRAITEMENTS ACTUELS DE L'ARTHROSE**

A l'heure actuelle, aucun des traitements proposés au patient arthrosique ne permet de soigner sa maladie. La chirurgie de remplacement peut être proposée en cas d'échecs des traitements de première ligne, mais implique une opération qui peut être lourde et ne permet pas de récupérer toute la mobilité articulaire. Elle représente de plus un coût sociétal important ; en effet, elle est envisagée une fois que l'articulation est fortement endommagée, ou quand la gêne fonctionnelle est trop importante, et après que les autres traitements pharmacologiques et non pharmacologiques aient montré leur inefficacité, d'où les efforts pour développer des thérapeutiques dans les phases précoces de la maladie.

Le traitement de l'arthrose est uniquement symptomatique, car aucune des alternatives thérapeutiques actuelles ne permet de soigner l'arthrose. Ces traitements ont donc pour objectif de calmer la douleur, diminuer la gêne fonctionnelle, améliorer la qualité de vie, et ultimement ralentir l'évolution de la pathologie. Ils combinent à la fois un traitement non pharmacologique et un traitement médicamenteux, voire une prise en charge chirurgicale.

### **1.1 Traitements non pharmacologiques**

Toutes les recommandations sont unanimes sur la nécessité de prendre en charge tous les patients souffrant d'arthrose de façon non pharmacologique. Cette

prise en charge repose sur l'éducation et l'information du patient, la perte de poids, l'utilisation d'aides techniques (telles que cannes, béquilles, orthèses, semelles), la pratique sportive et la kinésithérapie (Fernandes et al., 2013).

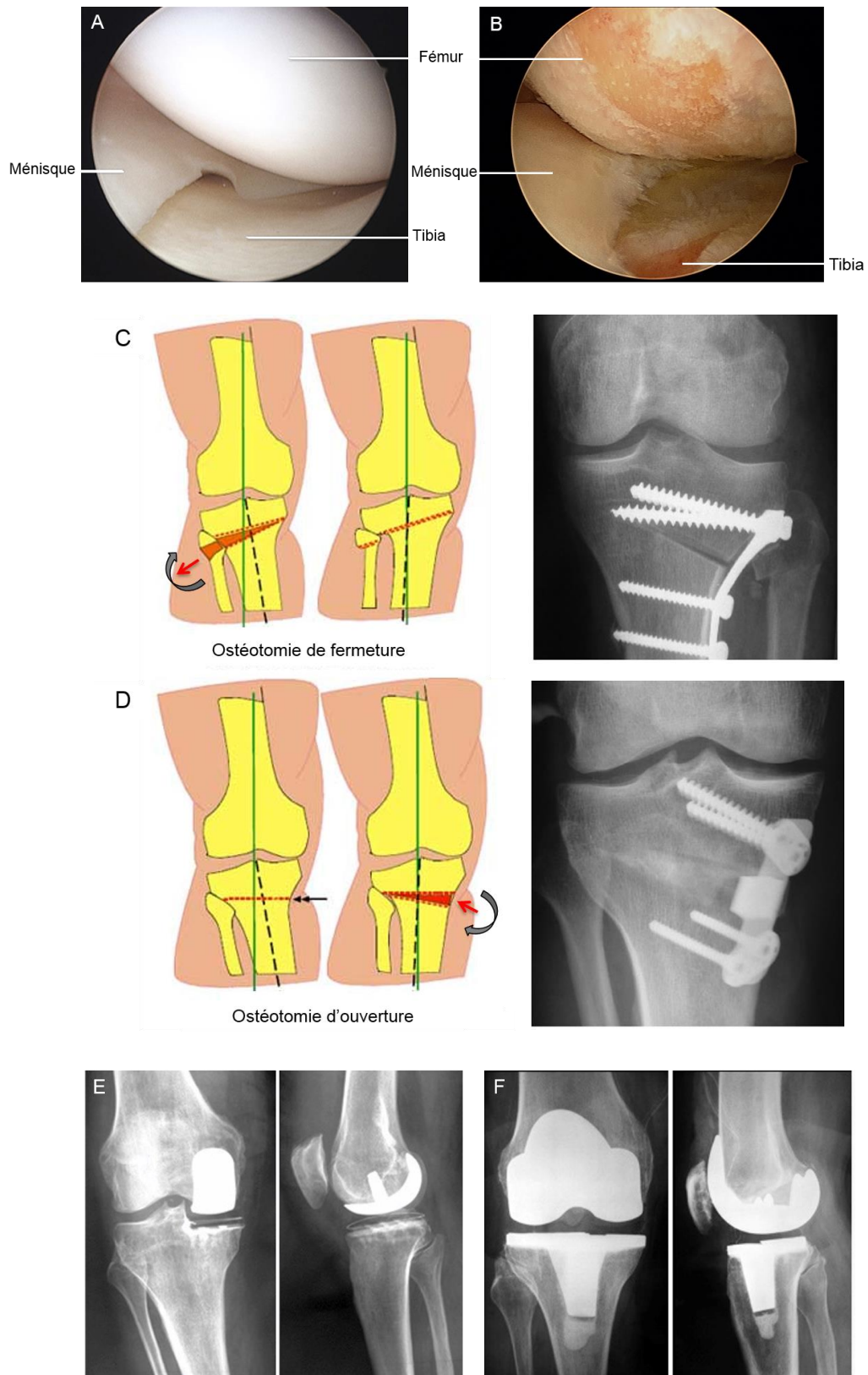
## 1.2 Traitements pharmacologiques

L'objectif essentiel des traitements existants est de soulager la douleur. Ces traitements incluent des traitements par voie orale, intra-articulaire ou percutanée.

Par voie orale, ces traitements consistent en des traitements d'action rapide, les antalgiques et anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) : le paracétamol (qui est le traitement de première intention des douleurs faibles à modérées associées à l'arthrose), les AINS (qui possèdent des effets indésirables gastro-intestinaux et cardiovasculaires), et les opioïdes (pour les poussées douloureuses, et qui peuvent induire des effets indésirables neurologiques et une dépendance).

Mais aussi des traitements d'action lente, les molécules anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente (AASALs) : la chondroïtine sulfate, la glucosamine, la diacérhéine et les insaponifiables d'huiles d'avocat et de soja. Ces molécules auraient un effet symptomatique et structuromodulateur. Dans certains pays, ces molécules sont commercialisées à titre de compléments alimentaires. L'efficacité clinique de ce type de traitement a jusque-là été difficile à démontrer, et ce pour plusieurs raisons : le fait que l'arthrose soit une pathologie à évolution lente, nécessitant donc un suivi à très long terme pour déceler un effet bénéfique d'un traitement ; l'utilisation de méthodes d'évaluation différentes entre les études cliniques ; et l'existence d'un effet placebo important dans les études cliniques concernant l'arthrose (Zhang et al., 2008 b). Même s'il est plutôt bien admis un effet bénéfique des AASALs, bien que modeste, notamment sur la douleur et une diminution du recours aux AINS, des études cliniques rigoureuses sont nécessaires pour définir l'effet de ces molécules.

En cas de poussées douloureuses ou d'épanchement liquidien, une injection intra-articulaire de corticoïdes ou d'acide hyaluronique (AH) peut être pratiquée à



**Figure 29 : Traitements chirurgicaux de l'arthrose du genou.** Arthroscopie d'un genou sain (A) et arthroscopie (B). Ostéotomie tibiale de fermeture (C) ou d'ouverture (D). Arthroplastie partielle (E) ou totale (F).

travers la capsule articulaire. Les corticoïdes sont utilisés pour leurs propriétés anti-inflammatoires, et les injections d'AH ont pour but de remplacer et stimuler la production de l'AH dégradé lors du processus arthrosique. La viscosupplémentation aurait de plus un effet anti-inflammatoire et anti-nociceptif. Ces injections peuvent être précédées d'un lavage articulaire (injection puis réaspiration de sérum physiologique dans l'articulation) dans le cas d'inflammation ou d'épanchement important. Tout comme pour les AASALs, l'efficacité des traitements par voie intra-articulaire est controversée. En effet, on retrouve dans la littérature à la fois des études montrant un effet bénéfique des injections intra-articulaires de corticoïdes ou d'AH, mais aussi des études ne montrant pas d'effet supérieur au placebo (Hameed et al., 2012; Ayhan et al., 2014).

Enfin, les AINS par voie percutanée permettent d'avoir le même effet anti-inflammatoire que les AINS administrés *per os*, tout en évitant les effets secondaires, digestifs notamment.

### 1.3 Traitements chirurgicaux

Lorsque les thérapeutiques précédentes sont insuffisantes, ou que l'arthrose est à un stade avancé, la chirurgie peut être envisagée. Ces opérations visent à réaligner l'articulation, ou à remplacer une surface articulaire qui est mise à nu. En pratique, 3 actes chirurgicaux sont actuellement réalisés : l'arthroscopie, l'ostéotomie et l'arthroplastie (**Figure 29**).

L'arthroscopie du genou est une technique mini-invasive permettant de réaliser différentes opérations au niveau de l'articulation sans avoir à l'ouvrir, grâce à l'introduction d'un arthroscope (une fibre optique rigide reliée à une caméra) permettant de visualiser l'intérieur de la capsule articulaire. Elle peut avoir un objectif diagnostique, permettant de distinguer d'éventuelles lésions des ménisques, du cartilage articulaire, de la membrane synoviale ou des ligaments croisés, mais aussi un objectif thérapeutique (régularisation de la surface du cartilage, réparation ou ablation des ménisques ou de la membrane synoviale, reconstruction des ligaments).

L'ostéotomie tibiale est envisagée lors d'un désaxage important de l'articulation (genu valgum ou genu varum), lorsqu'il reste des zones en bon état dans l'articulation. Le but est de mieux répartir les contraintes appliquées sur l'articulation, en redressant le tibia. La technique consiste à sectionner l'os pour le redresser. Deux techniques peuvent être utilisées, soit enlever un morceau de l'os (ostéotomie de fermeture), soit rajouter un morceau d'os, prélevé sur le bassin ou artificiel (métal, ciment, substitut osseux) (ostéotomie d'ouverture). Cette opération présente l'intérêt majeur d'être une intervention conservatrice, car ne touche pas les surfaces articulaires, et permet de ralentir voire éviter le recours à la pose de prothèse.

L'arthroplastie est réalisée en dernier recours, lorsque l'articulation est trop abimée et qu'il est donc nécessaire d'enlever le cartilage usé. Il existe 2 types de prothèses articulaires de genou : les prothèses totales de genou (PTG), les plus répandues, et les prothèses partielles ou unicompartmentales (PUC). Le but de cette chirurgie est de diminuer les douleurs, restaurer la mobilité et faire disparaître une éventuelle boiterie. Le choix de l'une ou de l'autre technique se fera selon la déformation de l'articulation, la localisation des lésions et la qualité des ligaments qui retiennent l'articulation.

## **2. L'APPORT DES MOLECULES NATURELLES DANS LE TRAITEMENT DE L'ARTHROSE**

Plusieurs nouveaux axes thérapeutiques sont actuellement en développement pour tenter de soigner ou prévenir le développement de l'arthrose. Parmi eux, un axe de prévention de l'arthrose par l'utilisation de molécules naturelles, ou « nutricaments », terme qui combine les mots nutrition et médicament ([Zeisel, 1999](#)), et qui ont un potentiel anti-inflammatoire, anti-oxydant voire chondroprotecteur sur les tissus articulaires ([Ameys et al., 2006](#); [Henrotin et al., 2011](#)).

Un des arguments en faveur de l'utilisation de ces molécules est le fait que les traitements médicamenteux actuels sont sources d'effets secondaires pouvant nécessiter l'arrêt du traitement, tels que les effets indésirables gastro-intestinaux et



cardiovasculaires des AINS (McCarberg et al., 2013). Certains composés, tels que la chondroïtine sulfate ou les insaponifiables de soja et d'avocat, qui dérivent de produits naturels, sont actuellement considérés comme des médicaments (ils disposent d'une autorisation de mise sur le marché AMM, pour certaines indications), représentent moins de dangers à long terme, et permettent de garantir des effets à plus long terme. Ces molécules sont extraites d'aliments, d'animaux ou de plantes, et possèdent des propriétés protectrices dans différentes maladies, telles que les maladies cardiovasculaires ou les cancers (Kalra, 2003; Das et al., 2012). Plusieurs molécules ont d'ores et déjà démontré un potentiel anti-inflammatoire, anti-oxydant et inhibiteur de la dégradation du cartilage *in vitro* voire *in vivo*, comme le resveratrol, la curcumine ou l'épigallocatechine gallate, mais les études cliniques n'ont pas encore réussi à démontrer un effet bénéfique de ces traitements (Ameye et al., 2006; Henrotin et al., 2011). Une multitude de molécules naturelles ont été testées dans le but de traiter ou prévenir l'arthrose, nous nous concentrerons ici sur quelques molécules parmi les plus décrites.

## 2.1 Le curcumin

Le curcumin (ou diferuloylmethane) est extrait du rhizome du curcuma (*Curcuma longa*), et possède des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes, particulièrement au sein du cartilage articulaire (Chin, 2016). Le curcumin bloque notamment l'inhibition de la chondrogénèse induite par l'IL1- $\beta$  dans des cellules souches mésenchymateuses (Buhrmann et al., 2010 a). Il a un rôle majeur dans l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B, ainsi que de l'expression des marqueurs de l'inflammation (COX-2, PGE<sub>2</sub> et IL-6) et du catabolisme (MMP3, 9 et 13, ADAMTS4 et 5) (Schulze-Tanzil et al., 2004; Shakibaei et al., 2007 a; Csaki et al., 2009 a; Mathy-Hartert et al., 2009; Clutterbuck et al., 2013; Comblain et al., 2015). Il a aussi un rôle protecteur de la dégradation de la MEC (Shakibaei et al., 2005; Clutterbuck et al., 2009). Yang *et al.* ont, de plus, démontré que le curcumin diminue la production de ROS, et augmente l'expression des enzymes catalase et superoxyde dismutase dans des chondrocytes stimulés par des produits finaux de glycation avancée (Advanced glycation end-products/AGEs), qui résultent de la réaction spontanée de réduction d'un sucre avec

une protéine, et qui s'accumulent dans le cartilage au cours de l'arthrose (Yang et al., 2013). De façon intéressante, plusieurs études montrent que le curcumin prévient l'apoptose *in vitro* dans des chondrocytes humains stimulés par de l'IL1- $\beta$  (Shakibaei et al., 2005, 2011; Csaki et al., 2009 b; Buhrmann et al., 2010 b). Toutefois, une étude reporte des effets toxiques du curcumin à forte dose (Toegel et al., 2008).

Deux études *in vivo* dans un modèle d'arthrose post-traumatique (déstabilisation du ménisque médial/DMM) montrent un ralentissement de la progression de l'arthrose en administrant le curcumin par voie intra-péritonéale (Sun et al., 2017), ou bien par voie orale, qui est associé à des effets anti-nociceptifs lorsque celui-ci est appliqué par voie topique (Zhang et al., 2016). Quelques études cliniques montrent des effets globalement positifs d'une supplémentation en curcumin, mais le nombre d'études et de participants à ces études est pour le moment trop faible pour conclure à un effet du curcumin dans l'arthrose (Liu et al., 2017).

## 2.2 Le resvératrol

Le resvératrol (ou trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) est un polyphénol extrait principalement de la peau du raisin (*Vitis vinifera*), des fruits rouges ou de la cacahuète. Ses propriétés sont multiples ; il est notamment anti-cancéreux, anti-inflammatoire et cardioprotecteur (Frémont, 2000). Dans le cartilage, le resvératrol est capable de bloquer l'apoptose des chondrocytes (Dave et al., 2008; Shakibaei et al., 2008; Csaki et al., 2009 a), par inhibition de la caspase-3 et de PARP (Shakibaei et al., 2007 b), ainsi que de p53 et de la production de ROS (Csaki et al., 2008; Liang et al., 2014). Ces différentes études montrent, de la même façon que le curcumin, que le resvératrol inhibe les effets de l'IL1- $\beta$ , mais aussi des AGEs (iNos, COX-2, MMPs, perte de PG et de collagène) (Liu et al., 2010). C'est aussi un puissant inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B (Csaki et al., 2008; Shakibaei et al., 2008), grâce à ses propriétés activatrices de la protéine SIRT1 (sirtuin-1), une déacétylase qui régule notamment l'inflammation et la survie des chondrocytes (Lei et al., 2012; Moon et al., 2013).

*In vivo*, l'effet du resvératrol a été testé par voie intra-articulaire. Elmali et al. rapportent une diminution de la destruction du cartilage et de la perte de PG chez des lapins ayant subi une section du ligament croisé antérieur (anterior cruciate

ligament transection/ACLT) et traités par le resvératrol (Elmali et al., 2005). Dans un modèle de résection des ligaments croisés antérieur et postérieur chez le lapin, le même effet inhibiteur de la dégradation du cartilage articulaire a été observé chez les animaux traités par le resvératrol, associé à une diminution de l'apoptose des chondrocytes et de la production de NO dans le liquide synovial (Wang et al., 2012). Plus récemment, dans un modèle de DMM chez la souris, l'injection de resvératrol a été associée à une protection du cartilage et de l'os sous-chondral, ainsi qu'un maintien de l'expression du collagène II, une diminution de l'expression de MMP13, iNos et NF- $\kappa$ B, et une augmentation de SIRT1 (Li et al., 2015). Enfin, dans un modèle d'arthrose liée à l'obésité chez la souris, une administration par voie orale de resvératrol protège du développement de l'arthrose et de l'apoptose des chondrocytes (Gu et al., 2016).

### 2.3 L'épigallocatechine gallate

Le thé vert (*Camellia sinensis*) est une des boissons les plus communément consommée à travers le monde, et est une source importante de polyphénols appelés les catéchines, dont majoritairement l'épigallocatechine 3-gallate (EGCG) (Manning et al., 2009). Différentes études *in vitro* montrent que l'EGCG possède des propriétés inhibitrices sur les effets médiés par l'IL1- $\beta$  dans des chondrocytes articulaires arthrosiques (Akhtar et al., 2011). L'EGCG (et plus largement les catéchines extraites du thé vert) inhibent l'induction de l'expression de iNos et COX-2, associée à la production de NO et PGE2 (Ahmed et al., 2002; Heinecke et al., 2010), notamment via l'inhibition des voies NF- $\kappa$ B et c-Jun-N-terminal kinase (JNK) qui sont impliquées dans les effets inflammatoires et cataboliques de l'IL1- $\beta$  (Singh et al., 2002, 2003). Ces extraits bloquent aussi l'expression de différentes métalloprotéases (MMP1 et 13) (Ahmed et al., 2004; Rasheed et al., 2009), et agrécánases (ADAMTS 1, 4 et 5) (Vankemmelbeke et al., 2003), ainsi que la dégradation des GAG, de l'agrécane et du collagène II (Adcocks et al., 2002; Andriamanalijaona et al., 2005; Huang et al., 2015).

Une étude *in vivo* a été réalisée chez la souris dans le modèle d'arthrose post-traumatique par DMM (Leong et al., 2014). Celle-ci montre un ralentissement de la progression de l'arthrose chez les souris traitées par l'EGCG, associé à une diminution

de la dégradation de la matrice cartilagineuse et de la douleur.

## 2.4 Le collagène hydrolysé

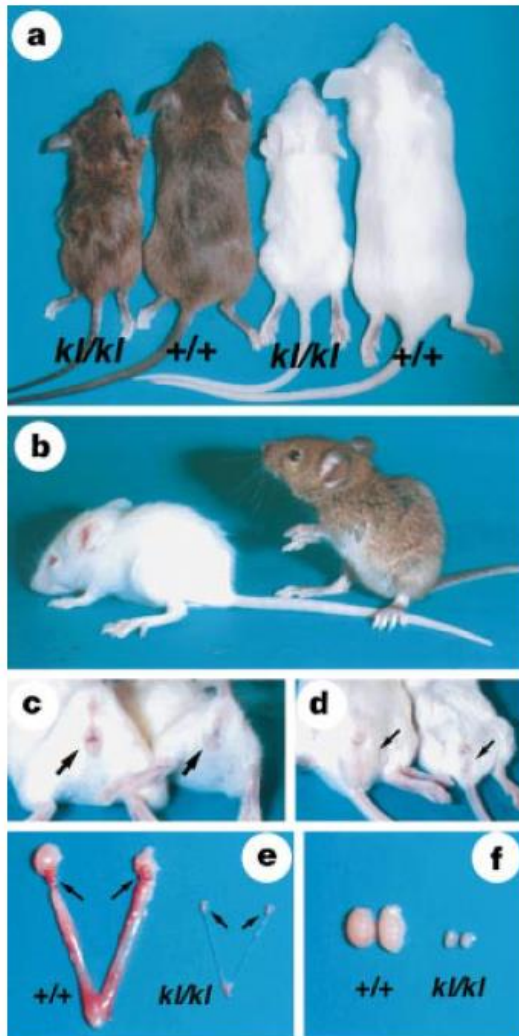
Le collagène hydrolysé (CH) est obtenu par hydrolyse de tissus riches en collagène, tels que l'os et la peau, et est composé principalement des acides aminés glycine et proline, tous deux essentiels à la stabilité de la matrice cartilagineuse (Moskowitz, 2000; Walrand et al., 2008). Quelques études montrent un effet bénéfique du CH sur la biosynthèse de MEC *in vitro* (Oesser et al., 2003; Schunck et al., 2006). *In vivo*, une supplémentation en CH chez la souris STR/Ort, une souche de souris génétiquement modifiée ayant une incidence élevée d'arthrose avec l'âge (Sokoloff, 1956), ralentit la progression de l'arthrose (Oesser et al., 2008). Une seconde étude montre que le CH protège de la dégradation du cartilage induite par le phosphate chez la souris (Nakatani et al., 2009). Des études cliniques ont été réalisées pour évaluer l'effet du CH chez l'homme, de façon similaire aux études sur le curcumin, les résultats observés semblent globalement positifs, mais ces études restent rares (Liu et al., 2017).

En conclusion de cette partie, de nombreuses études *in vitro* ont été réalisées pour évaluer l'effet de ces molécules naturelles sur le développement de l'arthrose. Et même si les résultats de ces études montrent divers effets bénéfiques sur l'inflammation, la mort des chondrocytes et la dégradation de la MEC, peu d'études *in vivo* (précliniques et cliniques) ont été réalisées. De plus, ces études utilisent majoritairement les techniques histologiques pour évaluer l'atteinte du cartilage articulaire. Bien qu'étant la technique de référence dans les études sur l'arthrose, c'est une technique longue qui ne permet pas de réaliser un suivi longitudinal de l'arthrose chez l'animal. De plus, il est impossible de transposer cette approche en clinique humaine, d'où l'intérêt grandissant pour le développement de nouvelles techniques non invasives d'évaluation de l'arthrose chez l'animal. Celles-ci ont l'avantage de permettre à la fois de suivre la progression de la maladie chez le même animal, tout en réduisant le nombre d'animaux, donc le coût des études, et sont directement transposables aux études chez l'homme. Les techniques d'imagerie, telles que la

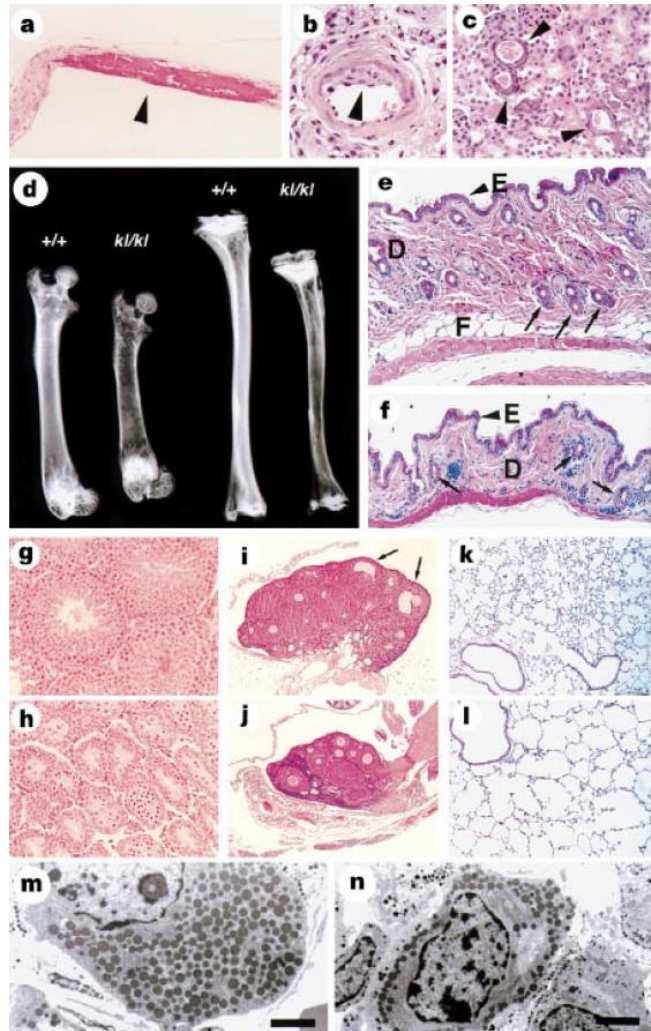
radiologie (Walton, 1977; Pataki et al., 1987, 1990), l'IRM (Imagerie à Résonance Magnétique) (Goebel et al., 2010), ou le microscanner (Mohan et al., 2011) sont particulièrement intéressantes car sont directement utilisées pour le diagnostic et le suivi de l'arthrose en clinique. Les biomarqueurs sont aussi beaucoup étudiés car ils permettraient de détecter les stades précoces de la maladie (Kraus et al., 2011). Enfin, des techniques innovantes ont été développées pour suivre la gêne fonctionnelle associée à la maladie, comme l'analyse de la démarche, grâce à différents systèmes développés chez l'animal (Ferreira-Gomes et al., 2008; Ferland et al., 2011).



(A)



(B)



**Figure 30 : Phénotype des souris transgéniques *kl/kl*.** (A) Phénotype macroscopique : (a-b) Les souris *kl/kl* de 8 semaines sont plus petites que les souris sauvages. (c-f) Les organes génitaux des femelles (c, e) et des mâles (d, f) *kl/kl* sont atrophiés. (B) Analyse histologique : (a) Calcification de l'aorte, (b) Epaissement de la paroi des artères, (c) Calcification des artères rénales, (d) Ostéopénie, (e-f) Atrophie de la peau, (g-h) Atrophie des testicules, et des ovaires (i-j), (k-l) Emphysème pulmonaires, (m-n) Anomalie de la glande pituitaire, caractérisée par une diminution de la taille et du nombre de cellules produisant l'hormone de croissance (GH) (adapté de Kuro-o et al., 1997).

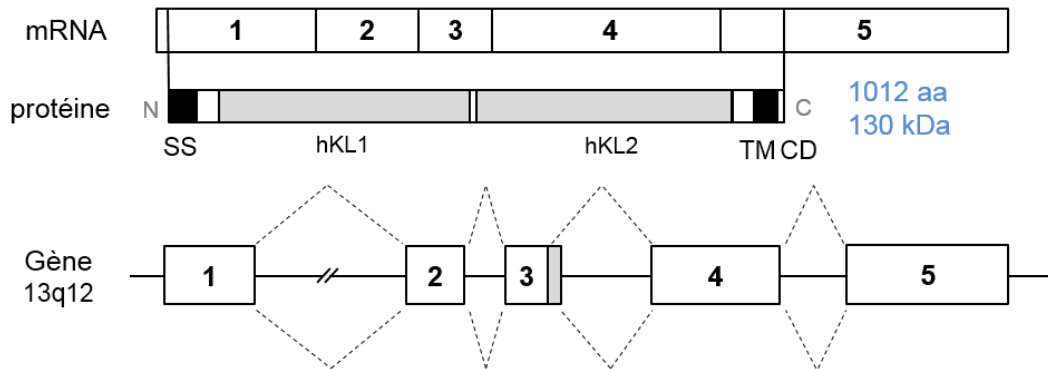
### 3. LA PROTEINE ANTI-VIEILLISSEMENT $\alpha$ -KLOTHO

Il y a 20 ans, Makoto Kuro-o décrit le phénotype d'une souris transgénique qui présente différents signes de vieillissement accéléré (Kuro-o et al., 1997). Cette protéine mutante a été nommée  $\alpha$ -Klotho, du nom de la déesse Clotho (aussi écrit Klotho), une des Moires dans la mythologie grecque qui tisse le fil de la vie, contrôlant alors la destinée de l'Homme. La souris *kl/kl* présente un phénotype ressemblant à celui de patients présentant un syndrome de vieillissement prématuré, caractérisé notamment par la présence d'artériosclérose, d'ostéoporose, d'anomalies de la peau et de calcifications ectopiques, et une infertilité (**Figure 30**). Cette souris a une croissance normale jusqu'à 3 à 4 semaines, puis elle commence à présenter des retards de croissance et meurt prématurément après 8 à 9 semaines de vie. Inversement, les souris surexprimant le gène  $\alpha$ -Klotho ont une espérance de vie plus longue (20-30%) que les souris sauvages (Kurosu et al., 2005). Ces observations suggèrent un rôle majeur de  $\alpha$ -Klotho dans les voies de régulation du vieillissement. De plus, différents polymorphismes de  $\alpha$ -Klotho ont été associés à la longévité (Arking et al., 2002) et des maladies liées au vieillissement, comme l'ostéoporose (Kawano et al., 2002), des pertes cognitives (Hao et al., 2016; Almeida et al., 2017), ou des troubles coronariens (Arking et al., 2003) et rénaux (Telci et al., 2011).

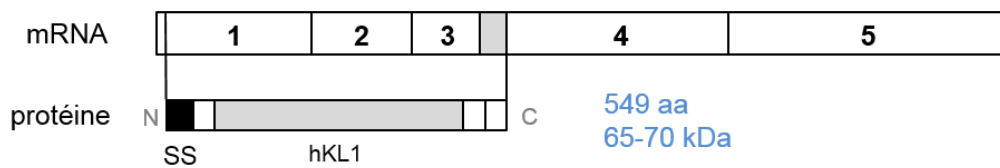
La protéine  $\alpha$ -Klotho est majoritairement exprimée dans le tubule distal du rein, ainsi que dans le plexus choroïde et la glande parathyroïde (Li et al., 2004). Elle agit comme co-récepteur du facteur de croissance fibroblastique 23 (FGF23) pour réguler l'excrétion rénale de phosphate, et possède une action humorale par régulation de l'activité de différents transporteurs, récepteurs de facteurs de croissance, et canaux ioniques (Kuro-o, 2010). Elle possède aussi d'autres fonctions, notamment dans la régulation de différents processus de mort cellulaire, comme l'apoptose, la senescence et l'autophagie.



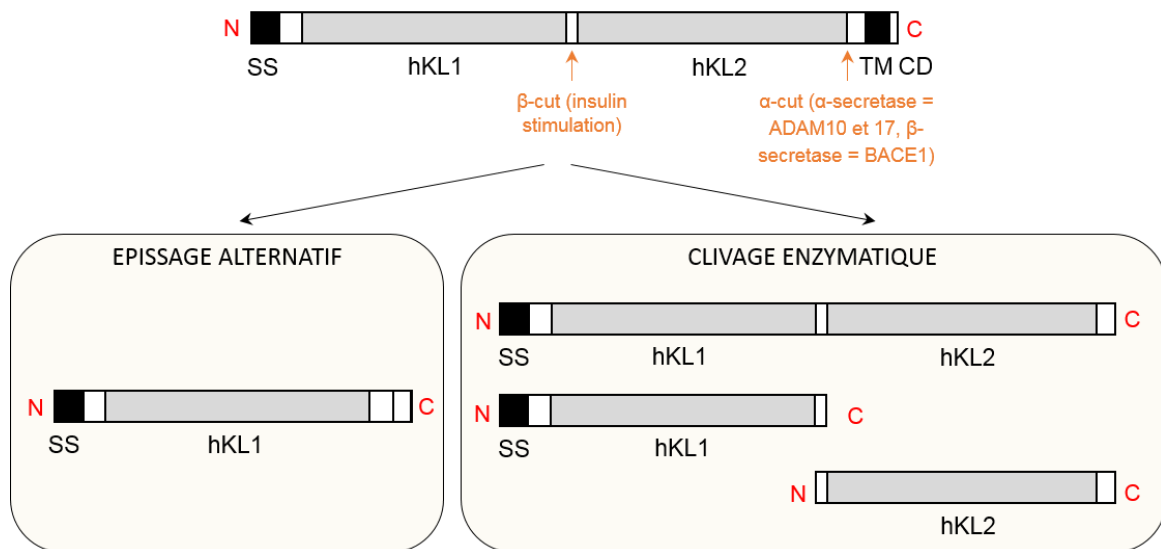
## Forme membranaire



## Forme sécrétée



**Figure 31 : Représentation schématique des différents transcrits codés par le gène  $\alpha$ -Klotho chez l'homme.** La forme membranaire de  $\alpha$ -Klotho comporte une séquence signal (SS), deux domaines répétés KL1 et KL2, un domaine transmembranaire (TM) et un court domaine cytoplasmique (CD). Un épissage alternatif au niveau de l'exon 3 génère une forme tronquée entre les domaines KL1 et KL2 ; cette forme est alors soluble et diffuse dans les fluides biologiques.



**Figure 32 : Représentation schématique des différentes formes de la protéine  $\alpha$ -Klotho.** La forme transmembranaire de  $\alpha$ -Klotho peut subir un épissage alternatif et générer une forme sécrétée (KL1), ou être clivée en  $\alpha$  (par des protéases ADAM10 et 17 et BACE1) ou en  $\beta$  (par stimulation à l'insuline) et générer différentes formes solubles (KL1-KL2, KL1 ou KL2).

### 3.1 Structure, expression et régulation de la protéine $\alpha$ -Klotho

Le gène  *$\alpha$ -Klotho* est composé de 5 exons et code pour une protéine transmembranaire de 1012 acides aminés chez l'homme (1014 chez la souris) (Matsumura et al., 1998; Shiraki-Iida et al., 1998). Cette protéine transmembranaire possède un domaine intracellulaire très court (10 acides aminés) qui n'a pas de fonction connue, un court domaine transmembranaire, un domaine extracellulaire partageant une homologie avec les enzymes  $\beta$ -glucosidases constitué de 2 domaines répétés KL1 et KL2 et une séquence signal terminale.  $\alpha$ -Klotho existe sous forme membranaire (d'un poids moléculaire de 130 kDa), mais aussi sous forme sécrétée, par épissage alternatif, générant une protéine tronquée de 549 acides aminés (550 chez la souris) possédant uniquement la partie N-terminale avec le segment KL1 (d'un poids moléculaire de 65-70 kDa) (**Figure 31**). De façon inattendue, la forme longue de  $\alpha$ -Klotho (composée de KL1 et KL2) a aussi été retrouvée dans le sérum, l'urine et le liquide cébrospinal (Imura et al., 2004). En effet, plusieurs études ont démontré que la forme membranaire de  $\alpha$ -Klotho pouvait être clivée par différentes protéases à différents sites de clivage (**Figure 32**) (Chen et al., 2007, 2014; Bloch et al., 2009) :

- un clivage en  $\alpha$  par des  $\alpha$ -sécrétases ADAM10 et 17 (A disintegrin and metalloproteinase domain-containing proteins) et des  $\beta$ -sécrétases BACE1 (beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)
- un clivage en  $\beta$  induit par stimulation de l'insuline

Comme dit précédemment,  $\alpha$ -Klotho a été initialement décrit comme étant exprimé majoritairement dans le rein, le plexus choroïde et la glande parathyroïde. Mais des études récentes montrent un profil d'expression plus vaste de  $\alpha$ -Klotho (Olsson et al., 2017). D'autre part, bien que certains organes n'expriment pas ou peu de  $\alpha$ -Klotho, comme le poumon par exemple, on observe un phénotype pulmonaire majeur chez la souris déficiente en  $\alpha$ -Klotho (emphysème pulmonaire), suggérant un rôle critique de  $\alpha$ -Klotho soluble (Kuro-o et al., 1997). Concernant l'origine de la (les) forme(s) soluble(s) de  $\alpha$ -Klotho, il a été proposé qu'elle(s) provienne(nt) principalement du clivage de la forme membranaire présente dans le rein. En effet, lors de l'invalidation de l'expression de  $\alpha$ -Klotho spécifiquement dans le rein, la sécrétion de

$\alpha$ -Klotho dans le sérum est sensiblement diminuée (Lindberg et al., 2014). De la même façon, la concentration de  $\alpha$ -Klotho sérique chute après néphrectomie bilatérale ou après traitement par un inhibiteur des  $\alpha$ - et  $\beta$ -sécrétases (Hu et al., 2016).

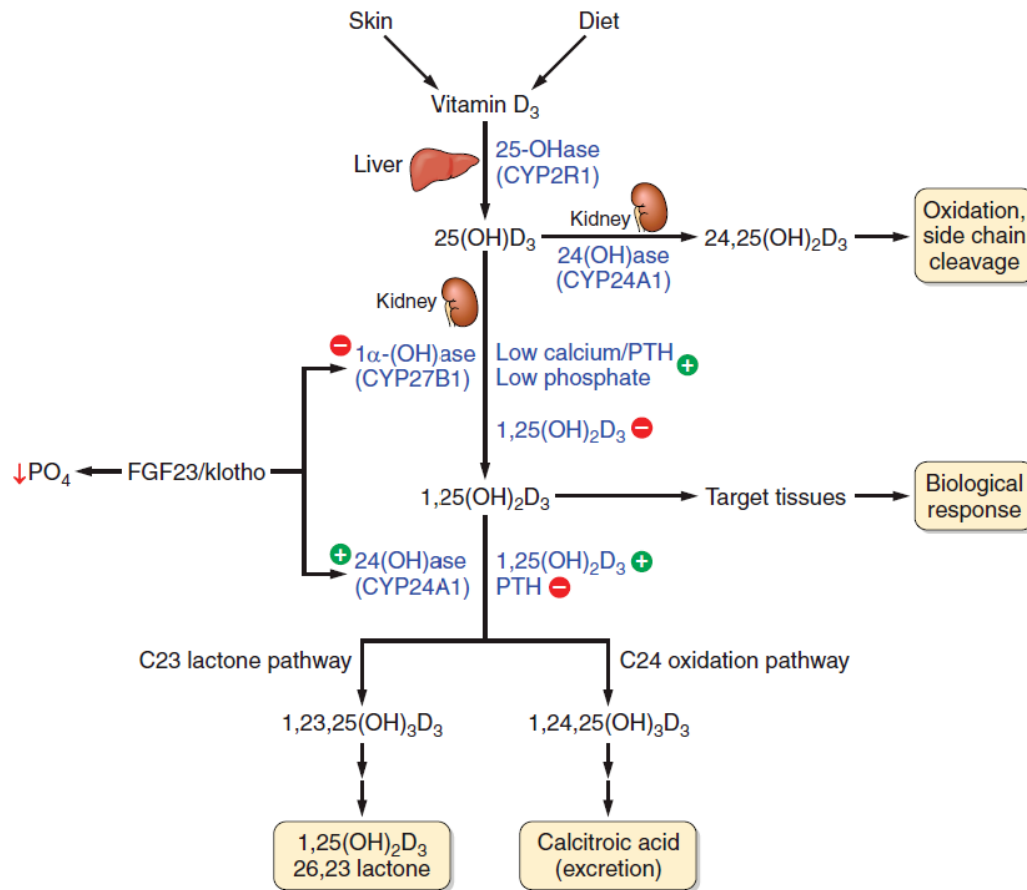
Très peu d'études décrivent le profil d'expression de  $\alpha$ -Klotho au sein du cartilage. Une étude chez le cochon montre que  $\alpha$ -Klotho est exprimé dans la plaque de croissance et le cartilage articulaire à des niveaux d'expression beaucoup plus faibles que dans le rein (Raimann et al., 2013). Une autre étude rapporte des niveaux d'expression faibles dans des chondrocytes primaires murins et dans une lignée cellulaire chondrogénique murine (ATDC5) (Kawai et al., 2013). Une étude récente démontre elle aussi la présence de  $\alpha$ -Klotho dans le cartilage articulaire, chez l'homme cette fois, ainsi qu'une augmentation de son expression dans le cartilage arthrosique (Bianchi et al., 2016). En accord avec ces derniers résultats, plusieurs polymorphismes de  $\alpha$ -Klotho ont été associés à un risque accru de développer de l'arthrose (Zhang et al., 2007; Tsezou et al., 2008).

### 3.2 Les différentes fonctions de la protéine $\alpha$ -Klotho

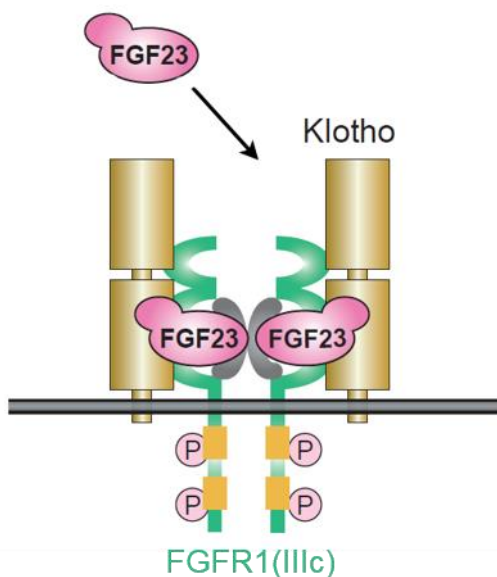
Les formes transmembranaire et soluble semblent avoir des rôles distincts : la forme membranaire a un rôle de régulation du métabolisme phosphocalcique via son rôle de cofacteur du FGF23, alors que la forme soluble agit comme un facteur humoral et active différentes voies de signalisation, notamment les voies liées au vieillissement.

#### 3.2.1 La régulation du métabolisme phosphocalcique

Le rôle de  $\alpha$ -Klotho dans le métabolisme du phosphate via son rôle de cofacteur de FGF23 n'a été découvert qu'après l'observation d'un phénotype similaire entre les souris *kl/kl* et des souris invalidées pour FGF23 (souris *Fgf23*<sup>-/-</sup>) (Shimada et al., 2004 a). De plus, les souris *kl/kl* présentent une hyperphosphatémie, une hypercalcémie et une hypervitaminose D (Tsujikawa et al., 2003). Elles ont des concentrations sériques de FGF23 très élevées, et deviennent résistantes au FGF23 (Urakawa et al., 2006).



**Figure 33 : Métabolisme de la vitamine D.** La vitamine D<sub>3</sub> provenant de l'alimentation ou de la transformation du 7-déhydrocholestérol de la peau par les rayonnements UV, est transportée au foie par la circulation sanguine. Elle est alors hydrolysée par l'enzyme 25-hydroxylase (CYP2R1) formant la 25-hydroxyvitamine D. Celle-ci est ensuite transportée aux reins, et hydroxylée en 1,25-dihydroxyvitamine D, le métabolite actif de la vitamine D, par l'enzyme 1- $\alpha$ -hydroxylase (CYP27B1). Ce métabolite peut aussi être inactivé par hydroxylation par l'enzyme 24-hydroxylase (CYP24A1), afin d'être excrété par le rein (Christakos et al., 2016).



**Figure 34 : Représentation schématique du complexe binaire  $\alpha$ -Klotho-FGFR1c.** La formation de ce complexe est indispensable à l'activation des voies de signalisation du FGF23 (adapté de Urakawa et al., 2006).

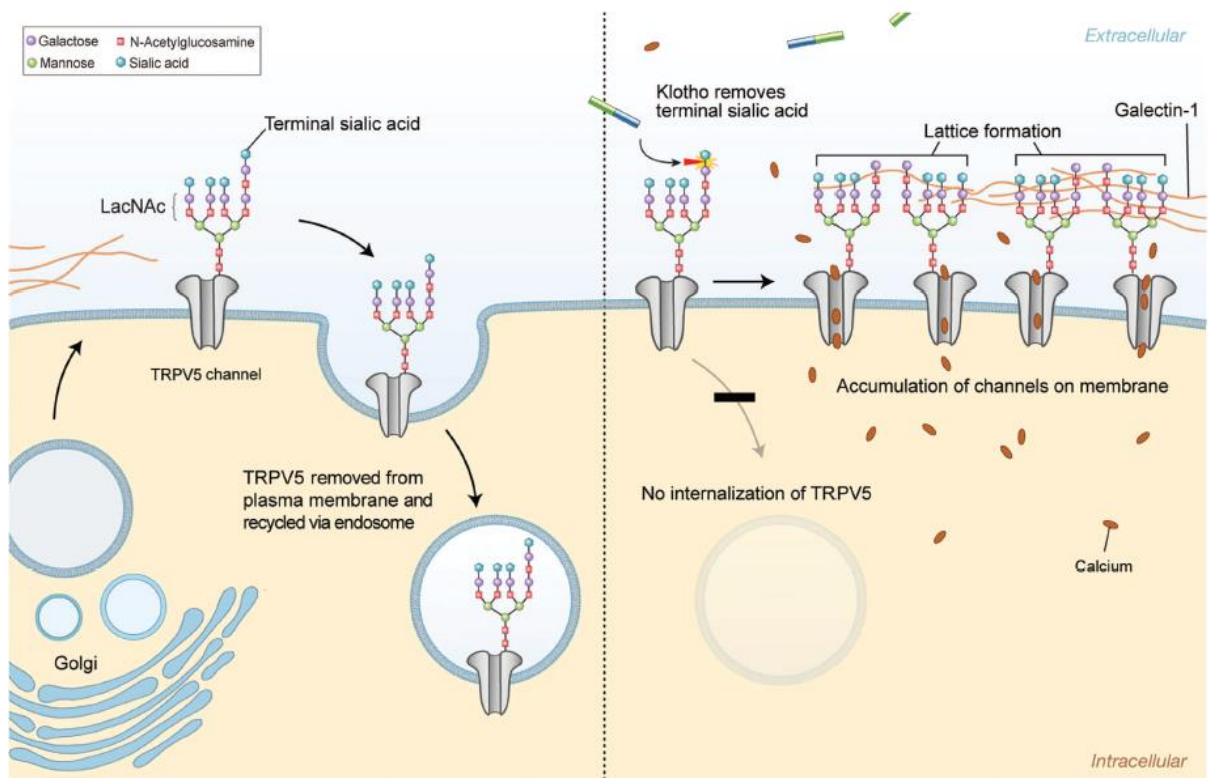
La protéine FGF23 est une hormone produite par les ostéocytes qui régule l'homéostasie du phosphate et de la vitamine D. Elle agit sur le rein pour augmenter l'excrétion de phosphate dans les urines (hormone phosphaturique), via l'inhibition de la protéine NaPi-2a (sodium-phosphate cotransporter type-2a) exprimée au niveau des tubules proximaux (Liu et al., 2007 b). FGF23 inhibe la synthèse de la vitamine D en inhibant l'enzyme CYP27B1 et stimule son catabolisme en induisant l'enzyme CYP24A1 (**Figure 33**) (Shimada et al., 2004 b).

Seul, FGF23 possède une faible affinité pour les récepteurs au FGF (FGFR). Cependant, en présence de  $\alpha$ -Klotho, celui-ci forme un complexe binaire avec différents FGFR (FGFR1c, 3c et 4), qui possède alors une haute affinité pour le FGF23, et permet l'activation des voies de signalisation du FGF23 (**Figure 34**) (Urakawa et al., 2006). Une controverse existe cependant sur la localisation de l'interaction  $\alpha$ -Klotho-FGFR-FGF23 car ce complexe se forme au niveau des tubules distaux, alors que l'effet biologique du FGF23 est majoritairement localisé dans le tubule proximal. Même si des études suggèrent la présence de  $\alpha$ -Klotho dans les tubules proximaux, cette divergence n'est pour le moment pas totalement élucidée.

### 3.2.2 La régulation de canaux ioniques

La protéine  $\alpha$ -Klotho possède aussi un rôle régulateur de différents canaux ioniques à la surface des cellules rénales, de façon indépendante au FGF23. En effet,  $\alpha$ -Klotho régule les canaux TRPV5 (Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 5) et ROMK1 (renal outer medullary potassium channel) (Chang et al., 2005; Cha et al., 2009). Le canal TRPV5 est un canal calcique situé sur la face apicale des cellules tubulaires rénales, et permet la réabsorption du calcium dans le rein ; alors que ROMK1 est un canal potassique permettant la sécrétion de potassium dans les urines.

La protéine  $\alpha$ -Klotho soluble inhibe l'internalisation de TRPV5 et augmente donc le nombre de canaux à la surface, permettant une réabsorption accrue du calcium dans le rein. Ce mécanisme met en jeu l'activité sialidase de  $\alpha$ -Klotho, qui hydrolyse l'acide sialique terminal du canal TRPV5, exposant alors un sucre galactose ou N-



**Figure 35 : Activité sialidase de  $\alpha$ -Klotho.** Les canaux TRPV5 (et ROMK1) sont endocytés en condition physiologique. La forme soluble de  $\alpha$ -Klotho clive l'acide sialique terminal du canal calcique TRPV5 (mais aussi du canal potassique ROMK1) libérant les résidus saccharidiques galactose ou N-acetylglucosamine. Ceux-ci peuvent alors lier une galectine-1, entraînant leur rétention à la membrane (Pavlatou et al., 2016).

acetyllactosamine. Une galectin-1 présente dans l'espace extracellulaire peut alors se lier à ce sucre et former des dimères, permettant la rétention de TRPV5 à la surface (**Figure 35**) (Chang et al., 2005).  $\alpha$ -Klotho régule de la même manière les canaux ROMK1, et induit une augmentation de l'excrétion de potassium dans les urines (Cha et al., 2009).

### 3.2.3 La régulation de différentes voies impliquées dans le vieillissement

En plus de son rôle dans la régulation du métabolisme phosphocalcique, la protéine  $\alpha$ -Klotho interagit avec de nombreuses voies impliquées dans le vieillissement, telles que la voie IGF-1, le stress oxydant, la voie Wnt, la senescence, la voie NF- $\kappa$ B, ainsi que l'autophagie et l'apoptose. De façon intéressante, ces différentes voies sont impliquées dans la physiopathogénie de l'arthrose.  $\alpha$ -Klotho, grâce à ces propriétés anti-vieillescence, pourrait alors représenter une alternative thérapeutique intéressante dans le traitement de l'arthrose.

#### a) La voie de signalisation insuline/IGF-1 et le stress oxydant

Il est actuellement bien admis qu'une inhibition de la signalisation insuline/IGF-1 allonge la durée de vie (Tatar et al., 2003). Or, les souris déficientes en  $\alpha$ -Klotho sont hypoglycémiques, hypo-insulinémiques et ont une sensibilité accrue à l'insuline (Utsugi et al., 2000). A l'inverse, les souris qui surexpriment  $\alpha$ -Klotho sont résistantes à l'insuline et à l'IGF-1, tout en ayant une glycémie normale (Kurosu et al., 2005). Ces données suggèrent un rôle inhibiteur de  $\alpha$ -Klotho sur la voie insuline/IGF-1, qui contribue à son rôle anti-vieillescence. Cependant, les mécanismes impliqués ne sont pour le moment pas clairement élucidés, même s'ils semblent impliquer une inhibition des voies de signalisation de l'IRS (insulin receptor substrate) et du récepteur de l'IGF-1 (IGF-1R) (Kurosu et al., 2005; Wolf et al., 2008; Abramovitz et al., 2011).

Les voies de signalisation de l'insuline et de l'IGF-1 mettent en jeu une cascade de signalisation intracellulaire impliquant la voie PI3K-Akt (protéine kinase B). De façon intéressante, les facteurs de transcription FOXOs (Forkhead box O transcription factors) ont été identifiés comme majeurs dans la transmission du signal provenant de



ces voies (Kenyon et al., 1993; Brunet et al., 1999). En effet, l'activation de la voie l'insuline/IGF-1 entraîne la phosphorylation et donc l'activation de la sérine/thréonine kinase Akt, qui phosphoryle à son tour les FOXOs. Ceux-ci sont alors séquestrés dans le cytoplasme et inactifs (Martins et al., 2016).  $\alpha$ -Klotho, en inhibant la voie insuline/IGF-1, bloque la phosphorylation des FOXOs, et permet donc leur translocation au noyau où ils induisent l'expression de gènes notamment impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN et dans l'élimination des ROS (via les enzymes catalase et superoxide dismutase SOD) (Nagai et al., 2002; Yamamoto et al., 2005; Rakugi et al., 2007). La protéine  $\alpha$ -Klotho est alors décrite comme une protéine qui augmente la résistance au stress oxydatif.

#### b) La voie Wnt et la senescence cellulaire

La voie de signalisation Wnt est essentielle à la prolifération et au maintien des cellules souches (Reya et al., 2003). Néanmoins, une stimulation chronique de la voie Wnt entraîne une dysfonction et une déplétion des cellules souches (Kirstetter et al., 2006; Scheller et al., 2006), entraînant alors le développement de maladies telles que certains cancers. La voie de signalisation canonique de Wnt met en jeu la protéine  $\beta$ -catenin (Willert et al., 1998). Au cours de l'arthrose, la voie Wnt est activée de façon anormale et entraîne la destruction de la MEC cartilagineuse (Blom et al., 2009; Zhu et al., 2009). Plusieurs auteurs ont démontré que  $\alpha$ -Klotho était capable de se lier à différentes isoformes de Wnt, et d'inhiber leur signalisation (Liu et al., 2007 a; Zhou et al., 2013). Zhou et al. montrent de plus que  $\alpha$ -Klotho diminue l'activation de la  $\beta$ -catenin rénale, et améliore alors la fonction rénale (Zhou et al., 2013). La voie Wnt est aussi impliquée dans la formation osseuse (Krishnan et al., 2006), et même si aucun lien n'a été pour le moment fermement établi, l'activité de la voie Wnt a été détectée dans le tibia de souris *kl/kl* (Liu et al., 2007 a), et les anomalies osseuses chez la souris *kl/kl* pourraient être en partie dues à des anomalies de la voie Wnt (Yamashita et al., 1998; Kawaguchi et al., 1999; Suzuki et al., 2008).

Liu et al. démontrent de plus que la voie Wnt est activée de façon anormale chez la souris *kl/kl*, tout comme la SA- $\beta$ -galactosidase, suggérant que l'activation de la voie

Wnt chez la souris déficiente en  $\alpha$ -Klotho pourrait entraîner la senescence des cellules souches (Liu et al., 2007 a). Cette observation a été confirmée dans divers contextes.

En effet, l'inactivation de l'expression de  $\alpha$ -Klotho entraîne une senescence prématurée dépendante de la voie p53/p21 dans des fibroblastes humains (de Oliveira, 2006), alors que l'ajout de  $\alpha$ -Klotho diminue la senescence induite par le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) dans des cellules endothéliales humaines (Ikushima et al., 2006; Maekawa et al., 2011). La voie p16 semble aussi impliquée, car on retrouve cette protéine de manière abondante chez la souris *kl/kl* (Eren et al., 2014), et le croisement de souris invalidées pour p16 (*p16<sup>-/-</sup>*) avec des souris *kl/kl* corrige le phénotype de vieillissement accéléré des souris déficientes en  $\alpha$ -Klotho (Sato et al., 2015).

#### c) L'inflammation et la voie NF- $\kappa$ B

Comme décrit précédemment, la senescence s'accompagne d'un phénotype particulier, le SASP, qui secrète des facteurs pro-inflammatoires, notamment les IL6 et 8. La protéine RIG-I (retinoic-acid-inducible gene-I) a été associée à cette production d'IL-6 et 8 induite au cours de la senescence (Liu et al., 2011). Dans ce contexte, la forme intracellulaire de  $\alpha$ -Klotho a démontré des propriétés inhibitrices de l'activation de RIG-I notamment via la voie NF- $\kappa$ B (Liu et al., 2011; Zeng et al., 2016). En effet, plusieurs études montrent que  $\alpha$ -Klotho inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B dans les cellules endothéliales (Maekawa et al., 2009; Yang et al., 2012; Buendía et al., 2015). Une autre étude montre le rôle protecteur de  $\alpha$ -Klotho sur la production d'IL1- $\beta$ , IL6 et TNF- $\alpha$ , ainsi que l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B induites par le glucose sur des cardiomyocytes dans le contexte de la cardiomyopathie diabétique (Guo et al., 2017). Inversement, l'activation de NF- $\kappa$ B, et donc de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$ , le TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) ou l'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ), diminue l'expression de  $\alpha$ -Klotho (Thurston et al., 2010; Moreno et al., 2011).

#### d) L'autophagie et l'apoptose

Le lien entre  $\alpha$ -Klotho et l'autophagie et l'apoptose a été étudié dans divers contextes, toutefois cette relation reste obscure. La présence d'apoptose a été

démontrée dans le poumon et le cerveau des souris *kl/kl* (Ishii et al., 2008; Shiozaki et al., 2008), ainsi qu'une plus grande sensibilité à un stimulus apoptotique des lymphocytes et érythrocytes chez ces souris (Kempe et al., 2009; Inoue et al., 2013). Les premières études suggérant un effet de  $\alpha$ -Klotho sur l'apoptose datent d'une dizaine d'années, dans le contexte des maladies rénales telles que l'insuffisance rénale ou les lésions d'ischémie/reperfusion rénales, et montrent une diminution de l'apoptose induite dans des cellules rénales *in vivo* et *in vitro* (Mitobe et al., 2005; Sugiura et al., 2005, 2010; Haruna et al., 2007; Panesso et al., 2014). Cet effet protecteur de  $\alpha$ -Klotho sur l'apoptose a aussi été démontré dans les cellules endothéliales (Ikushima et al., 2006; Maekawa et al., 2011), les cellules épithéliales pulmonaires (Ravikumar et al., 2014; Kim et al., 2017) et les cellules bêta du pancréas (Lin et al., 2015).

A l'inverse, d'autres études montrent que  $\alpha$ -Klotho induit l'apoptose des cellules cancéreuses. En effet, les cellules tumorales ont développé des stratégies pour échapper à l'apoptose déclenchée suite à un stress oncogénique (Hanahan et al., 2011). L'utilisation de molécules pouvant stimuler l'apoptose des cellules cancéreuses représente donc une approche prometteuse. De façon intéressante, plusieurs études montrent que  $\alpha$ -Klotho diminue la prolifération et augmente l'apoptose des cellules cancéreuses pulmonaires (Chen et al., 2010, 2012, Wang et al., 2011, 2013). De la même façon, d'autres études soutiennent l'effet pro-apoptotique de  $\alpha$ -Klotho dans d'autres types de cellules cancéreuses, dans le foie, l'estomac ou la thyroïde (Shu et al., 2013; Xie et al., 2013; Sun et al., 2015; Dai et al., 2016).

D'autre part, une augmentation du nombre de structures autophagiques ainsi que de l'expression du marqueur LC3 a été détectée dans le cerveau ainsi que dans les muscles masséter et de la langue des souris *kl/kl* (Shiozaki et al., 2008; Iida et al., 2011). De la même manière que pour l'apoptose, le rôle de  $\alpha$ -Klotho sur l'autophagie est double. Dans certains types de cancer, l'induction de l'autophagie serait un moyen de détruire les cellules cancéreuses (White et al., 2015). Des études ont d'ailleurs montré une augmentation de l'autophagie *in vitro* dans les cancers de l'estomac et du foie suite à la surexpression de  $\alpha$ -Klotho (Shu et al., 2013; Xie et al., 2013).

En revanche, certaines études montrent au contraire un effet inhibiteur de  $\alpha$ -Klotho sur l'autophagie, dans l'épithélium artériel (Chen et al., 2015) ou dans les macrophages alvéolaires (Li et al., 2017 b), laquelle a été associée à la rigidification des artères et la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) liée à la fumée de cigarette (Chen et al., 2008).

A l'inverse, une étude montre un rôle de la voie mTOR dans la régulation de l'expression de  $\alpha$ -Klotho dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Zhao et al., 2015). En effet, l'inhibition de mTOR par la rapamycine induit une augmentation de l'expression de  $\alpha$ -Klotho, alors qu'une induction de mTOR inhibe  $\alpha$ -Klotho. De plus, en absence de  $\alpha$ -Klotho, l'effet bénéfique de la rapamycine sur la diminution de la calcification des vaisseaux est abrogé, suggérant un rôle critique de  $\alpha$ -Klotho dans la voie mTOR dans la régulation des calcifications vasculaires.

Pour conclure sur cette partie, la protéine  $\alpha$ -Klotho semble donc avoir un rôle majeur dans les voies du vieillissement cellulaire. Elle semble avoir un rôle clé dans l'inhibition du stress oxydant, de l'inflammation ainsi que de la mort cellulaire. Dans la littérature, son rôle a été étudié dans une multitude de contextes différents, et il en ressort un effet global bénéfique de ce facteur sur la santé.

## **OBJECTIFS DE LA THESE**

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

1) Evaluer l'effet d'un mélange de molécules naturelles, caractérisées précédemment pour leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes ou pro-anaboliques, sur le développement de l'arthrose liée au vieillissement *in vivo* chez la souris.

- ↳ Pour cela, nous avons tout d'abord développé une approche non-invasive pour évaluer l'arthrose *in vivo* chez la souris, dans un modèle d'arthrose spontanée liée à l'âge. Celle-ci combine une analyse structurale de l'articulation par radiographie, à une analyse fonctionnelle de la démarche des souris.
- ↳ L'effet de ce traitement a ensuite été évalué *in vitro* dans un modèle qui mime le contexte arthrosique dans les chondrocytes articulaires. Puis, il a enfin été testé *in vivo* chez la souris grâce aux méthodes d'analyse développées précédemment.

**Article 1 : Assessment of osteoarthritic damages in aging mice following nutraceutical supplementation using a combination of gait and radiographic analyses**

2) Evaluer, d'un point de vue plus fondamental, l'effet de la molécule anti-vieillessement  $\alpha$ -Klotho dans l'arthrose liée à l'âge, et notamment son effet sur les mécanismes de mort des chondrocytes.

- ↳ Pour cela, nous avons évalué l'expression de  $\alpha$ -Klotho et des marqueurs d'autophagie dans le cartilage articulaire de souris vieillissantes, que nous avons corrélé au score d'arthrose de ces souris. Nous avons, de plus, évalué le phénotype articulaire de souris invalidées pour le gène  $\alpha$ -Klotho, et nous sommes intéressés plus particulièrement à l'autophagie et l'apoptose dans le cartilage.
- ↳ *In vitro*, nous avons étudié le rôle de  $\alpha$ -Klotho sur l'autophagie et l'apoptose dans des chondrocyte articulaires murins, en condition basale et en condition pathologique suite à un stress.

**Article 2 : Involvement of the anti-aging protein Klotho in chondrocyte autophagy and apoptosis during osteoarthritis**

## **RESULTATS EXPERIMENTAUX**



## **ARTICLE 1 : Assessment of osteoarthritic damages in aging mice following nutraceutical supplementation using a combination of gait and radiographic analyses**

### **Problématique**

Comme nous l'avons décrit dans la partie introductive, un lien fort existe entre arthrose et vieillissement. Face à l'absence de traitements efficaces, différentes stratégies sont actuellement en développement, dont l'utilisation de molécules naturelles anti-oxydantes. Or, bien que les effets de ces molécules soient relativement bien décrits dans des modèles *in vitro*, peu d'études chez l'animal ont été réalisées. De plus, la majorité de ces études évaluent l'effet d'un composé de manière isolée. L'objectif de cette première étude a été double. Le premier objectif a été de combiner 3 molécules naturelles dont les propriétés ont déjà été décrites de manière isolée, et tester la capacité de ce mélange nutraceutique à ralentir la progression de l'arthrose. Le deuxième objectif visait à proposer une méthode d'évaluation de l'arthrose *in vivo* pouvant se substituer aux méthodes invasives actuellement utilisées. En effet, la méthode de référence qu'est l'histologie est non seulement invasive et destructrice, mais ne permet pas de réaliser de suivi longitudinal. Ainsi nous proposons dans cette étude une méthode d'évaluation non invasive de l'arthrose, que nous avons appliquée dans un second temps à l'évaluation de l'effet du mélange nutraceutique chez la souris vieillissante.

### **Méthodologie**

*In vitro* : L'effet du mélange composé d'un extrait de thé vert, de collagène hydrolysé et de chondroïtine a été évalué dans des chondrocytes articulaires de lapin stimulés par l'IL1- $\beta$ . L'expression des marqueurs chondrogéniques (agrécan, collagène de type II), la production de PGE<sub>2</sub> et de NO, ainsi que l'expression de iNos, COX-2 et MMP13 ont été déterminées en présence ou non d'IL1- $\beta$ . La production de MEC a été évaluée par coloration au Bleu Alcian.

*In vivo* : Une analyse histologique a été réalisée afin de valider les techniques non invasives utilisées pour évaluer l'arthrose chez des souris C57BL/6 âgées de 18 mois,

décrites pour développer une arthrose spontanément avec l'âge. La progression de l'arthrose a été appréciée par radiographie et analyse de la démarche (système CatWalk®). Après avoir validé ces méthodes, des souris de 18 mois ont été traitées par le mélange nutraceutique composé d'un extrait de thé vert, de collagène hydrolysé et de chondroïtine par voie orale pendant 4 mois. Des enregistrements radiographiques et de la démarche ont été réalisés au début du traitement puis tous les mois pendant 4 mois.

### Résultats

*In vitro* : Le traitement des chondrocytes primaires par le cocktail de molécules induit une augmentation de l'expression de l'agrécan et du collagène de type II en culture, associée à une production de GAG exacerbée. De plus, il induit une diminution de la production de PGE<sub>2</sub>, ainsi que de l'expression de iNos, COX-2 et MMP13 induites par l'IL1-β. Ceci démontre que le cocktail possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-cataboliques *in vitro*.

*In vivo* : Dans un premier temps, nous montrons qu'au cours du vieillissement de la souris, le score radiologique d'arthrose augmente progressivement, de même que des anomalies de la démarche des souris, démontrant qu'il est possible de réaliser un suivi longitudinal de l'arthrose chez la souris par des méthodes non invasives. Ces résultats sont en corrélation avec des analyses histologiques que nous avons réalisées en parallèle montrant une augmentation graduelle du score histologique d'arthrose. De plus, en utilisant cette approche non invasive, nous observons une diminution significative des scores radiologiques et des paramètres de la démarche après 4 mois de traitement par le mélange nutraceutique suggérant un potentiel pour ralentir la progression de l'arthrose.

**Ces travaux sont actuellement en cours de révision dans la revue Scientific Reports.**

# Assessment of osteoarthritic damages in aging mice following nutraceutical supplementation using a combination of gait and radiographic analyses

Elodie Le Tilly<sup>1,2</sup>, Vincent Hivernaud<sup>1,2</sup>, Sophie Sourice<sup>1,2</sup>, Jérôme Abadie<sup>3</sup>, Jérôme Guicheux<sup>1,2,4,+</sup> and Laurent Beck<sup>1,2,+,\*</sup>

## **Author affiliations:**

<sup>1</sup> INSERM, U1229, RMeS, Nantes, F-44042, France

<sup>2</sup> Université de Nantes, UMR\_S1229, RMeS, UFR Odontologie, Nantes, F-44042, France

<sup>3</sup> Animal cancers as Models for Research in comparative Oncology (AMaROC), ONIRIS, Nantes, F-44307, France

<sup>4</sup> CHU Nantes, PHU 4 OTONN, Nantes, F-44042, France

+ Equally contributing authors

\* Corresponding author:

Laurent Beck, Ph.D.

INSERM U1229-RMeS

Faculté de Chirurgie Dentaire

1, place Alexis Ricordeau

44042 Nantes cedex 1

E-mail: [laurent.beck@inserm.fr](mailto:laurent.beck@inserm.fr)

The histological analysis of the joints enables an accurate evaluation of OA progression and severity. However, this approach is an invasive and time-consuming process requiring a high number of animals, while remaining poorly relevant to the clinical practice. Here, we combined radiographic imaging of the knee and functional gait analysis to overcome those limits. We showed that this approach can be compared to a histological assessment and be used for the accurate monitoring of OA severity and progression in 6- to 22-month-old C57BL/6 male mice. In addition, with the aim to further validate this approach and to propose alternative therapeutic approaches with potential long-term health benefits, we investigated the effect of a nutraceutical cocktail composed of green tea extract, chondroitin sulfate and collagen hydrolysate. *In vitro*, this cocktail exerted anti-inflammatory and chondro-protective effects in IL1- $\beta$  treated primary articular chondrocytes. *In vivo*, the nutraceuticals prevented the increase in the radiological OA score and gait disturbances when administrated during 4 months to 18-month-old C57BL/6 male mice. In summary, this study proposes alternative OA assessment and prevention approaches enabling longitudinal studies more closely mimicking the clinical practice

## **Introduction**

Osteoarthritis (OA) is a chronic affection that has long been considered a disease of the cartilage, but is now defined as a whole joint disease<sup>1</sup>. It is characterized by a progressive destruction of articular tissues during aging including a gradual disappearance of articular cartilage, a remodeling and sclerosis of the subchondral bone and the formation of osteophytes. These alterations are associated with synovial inflammation and pain which are one of the major causes of incapacity in OA patients<sup>2</sup>. In human clinical practice, the diagnosis of OA is based both on functional symptoms such as chronic joint pain and restriction of motion, and a radiographic evaluation of the joint<sup>3</sup>. In preclinical studies, histological analyses are widely used as the gold standard approach for the evaluation of OA progression and severity, enabling accurate quantification of the joint lesions. However, this approach is a time-consuming, laborious and invasive process requiring a high number of animals, and remains poorly relevant for translating preclinical data to a clinical context.

To overcome those limits, imaging techniques such as radiography<sup>4-6</sup>, micro-Magnetic Resonance Imaging<sup>7</sup> and *in vivo* micro-computed tomography<sup>8</sup> have started to emerge as non-invasive OA assessment methods for small animal models. These non-invasive approaches have the potential to generate relevant and comprehensive data at the tissue level that would more closely mimic clinical practice. However, since discordances between structural alterations and symptoms have been described<sup>9</sup>, the monitoring of the functional consequences of OA using gait analysis<sup>10</sup>, would strengthen this approach. In this context, we have set up here a non-invasive OA assessment method using a combination of radiographic imaging and gait analysis to monitor OA severity and progression in aging C57BL/6 mice. We show that our non-invasive method could be used in place of a histological evaluation of OA during aging, with the advantage of allowing longitudinal studies and the use of a reduced number of animals.

Moreover, the development of non-invasive methods as alternative approaches to invasive techniques parallels the need of replacing commonly used OA therapeutic approaches that are associated with short-term health benefits and negative side effects (gastro-intestinal mostly) in long term use<sup>11</sup>. In addition, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which are the most widely prescribed drugs during OA in humans, are mainly reducing the symptoms of OA, such as inflammation or pain, without providing long-term benefits. Interestingly, the use of natural molecules derived from food sources is now emerging as a new therapeutic strategy for OA, providing long-term rather than short-term health benefits<sup>12</sup>. Among others, the epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a polyphenol present in green tea, has demonstrated powerful anti-inflammatory and anti-catabolic properties, both *in vitro*<sup>13,14</sup> and *in vivo*<sup>15</sup>. On the other hand, collagen hydrolysate and chondroitin sulfate have shown interesting properties allowing the maintenance of cartilage matrix integrity<sup>16-18</sup>.

Therefore, with the aim to propose a non-invasive approach for OA assessment and treatment in small animals, we used our optimized non-invasive evaluation of OA to evaluate the combined anti-inflammatory properties of the green tea polyphenol together with the pro-chondrocytic and anti-catabolic properties of collagen hydrolysate and chondroitin sulfate<sup>19,20</sup> *in vivo*.

## **Results**

**Non-invasive assessment of OA during aging using radiographic imaging and gait analysis.** We performed a radiological evaluation of the knees from 6, 10, 18 and 22-month-old C57BL/6 mice. To score the images, we established an updated radiological scoring system (Table 1) based on previously published studies<sup>5,6,21,22</sup>. This optimized scoring scale allows the evaluation of previously underestimated parameters, such as meniscal calcification. Representative radiological images of knees corresponding to increasing radiological score are shown on Figure 1A. A dramatic decrease in low 0-1 radiological scores from 6 to 22 months was observed, together with an increase in medium 2-3 scores (Figure 1B). The proportion of high 4-5 and 6-7 scores increased at 18 months and, even more so, at 22 months of age. Severe radiological scores of 8-10 were detected only at 22 months of age (Figure 1B). Interestingly, the progression of the different criteria showed that the surface of the menisci (M) was considerably increased during aging, whereas the joint space narrowing (JSN) was only slightly modified during OA progression (Figure 1C). These results were compared to OARSI scoring using conventional histological analyses. Representative images of histological sections of Safranin-O-stained articular cartilage (Figure 1D) illustrate cartilage fibrillations as well as loss of Safranin-O staining during aging. This translated into an increased OARSI histological score after 10 months of age (Figure 1E), a result similar to the observations made using radiological images. Next, we evaluated the possible correlation between structural alterations and functional symptoms using gait analysis on the same C57BL/6 aging mice cohort (Figure 1F). The CatWalk® analysis software generated a wide range of parameters from which two were extracted: “Max Intensity At”, which decreased with age, and “Max Contact At”, which increased with age. “Max Intensity At” was significantly lower in 18 and 22-month-old mice as compared to 6-month-old mice, whereas “Max Contact At” was significantly higher in 22-month-old mice, compared to 6-, 10- and 18-month-old mice. “Max Contact At” represents the



point at which the braking phase turns into the propulsion phase relative to Stand of a paw (the stand phase is the phase of contact of a paw with the glass plate), while “*Max Intensity At*” represents the time when the maximum intensity is measured relative to Stand. In other words, paws from aged mice stayed longer in contact with the plate and with more intensity.

**Assessment of a nutraceutical cocktail on primary chondrocytes phenotype.** In line with our aim to provide non-invasive approaches for OA assessment and treatment, we next sought to investigate the effect of a cocktail of known molecules extracted from natural sources on OA progression, using the above non-invasive assessment method. Combining the known anti-inflammatory properties of EGCG, and the effect of collagen hydrolysate and chondroitin sulfate on cartilage matrix maintenance, we first investigated the effect of this cocktail on primary articular chondrocytes *in vitro*. As shown on Figure 2A, a 14-days treatment with this cocktail resulted in a stronger Alcian Blue staining than untreated cells. Although this method detecting glycosaminoglycan (GAG) is not quantitative, this result was consistent with the significant increase of the expression of cartilage-specific markers aggrecan, type II collagen and Sox9 (Figure 2B). Consistently, the expression of type X collagen was not detected, type I collagen expression was not influenced by the treatment and the expression of the marker of matrix degradation Mmp13 was decreased in cocktail-treated cells (Figure 2B). Altogether, these data illustrated a chondro-protective effect of the nutraceutical cocktail. We next evaluated whether this cocktail could antagonize the effects of IL1- $\beta$ , a key mediator of inflammation during OA. As expected, IL1- $\beta$  treatment resulted in an increase of Mmp13, iNos and Cox2 expression (Figures 2C, 2D and 2E), as well as NO and PGE<sub>2</sub> production (Figures 2F and 2G). When cells were pre-treated with the nutraceutical cocktail, the expression of Mmp13 and Cox2 were significantly decreased (Figures 2C and 2E). The decrease in Cox2 expression correlated with a dramatic inhibition of PGE<sub>2</sub> secretion (Figure 2G). Although iNos expression was not influenced by the cocktail treatment in our experimental conditions (Figure 2D), a

significant decrease of NO production was measured in cocktail-treated cells (Figure 2F). Altogether these data supported an anti-inflammatory and anti-catabolic role of this cocktail *in vitro* suggesting a possible beneficial effect on OA *in vivo*.

**Non-invasive assessment of OA progression in cocktail-treated aging mice.** To assess the *in vivo* effect of the cocktail on OA progression, 18-months old C57BL/6 mice were fed with a cocktail-enriched diet or a regular chow during 4 months. As shown in Figure 3A, after 4 months the mean radiological score of the untreated group of mice was significantly increased (Figure 3A), indicating a worsening of the disease. In contrast, the mean radiological score of cocktail-treated mice did not change (T=0 vs T=4 months in cocktail-treated mice), suggesting that the cocktail treatment had slow down the progression of OA. Consistent with this hypothesis, the mean radiological score of treated mice after 4 months of treatment was significantly lower than the one of untreated mice (Figure 3A). The analysis of individual radiological scores showed a decrease in low 0-1 scores in control mice, together with an increase of high 6-7 and 8-10 radiological scores after 4 months (Figure 3B). Conversely, no differences were seen in the distribution of radiological scores from cocktail-treated mice (Figure 3B). In addition, when analyzing the different criteria used to generate the radiological scoring, an increase in the size of the menisci (M) and in the number of calcifications (C) and osteophytes (OF) were noted in control mice after 4 months, whereas smaller modification of these parameters were apparent in treated mice (Figure 3C).

When analyzing the gait parameters using the CatWalk® system, we first verified the absence of differences between untreated and treated mice at the beginning of the study (T=0) for both parameters evaluated (figures 4A and B). After 4 months of treatment, the effect of the cocktail showed no statistical differences on the “Max Intensity At” parameter compared to untreated mice (Figure 4A). On the other hand, the “Max Contact At” parameter significantly increased in the control group, whereas this parameter did not significantly increased in the

cocktail-fed group after 4 months of treatment (Figure 4B). Consistently, the “Max Contact At” parameter was significantly different in 22-month-old control and cocktail-treated mice (Figure 4B).

## **Discussion**

Monitoring OA progression in small animal preclinical studies often use invasive approaches such as histological analyses of the knee. In this study, we demonstrated that OA progression in mice can be monitored using a non-invasive approach using both radiology and gait analysis, which are used in clinical practice. We also illustrated that this method could be used to assess the effect of a cocktail of nutraceutical supplements on age-related progression of OA.

The etiology of OA being multifactorial and still incompletely understood, there is no optimal animal model for OA<sup>23</sup>. Several well-described methods of OA induction are being used, such as chemical induction, which provokes mainly a local inflammation, or surgical induction, which results in severe grades of OA, or genetically modified animals<sup>24</sup>. These post-traumatic models of OA do not recreate the natural development of the disease. In aging mice from the C57BL/6 strain, the spontaneous development of the disease is progressive and more closely recapitulates the natural development of OA as seen in human during aging<sup>25</sup>. Indeed, it has been shown that about 80% of mice from this strain develop osteoarthritis when they reach 18 months of age, and almost all of them become affected before they die<sup>25</sup>. Moreover, most current preclinical studies use histological analyses to evaluate potential new therapies, which is a time-consuming and laborious technique, and cannot be used in the human clinical context. Interestingly, non-invasive techniques allowing a longitudinal analysis of OA in animal models are emerging, such as imaging techniques (radiography<sup>4-6</sup>, micro-Magnetic Resonance Imaging<sup>7</sup>, *in vivo* micro-computed tomography<sup>8</sup>), or gait analysis with different devices, such as the CatWalk® or the TreadScan®<sup>10,26,27</sup>. Because they allow a longitudinal assessment of the disease in the same animal, they have the major advantage of decreasing the number of animal needed in preclinical studies and re-create conditions close to the human clinical practice.

Very few preclinical studies using radiographic analysis in osteoarthritis have been published in mice. Among them, radiological OA has been studied in STR/Ort mice, which is a genetically-modified strain developing osteoarthritis at an early stage<sup>21,22,28</sup> ; and one study has shown a positive correlation between histopathological and radiological scores of OA in C57BL/6 mice<sup>5</sup>. Indeed, Pataki *et al.* showed that the size of the menisci on radiographic images is positively correlated with the histological score of OA. Our present study is in line with this earlier observation and extends further in establishing a radiological score enabling to take into account the enlargement of the menisci, the sub-chondral sclerosis, the joint space narrowing and the presence of tendon calcification or osteophytes. Furthermore, we confirmed that in the C57BL/6 mouse model of OA, the evaluation of meniscus surface is a valuable tool for discriminating the grades of OA severity. Meanwhile, this technique still requires high-precision and high-definition radiographic devices in order to be used in small animal studies. Indeed, in this study we show that JSN, one of the major criterion used in the radiological diagnosis of OA in clinical practice, does not appear to be modified during OA progression. This may be explained by the difficulty to precisely assess a reduction of this parameter in the mouse joint space using radiology.

In addition to non-invasive imaging techniques used for OA evaluation, the functional analysis of animal gait has been developed, especially with the use of the CatWalk® system. Initially, the CatWalk® was used in the field of neurology, to monitor functional consequences of spinal cord or sciatic nerve injuries, ischemic stroke or Parkinson's disease<sup>29</sup>. It has recently been used to objectively quantify gait in rodent models of arthritis, which is characterized by joint inflammation resulting in a limping gait<sup>30</sup>. The CatWalk® system is now being used to assess disturbances in locomotion in small animals, particularly in osteoarthritis<sup>31-33</sup>. Similar to our results, Zhen *et al.*<sup>34</sup> have recently illustrated a change in the "Max Contact At" parameter in a model of Anterior Cruciate Ligament Transection (ACLT), prevented by TGF- $\beta$  injection in sub-chondral bone. Muramatsu *et al.*<sup>35</sup> recently showed changes in different gait parameters,

such as the swing speed, the duty cycle or the duration of the stance phase, in the Destabilization of the Medial Meniscus (DMM) model of OA in mice, but failed to detect an amelioration of these parameters following hyaluronan injection. These studies confirm the usefulness of this technique in following OA progression in rodents. Our study pointed out that, even though many parameters can be analyzed with the CatWalk®, very few of them have been showed to be modified in this pathological model. The parameters “Max Contact At” and “Max Intensity At” showed interesting results by suggesting that paws from aged mice stay longer in contact with the plate and with more intensity, more likely revealing a true gait disturbance rather than a pain of the animals, which would have been translated in shorter and more superficial contact of the paw with the plate.

Using this non-invasive analysis method of OA progression, we also showed that a 4-month diet supplementation with a cocktail of nutraceutical compounds had beneficial effects on OA progression. Even though the radiological score worsens in the untreated group of aging mice, this progression was prevented in the cocktail-treated group. Similarly, the “Max Contact At” gait parameter was also improved, although the “Max Intensity At” was not. As the “Max Contact At” parameter is likely to be affected in later stages of OA whereas the “Max Intensity At” would be affected in earlier stages, this may indicate that the cocktail may have a beneficial effect on functional parameters only once OA is well established. Another possibility would be that a longer treatment by the cocktail (more than the 4-month study performed here), or a treatment given earlier, may be necessary to reveal more drastic functional differences with the CatWalk®.

In conclusion, our study illustrates that OA progression during aging can be efficiently monitored using a combination of non-invasive imaging and functional approaches in a small animal model. This non-invasive and longitudinal approach may therefore have the potential to replace invasive pre-clinical histological analyses while improving the clinical relevance of OA evaluation. In addition, a promising preventive approach to slow down the progression of the

disease was presented, reinforcing the rationale for the potential use of food-derived nutrients in OA management<sup>36,37</sup>.



## **Methods**

**Ethical considerations in animal procedures.** All animal experiments were approved by the Animal Care Committee of Pays de la Loire and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (Agreement no. 00035.01) and were conducted in accordance with the European's guidelines for the care and use of laboratory animals (2010/63/UE). Mice and rabbits were housed in the animal facility of Nantes faculty of Medicine (Agreement no. D44-015).

**Animals.** C57BL/6 male mice (Charles River Laboratories, France) were housed with free access to food and water and a 12h/12h light/dark cycle. For radiographic imaging and gait analysis, three groups of mice were used: one group of fifteen 6-month-old mice (group 1) and two groups of fifteen 18-month-old mice (group 2 and 3). Recordings were made at the beginning of the study and 4 months later, generating data for 6-, 10-, 18- and 22-month old mice. The validation of the radiological and gait methods was performed using mice from group 1 and 2, which were fed standard diet (RM1 diet, SDS, DIETEX, France). The in vivo assessment of the nutraceutical cocktail was performed using mice from group 3 that were fed the RM1 diet enriched with a green tea extract (300 mg/kg) (Naturex, France), collagen hydrolysate (1000 mg/kg) (Fortigel®, Gelita, Germany) and chondroitin sulfate (200 mg/kg) (Bioiberica, Spain). The control group was group 2, fed with unmodified RM1 diet. Food intakes as well as mice weight were monitored for all experiments. Histological analysis of the knees were performed on additional 6-, 10-, 18- and 22-months old mice (n=3) fed a standard RM1 diet. Primary articular chondrocytes were obtained from 7-week-old New Zealand white rabbits (Hypharm, France) that were housed with free access to food and water and a 12h/12h light/dark cycle. They were euthanized after general anesthesia, and the shoulders, knees and femoral heads were harvested aseptically.

**Histological study.** Mice were sacrificed by carbon dioxide inhalation to harvest hind limbs. Limbs were fixed in 4% paraformaldehyde and decalcified with Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) 0.5M pH=8 at 27°C for approximately 130h in a microwave tissue processor (KOS microwave, Milestone, Italy). Then, they were embedded in paraffin and cut in 5 µm sections and stained using Safranin-O. The severity of OA was evaluated blindly by two independent readers using the Osteoarthritis Research Society International (OARSI) scoring system<sup>38</sup>. The severity of OA lesions was scored using parameters such as chondrocyte death, hypertrophy, clusters, loss of Safranin-O staining and surface alteration. Scoring was performed at different levels of the joint on at least two joint regions for each sample.

**Radiographic imaging.** Radiographic pictures of the hind legs (antero-posterior and lateral views) were taken using a MX-20 DC-12 device (Faxitron Bioptics LLC, Arizona, USA). Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg). Animals were placed in the apparatus and pictures were taken using the following settings: 26 kV, 7 seconds of exposure and a 3x magnification. Using a blind procedure, two readers scored the radiographic severity of OA from each sample using multiple graded criteria summarized in Table 1, which was adapted from earlier published work<sup>5,6,21,22</sup>. The following characteristics were evaluated: surface area of medial and lateral menisci (M), number of visible osteophytes (OF), subchondral bone sclerosis (SS), joint space narrowing (JSN) and the presence of calcifications (C) within the joints. Each criterion was assigned a score from 0 to 2, and the sum of all 5 parameters was then scored from 0 to 10. The radiographic scoring was established as follows: 0-1=normal, 2-3=mild, 4-5=moderate, 6-7=severe and 8-10=extreme (Table 1).

**Gait analysis.** Gait analysis was performed using the CatWalk® system (Noldus Information Technology, the Netherlands). This system consists of a walkway equipped with a

glass floor enlightened with a LED lamp, a high frequency video camera placed underneath the glass floor and a recording and analysis software (CatWalk XT® 10). Each mouse was allowed to walk freely from one side of the walkway to the other. At each contact of the paw with the glass plate, the LED light was reflected down through the glass floor and recorded by the camera. Reliable recordings (speed duration lower than 5 seconds, speed variation lower than 60%) were obtained by training mice daily to cross the walkway for 7 days, before the actual gait recording. A minimum of three compliant runs were selected and analyzed at each time point.

**Chondrocyte culture.** The rabbit articular cartilage was removed, cut into small slices and digested as previously described<sup>39,40</sup>. The obtained rabbit articular chondrocytes (RAC) were then cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FCS, glutamine and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Life Technologies, Switzerland) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Chondrocytes were plated in 96-well plates (10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>) for nitric oxide (NO), and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) determinations, and in 6-well plates (3x10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>) for RNA extraction and Alcian blue staining. One day after seeding, the medium was replaced with fresh medium containing the cocktail, composed of 250 µg/ml of green tea extract, 0.5 mg/ml of collagen hydrolysate and 200 µg/ml of chondroitin sulfate for 24 hours. IL1-β (10 ng/ml) (Merck Millipore, USA) was then added for an additional 24 hours for further analyses.

**NO and PGE<sub>2</sub> production measurements.** The conditioned media recovered from rabbit articular chondrocytes cultures pre-incubated with or without the cocktail, and treated or not with IL1-β (10 ng/ml), were used to determine NO and PGE<sub>2</sub> production, as per manufacturer's instructions. NO production was estimated spectrophotometrically by measuring the accumulation of nitrites in the culture supernatants by Griess reaction using a

standard curve prepared with sodium nitrite (Cayman Chemicals, Bertin Pharma, France). PGE<sub>2</sub> production was estimated using an Enzyme Immunoassay kit (Cayman Chemicals, Bertin Pharma, France).

**RNA isolation and real-time PCR.** Total RNA was extracted from chondrocytes using the NucleoSpin® RNA II kit (Macherey-Nagel, France), as per manufacturer's instructions. RNA was retro-transcribed with SuperScript III (Life Technologies) and real-time polymerase chain reaction (rt-PCR) was performed with SYBR Select mix (Life Technologies) to quantify the relative gene expression using GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) as a reference gene. The primer sequences used in this study are reported in Table 2.

**Alcian blue staining.** After 14 days of treatment with basal or cocktail-enriched medium, chondrocytes were washed twice with Phosphate Buffered Saline (PBS) (Gibco, Life Technologies, Switzerland), and fixed with 100% ethanol for 20 minutes at -20°C. Cells were rinsed with distilled water, then stained with 0.1% Alcian blue (in HCl 0.1M) at room temperature overnight. The stain was then removed and cells were rinsed with HCl 0.1M for 1 hour and pictures were taken.

**Statistical analysis.** Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 7®, using either an analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison *post hoc* test, or Student's unpaired t-test, with Welch correction when variances were significantly different. Non-parametric Mann and Whitney t-test was used for the *in vitro* analysis. Each *in vitro* experiment was performed at least two times in triplicates. Data are presented as the mean value ± SEM. *P* values less than 0.05 were considered significant and exact *P* values were given for each graph.

## References

1. Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R. & Goldring, M. B. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* **64**, 1697–1707 (2012).
2. Buckwalter, J. A. & Martin, J. A. Osteoarthritis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 150–167 (2006).
3. Bijlsma, J. W. J., Berenbaum, F. & Lafeber, F. P. J. G. Osteoarthritis: An update with relevance for clinical practice. *Lancet* **377**, 2115–2126 (2011).
4. Walton, M. Degenerative joint disease in the mouse knee; radiological and morphological observations. *J. Pathol.* **123**, 97–107 (1977).
5. Pataki, A., Reife, R., Witzemann, E., Graf, H. P. & Schweizer, A. Quantitative radiographic diagnosis of osteo-arthritis of the knee-joint in the C57BL mouse. *Agents Actions* **29**, 201–209 (1990).
6. Pataki, A., Fries, R., Ochsner, K. & Witzemann, E. Qualitative radiographic diagnosis of osteo-arthritis of the knee joint in the C57BL mouse. *Agents Actions* **22**, 123–130 (1987).
7. Goebel, J. C. *et al.* In vivo high-resolution MRI (7T) of femoro-tibial cartilage changes in the rat anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis: a cross-sectional study. *Rheumatology* **49**, 1654–1664 (2010).
8. Mohan, G. *et al.* Application of in vivo micro-computed tomography in the temporal characterisation of subchondral bone architecture in a rat model of low-dose monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **13**, R210 (2011).
9. Hannan, M. T., Felson, D. T. & Pincus, T. Analysis of the discordance between radiographic changes and knee pain in osteoarthritis of the knee. *J. Rheumatol.* **27**, 1513–1517 (2000).
10. Parvathy, S. S. & Masocha, W. Gait analysis of C57BL/6 mice with complete Freund's

- adjuvant-induced arthritis using the CatWalk system. *BMC Musculoskelet. Disord.* **14**, 14 (2013).
11. Coxib and traditional NSAID Trialists' (CNT) Collaboration. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *Lancet* **382**, 769–779 (2013).
  12. Ameye, L. G. & Chee, W. S. S. Osteoarthritis and nutrition. From nutraceuticals to functional foods: a systematic review of the scientific evidence. *Arthritis Res. Ther.* **8**, R127 (2006).
  13. Ahmed, S., Wang, N., Lalonde, M., Goldberg, V. M. & Haqqi, T. M. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) differentially inhibits interleukin-1beta-induced expression of matrix metalloproteinase-1 and -13 in human chondrocytes. *J. Pharmacology Exp. Ther.* **308**, 767–773 (2004).
  14. Akhtar, N. & Haqqi, T. M. Epigallocatechin-3-gallate suppresses the global interleukin-1beta-induced inflammatory response in human chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* **13**, R93 (2011).
  15. Leong, D. J. *et al.* Green tea polyphenol treatment is chondroprotective, anti-inflammatory and palliative in a mouse post-traumatic osteoarthritis model. *Arthritis Res. Ther.* **16**, 508 (2014).
  16. Oesser, S. & Seifert, J. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell Tissue Res.* **311**, 393–399 (2003).
  17. Nakatani, S., Mano, H., Sampei, C., Shimizu, J. & Wada, M. Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage in vitro and in vivo. *Osteoarthr. Cartil.* **17**, 1620–1627 (2009).
  18. Calamia, V. *et al.* Secretome analysis of chondroitin sulfate-treated chondrocytes reveals anti-angiogenic, anti-inflammatory and anti-catabolic properties. *Arthritis Res. Ther.* **14**,

- R202 (2012).
19. Henrotin, Y., Lambert, C., Couchourel, D., Ripoll, C. & Chiotelli, E. Nutraceuticals: do they represent a new era in the management of osteoarthritis? - a narrative review from the lessons taken with five products. *Osteoarthr. Cartil.* **19**, 1–21 (2010).
  20. Verbruggen, G. Chondroprotective drugs in degenerative joint diseases. *Rheumatology* **45**, 129–138 (2006).
  21. Evans, R. G., Collins, C., Miller, P., Ponsford, F. M. & Elson, C. J. Radiological scoring of osteoarthritis progression in STR/ORT mice. *Osteoarthr. Cartil.* **2**, 103–109 (1994).
  22. Sarukawa, J., Takahashi, M., Doi, M., Suzuki, D. & Nagano, A. A longitudinal analysis of urinary biochemical markers and bone mineral density in STR/Ort mice as a model of spontaneous osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **62**, 463–471 (2010).
  23. Mevel, E. *et al.* Nutraceuticals in joint health: Animal models as instrumental tools. *Drug Discovery Today* **19**, 1649–1658 (2014).
  24. Little, C. B. & Smith, M. M. Animal Models of Osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rev.* **4**, 175–182 (2008).
  25. Stanescu, R., Knyszynski, A., Muriel, M. P. & Stanescu, V. Early lesions of the articular surface in a strain of mice with very high incidence of spontaneous osteoarthritic-like lesions. *J. Rheumatol.* **20**, 102–110 (1993).
  26. Plaas, A. *et al.* Intraarticular injection of hyaluronan prevents cartilage erosion, periarticular fibrosis and mechanical allodynia and normalizes stance time in murine knee osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **13**, R46 (2011).
  27. Lakes, E. H. & Allen, K. D. Gait analysis methods for rodent models of arthritic disorders: Reviews and recommendations. *Osteoarthr. Cartil.* **24**, 1837–1849 (2016).
  28. Naruse, K. *et al.* Osteoarthritic changes of the patellofemoral joint in STR/OrtCrlj mice are the earliest detectable changes and may be caused by internal tibial torsion. *Connect. Tissue Res.* **50**, 243–55 (2009).

29. Hamers, F. P., Lankhorst, a J., van Laar, T. J., Veldhuis, W. B. & Gispén, W. H. Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries. *J. Neurotrauma* **18**, 187–201 (2001).
30. Hoffmann, M. H. *et al.* Gait changes precede overt arthritis and strongly correlate with symptoms and histopathological events in pristane-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **12**, R41 (2010).
31. Ferland, C. E., Laverty, S., Beaudry, F. & Vachon, P. Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **97**, 603–610 (2010).
32. Ferreira-Gomes, J., Adães, S., Mendonça, M. & Castro-Lopes, J. M. Analgesic effects of lidocaine, morphine and diclofenac on movement-induced nociception, as assessed by the Knee-Bend and CatWalk tests in a rat model of osteoarthritis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **101**, 617–624 (2012).
33. Javaheri, B. *et al.* Stable sulforaphane protects against gait anomalies and modifies bone microarchitecture in the spontaneous STR/Ort model of osteoarthritis. *Bone* **103**, 308–317 (2017).
34. Zhen, G. & Cao, X. Targeting TGF $\beta$  signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis. *Trends Pharmacol. Sci.* **35**, 227–236 (2014).
35. Muramatsu, Y. *et al.* Preventive effects of hyaluronan from deterioration of gait parameters in surgically induced mice osteoarthritic knee model. *Osteoarthr. Cartil.* **22**, 831–835 (2014).
36. Comblain, F. *et al.* Curcuminoids extract, hydrolyzed collagen and green tea extract synergically inhibit inflammatory and catabolic mediator's synthesis by normal bovine and osteoarthritic human chondrocytes in monolayer. *PLoS One* **10**, (2015).
37. Comblain, F. *et al.* Identification of Targets of a New Nutritional Mixture for Osteoarthritis Management Composed by Curcuminoids Extract, Hydrolyzed Collagen



- and Green Tea Extract. *PLoS One* **11**, 1–14 (2016).
38. Glasson, S. S., Chambers, M. G., Van Den Berg, W. B. & Little, C. B. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthr. Cartil.* **18 Suppl 3**, S17-23 (2010).
  39. Vinatier, C. *et al.* A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* **26**, 6643–6651 (2005).
  40. Mével, E. *et al.* Olive and grape seed extract prevents post-traumatic osteoarthritis damages and exhibits in vitro anti IL-1 $\beta$  activities before and after oral consumption. *Sci. Rep.* **6**, 33527 (2016).

**Acknowledgements** The authors acknowledge Séverine Battaglia (INSERM U1238, Nantes) for the help with the radiological study, as well as the SC3M platform (Service Commun de Microscopie électronique, Microcaractérisation et Morpho-histologie-imagerie fonctionnelle, SFR François Bonamy – UMS016, Nantes) for image analysis.

**Author contributions** ELT, LB, JG Conception and design, analysis and interpretation of data, drafting the article, critical revision; ELT Collection and assembly of data; JG, LB Obtaining of funding; VH, SS, JA Analysis and interpretation of data, critical revision, technical support. All authors approved the final version of the manuscript.

**Competing interests** None to declare.

**Funding** This work was supported by the Arthritis Foundation (“French national network ROAD” (Research on OsteoArthritis Diseases)) and Région Pays-de-la-Loire (“Longévité-Mobilité-Autonomie” project). ELT received a grant from INSERM and Région Pays de la Loire.

**Disclaimer** The funding sources have had no role in study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the manuscript and in the decision to submit the manuscript for publication.

## **Figure legends**

**Figure 1: Osteoarthritis evaluation in aging male C57BL/6 mice from 6 to 22 months of age, by comparing histological, radiological and gait analyses.** (A) Representative radiological images of knees from 6- to 22-month-old mice displaying radiological scores ranging from 0 to 10, according to our grading scale (Table 1). M: menisci; OF: osteophytes; SS: sub-chondral bone sclerosis; JSN: joint space narrowing; C: calcifications. (B) The radiological scores from 6- to 22-month-old C57BL/6 mice was calculated and showed a decrease in low radiological scores in favor of an increase in higher scores. (C) The radiological score of individual criterium reveals differences in progression during aging, such as an increase of the size of the menisci and a decrease in the width of the joint space. (D) Representative images of knee sections from 6-, 10-, 18- and 22-month-old mice (n=3 mice per group) stained with Safranin-O. Scale bar 100  $\mu$ m. (E) The histological score of each knee joint was determined using the OARSI histological scoring method<sup>38</sup>, and significantly increased with age from 6 to 22-month-old. (F) Gait parameters evaluated with the CatWalk® system in 6 to 22-month-old C57BL/6 male mice. Two parameters were statistically affected in this model: *Max Intensity At*, which decreases with age, and *Max Contact At*, which increases.

**Figure 2: The EGCG/collagen hydrolysate/chondroitin sulfate cocktail exerts chondroprotective and anti-inflammatory properties in IL1- $\beta$ -treated chondrocytes.** (A) Rabbit articular chondrocytes (RAC) were cultured for 14 days in presence or absence of the nutraceutical cocktail and GAG production was estimated using Alcian blue staining. (B) RAC were cultured for 3 days in presence (hatched bars) or absence (black bars) of the cocktail and the relative expression of aggrecan, collagen II, Sox9, collagen I and X was evaluated by real-time PCR. (C-G) RAC were cultured for 24h and then treated (hatched bars) or not treated

(grey bars) with the cocktail for 48h in the presence or absence of IL1- $\beta$  (10 ng/ml) during the last 24h. The effect of the cocktail on IL1- $\beta$ -induced MMP13 (C), iNos (D) and COX2 (E) mRNA expression was evaluated by real-time PCR. The production of Nitric Oxide (F) and PGE<sub>2</sub> (G) in RAC supernatants was evaluated using commercial kits.

**Figure 3: The nutraceutical cocktail supplementation improves the radiological osteoarthritic score after 4 months of treatment.** Aged C57BL/6 mice (18-month-old) were given the nutraceutical-supplemented diet (*cocktail*) or a control diet (*control*) for 4 months. (A) The mean radiological score in control mice increased, whereas it did not worsen in cocktail-treated mice. (B) Low 0-1 scores decreased while high 6-7 and 8-10 scores increased in control mice, but no difference were seen in treated mice after 4 months of treatment. (C) The radiological score of individual criterium showed an increase in the size of the menisci, the number of calcifications and osteophytes in control mice, which was smaller in treated mice.

**Figure 4: The nutraceutical cocktail supplementation improves gait parameters after 4 months of treatment.** Aged C57BL/6 mice (18-month-old) were given the nutraceutical-supplemented diet (*cocktail*) or a control diet (*control*) for 4 months. (A) No effect of a cocktail-enriched diet was evidenced on the *Max Intensity At* parameter after 4-month of treatment. (B) Gait analysis showed a worsening of the *Max Contact At* parameter in control mice after a 4-month period, whereas the effect on the cocktail-treated group was significantly lower.

Figure 1: Le Tilly et al.

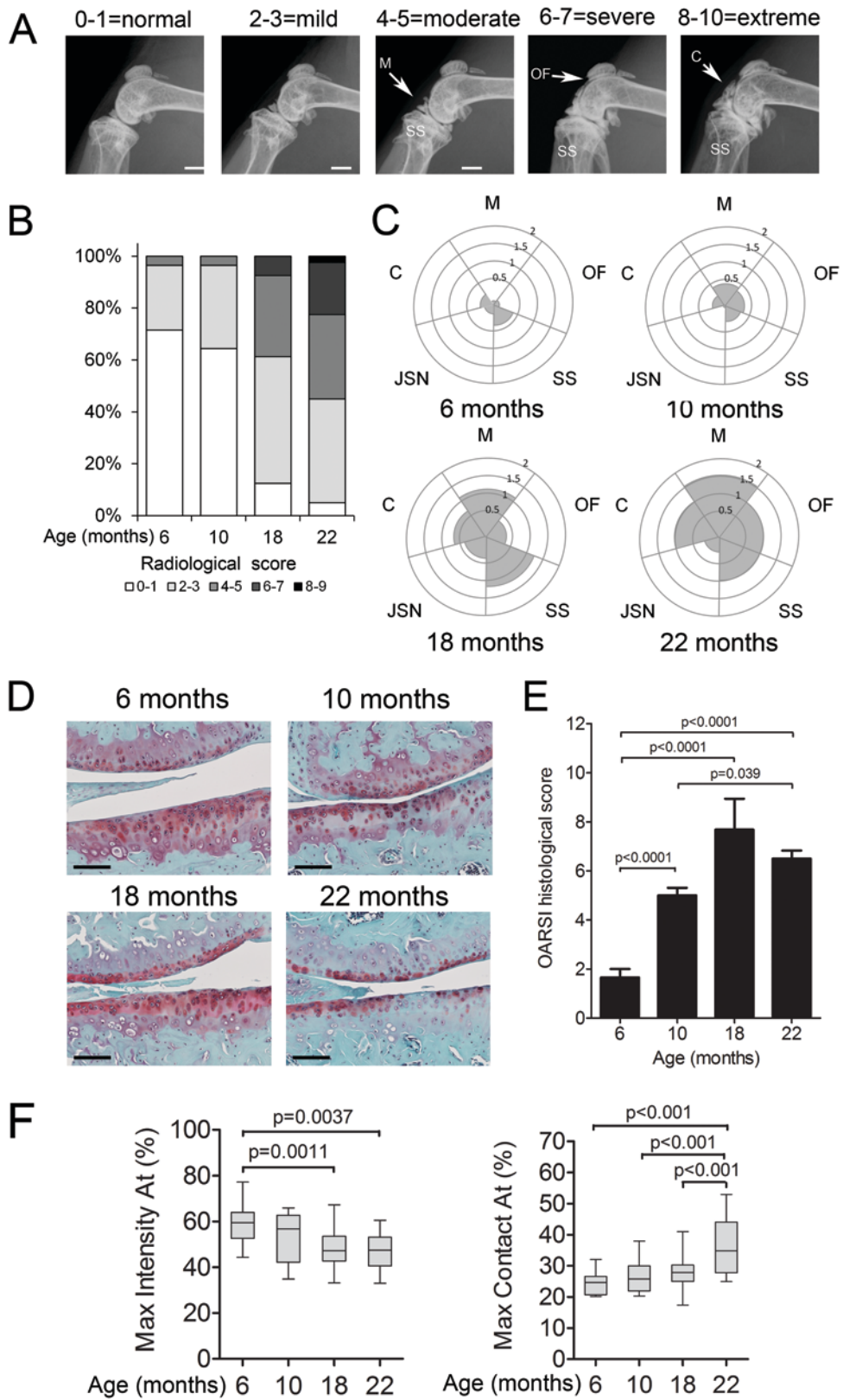


Figure 2 : Le Tilly et al.

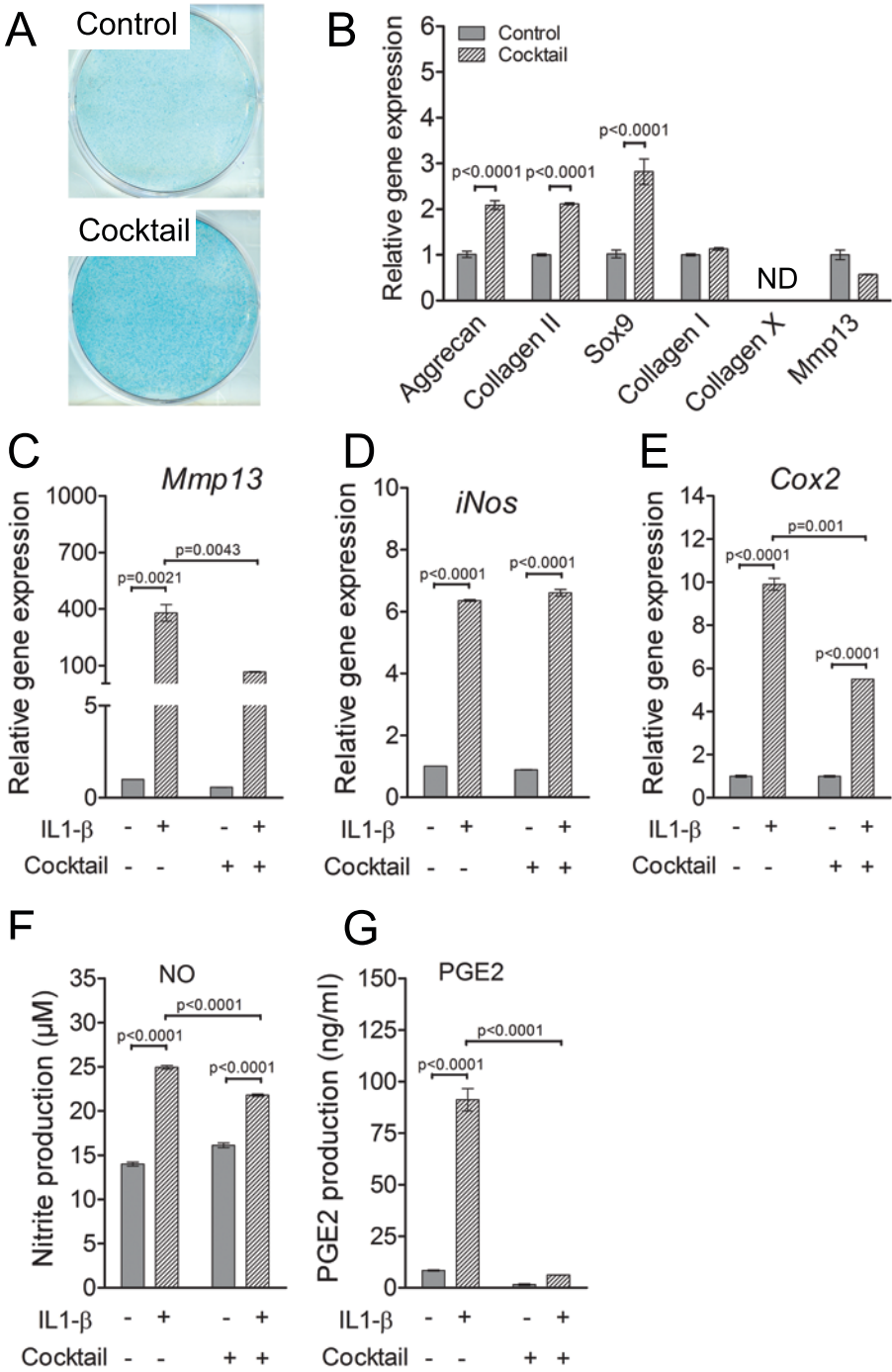


Figure 3: Le Tilly et al.

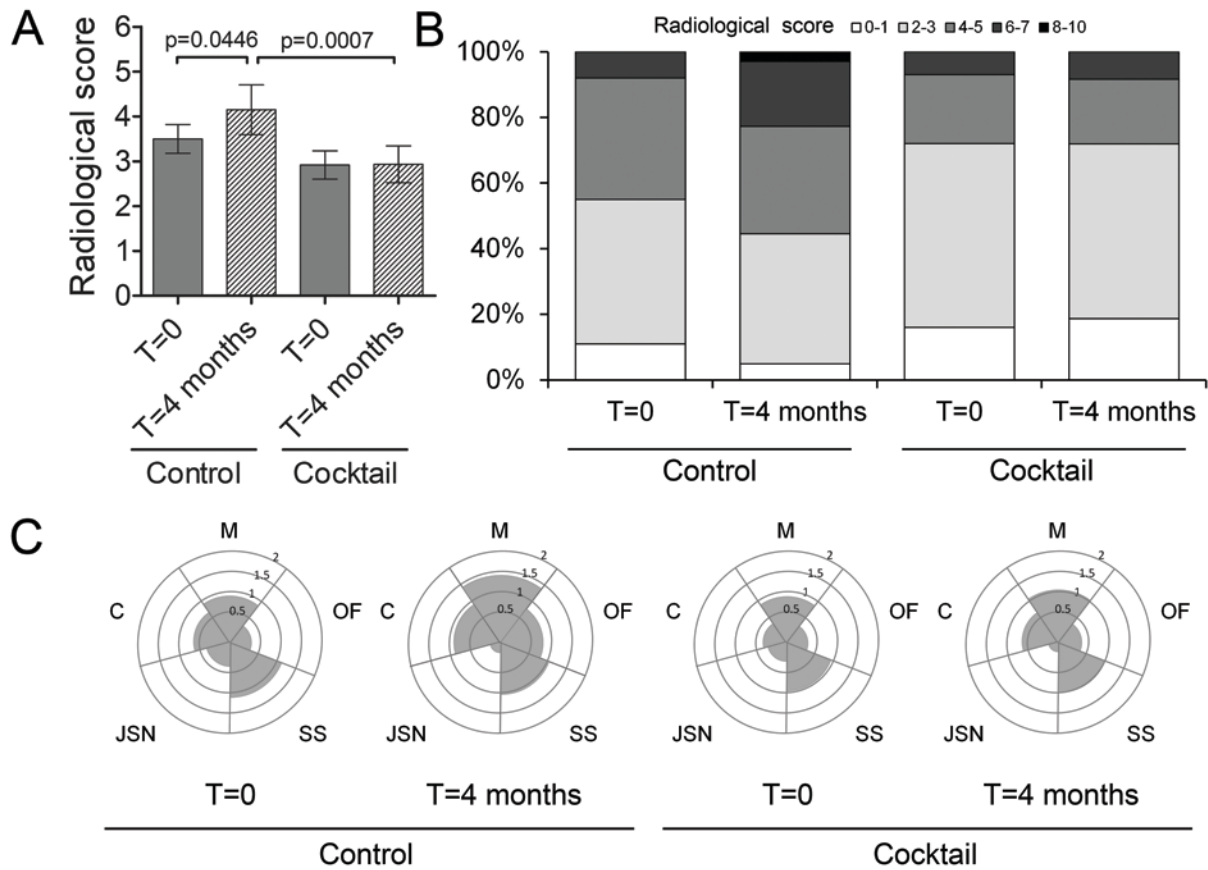
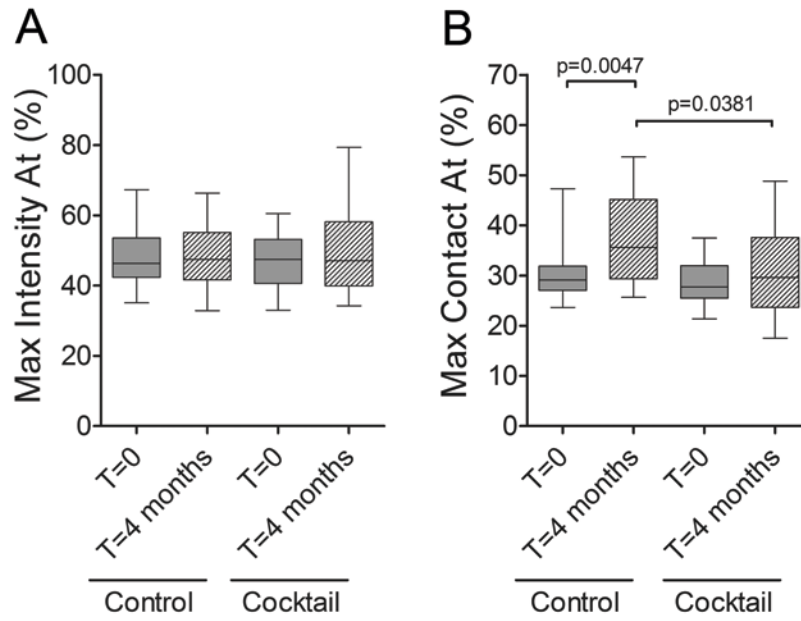


Figure 4: Le Tilly et al.





**Table 1: Radiological grading scale for the evaluation of OA changes on C57BL/6 mice's****hind knees**

<b>Surface of medial and lateral menisci (M) (calcified)</b>	Less than 2,8 mm <sup>2</sup>	0
	2,8 – 4,6 mm <sup>2</sup>	1
	More than 4,6 mm <sup>2</sup>	2
<b>Number of visible osteophytes (OF)</b>	None	0
	One site	1
	More than one site	2
<b>Structural modifications of subchondral bone (sclerosis) (SS)</b>	None	0
	Low to moderate	1
	Moderate to high	2
<b>Width of the joint space (JSN)</b>	Normal	0
	Reduced	1
	Absent	2
<b>Calcifications (C)</b>	None	0
	One site	1
	More than one site	2
	Maximal score	10

**Table 2: Sequences of primers used in the study**

mRNA	Forward primer	Reverse primer
iNos	5'-TGACGTCCAGCGCTACAATA-3'	5'-TGCGTCTCCAGTCCCATC-3'
Cox2	5'-GGAAGCGCTCTACGGCGACA-3'	5'-CCCCAAAGATGGCATCCGGGC-3'
Mmp13	5'-TTTTGAAGACACGGGCAAG-3'	5'-TCATCATAGCTCCAGACTTGGTT-3'
Aggrecan	5'-GAGGATGGCTTCCACCAGT-3'	5'-TGGGGTACCTGACAGTCTGA-3'
Collagen I	5'-AGCGATGGTCCTCCAGGT-3'	5'-GCCAGGGTAACCACGTTCT-3'
Collagen II	5'-ACAGCAGGTTCACCTATAACCG-3'	5'-CCCCTTACCGGTGTGTTTC-3'
Collagen X	5'-CAGGACCAGCTGGCATT-3'	5'-GGGCTCCTGTAAGTCCCTGT-3'
Sox9	5'-CTCAAGGGCTACGACTGGAC-3'	5'-CTTGACGTGGGGCTTGTT-3'
Gapdh	5'-AGAACGGGAAGCTGGTCAT-3'	5'-TTGATGTTGGCGGGATCT-3'

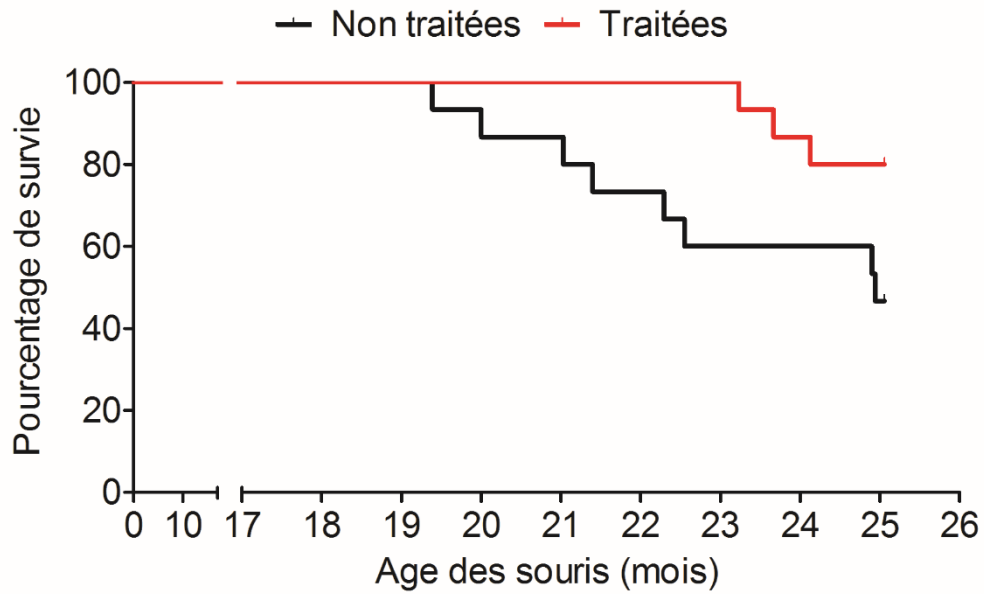


Figure 36 : Courbe de survie des souris C57BL/6 traitées ou non par le cocktail de molécules naturelles composé d'un extrait de thé vert, de collagène hydrolysé et de chondroïtine sulfate.

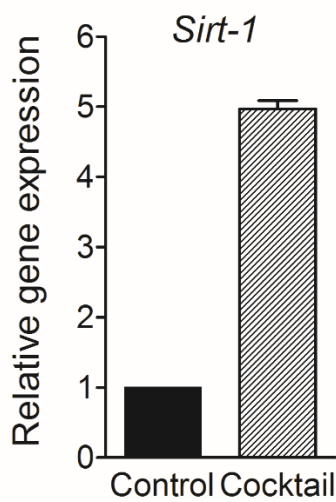


Figure 37 : Induction de l'expression de l'enzyme Sirtuin-1 par le cocktail de molécules dans des chondrocytes articulaires de lapin.

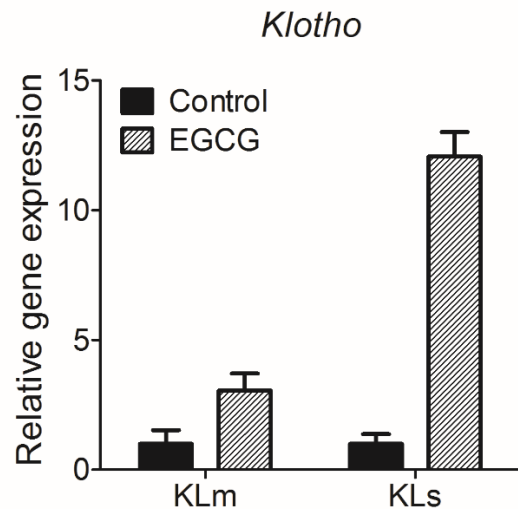


Figure 38 : Induction de l'expression de  $\alpha$ -Klotho par l'EGCG (le polyphénol majeur contenu dans le thé vert).

### Discussion et perspectives de ce travail :

L'effet des polyphénols sur la santé humaine a été étudié depuis environ 25 ans. En particulier, le chercheur Serge Renaud a introduit au début des années 90 la notion de « Paradoxe Français » (Renaud et al., 1993). Ce paradoxe provient de l'observation que les Français présentent des risques statistiques de développer une maladie cardio-vasculaire 3 fois inférieurs à d'autres pays industrialisés, tels que les Etats-Unis, en dépit d'une consommation élevée de graisses saturées, d'un manque d'exercice physique et d'un tabagisme élevé (Constant, 1997). Une explication de ce phénomène provient de la consommation du « régime Méditerranéen », qui est constitué d'un apport modéré de viande animale et de graisses, associé à une consommation élevée de légumes, fruits et huile d'olive. Ceux-ci, de même que le vin rouge consommé de façon modérée tous les jours (1 à 3 verres par jour), sont riches en polyphénols anti-oxydants, fibres, vitamines et acides gras insaturés.

Les polyphénols possèderaient des effets bénéfiques dans diverses maladies chroniques, telles que différents cancers, les maladies cardiovasculaires, le diabète et les maladies neurodégénératives (Alzheimer et maladie de Parkinson) (Costa et al., 2017). De façon intéressante et inattendue, au cours de notre étude, nous avons remarqué une augmentation de la survie des souris traitées par le mélange de molécules naturelles par rapport aux souris non traitées sur la durée de l'étude (**Figure 36**). Ces résultats sont en concordance avec la littérature, qui attribue cet effet positif sur la longévité aux propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires des polyphénols contenus dans le thé vert (Kitani et al., 2007; Zhang et al., 2009 b; Niu et al., 2013).

La protéine SIRT1 pourrait être un des facteurs pouvant expliquer l'effet bénéfique que nous avons observé à la fois sur le développement de l'arthrose et sur la survie des souris. En effet, cette protéine histone déacétylase est l'orthologue de la protéine Sir2 (Silent information regulator 2) qui régule la longévité chez la levure (Kaeberlein et al., 1999). Les souris déficientes en SIRT1 présentent des anomalies cartilagineuses et développent plus d'arthrose spontanément avec l'âge, ou suite à une déstabilisation méniscale (DMM) (Gabay et al., 2012, 2013; Matsuzaki et al.,

2014). En phase avec un rôle bénéfique de SIRT1, l'augmentation de l'expression de SIRT1, que ce soit par surexpression (Matsushita et al., 2013) ou par l'addition de molécules anti-oxydantes (dont le resvératrol) (Lei et al., 2012; Na et al., 2016; Zheng et al., 2017), diminue l'expression des marqueurs d'arthrose *in vitro*. Au cours de notre étude, le traitement des chondrocytes primaires avec le cocktail de molécules naturelles pendant 24h induit une augmentation de l'expression de SIRT1 par rapport aux chondrocytes non traités (**Figure 37**), suggérant un lien entre SIRT1 et l'action anti-arthrosique et anti-vieillessement du mélange. Ces observations ont été réalisées tardivement durant mon travail de thèse, et une perspective immédiate de cette hypothèse serait d'utiliser un inhibiteur de SIRT1, tel que le sirtinol, dans les chondrocytes traités par l'IL1- $\beta$  et le mélange, et observer l'expression des marqueurs typiques d'arthrose. Ceci permettrait de mieux caractériser le lien mécanistique existant entre SIRT1 et le mélange nutraceutique.

Une autre protéine intéressante, et qui fait l'objet du second article de ce projet, est la protéine anti-vieillessement  $\alpha$ -Klotho. En effet, nous avons observé une augmentation de l'expression des différentes formes de  $\alpha$ -Klotho, la forme membranaire (KLM) et surtout la forme sécrétée/splicée (KLs), dans des chondrocytes murins traités pendant 24h par de l'EGCG (**Figure 38**). Cette observation est cohérente avec une étude publiée rapportant l'induction de l'expression de  $\alpha$ -Klotho par l'EGCG dans des kératinocytes humains (Kim et al., 2014). En parallèle, et comme nous le verrons par la suite, l'expression de  $\alpha$ -Klotho a été évaluée dans le cartilage articulaire des souris de 18 mois (**Article 2 Figure 1**), et nous avons montré une diminution graduelle de son expression de 1 mois à 24 mois. Dans ce contexte, une perspective intéressante serait d'analyser son expression dans le cartilage des souris traitées par le mélange nutraceutique au cours du vieillissement, afin d'établir une corrélation entre  $\alpha$ -Klotho et la progression de l'arthrose.

Enfin, nous pensons que l'évaluation de l'effet du mélange nutraceutique sur le statut oxydant du cartilage serait une perspective intéressante à notre travail. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, les ROS jouent un rôle majeur dans l'arthrose, et l'effet anti-oxydant de l'EGCG n'a pour le moment jamais été testé dans le cartilage.

Enfin, les propriétés modulatrices de la mort (par apoptose et autophagie) et de la senescence cellulaire (Singh et al., 2011; Hasima et al., 2014; Malavolta et al., 2014), qui ont été décrites pour l'EGCG constituent sans aucun doute des voies d'explorations très intéressantes qui pourraient permettre de mieux comprendre les mécanismes de mort cellulaire des chondrocytes dans le cartilage articulaire.

## **ARTICLE 2 : INVOLVEMENT OF THE ANTI-AGING PROTEIN KLOTHO IN CHONDROCYTE AUTOPHAGY AND APOPTOSIS DURING OSTEOARTHRITIS**

Problématique : Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'arthrose ne sont pas encore totalement caractérisés, mais comme nous l'avons vu dans la partie introductive, elle est liée à des perturbations de l'homéostasie du cartilage, et notamment à des anomalies du processus autophagique. L'arthrose étant intimement liée au vieillissement, les molécules anti-vieillessement connaissent un intérêt grandissant dans l'optique de la prise en charge de l'arthrose. Parmi ces facteurs, la protéine anti-vieillessement  $\alpha$ -Klotho a été démontrée comme modulant l'autophagie dans différents systèmes cellulaires. De plus, des polymorphismes de  $\alpha$ -Klotho ont été associés à un risque accru d'arthrose. L'objectif de cette étude a donc été de préciser le rôle de  $\alpha$ -Klotho dans le développement de l'arthrose, plus particulièrement en lien avec l'autophagie des chondrocytes.

### Méthodologie :

*In vivo* : L'expression de  $\alpha$ -Klotho et des marqueurs d'autophagie, ainsi que le score histologique d'arthrose ont été évalués dans le cartilage articulaire de souris âgées de 1 à 24 mois. En parallèle, le phénotype cartilagineux, l'autophagie et l'apoptose des chondrocytes dans le cartilage des souris  $KL^{-/-}$  ont été caractérisés.

*In vitro* : L'effet de  $\alpha$ -Klotho sur les processus de mort cellulaire a été recherché dans des chondrocytes articulaires murins isolés de souriceaux (iMACs). Ceux-ci ont été stimulés par des concentrations croissantes de  $\alpha$ -Klotho recombinant, et le statut autophagique a été évalué. Les effets de  $\alpha$ -Klotho sur la mort des chondrocytes ont aussi été observés en condition de stress, induit par de l'IL1- $\beta$ .

### Résultats :

*In vivo* : Nos résultats montrent que l'apparition de l'arthrose au cours du vieillissement est corrélée à une diminution de l'expression de  $\alpha$ -Klotho et de l'autophagie dans le cartilage. De plus, le cartilage des souris invalidées pour  $\alpha$ -Klotho, bien que ne présentant pas de lésions évidentes d'arthrose, présente un score histologique

d'arthrose supérieur aux souris sauvages. L'évaluation de la mort des chondrocytes dans le cartilage des souris  $KL^{-/-}$  démontre une augmentation du nombre de lacunes vides dans la matrice et une augmentation de l'expression des marqueurs de l'autophagie et de l'apoptose.

*In vitro* : Le traitement des chondrocytes par  $\alpha$ -Klotho n'induit pas de modifications de l'expression des marqueurs de l'autophagie dans des chondrocytes sains, ceci en dépit de la présence de FGF23 et des différents FGFR. Toutefois, en condition de stress suite au traitement par l'IL1- $\beta$ , l'autophagie et l'apoptose sont augmentées, ainsi que les principaux marqueurs inflammatoires et cataboliques (MMP13, ADAMTS5, COX-2 et iNos). En présence de  $\alpha$ -Klotho, nous démontrons que l'induction de l'autophagie et de l'apoptose suite au traitement par l'IL1- $\beta$  est réduite, alors que l'expression des marqueurs typiques d'arthrose n'est pas modifiée.

Conclusion : Au cours de cette étude, nous avons décrit la présence d'une arthrose précoce en l'absence de  $\alpha$ -Klotho chez la souris, suggérant un effet protecteur de  $\alpha$ -Klotho dans le cartilage articulaire. L'augmentation de l'autophagie dans les souris mutantes, associée à la diminution de l'autophagie et de  $\alpha$ -Klotho au cours du vieillissement indique clairement des liens intimes entre  $\alpha$ -Klotho et l'autophagie. Les expérimentations *in vitro* suggèrent que l'effet de  $\alpha$ -Klotho sur l'autophagie induite par une cytokine pro-inflammatoire comme l'IL1- $\beta$  serait liée à son effet sur l'apoptose dans les chondrocytes. Cette hypothèse est renforcée par l'observation de l'augmentation de l'apoptose dans le cartilage des souris déficientes en  $\alpha$ -Klotho, ainsi que le nombre grandissant d'études démontrant qu'une induction excessive de l'autophagie peut conduire à la mort cellulaire par apoptose. Des études supplémentaires sont nécessaires pour décrypter la relation entre autophagie et apoptose dans le cartilage au cours de l'arthrose.

**Ces travaux sont actuellement en cours de révision dans la revue Cellular Physiology and Biochemistry.**



**Involvement of the anti-aging protein Klotho in chondrocyte autophagy and apoptosis  
during osteoarthritis**

Elodie Le Tilly<sup>1,2</sup>, Tatiana Ong<sup>1</sup>, Jérôme Abadie<sup>3</sup>, Jérôme Guicheux<sup>1,2,4</sup>, Claire Vinatier<sup>1,2,\*</sup>,  
Laurent Beck<sup>1,2,\*,#</sup>

**Author affiliations:**

<sup>1</sup> Inserm, UMR 1229, RMeS, Regenerative Medicine and Skeleton, Université de Nantes, ONIRIS, Nantes, F-44042, France

<sup>2</sup> Université de Nantes, UFR Odontologie, Nantes, F-44042, France

<sup>3</sup> Animal cancers as Models for Research in comparative Oncology (AMaROC), ONIRIS, Nantes, F-44307, France

<sup>4</sup> CHU Nantes, PHU4 OTONN, Nantes, F-44093, France

\* Equally contributing authors

# Corresponding author:

Laurent Beck, Ph.D.

INSERM U1229 - RMeS

Faculté de Chirurgie Dentaire

1, place Alexis Ricordeau

44042 Nantes cedex 1

France

E-mail: [laurent.beck@inserm.fr](mailto:laurent.beck@inserm.fr)

## **Abstract**

*Background:* The pathogenesis of osteoarthritis (OA) is not fully characterized, but is thought to include an impairment in the autophagic process particularly during aging, one of the main risk factor for OA. The antiaging factor Klotho has been shown to regulate autophagy in a variety of cell types, and Klotho polymorphisms have been associated with higher risks of OA. The aim of this study was thus to investigate the role of Klotho in OA.

*Methods:* The expression of Klotho and autophagy markers (LC3b and Beclin-1) and OA onset were evaluated in aging C57BL/6 mice as an age-related spontaneous model of OA. The cartilage integrity, autophagy and apoptosis status in Klotho-deficient mice knee joints were also analyzed. In parallel, to investigate the relationship between Klotho and autophagy, immature murine articular chondrocytes (iMACs) were stimulated with increasing doses of soluble recombinant Klotho. The effect of Klotho on autophagy was also evaluated in a pathological context, i.e. following IL1- $\beta$  stimulation (10 ng/ml) for 24 hours. Bax/Bcl-2 ratio, a marker of the intrinsic apoptotic pathway, was also evaluated in IL1- $\beta$ -treated chondrocytes.

*Results:* Our results revealed a gradual decrease in Klotho and autophagy markers expression, which correlated with OA progression appearance in aging mice. In the knee joint of Klotho-deficient mice, an increase in the OA histological score, associated with increased autophagy (LC3b) and chondrocyte death (caspase 3 and TUNEL) were observed, suggesting a protective anti-apoptotic role of Klotho in cartilage. *In vitro*, IL1- $\beta$  treatment in murine primary chondrocytes resulted in autophagy induction as well as an increase in Bax/Bcl-2 ratio, which were both counteracted by the addition of Klotho.

*Conclusion:* In summary, our study revealed the close relationship between the anti-aging Klotho protein and chondrocyte death in articular cartilage, unveiling Klotho as a potential target to enhance chondrocyte survival.

Keywords: Klotho – aging – osteoarthritis – autophagy – apoptosis

## Introduction

Aging can be defined as a time-related deterioration of physiological functions. Twenty years ago, the discovery of  $\alpha$ -Klotho [1] (referred hereafter as Klotho) as a putative aging-suppressor gene, has generated tremendous advances in the understanding of the aging process. Klotho is mainly expressed in the kidney, and three Klotho protein types with potentially different functions have been identified: a full-length transmembrane form and two circulating forms, arising either from alternative splicing [2,3] or enzymatic shedding [4]. The role of Klotho in mineral metabolism is now well described, acting as an obligatory FGF23 cofactor to regulate phosphate excretion and vitamin D levels *via* the FGFR1c, FGFR3c and FGFR4 receptors [5,6]. FGF23-independent roles for Klotho have more recently been described and attributed to the soluble form(s) of Klotho found in different biological fluids (blood, urine and cerebrospinal fluid) [7]. These roles include the regulation of ion channels (TRPV5 [8], ROMK1 [9]) and several signaling pathways (IGF-1 [10], TGF- $\beta$  [11], Wnt [12], NF- $\kappa$ B [13], oxidative stress [14], senescence [15]), and are expected to confer to Klotho a global positive effect on health. Furthermore, Klotho seems beneficial in various age-related degenerative diseases. Indeed, Klotho has been shown to improve the cognitive function in aging mice [16], attenuate renal fibrosis [11,17], delay the apparition of chronic kidney disease [18] and ameliorate resistance to diabetes [19]. At the genetic level, some polymorphisms of Klotho have been associated either with increased risks of cardiovascular disease and kidney stone formation [20,21], or with a reduction of cognitive impairment [22].

Consistent with a beneficial effect of Klotho, some polymorphisms of Klotho have been associated with higher risks of osteoarthritis (OA) [23,24], one of the most common and debilitating joint diseases. OA is a chronic affection resulting from the progressive degeneration of the articular cartilage, as well as synovial and bone alterations [25], which incidence is now well established to increase during aging [26]. During OA and aging, the extracellular matrix

is disrupted, and the number of chondrocytes decreases as a result of increased cell death [27,28]. This death of chondrocytes is commonly admitted to participate to the OA process [29,30], and may occur through several processes such as apoptosis, necrosis, senescence or autophagy [31,32].

Interestingly, an impairment in the autophagic process in chondrocytes has been enlightened during OA development and progression [33,34]. Autophagy is a cellular self-digestion mechanism involving the formation of the autophagosome eventually fusing with lysosomes to degrade and recycle the intracellular content [35]. The autophagic process is regulated by a family of autophagy-related gene (Atg) including Ulk1, Beclin-1 and microtubule-associated protein 1 light chain 3b (LC3b) [36]. Ulk1 and Beclin-1 are involved in autophagy initiation, whereas LC3b regulates the formation of the vacuole. Following autophagy activation, LC3b-I conjugates to phosphatidylethanolamine on the membrane of the autophagosome and is then converted into LC3b-II [37]. Although autophagy is usually considered as a cell survival mechanism, some studies have shown that it can lead to cell death in certain pathological contexts [38,39]. Until now, autophagy has been considered as a cytoprotective process in articular cartilage [40,41] and has been shown to decrease during OA [33]. Interestingly, several studies suggested that Klotho does regulate the autophagic process in several tissues [42,43]. However, the role of Klotho in the cartilage, and more specifically in OA progression, have been largely underexplored.

In the present study, we explored the role of the anti-aging protein Klotho during OA progression. We illustrated the time-dependent decrease in Klotho expression in cartilage during aging and uncovered its potential protective role in this tissue. Finally, we provided insights into the inter-related role of Klotho and autophagy in controlling chondrocyte survival in OA.

## **Materials & Methods**

### *Animals and histological evaluation.*

All animal experiments were approved by the Animal Care Committee of Pays de la Loire and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (Apafis agreement #00035.01). Knee joints from C57BL/6 male mice (Janvier Labs, France) were collected at different ages (1-, 6-, 12-, 18- and 24-month-old). Three mice of each age were euthanized, and both hind limbs were harvested (n=6 knee joints per age). Limbs were fixed in 4% paraformaldehyde and decalcified with Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) 0.5M pH=8 at 4°C for approximately 7 to 14 days. Specimen were then embedded in paraffin, cut in serial sections (4 µm), and stained with Safranin-O-fast green to evaluate the severity of OA, using a scoring system adapted from the Osteoarthritis Research Society International (OARSI) histopathology initiative recommendations as described [44–46]. This scoring allows evaluation of the severity of OA lesions using parameters such as presence of chondrocyte death, hypertrophy, clusters, loss of Safranin-O staining and surface alteration. Scoring was performed at different levels of the joint on at least two or three joint regions for each sample. Knee joint sections were also analyzed for Klotho, LC3b and Beclin-1 expression by immunohistochemistry. Knee joints originating from 1.5 month-old Klotho-deficient mice [1] ( $KL^{-/-}$ ) were compared to age-matched wild type mice (n=6 knee joints per group) and assessed for OA development by Safranin-O staining, as well as analyzed for LC3b, Beclin-1, TUNEL and cleaved caspase-3 expression.

### *Immunohistochemistry.*

Sections were deparaffinized and rehydrated in graded ethanol baths. Antigen unmasking was performed using citrate buffer (pH=6) overnight at 70°C, followed by peroxidase blocking with

3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 20 minutes and blocking with 10% goat serum + 4% bovine serum albumin (BSA) for 30 minutes at room temperature. Primary antibodies: LC3b (1:200, Cell Signaling Technology), Beclin-1 (1:200, Santa Cruz), Cleaved caspase 3 (1:300, Cell Signaling Technology), Klotho (1:100, KM2119, TransGenic Inc.) were incubated overnight at 4°C. Slides were then incubated with biotinylated goat anti-rabbit (1:500, Dako) or donkey anti-rat (1:1000, Interchim) secondary antibodies for 1h at room temperature. The signal was developed with 3,3-diaminobenzidine (DAB) substrate for 5 minutes, and counterstained with Mayer's hematoxylin. TUNEL assay (DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System, Promega) was performed as per manufacturer's instruction. In KL<sup>-/-</sup> mice, quantification of signal-positive chondrocytes was performed by counting LC3 and Beclin-1 positive cells in 300x100 μm area in two sites of each sample. Then, the number of positive cells was expressed as a percentage relative to the total number of cells in each area.

#### *Murine primary chondrocytes culture.*

Immature murine articular chondrocytes (iMACs) were isolated from knees of 6-days-old pups, as described by Gosset *et al.* [47]. Cells were cultured in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FCS, and 50 μg/ml gentamicin (Gibco, Life Technologies) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. For autophagy determination, chondrocytes were seeded at high density (50,000 cells/cm<sup>2</sup>) and treated with recombinant mouse Klotho (R&D, 1819-KL) at various concentrations (1 to 1000 pM) for 24h, in the presence or not of chloroquine (25 μM, Sigma-Aldrich) for the last 4h. The effect of Klotho on autophagy was also tested in presence of recombinant mouse FGF23 (R&D) (100 ng/ml). iMACs (10,000 cells/cm<sup>2</sup>) were also transfected with a plasmid overexpressing Klotho, using jetPRIME transfection reagent according to manufacturer's instructions (Polyplus transfection) for 24h. IL1-β treatment (0.1 to 10 ng/ml) was used as a catabolic stress inducer, and

chondrocytes were stimulated with soluble Klotho (1000 pM) for 24h before the addition of IL1- $\beta$  (10 ng/ml) for another 24h.

*RNA isolation and quantitative polymerase chain reaction.*

Total RNA was extracted from chondrocytes using the NucleoSpin® RNA II kit (Macherey-Nagel), according to manufacturer's instructions. Fifteen nanograms of RNA was retro-transcribed with SuperScript III (Life Technologies) and real-time polymerase chain reaction (rt-PCR) was performed with SYBR Select mix (Life Technologies) to quantify the relative gene expression of *Mmp13*, *Adamts5*, *Cox2*, *iNos*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3*, *Fgfr4*, *Bax* and *Bcl-2*, using *Pinin* as a reference gene. The primer sequences used in this study are reported in Supplementary Table S1.

*Protein isolation and Western Blotting.*

Chondrocytes were washed three times with DMEM, and lysed with ice-cold RIPA buffer (Tris HCl pH8 50 mM, NaCl 150 mM, 1% NP40, Sodium deoxycholate 0.5% w/v, EDTA 20 mM) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Sigma Aldrich). Fifteen micrograms of total proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred into polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad). Membranes were probed with the following primary antibodies: LC3b (1:1000, Cell Signaling Technology), Ulk1 (1:1000, Cell Signaling Technology), Klotho (1:500, KM2076, TransGenic Inc.),  $\beta$ -actin (1:5000, Sigma Aldrich) overnight at 4°C. Membranes were then incubated for 1h at room temperature with HRP-conjugated secondary antibodies goat anti-rabbit (1:2000, Cell Signaling Technology) or goat anti-mouse (1:80,000, Sigma Aldrich). Blots were visualized with SuperSignal West Dura or Femto reagents (Bio-Rad).

*Statistical analysis.*

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 7®. Comparative studies were analyzed using a non-parametric Mann and Whitney t-test with p values less than 0.05 considered as statistically significant. Each experiment was performed at least three times, and data are presented as the mean value  $\pm$  SEM.



## Results

### *Concurrent decrease in Klotho expression and autophagy during age-related OA progression.*

As a first step in deciphering the role of Klotho in OA, we investigated the expression of Klotho in the cartilage of male C57BL/6 mice from escalating ages and analyzed its expression pattern as a function of OA progression (Figure 1A). OA development was evaluated in joints from 1-, 6-, 12-, 18- and 24-month-old mice using Safranin-O staining followed by grading using a scoring system adapted from the OARSI scale [44–46]. Fibrillations of the articular surface, as well as de-cellularized areas were observed as early as 12 months of age and were clearly visible at 18 and 24 months of age (Figure 1A). This translated into an OARSI score progressively increasing with age (Figure 1B). Interestingly, an increased cell death, as evaluated by the presence of empty lacunae within the cartilage, was also detected during aging. The evaluation of Klotho protein immunostaining showed inversely a gradual decrease of Klotho expression in the articular cartilage of 1 to 24-month-old mice (Figure 1A). Similarly, the expression profile of the autophagy markers LC3b and Beclin-1 during aging revealed a decrease of autophagy in aged mice compared to young mice cartilage (Figure 1C), resembling Klotho expression profile. This concurrent decrease of both Klotho expression and autophagy markers during aging may indicate a role in the progressive apparition of OA.

### *Klotho-deficient mice display cartilage anomalies and increased autophagy.*

To further analyze whether the decrease in Klotho expression may be involved in the onset of OA, knee joints from 1.5 month-old  $KL^{-/-}$  mice were analyzed for cartilage integrity using Safranin-O staining (Figure 2A). Articular cartilage surface appeared normal, with no apparent fibrillations or surface erosion. However, despite this absence of cartilage surface erosion, the histological score was slightly but significantly increased compared to wild-type mice (Figure 2B). This

originated from an increased number of hypertrophic chondrocytes that could be observed in  $KL^{-/-}$  mice compared to wild-type mice (Figure 2B). Of note, chondrocyte death was also enhanced in  $KL^{-/-}$  mice. The expression of LC3b and Beclin-1 autophagy markers was also evaluated (Figure 2C) revealing a significant increase in the percentage of LC3b positive cells in  $KL^{-/-}$  mice compared to wild-type mice, whereas Beclin-1 expression remained similar between  $KL^{-/-}$  and wild-type mice.

*Klotho does not modulate autophagy in healthy chondrocytes.* Since Klotho deficiency resulted in an unexpected increase of LC3b, we investigated further the interplay between Klotho and autophagy. To this aim, immature murine articular chondrocytes (iMACs) were incubated with increasing doses of recombinant Klotho for 24h. Surprisingly, no significant differences in Ulk1 expression and LC3b-II/I ratio could be noted following Klotho stimulation (Figure 3A). These results were further confirmed by the evaluation of autophagy level in Klotho-overexpressing chondrocytes (Supplementary Figure S1A). No differences in Ulk1 expression and LC3b-II/I ratio could be seen 24h after Klotho transfection when compared to control chondrocytes. To ascertain that this lack of effect of Klotho on LC3b-II/I ratio was not due to an increased autophagy turnover, we used chloroquine, which blocks the turnover of LC3-II. In the presence of chloroquine, no difference in LC3b-II/I ratio was observed between untreated and Klotho-treated cells (Figure 3B), confirming that increased expression of Klotho did not modulate the autophagic flux. However, it remained possible that the absence of Klotho effect was due to the absence of its co-factor FGF23 in the *in vitro* experiments. Therefore, chondrocytes were treated with recombinant Klotho alone or in association with recombinant FGF23 for 24h, and the effect of Klotho and FGF23 were evaluated on autophagic flux in absence or presence of chloroquine. Results showed that the LC3b-II/I ratio did not vary in any tested conditions (Figure 3C). This negative result could not be attributed to a defect in FGF receptors expression

since all four of the FGF receptors were expressed in chondrocytes (Supplementary Figure S1B), notably FGFR1 and FGFR3 through which Klotho, together with FGF23, was shown to mediate part of its physiological roles [6].

*Klotho counteracts the effect of IL1- $\beta$  on autophagy.* Although no effect of Klotho on autophagy could be evidenced in a steady-state situations, it remained possible that Klotho could play a role during pathological-like situation. Using IL1- $\beta$  stimulation as a stress-induced pathological situation [48], we evaluated the effect of IL1- $\beta$  in iMACs on OA and autophagy markers. IL1- $\beta$  treatment (0.1 to 10 ng/ml) of iMACs for 24h resulted in a dose dependent increase of LC3b-II/I ratio and Ulk1 expression with a maximal effect at 10 ng/ml (Figure 4A). As expected, IL1- $\beta$  stimulation resulted in an increase in OA markers *Mmp13*, *Adamts5*, *Cox2* and *iNos* (Figure 4B). Interestingly, pretreatment of iMACs with recombinant Klotho (1000 pM) 24h before IL1- $\beta$  stimulation (10 ng/ml) for 24h resulted in a significant decrease in Ulk1 expression and LC3b-II/I ratio (Figure 4C). Of note, although Klotho blunted the IL1- $\beta$  effect on autophagy, it did not induce any modification in the IL1- $\beta$  driven expression of OA markers *Mmp13*, *Adamts5*, *Cox2* and *iNos* (Figure 4D). We further confirmed the effect of exogenous Klotho on autophagy by transfecting a Klotho-expressing vector in cells treated with IL1- $\beta$  (10 ng/ml) for 24h (Supplementary Figure S2). Similarly to extracellular addition, Klotho over-expression resulted in a lower autophagy induction as shown by the significant reduction in Ulk1 expression and the decrease in LC3b-II/I ratio in Klotho overexpressing chondrocytes treated with IL1- $\beta$  compared to control chondrocytes.

*Klotho-deficient mice display high apoptosis in the cartilage.* As mentioned above, histological observations of articular cartilage from *KL*<sup>-/-</sup> mice suggested that chondrocyte death was increased. Since autophagy and apoptosis processes are interrelated [49] and that IL1- $\beta$  could

induce apoptosis in chondrocytes [50], we investigated the apoptosis status in IL1- $\beta$ -treated chondrocytes and in knees from Klotho-deficient mice (Figure 5). TUNEL assay and cleaved caspase 3 immunostaining in joints of KL<sup>-/-</sup> mice confirmed an increased in apoptosis in KL<sup>-/-</sup> mice compared to wild-type mice in which both immunostainings were negative (Figure 5A). The cleaved caspase 3 was detected in the articular cartilage of KL<sup>-/-</sup> mice, whereas the TUNEL assay revealed apoptotic cells in the calcified cartilage underneath the articular cartilage. When iMACs were treated with IL1- $\beta$  for 24h, a dose-dependent increase in Bax/Bcl-2 ratio in mouse chondrocytes was shown (Figure 5B). Bax/Bcl-2 ratio is considered as an important determinant of cell susceptibility to apoptosis [51], and has been shown to be altered in OA cartilage and following IL1- $\beta$ -treated chondrocytes [52,53]. Strikingly, pre-treatment with Klotho (1000 pM) followed by IL1- $\beta$  stimulation for 24h resulted in a dose-dependent decrease in the Bax/Bcl-2 ratio (Figure 5C). Altogether these data suggest that Klotho may have a beneficial effect in articular cartilage by preventing both autophagy and apoptosis induced by IL1- $\beta$ .

## Discussion

The well-established functional link between osteoarthritis and aging [26] led us to investigate the role of the anti-aging protein Klotho in cartilage. Although earlier work did report Klotho expression in piglet growth plate [54] and in human articular cartilage [55], its functional role and kinetics of expression were not investigated. Here, we illustrated for the first time the kinetics of Klotho expression in articular cartilage, revealing a progressive decrease during aging. Interestingly, the histological examination of articular cartilage from Klotho-deficient mice suggested a possible role of Klotho in the osteoarthritic process. Although this role needs further work to fully understand the mechanistic issues involving Klotho in the osteoarthritic process, we demonstrated that the *in vivo* absence of Klotho led to an increased chondrocyte death. Consistent with recent studies showing that during OA, chondrocyte death could occur by a combination of several mechanisms, including apoptosis and autophagy [56], we illustrated an increase in autophagy and apoptotic-mediated death of chondrocytes in  $KL^{-/-}$  mice that is consistent with a chondroprotective role of Klotho.

The inter-relationship between Klotho and autophagy has been documented earlier in various cellular contexts but still remains elusive. Several studies have shown that Klotho increases autophagy in gastric cancer cells [57] or hepatocellular carcinoma cells [42], and that in certain cancer types, autophagy induction could be a way of killing cancer cells [58]. In contrast, other studies have described an inhibitory effect of Klotho on autophagy in contexts such as in arterial cells [43] or alveolar macrophages [59], in which autophagy induction is associated with the development of arterial stiffening and cigarette smoke-induced emphysema [60], respectively. While the inhibitory or stimulatory effect of Klotho on autophagy may appear inconsistent at first sight, this may indicate that the mechanistic link between Klotho and the autophagic process may depend on different cellular or physiological contexts, resulting

in all cases in a beneficial role of Klotho. This may explain the difference between the blunting effect of Klotho on IL1- $\beta$ -induced autophagy and the absence of effect of Klotho on basal autophagy level in murine chondrocytes, or the concomitant decrease in Klotho and autophagy during aging.

In addition, an increasing number of studies suggest that autophagy levels vary depending on the histological localization of chondrocytes within the articular cartilage (superficial, middle or deep zone), but also during the stages of OA progression (early or late OA) [56,61]. Therefore, the apparent discrepancies in Klotho effect on autophagy illustrated by the increased autophagy in  $KL^{-/-}$  cartilage and decreased autophagy in aging cartilage expressing low levels of Klotho, may relate to the different stages of OA in both models. Consistent with this hypothesis, it must be stressed that while higher than in wild-type mice, the histological OA score of  $KL^{-/-}$  cartilage remained relatively mild when compared to the OA score of aged mice.

Recent studies have shown that during the early phases of OA development, the autophagic process was increased as a result of increased stress events, serving as a tissue-survival compensatory response aimed at removing damaged cells [62,63]. On the contrary, some studies have demonstrated that excessive induction of autophagy in OA-chondrocytes led to cell death [61]. Therefore, our results may illustrate a beneficial effect of Klotho on articular cartilage. When murine chondrocytes were treated with IL1- $\beta$ , we observed an increase of autophagy markers, a result similar to a previously reported study in humans [50]. Interestingly, the latter study also demonstrated that by blocking autophagy induction in IL1- $\beta$ -treated cells using Atg5 silencing, the expression of OA markers was exacerbated, revealing the detrimental effect of autophagy blockade on articular cartilage. Similar detrimental effects of blunted autophagy were also reported in the studies of Ribeiro *et al.* [64] and Zhang *et al.* [40]. However, in contrast with the above studies, we showed here that Klotho blunted the effect of

IL1- $\beta$  on autophagy while did not induce any effect on Mmp13, Adamts5, Cox2 and iNos-increased expression following IL1- $\beta$  stimulation, suggesting that Klotho's counteracting effect on autophagy does not result in an aggravation of OA progression.

While the relationship between autophagy and apoptosis has been extensively reviewed during the last decade [65], this dialogue is not fully deciphered. During the later stages of OA, both autophagy and apoptosis have been detected in the same cells [56], resulting in cell death. Interestingly, Roach *et al.* [66] described a variant of chondrocyte death, called chondroptosis, sharing features of apoptosis and autophagy. In this study, we did observe some characteristics of apoptotic cell death in IL1- $\beta$ -treated chondrocytes, as revealed by the increased Bax/Bcl-2 ratio. Interestingly, this ratio decreased when cells were pre-treated with Klotho. Similarly, the absence of Klotho *in vivo* resulted in a major activation of caspase 3 in the articular cartilage, and an increase in TUNEL-positive cells in the non-calcified cartilage.

The role of Klotho in apoptosis has been investigated in other contexts, and, as with autophagy, published studies suggest that Klotho induces apoptosis in cancer cells [42,57], whereas it rather inhibits apoptosis in other cells [67,68]. Interestingly, autophagy has been extensively studied in the pathogenesis of pulmonary diseases [69], and has been shown to have both protective and deleterious effects, depending on the cellular context. In chronic obstructive pulmonary disease (COPD) caused by exposure to cigarette smoke, autophagy has been shown to be increased [60], which resulted in an activation of apoptosis [70]. Strikingly, in this context, Klotho decreased cigarette-smoke induced autophagy [59], similarly to our results in IL1- $\beta$ -treated chondrocytes. This present study illustrates for the first time a repressive role of Klotho on chondrocyte apoptosis, which is consistent with the chondro-protective role of Klotho illustrated through its role on autophagy.

Since the chondrocyte is the only present cell type in the non-innervated and avascular cartilage tissue lacking self-renewing capacity [71], the modulation of pathways leading to its

death or survival is an essential parameter during OA progression. Treatment aimed at preventing, limiting or delaying chondrocytes death is then of crucial importance in the management of OA. In this context, our work suggests that modulating Klotho expression in the cartilage may represent a promising therapeutic approach to promote articular chondrocyte cell survival.

**Acknowledgements** The authors acknowledge F. Cailotto and D. Moulin (Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire, UMR 7365 CNRS, Nancy) for providing the knees from Klotho-deficient mice.

**Author contributions** ELT, LB, CV, JG Conception and design, analysis and interpretation of data, drafting the article, critical revision; ELT Collection and assembly of data; JG, CV Obtaining of funding; TO, JA Analysis and interpretation of data, critical revision, technical support. All authors approved the final version of the manuscript.

**Competing interests** None declared

**Funding** This work was supported by grants from the French national network ROAD (“Research on OsteoArthritis Diseases”) of the Arthritis foundation and “Région Pays-de-la-Loire” through the program “Longévité-Mobilité-Autonomie” (JG) and by research grants to from the Arthritis Foundation and the “Société Française de Rhumatologie” (CV).

**Disclaimer** The funding sources have had no role in study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the manuscript and in the decision to submit the manuscript for publication.



## References

- 1 Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al.: Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997;390:45–51.
- 2 Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y: Identification of the Human *Klotho* Gene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and Secreted *Klotho* Protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;242:626–630.
- 3 Shiraki-Iida T, Aizawa H, Matsumura Y, Sekine S, Iida A, Anazawa H, et al.: Structure of the mouse *klotho* gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Lett* 1998;424:6–10.
- 4 Chen C-D, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR: Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of *Klotho* by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19796–19801.
- 5 Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, et al.: Targeted ablation of *Fgf23* demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 2004;113:561–568.
- 6 Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, et al.: *Klotho* converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 2006;444:770–774.
- 7 Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N, et al.: Secreted *Klotho* protein in sera and CSF: Implication for post-translational cleavage in release of *Klotho* protein from cell membrane. *FEBS Lett* 2004;565:143–147.
- 8 Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG: The  $\beta$ -Glucuronidase *Klotho* Hydrolyzes and Activates the TRPV5 Channel. *Science* (80- )

- 2005;310:490–493.
- 9 Cha S-K, Hu M-C, Kurosu H, Kuro-o M, Moe O, Huang C-L: Regulation of Renal Outer Medullary Potassium Channel and Renal K(+) Excretion by Klotho. *Mol Pharmacol* 2009;76:38–46.
  - 10 Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor J V, Nandi A, Gurnani P, et al.: Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* 2005;309:1829–1833.
  - 11 Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor J V., John GB, Wang L, et al.: Klotho inhibits transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *J Biol Chem* 2011;286:8655–8665.
  - 12 Liu H, Fergusson MM, Castilho RM, Liu J, Cao L, Chen J, et al.: Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 2007;317:803–806.
  - 13 Buendía P, Carracedo J, Soriano S, Madueño JA, Ortiz A, Martín-Malo A, et al.: Klotho Prevents NF $\kappa$ B Translocation and Protects Endothelial Cell from Senescence Induced by Uremia. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* 2014;70:1198–1209.
  - 14 Yamamoto M, Clark JD, Pastor J V., Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, et al.: Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *J Biol Chem* 2005;280:38029–38034.
  - 15 de Oliveira RM: Klotho RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway. *FEBS Lett* 2006;580:5753–8.
  - 16 Leon J, Moreno AJ, Garay BI, Chalkley RJ, Burlingame AL, Wang D, et al.: Peripheral Elevation of a Klotho Fragment Enhances Brain Function and Resilience in Young, Aging, and  $\alpha$ -Synuclein Transgenic Mice. *Cell Rep* 2017;20:1360–1371.
  - 17 Haruna Y, Kashihara N, Satoh M, Tomita N, Namikoshi T, Sasaki T, et al.: Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104:2331–2336.

- 18 Shi M, Flores B, Gillings N, Bian A, Cho HJ, Yan S, et al.: Klotho Mitigates Progression of AKI to CKD through Activation of Autophagy. *J Am Soc Nephrol* 2015;1–15.
- 19 Lin Y, Sun Z: In vivo pancreatic beta-cell-specific expression of antiaging gene klotho: A novel approach for preserving beta-cells in type 2 diabetes. *Diabetes* 2015;64:1444–1458.
- 20 Arking DE, Becker DM, Yanek LR, Fallin D, Judge DP, Moy TF, et al.: KLOTHO Allele Status and the Risk of Early-Onset Occult Coronary Artery Disease. *Am J Hum Genet* 2003;72:1154–1161.
- 21 Telci D, Dogan AU, Ozbek E, Polat EC, Simsek A, Cakir SS, et al.: KLOTHO gene polymorphism of G395A is associated with kidney stones. *Am J Nephrol* 2011;33:337–343.
- 22 Hao Q, Ding X, Gao L, Yang M, Dong B: G-395A polymorphism in the promoter region of the KLOTHO gene associates with reduced cognitive impairment among the oldest old. *Age (Omaha)* 2016;38:7.
- 23 Zhang F, Zhai G, Kato BS, Hart DJ, Hunter D, Spector TD, et al.: Association between KLOTHO gene and hand osteoarthritis in a female Caucasian population. *Osteoarthr Cartil* 2007;15:624–629.
- 24 Tsezou A, Furuichi T, Satra M, Makrythanasis P, Ikegawa S, Malizos KN: Association of KLOTHO gene polymorphisms with knee osteoarthritis in Greek population. *J Orthop Res* 2008;26:1466–70.
- 25 Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB: Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 2012;64:1697–1707.
- 26 Loeser RF, Collins JA, Diekman BO: Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:412–20.
- 27 Bobacz K, Erlacher L, Smolen J, Soleiman A, Graninger W: Chondrocyte number and

- proteoglycan synthesis in the aging and osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1618–1622.
- 28 Allen RT, Robertson CM, Harwood FL, Sasho T, Williams SK, Pomerleau BA, et al.: Characterization of mature vs aged rabbit articular cartilage: Analysis of cell density, apoptosis-related gene expression and mechanisms controlling chondrocyte apoptosis. *Osteoarthr Cartil* 2004;12:917–923.
- 29 Rahmati M, Nalesso G, Mobasheri A, Mozafari M: Aging and Osteoarthritis: Central Role of the Extracellular Matrix. *Ageing Res Rev* 2017;40:20–30.
- 30 Aigner T, Söder S, Gebhard PM, McAlinden A, Haag J: Mechanisms of Disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis—structure, chaos and senescence. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007;3:391–399.
- 31 Kühn K, D’Lima DD, Hashimoto S, Lotz M: Cell death in cartilage. *Osteoarthr Cartil* 2004;12:1–16.
- 32 Komori T: Cell death in Chondrocytes, osteoblasts, and osteocytes. *Int J Mol Sci* 2016;17. DOI: 10.3390/ijms17122045
- 33 Caramés B, Taniguchi N, Otsuki S, Blanco FJ, Lotz M: Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:791–801.
- 34 Boudierlique T, Vuppalapati KK, Newton PT, Li L, Barenus B, Chagin AS: Targeted deletion of Atg5 in chondrocytes promotes age-related osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2016;75:627–631.
- 35 Mizushima N: Autophagy: Process and function. *Genes Dev* 2007;21:2861–2873.
- 36 Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Emr SD, Sakai Y, Sandoval I V., et al.: A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 2003;5:539–545.
- 37 Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al.: LC3, a

- mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000;19:5720–5728.
- 38 Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ: Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008;451:1069–1075.
- 39 Scott RC, Juhász G, Neufeld TP: Direct Induction of Autophagy by Atg1 Inhibits Cell Growth and Induces Apoptotic Cell Death. *Curr Biol* 2007;17:1–11.
- 40 Zhang Y, Vasheghani F, Li Y-H, Blati M, Simeone K, Fahmi H, et al.: Cartilage-specific deletion of mTOR upregulates autophagy and protects mice from osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2014;1–9.
- 41 Caramés B, Taniguchi N, Seino D, Blanco FJ, D’Lima D, Lotz M: Mechanical injury suppresses autophagy regulators and pharmacologic activation of autophagy results in chondroprotection. *Arthritis Rheum* 2012;64:1182–1192.
- 42 Shu G, Xie B, Ren F, Liu D, Zhou J, Li Q, et al.: Restoration of klotho expression induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Oncol* 2013;36:121–9.
- 43 Chen K, Zhou X, Sun Z: Haplodeficiency of klotho gene causes arterial stiffening via upregulation of scleraxis expression and induction of autophagy. *Hypertension* 2015;66:1006–1013.
- 44 Mével E, Merceron C, Vinatier C, Krisa S, Richard T, Masson M, et al.: Olive and grape seed extract prevents post-traumatic osteoarthritis damages and exhibits in vitro anti IL-1 $\beta$  activities before and after oral consumption. *Sci Rep* 2016;6:33527.
- 45 Glasson SS, Chambers MG, Van Den Berg WB, Little CB: The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthr Cartil* 2010;18 Suppl 3:S17-23.
- 46 Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell K, et al.: Osteoarthritis cartilage histopathology: Grading and staging. *Osteoarthr Cartil*

- 2006;14:13–29.
- 47 Gosset M, Berenbaum F, Thirion S, Jacques C: Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat Protoc* 2008;3:1253–1260.
- 48 Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier J-P, Fahmi H: Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2010;7:33–42.
- 49 Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G: Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:81–94.
- 50 Sasaki H, Takayama K, Matsushita T, Ishida K, Kubo S, Matsumoto T, et al.: Autophagy modulates osteoarthritis-related gene expression in human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2012;64:1920–1928.
- 51 Cory S, Adams JM: The bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;2:647–656.
- 52 Hosseinzadeh A, Jafari D, Kamarul T, Bagheri A, Sharifi AM: Evaluating the Protective Effects and Mechanisms of Diallyl Disulfide on Interleukin-1 $\beta$ -Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Apoptotic Signaling Pathways in Cultured Chondrocytes. *J Cell Biochem* 2017;118:1879–1888.
- 53 Karaliotas GI, Mavridis K, Scorilas A, Babis GC: Quantitative analysis of the mRNA expression levels of BCL2 and BAX genes in human osteoarthritis and normal articular cartilage: An investigation into their differential expression. *Mol Med Rep* 2015;12:4514–4521.
- 54 Raimann a., Ertl D a., Helmreich M, Sagmeister S, Egerbacher M, Haeusler G: Fibroblast growth factor 23 and Klotho are present in the growth plate. *Connect Tissue Res* 2013;54:108–17.
- 55 Bianchi A, Guibert M, Cailotto F, Gasser A, Presle N, Mainard D, et al.: Fibroblast

- Growth Factor 23 drives MMP13 expression in human osteoarthritic chondrocytes in a Klotho-independent manner. *Osteoarthr Cartil* 2016;24:1961–1969.
- 56 Almonte-Becerril M, Navarro-Garcia F, Gonzalez-Robles A, Vega-Lopez MA, Lavalle C, Kouri JB: Cell death of chondrocytes is a combination between apoptosis and autophagy during the pathogenesis of Osteoarthritis within an experimental model. *Apoptosis* 2010;15:631–638.
- 57 Xie B, Zhou J, Shu G, Liu D-C, Zhou J, Chen J, et al.: Restoration of klotho gene expression induces apoptosis and autophagy in gastric cancer cells: tumor suppressive role of klotho in gastric cancer. *Cancer Cell Int* 2013;13:18.
- 58 White E, Mehnert JM, Chan CS: Autophagy, Metabolism, and Cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21:5037–5046.
- 59 Li L, Zhang M, Zhang L, Cheng Y, Tu X, Lu Z: Klotho Regulates Cigarette Smoke-Induced Autophagy: Implication in Pathogenesis of COPD. *Lung* 2017;195:295–301.
- 60 Chen ZH, Kim HP, Scieurba FC, Lee SJ, Feghali-Bostwick C, Stolz DB, et al.: Egr-1 regulates autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 2008;3. DOI: 10.1371/journal.pone.0003316
- 61 Chang J, Wang W, Zhang H, Hu Y, Wang M, Yin Z: The dual role of autophagy in chondrocyte responses in the pathogenesis of articular cartilage degeneration in osteoarthritis. *Int J Mol Med* 2013;32:1311–1318.
- 62 Lopez De Figueroa P, Lotz MK, Blanco FJ, Caram??s B: Autophagy activation and protection from mitochondrial dysfunction in human chondrocytes. *Arthritis Rheumatol* 2015;67:966–976.
- 63 Bohensky J, Terkhorn SP, Freeman TA, Adams CS, Garcia JA, Shapiro IM, et al.: Regulation of autophagy in human and murine cartilage: Hypoxia-inducible factor 2 suppresses chondrocyte autophagy. *Arthritis Rheum* 2009;60:1406–1415.

- 64 Ribeiro M, López de Figueroa P, Blanco FJ, Mendes AF, Caramés B: Insulin decreases autophagy and leads to cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 2016;24:731–739.
- 65 Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G: Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:741–752.
- 66 Roach HI, Aigner T, Kouri JB: Chondroptosis: A variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis* 2004;9:265–277.
- 67 Panesso MC, Shi M, Cho HJ, Paek J, Ye J, Moe OW, et al.: Klotho has dual protective effects on cisplatin-induced acute kidney injury. *Kidney Int* 2014;85:855–70.
- 68 Medici D, Razzaque MS, DeLuca S, Rector TL, Hou B, Kang K, et al.: FGF-23 - Klotho signaling stimulates proliferation and prevents vitamin D-induced apoptosis. *J Cell Biol* 2008;182:459–465.
- 69 Li Z-Y, Wu Y-F, Xu X-C, Zhou J-S, Wang Y, Shen H-H, et al.: Autophagy as a Double-Edged Sword in Pulmonary Epithelial Injury: A Review and Perspective. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2017;ajplung.00562.2016.
- 70 Chen Z-H, Lam HC, Jin Y, Kim H-P, Cao J, Lee S-J, et al.: Autophagy protein microtubule-associated protein 1 light chain-3B (LC3B) activates extrinsic apoptosis during cigarette smoke-induced emphysema. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:18880–18885.
- 71 Aigner T, Stöve J: Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1569–1593.



## Figure legends

**Fig. 1:** Klotho and autophagy concomitantly decrease while OA features appear in aging C57BL/6 mice articular cartilage. Knee joints from 1, 6, 12, 18 and 24-month-old male C57BL/6 mice were analyzed by histology and immunohistochemistry as described in the materials and methods. **(A)** Safranin-O staining and Klotho immunohistochemistry. **(B)** Modified histological OARSI scoring, and mean chondrocyte death score (see text for details). Data are presented as mean values  $\pm$  SEM.  $*=p<0.05$  versus 1 month-old mice,  $\#=p<0.05$  versus 6-month-old mice, and  $\$=p<0.05$  versus 12-month-old mice. **(C)** Autophagy markers LC3b and Beclin-1 expression were also evaluated by immunohistochemistry in 1, 6 and 18-month-old mice.  $n=6$  knee joints for each age. Scale bar 100  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 2:** Klotho-deficient mice cartilage phenotype and autophagy status. Knee joint of 1.5 month-old  $KL^{-/-}$  and wild-type mice were analyzed by histology and immunohistochemistry as described in the material and methods. **(A)** Safranin-O staining. **(B)** Histological OARSI score [44–46] and histologic evaluation of chondrocyte death and hypertrophy. Data are presented as mean values  $\pm$  SEM.  $*=p<0.05$  versus wild-type mice. **(C)** Immunohistochemistry for LC3b and Beclin-1 expression, and quantification of LC3b and Beclin-1-positive cells (% of positive cells compared to total number of cells).  $n=6$  knee joints for each strain. Scale bar 100  $\mu\text{m}$ .  $*=p<0.05$  versus wild-type mice.

**Fig. 3:** Effect of Klotho on basal autophagy in murine chondrocytes. **(A)** iMACs were treated with increasing doses of recombinant murine Klotho (1 to 1000 pM) for 24h and autophagy markers Ulk1 and LC3b expression was evaluated by Western Blot. **(B)** iMACs were treated with recombinant murine Klotho (1, 100 and 1000 pM) and Chloroquine (25  $\mu\text{M}$ ) was added

for the last 4h of treatment. LC3b expression was evaluated by Western blot. (C) FGF23 (100 ng/ml), a cofactor of Klotho, was added simultaneously with Klotho (1000 pM) for 24h in the presence of chloroquine (25  $\mu$ M) or not for the last 4h. Quantitative results are expressed relative to control and represented as mean values  $\pm$  SEM of three independent experiments.

**Fig. 4:** Klotho counteracts the effect of IL1- $\beta$  on autophagy in iMACs. (A-B) iMACs were treated with increasing doses of IL1- $\beta$  (0.1, 1 and 10 ng/ml) for 24h. Autophagy markers Ulk1 and LC3b expression levels were evaluated by Western Blot (A), and typical OA markers *Mmp13*, *Adamts5*, *Cox2* and *iNos* mRNA expressions were quantified (B). Results are expressed relative to control. (C-D) iMACs were then treated with recombinant Klotho (1000 pM) for 24h followed by treatment with IL1- $\beta$  (10 ng/ml) for another 24h. Ulk1 and LC3b-II/I ratio (C) and OA markers *Mmp13*, *Adamts5*, *Cox2* and *iNos* mRNA expressions (D) were analyzed. Results are expressed as a fold change relative to IL1- $\beta$  alone treated cells (i.e. in absence of Klotho). Data are represented as mean values  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*=p<0.05 versus control.

**Fig. 5:** Klotho mediates apoptosis in chondrocytes. (A) The apoptosis status in 1.5 months old KL<sup>-/-</sup> mice knees was compared to wild-type mice, and evaluated by TUNEL assay and caspase-3 immunostaining. n=6 knee joints for each strain. Scale bar 100  $\mu$ m. (B-C) Bax/Bcl-2 ratio was assessed by RT-qPCR in chondrocytes treated with increasing doses of IL1- $\beta$  (0.1 to 10 ng/ml) for 24h (B), and in iMACs treated with recombinant Klotho (1000 pM) for 24h followed by IL1- $\beta$  treatment for another 24h (C). Results are expressed relative to control, or as a fold change relative to IL1- $\beta$  alone treated cells (i.e. in absence of Klotho). Data are represented as mean values  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*=p<0.05 versus control.

Figure 1: Le Tilly et al.

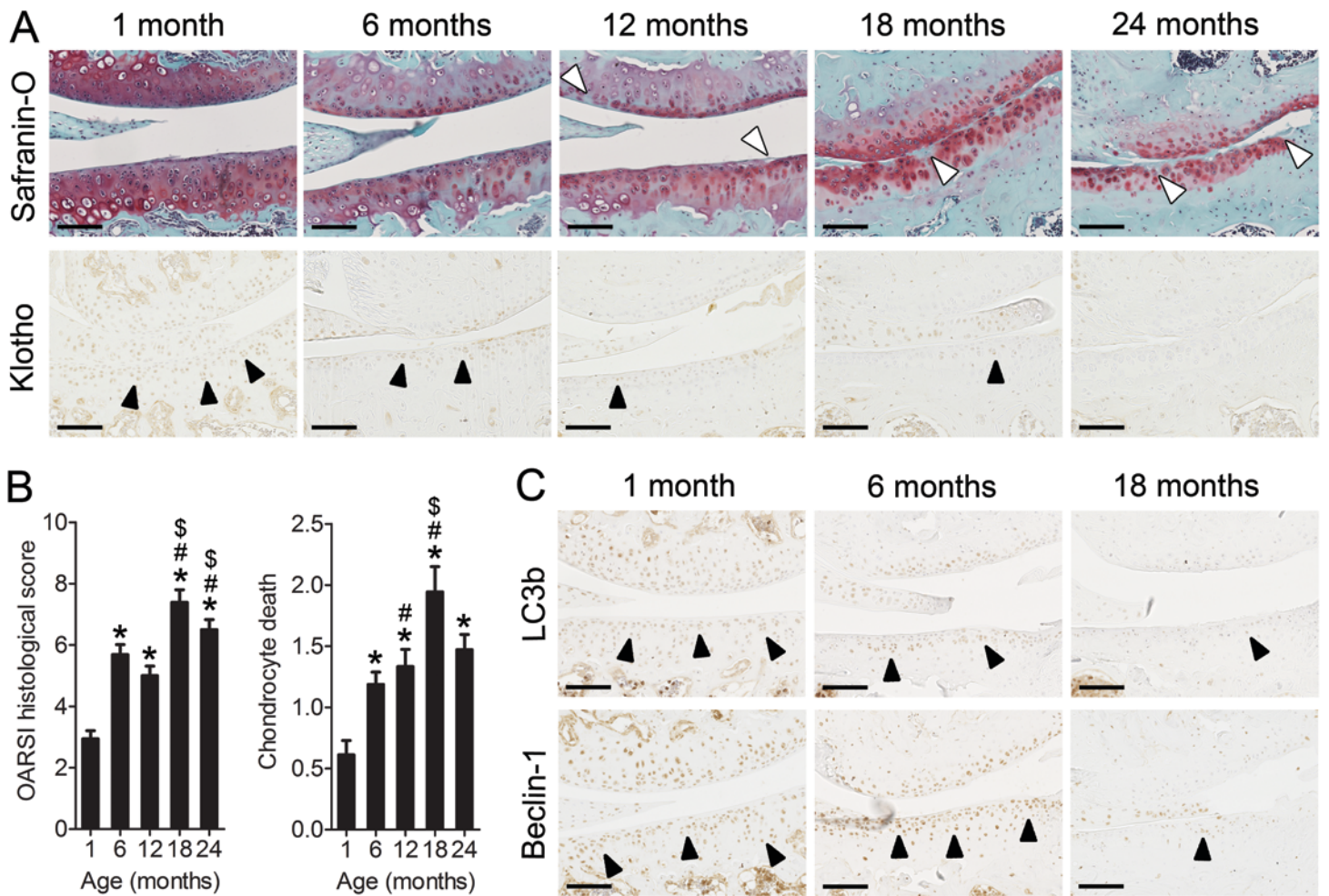


Figure 2: Le Tilly et al.

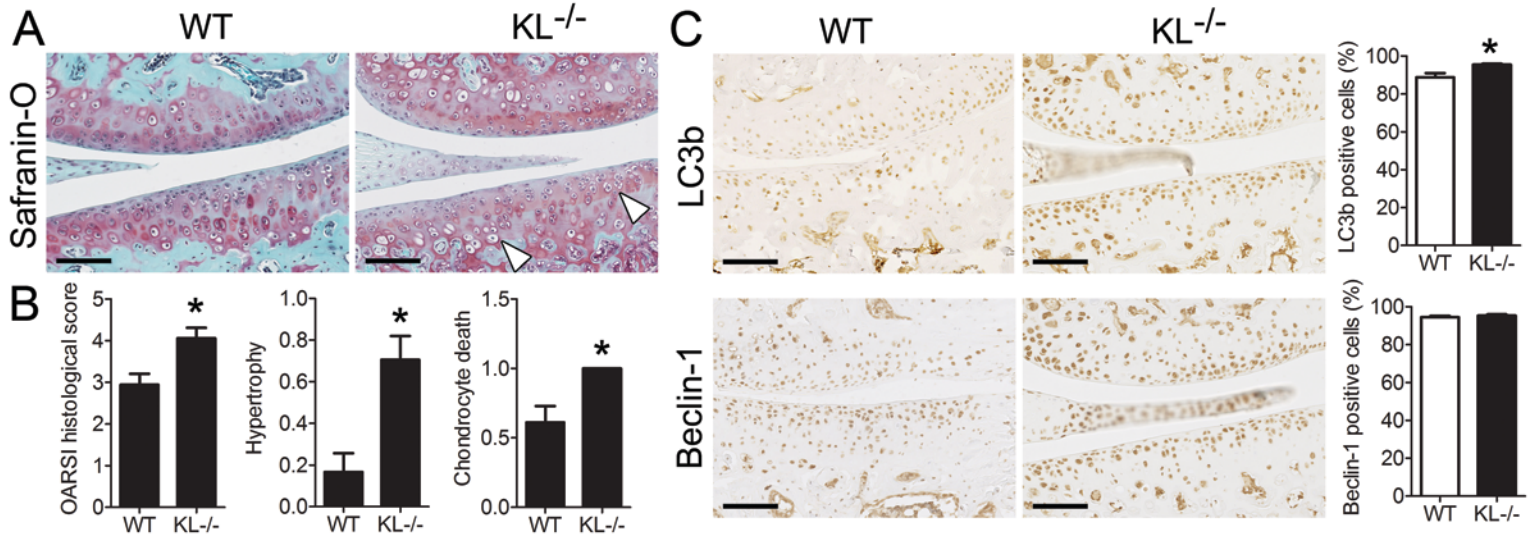


Figure 3: Le Tilly et al.

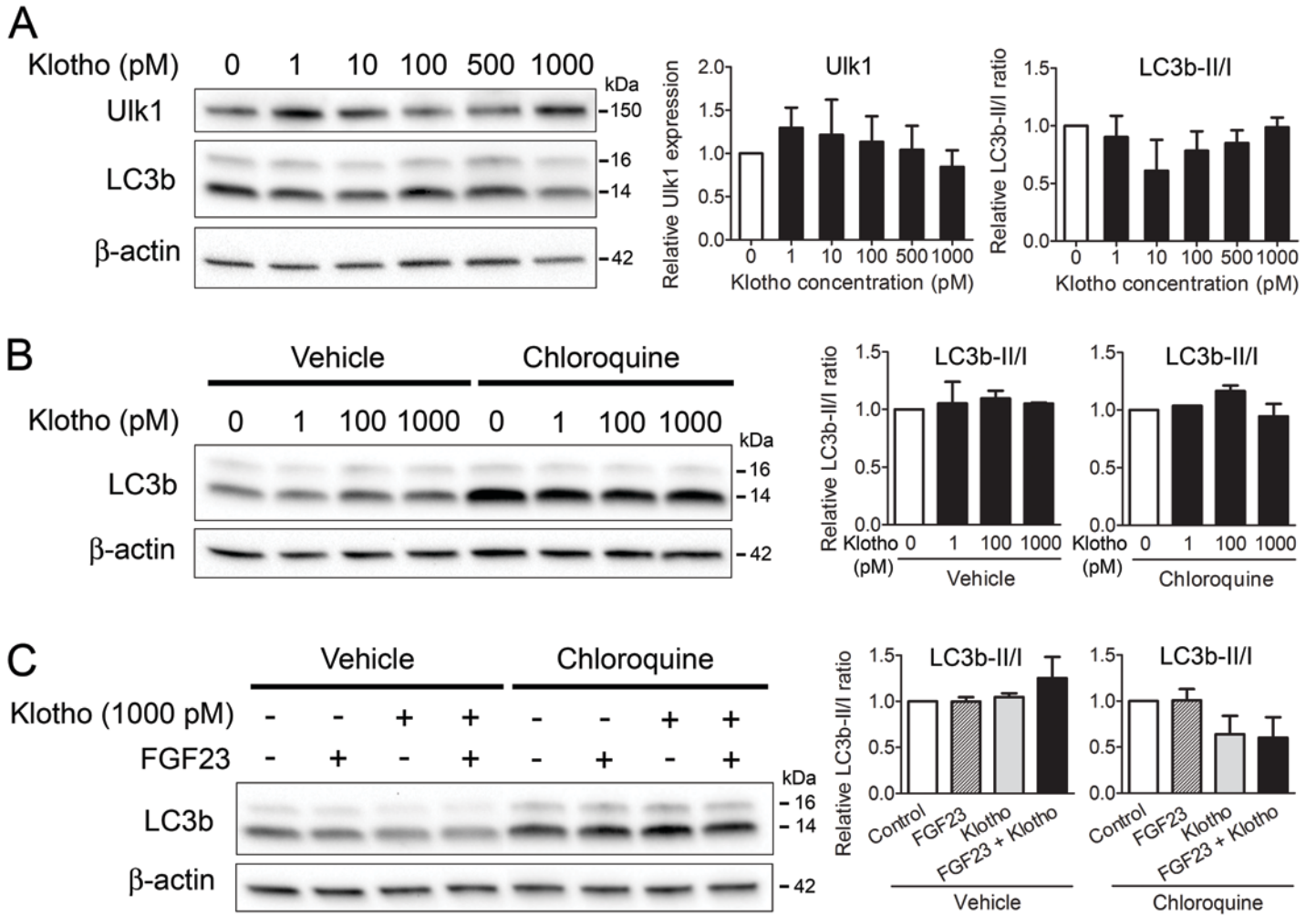


Figure 4: Le Tilly et al.

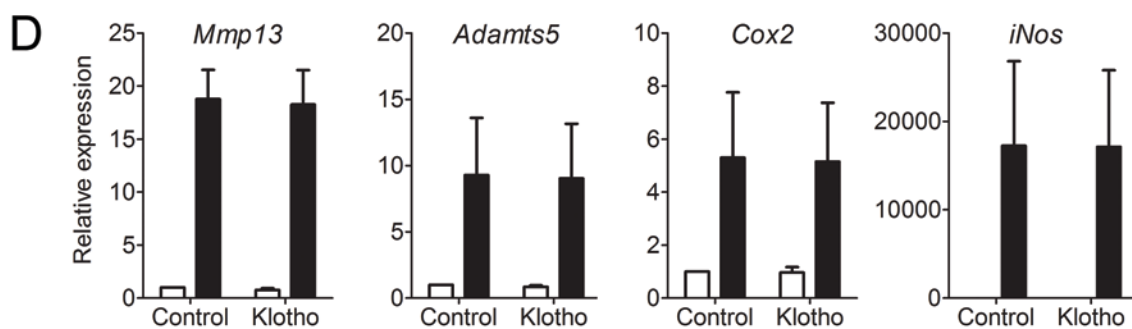
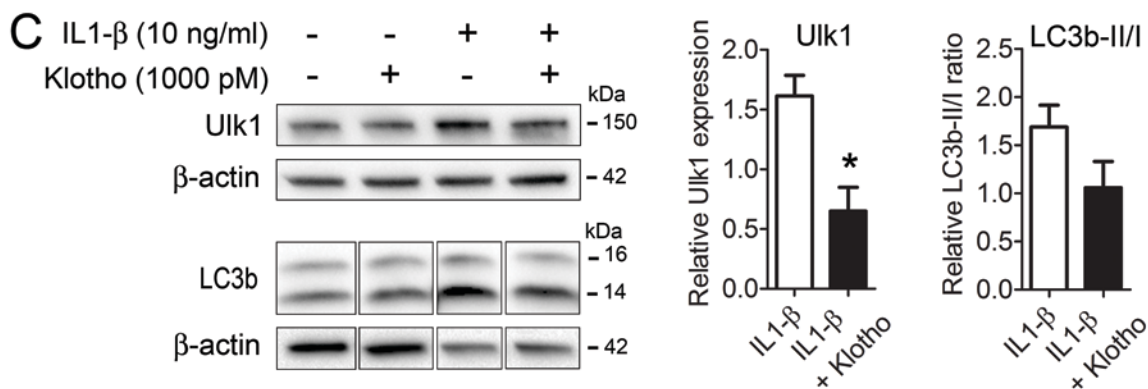
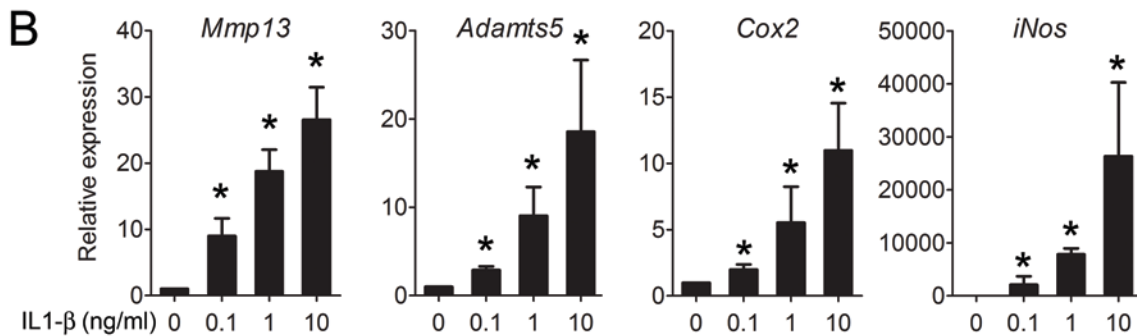
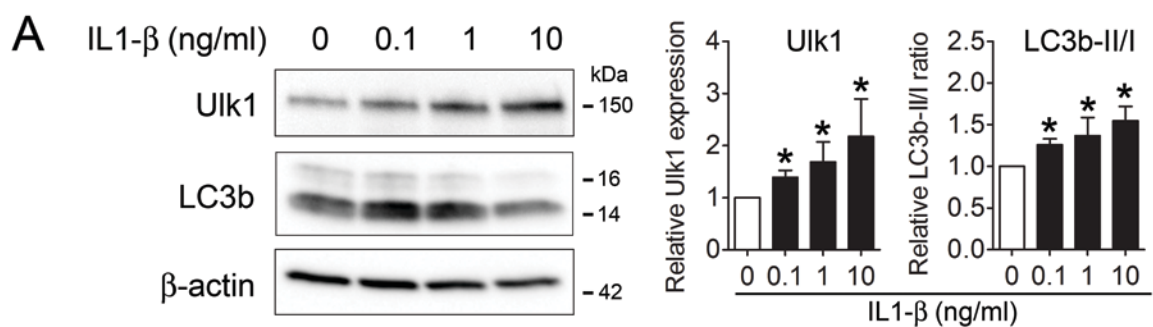
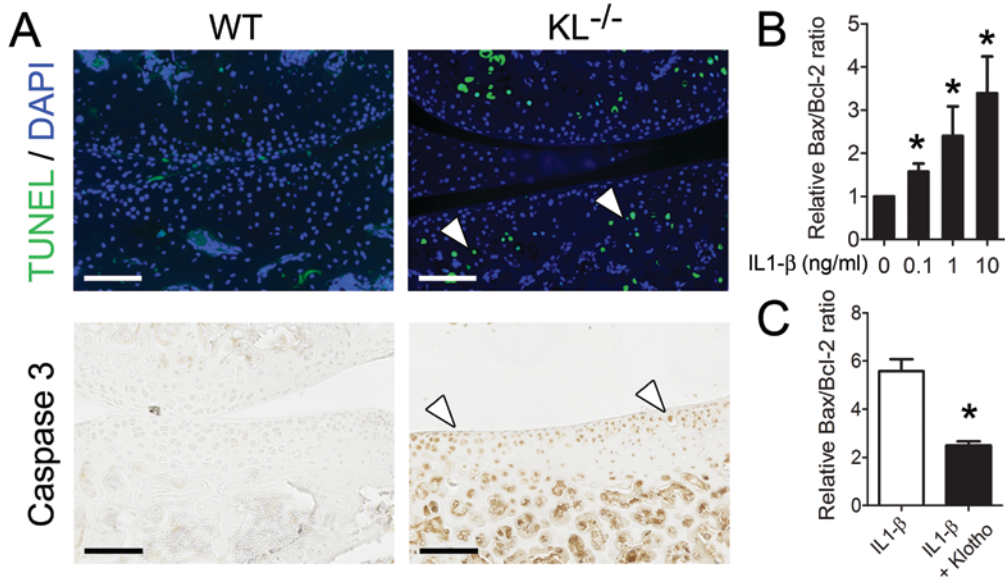




Figure 5: Le Tilly et al.



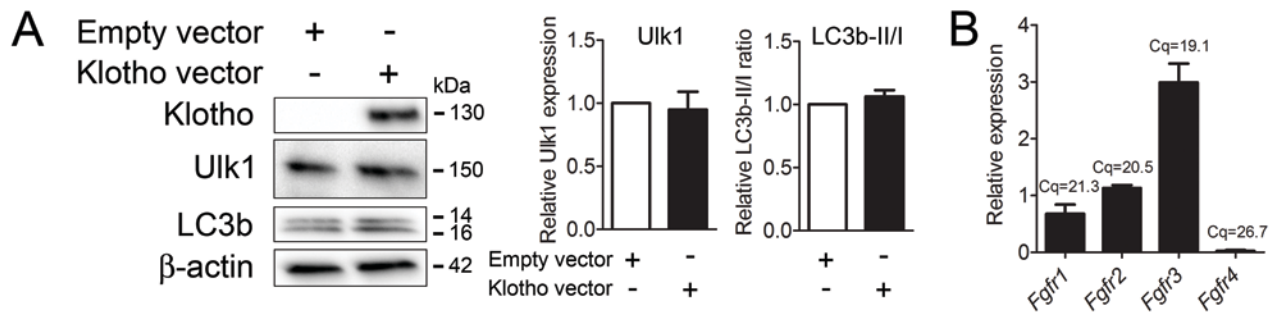
### **Supplementary figure legends**

**Supplementary Figure S1:** Autophagy status in Klotho-overexpressing chondrocytes, and expression of the different FGFR in iMACs. **(A)** Klotho expression was verified after transfection in iMACs, and autophagy markers Ulk1 and LC3b expression was evaluated in Klotho-overexpressing chondrocytes 24h after transfection. **(B)** The mRNA expression of the different FGF receptors was evaluated by qPCR. Data are represented as mean values  $\pm$  SEM of three independent experiments.

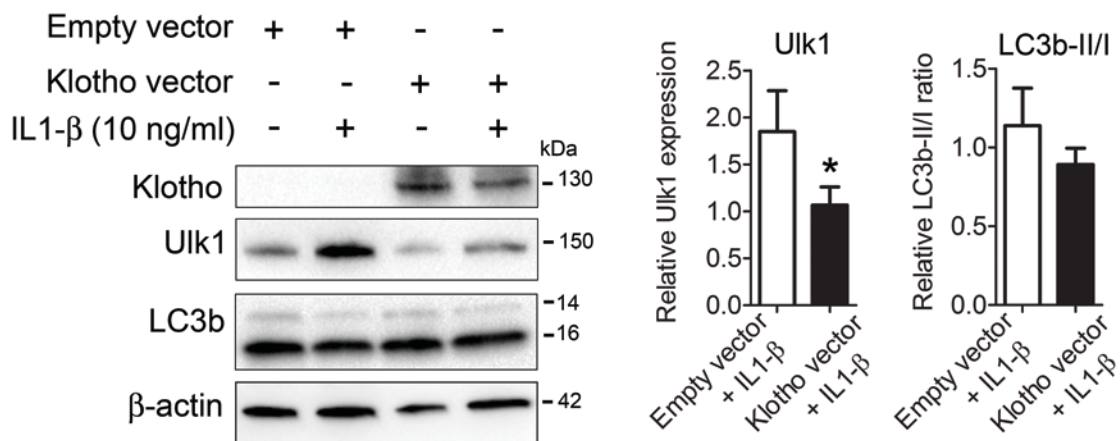
**Supplementary Figure S2:** Klotho overexpression counteracts the effect of IL1- $\beta$  on autophagy in iMACs. Klotho-overexpressing chondrocytes were stimulated with IL1- $\beta$  (10 ng/ml) for 24h, and autophagy markers Ulk1 and LC3b expression levels were quantified by Western Blot. Results are expressed as a fold change relative to IL1- $\beta$  alone treated cells (i.e. in absence of Klotho). Data are represented as mean values  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*= $p < 0.05$  versus control.



# Supplementary Figure S1: Le Tilly et al.

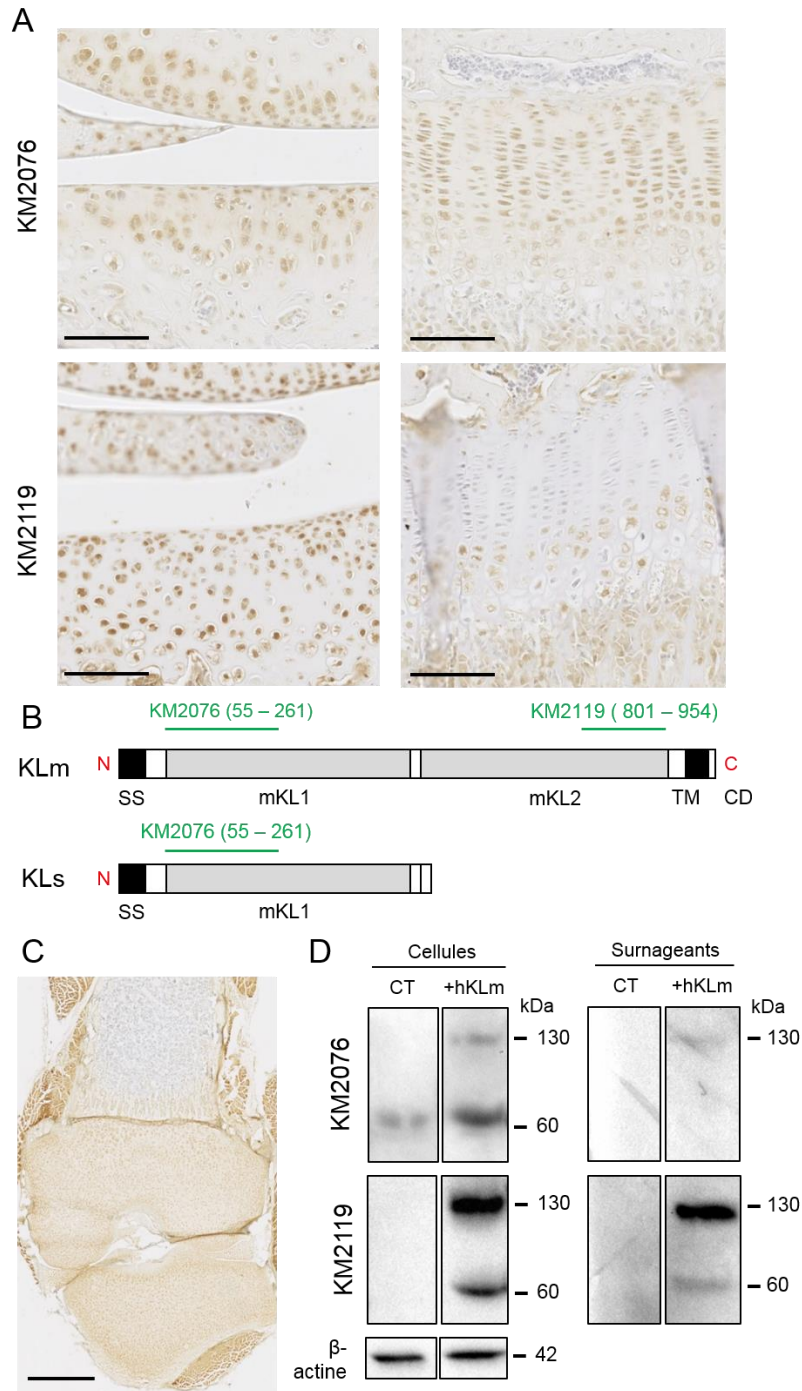


## Supplementary Figure S2: Le Tilly et al.



**Supplementary Table SI : Le Tilly et al.**

mRNA	Forward primer	Reverse primer
Mmp13	5'-CTATCCCTTGATGCCATTACCAG-3'	5'-ATCCACATGGTTGGGAAGTTC-3'
Adamts5	5'-ATGTGTGCAAGCTTACCTGC-3'	5'-ATCCAGTTCTCACACACCGT-3'
Cox2	5'-TGAGCAACTATTCCAAACCAGC-3'	5'-GCACGTAGTCTTCGATCACTATC-3'
iNos	5'-TCTTGGAGCGAGTTGTGGAT-3'	5'-GGGGTCGTAATGTCCAGGAA-3'
Bax	5'-TGAAGACAGGGGCCTTTTTG-3'	5'-AATTCCGCCGGAGACACTCG-3'
Bcl-2	5'-ATGCCTTTGTGGA ACTATATGGC-3'	5'-GGTATGCACCCAGAGTGATGC-3'
Fgfr1	5'-ACTCTGCGCTGGTTGAAAAAT-3'	5'-GGTGGCATAGCGAACCTTGTA-3'
Fgfr2	5'-GCTATAAGGTACGAAACCAGCAC-3'	5'-GGTTGATGGACCCGTATTCATTC-3'
Fgfr3	5'-CCGGCTGACACTTGGTAAG-3'	5'-CTTGTCGATGCCAATAGCTTCT-3'
Fgfr4	5'-GCTCGGAGGTAGAGGTCTTGT-3'	5'-CCACGCTGACTGGTAGGAA-3'
Pinin	5'-ACCTGGAAGGGGCAGTCAGTA-3'	5'-ATCATCGTCTTCTGGGTCGCT-3'



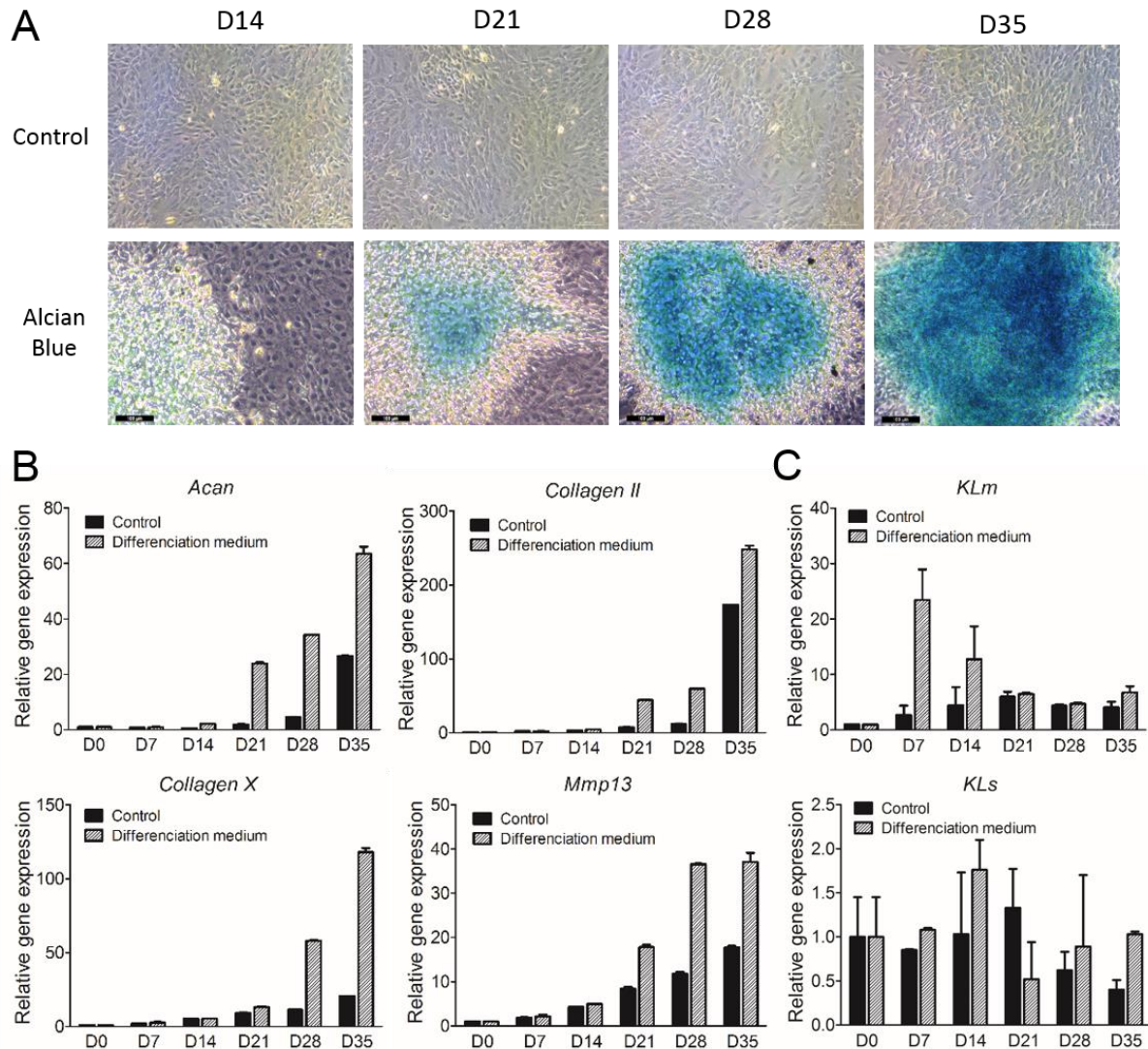
**Figure 39 : Profil d'expression de  $\alpha$ -Klotho dans le tissu cartilagineux.** (A) Profil d'expression de  $\alpha$ -Klotho dans le cartilage artériel et la plaque de croissance de souris C57BL/6 âgées de 1 mois (Echelle : 100  $\mu$ m). (B) Schéma représentant les séquences reconnues par les différents anticorps anti- $\alpha$ -Klotho. (C) Expression de  $\alpha$ -Klotho dans des épiphyses de souris âgées de 6 jours (KM2119) (Echelle : 500  $\mu$ m). (D) Profil d'expression des différentes formes de  $\alpha$ -Klotho dans des chondrocytes artériels murins (iMACs) surexprimant la forme membranaire de  $\alpha$ -Klotho humaine (hKLm).

Résultats complémentaires, discussion et perspectives de ce travail :

a) Expression différentielle des différentes formes de  $\alpha$ -Klotho

A ce jour, une seule étude, chez le cochon, décrit la présence de  $\alpha$ -Klotho dans le tissu cartilagineux (Raimann et al., 2013). Notre étude a permis de montrer pour la première fois l'expression de  $\alpha$ -Klotho dans le cartilage articulaire chez la souris. Au cours de ce travail, nous nous sommes aussi intéressés à la caractérisation des différentes formes de  $\alpha$ -Klotho dans le cartilage (Figure 39). En effet, des études ont montré que chez la souris, la forme prédominante était la forme membranaire, alors que c'est la forme sécrétée qui serait la plus abondante chez l'Homme (MATSUMURA ET AL., 1998; LI ET AL., 2004). Nous avons utilisé 2 anticorps (KM2076 et KM2119) qui permettent de distinguer la forme totale de  $\alpha$ -Klotho (KL1-KL2) des formes courtes (KL1) obtenues par épissage ou clivage (Figure 39B) (Kato et al., 2000). Au sein du cartilage articulaire nous n'avons pas observé de différence de marquage entre les 2 anticorps (Figure 39A). Toutefois, nous avons remarqué un profil d'expression différent dans la plaque de croissance des souris âgées de 1 mois : les chondrocytes prolifératifs (organisées en « piles d'assiettes ») ne sont pas marqués avec l'anticorps KM2119, suggérant que la forme longue de  $\alpha$ -Klotho (KL1-KL2) n'est pas exprimée dans les chondrocytes prolifératifs. Cette forme est cependant exprimée dans les chondrocytes articulaires ainsi que dans les chondrocytes hypertrophiques de la plaque de croissance.

*In vitro*, nous n'avons pas détecté la forme membranaire de  $\alpha$ -Klotho dans les chondrocytes murins immatures (iMACs) obtenus par digestion d'épiphyse de souriceaux âgés de 6 jours (Gosset et al., 2008). L'analyse de ces épiphyses avant digestion a cependant montré que la quasi-totalité des cellules sont marquées avec les deux anticorps (Figure 39C). Ces observations pourraient suggérer que la forme membranaire est clivée par des enzymes présentes dans les chondrocytes. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons transfecté dans les chondrocytes primaires un plasmide permettant la surexpression de la forme membranaire de  $\alpha$ -Klotho, KLm, puis nous avons analysé l'expression des différentes formes de  $\alpha$ -Klotho dans les lysats cellulaires et les surnageants de culture (Figure 39D).



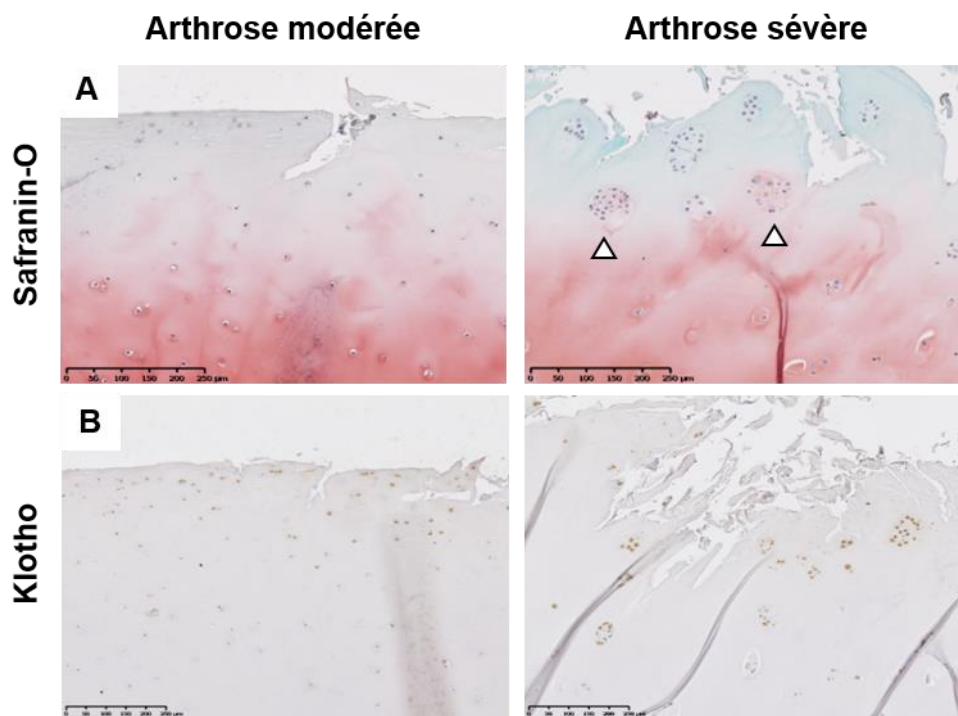
**Figure 40 : Expression de  $\alpha$ -Klotho et des marqueurs de différenciation au cours de la différenciation chondrocytaire à partir d'une lignée ATDC5. (A) La formation de nodules lors de la différenciation a été évaluée par coloration au bleu Alcian, qui colore les GAG en bleu (Barre d'échelle : 200  $\mu$ m). (B) L'expression des gènes agrécane (*Acan*), collagène II, collagène X et MMP13, ainsi que la forme membranaire de  $\alpha$ -Klotho (C) a été évaluée au cours de cette différenciation.**



Nos résultats montrent que la forme membranaire de  $\alpha$ -Klotho (130 kDa, correspondant à KL1-KL2) est détectée dans les lysats cellulaires, mais aussi dans les surnageants de culture, suggérant qu'il existe un clivage au niveau du segment transmembranaire dans les chondrocytes. Des formes courtes de 60 kDa sont aussi détectées avec les deux anticorps : celle correspondant au segment KL1 dans les cellules, et celle correspondant au segment KL2 dans les cellules et les surnageants. Ces observations montrent bien que les chondrocytes sont capables de cliver  $\alpha$ -Klotho au niveau des 2 sites de clivage  $\alpha$  et  $\beta$  décrits dans la partie introductive (partie 2 paragraphe 2.1). Dans la littérature, la présence des métalloprotéases ADAM10 et 17 a été démontrée dans des chondrocytes humains ou murins, et pourraient être responsables de ce clivage (Flannery et al., 1999; Hall et al., 2013).

#### b) Expression de $\alpha$ -Klotho au cours de la différenciation chondrocytaire

Pour compléter nos observations sur l'expression de  $\alpha$ -Klotho dans le cartilage articulaire, nous avons évalué l'expression de  $\alpha$ -Klotho au cours de la différenciation chondrocytaire dans la lignée ATDC5 (**Figure 40**). Cette lignée cellulaire, dérivée d'une lignée de tératocarcinome, est un modèle répandu permettant d'étudier les différentes étapes de la différenciation chondrocytaire, y compris les phénomènes d'hypertrophie et de minéralisation (Shukunami et al., 1997; Magne et al., 2003; Portron et al., 2015). Il a été démontré que cette lignée cellulaire, sous l'action d'ITS (Insuline-Transferrine-Sélénite), se différencie en chondrocytes au cours du temps jusqu'au stade hypertrophique. En utilisant cette approche, nous observons au cours de cette différenciation chondrocytaire la formation de nodules se colorant au bleu Alcian, révélant la présence de GAG de la matrice extracellulaire (**Figure 40A**). De plus, l'expression du collagène II et de l'agrécane augmente, de même que les marqueurs d'hypertrophie collagène X et MMP13 (**Figure 40B**). L'expression de  $\alpha$ -Klotho a été évaluée au cours de la différenciation chondrocytaire des ATDC5. Au cours de la différenciation, nous observons une augmentation de la forme membranaire de  $\alpha$ -Klotho (KLm) à J7, suivie d'une diminution de son expression jusqu'à J28. L'expression de la forme épissée (KLs), elle, n'est pas modifiée au cours de la différenciation. Ces résultats suggèrent que  $\alpha$ -Klotho pourrait être impliqué dans les phases précoces de différenciation.



**Figure 41 : Expression de  $\alpha$ -Klotho dans le cartilage articulaire humain arthrosique. (A)** Coloration à la Safranin-O du cartilage, qui montre la présence de lésions à la surface articulaire ainsi que la présence de clusters de chondrocytes (flèches), caractéristiques d'une arthrose sévère. **(B)** Immunomarquage de  $\alpha$ -Klotho (anticorps KM2119).

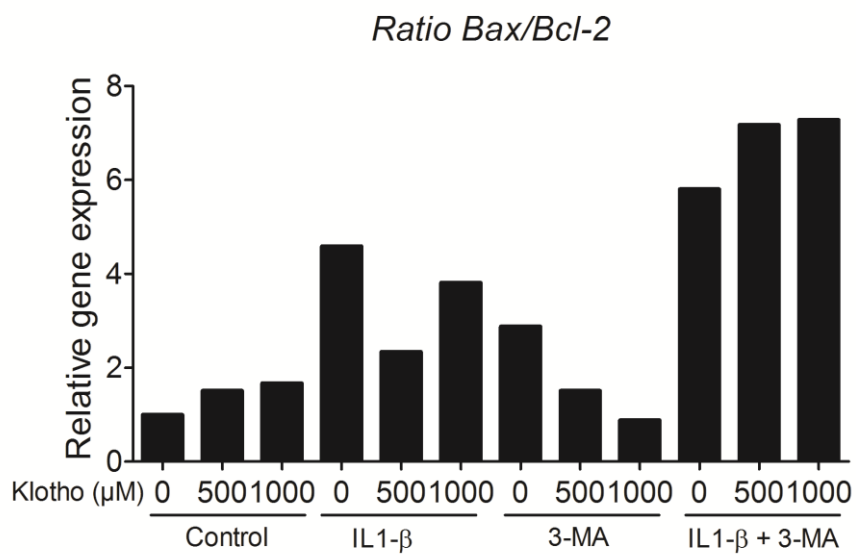


c) Expression de  $\alpha$ -Klotho dans le cartilage articulaire humain

Parallèlement aux observations faites chez la souris, nous avons aussi décrit la présence de  $\alpha$ -Klotho dans le cartilage articulaire arthrosique humain (**Figure 41**). Nous remarquons la présence d'un marquage dans la zone superficielle, présent dans les zones atteintes d'arthrose modérée, et plus intense dans les « clusters » de chondrocytes, dont la présence est caractéristique d'une arthrose avancée. Comme nous l'avons vu précédemment, ces clusters peuvent contenir jusqu'à 20 cellules et expriment différents marqueurs cataboliques et anaboliques, ainsi que des marqueurs de cellules progénitrices (Lotz et al., 2010). Leur rôle est pour le moment assez mal décrit, mais ces chondrocytes auraient la capacité de proliférer et de produire des nodules cartilagineux (Hoshiyama et al., 2015). Ainsi, il est possible que l'expression de  $\alpha$ -Klotho dans ces clusters présents dans des stades avancés d'arthrose, puisse être en lien avec le rôle bénéfique de  $\alpha$ -Klotho sur la survie cellulaire, traduisant une tentative de réparation du tissu lésé.

d) De la balance autophagie/senescence vers le lien autophagie-apoptose

Dans le cadre de l'étude du rôle de  $\alpha$ -Klotho dans l'arthrose, nous avons comme projet original de définir son implication dans la balance existant entre les phénomènes d'autophagie et de senescence. Cependant, le modèle de culture primaire de iMACs que nous avons utilisé lors de cette thèse s'est révélé un outil non adapté pour évaluer la senescence *in vitro*. En effet, notre modèle de chondrocytes murins immatures issus de souris très jeunes, s'est montré résistant à l'expression de la SA- $\beta$ -galactosidase. Nous avons testé d'autres protocoles d'isolation de chondrocytes articulaires à partir de souris âgées, sans succès. Faute de modèle adapté, nous avons donc mis de côté cette partie du projet et nous sommes concentrés sur le rôle de  $\alpha$ -Klotho sur l'autophagie, dont les études récentes montraient un rôle protecteur dans l'arthrose. Puis c'est après avoir observé une apoptose importante dans le cartilage des souris invalidées pour  $\alpha$ -Klotho, que nous nous sommes intéressés aux liens existants entre apoptose et autophagie. Nous avons alors montré une diminution de l'autophagie et de l'expression du ratio Bax/Bcl-2 dans les chondrocytes stimulés à l'IL1- $\beta$  en présence de  $\alpha$ -Klotho (Article 2).

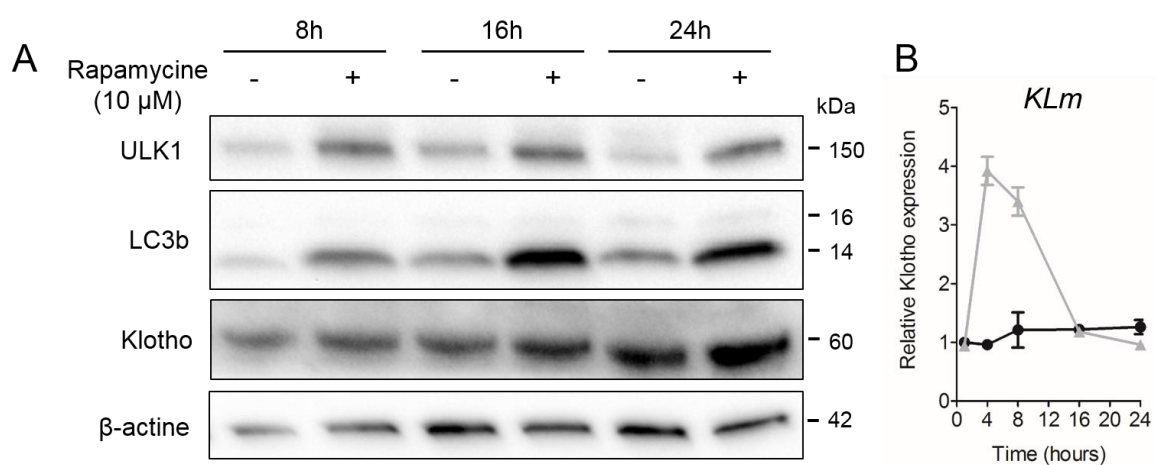


**Figure 42 : Expression du ratio Bax/Bcl-2 dans des chondrocytes murins stimulés par l'IL1-β (10 ng/ml) et/ou un inhibiteur de l'autophagie, la 3-méthyladenine (3-MA) (5 mM), en présence ou non de différentes concentrations de α-Klotho (500 et 1000 μM).**

Afin de déterminer si l'action de  $\alpha$ -Klotho sur ces 2 phénomènes est indépendante l'une de l'autre ou s'il existe un lien direct, l'utilisation d'un inhibiteur de l'autophagie (3-méthyladenine, qui inhibe la PI3K, ou par un siRNA ULK1 par exemple) ou de l'apoptose (de type z-VAD-FMK, un inhibiteur des caspases) permettrait d'apporter des éléments de réponse.

Dans cette optique, nous avons évalué comment le ratio Bax/Bcl-2 (utilisé comme marqueur d'apoptose) était modulé par un inhibiteur d'autophagie, la 3-méthyladenine, dans des chondrocytes stimulés ou non par l'IL1- $\beta$ , en présence ou non de  $\alpha$ -Klotho (**Figure 42**). En absence de  $\alpha$ -Klotho, l'IL1- $\beta$  induit comme attendu une augmentation du ratio Bax/Bcl2. L'ajout de 3-MA seul induit lui aussi une augmentation du ratio Bx/Bcl2, suggérant que l'apoptose serait augmentée lorsque l'autophagie est bloquée. De plus, même s'il n'est pas possible à ce stade d'en tirer une conclusion, les effets de l'IL-1- $\beta$  et de la 3-MA sur l'apoptose ne semblent s'additionner que très partiellement. De manière intéressante, l'ajout de  $\alpha$ -Klotho en présence de l'inhibiteur de l'autophagie diminue le ratio Bax/Bcl2, semblant indiquer que l'action de  $\alpha$ -Klotho sur l'apoptose ne nécessite pas un flux autophagique intègre. Cette observation n'est cependant pas identique lorsque les cellules sont traitées par l'IL1- $\beta$ , puisque l'effet de  $\alpha$ -Klotho sur l'apoptose dans ces conditions n'est plus visible, suggérant que l'effet de  $\alpha$ -Klotho sur l'induction de l'apoptose par l'IL1- $\beta$  ne serait pas direct, mais pourrait passer par une inhibition de l'autophagie.

Notre expérience de thèse nous a éclairés sur la difficulté de l'étude des mécanismes de mort des chondrocytes. Alors que l'autophagie des chondrocytes reste aisée à suivre *in vitro*, nous avons eu beaucoup plus de difficultés à décrypter les voies conduisant à l'apoptose des chondrocytes. Nous avons évalué l'expression de différents marqueurs d'apoptose au cours de cette étude (dont PARP et la caspase 3) mais n'avons pas observé d'augmentation de leur expression suite au traitement par l'IL1- $\beta$ . Nous pouvons proposer deux hypothèses à ces phénomènes. La première est que les chondrocytes stimulés par l'IL1- $\beta$  entrent dans un mécanisme d'apoptose indépendante des caspases ([Kroemer et al., 2005](#)) ; dans ce cas l'évaluation de l'expression des protéines AIF (Apoptosis inducing factor), endonucléase G, Smac/DIABLO et HtrA2/Omi pourrait être intéressante. La seconde est que les chondrocytes entrent en chondroptose (cf partie 1 paragraphe 2.4.2d), et donc



**Figure 43 : Régulation de l'expression de  $\alpha$ -Klotho par la rapamycine.** Les chondrocytes murins (iMACs) ont été traités par la rapamycine (10  $\mu$ M) pendant 1 à 24h, et l'expression protéique des marqueurs d'autophagie et de  $\alpha$ -Klotho (**A**), ainsi que de l'ARN messager  $\alpha$ -Klotho (en noir la condition contrôle, et en gris la condition traitée par la rapamycine) (**B**) ont été évalué par Western Blot ou qPCR.

possèdent à la fois des caractéristiques d'apoptose et d'autophagie. L'observation de l'ultrastructure des cellules par microscopie électronique permettrait d'apporter des éléments de réponse à cette hypothèse.

#### e) Régulation de $\alpha$ -Klotho par l'autophagie

Prenant en compte l'existence presque universelle de boucles de régulation, nous avons déterminé si l'expression de  $\alpha$ -Klotho était régulée par l'autophagie. Dans ce but nous avons stimulé des chondrocytes murins immatures par la rapamycine et analysé l'expression de  $\alpha$ -Klotho (**Figure 43**). L'induction de l'autophagie par la rapamycine, (mais aussi par la déprivation en nutriments en incubant les cellules par de l'EBSS), s'accompagne d'une augmentation des marqueurs de l'autophagie (**Figure 43A**), ainsi que de l'expression de l'ARN messager  $\alpha$ -Klotho (entre 1h et 8h) (**Figure 43B**) qui se traduit par une augmentation de l'expression de la protéine (entre 8h et 24h) (**Figure 43A**). La rapamycine inhibant la voie mTOR, la compréhension des mécanismes impliqués dans l'augmentation de  $\alpha$ -Klotho impliquerait de suivre l'expression de  $\alpha$ -Klotho tout en modulant le niveau d'autophagie : en l'inhibant avec la 3-MA ou un siRNA ULK1, ou en l'activant via un siRNA dirigé contre la protéine TSC1 qui régule négativement la protéine mTOR. Compte-tenu du fait qu'il a été montré que l'activation de la voie mTOR dans les chondrocytes entraîne une prolifération et une différenciation aberrante des chondrocytes, conduisant au développement d'arthrose de façon indépendante de l'autophagie ([Zhang et al., 2017](#)), ces expériences seraient cruciales pour analyser le lien entre  $\alpha$ -Klotho et mTOR.

## **CONCLUSION**

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux liens intimes qui existent entre arthrose et vieillissement. Dans une première partie, nous avons étudié l'effet d'un mélange de molécules naturelles anti-oxydantes et anti-inflammatoires dans un modèle murin d'arthrose liée au vieillissement, et montré un ralentissement de la progression de l'arthrose grâce à ce traitement. Malgré l'existence de nombreuses études montrant des effets bénéfiques de ce type de molécules dans l'arthrose *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal, aucune étude clinique ne permet pour le moment de recommander l'utilisation de ces composés (Henrotin et al., 2011). Ceci est d'autant plus dommageable que le développement de ces thérapeutiques basées sur les nutraceutiques offrirait une alternative intéressante au coût des traitements actuels de l'arthrose, notamment ceux de la chirurgie de remplacement. Ainsi, la mise en place de recommandations alimentaires, notamment pour les polyphénols qui sont présents en grande quantité dans différents aliments, pourrait représenter une alternative préventive au développement de l'arthrose, et d'une manière plus globale sur la santé humaine, au vu de nos résultats sur la courbe de survie des souris traitées par le mélange nutraceutique.

Dans une deuxième partie, nous avons évalué le rôle de la protéine anti-vieillesse  $\alpha$ -Klotho dans le développement de l'arthrose, et montré un rôle bénéfique de  $\alpha$ -Klotho dans la prévention de la mort des chondrocytes. Au vu de ce rôle, il paraîtrait alors intéressant d'augmenter son expression au sein du cartilage articulaire. En effet, la disparition des chondrocytes au sein de la matrice cartilagineuse étant un évènement inhérent à la progression de l'arthrose, des traitements ayant pour but de prévenir, limiter ou retarder la mort cellulaire sont d'une importance cruciale dans la prise en charge de l'arthrose.

Combinant nos deux principales observations, nous avons montré que l'épigallocatechine gallate (EGCG) extrait du thé vert était capable d'augmenter l'expression de  $\alpha$ -Klotho *in vitro*, suggérant une nouvelle fois un potentiel effet bénéfique de l'utilisation de ces molécules dans le traitement de l'arthrose. Par ailleurs, le rationnel de cette stratégie est renforcé par les études qui montrent un effet bénéfique de  $\alpha$ -Klotho et des polyphénols sur la sénescence, ainsi que les études démontrant que l'élimination des cellules sénescents prévient l'arthrose et allonge la durée de vie (Baker et al., 2016; Jeon et al., 2017).

Au vu des résultats obtenus au cours de cette thèse, plusieurs points me sembleraient intéressants à approfondir.

Tout d'abord, il semble indispensable de confirmer le phénotype articulaire des souris invalidées pour  $\alpha$ -Klotho dans un modèle d'invalidation spécifique dans le cartilage articulaire. En effet, comme décrit précédemment, de nombreuses études montrent l'implication de  $\alpha$ -Klotho dans le stress oxydant, lequel est aussi impliqué dans les phénomènes d'apoptose et d'autophagie au cours de l'arthrose. Il est donc possible que la suppression du gène  $\alpha$ -Klotho induise un stress circulant qui pourrait être responsable du phénotype que nous observons dans le cartilage articulaire (augmentation de l'apoptose et de l'autophagie). Pour répondre à cette question, le laboratoire a obtenu un financement afin de générer des souris invalidées spécifiquement dans les chondrocytes, en croisant des souris floxées  $KL^{fl/fl}$  avec des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de l'agrécan  $Agc1^{tm(IRES-creERT2)}$ . En parallèle, le rôle de  $\alpha$ -Klotho dans l'équilibre antioxydant/pro-oxydant dans le cartilage arthrosique serait intéressant à étudier, et pourrait être en lien avec l'effet inhibiteur de  $\alpha$ -Klotho observé sur l'autophagie et l'apoptose des chondrocytes.

De plus, tout au long de ce projet nous ne nous sommes intéressés qu'à l'arthrose liée au vieillissement. Chez l'Homme, l'arthrose est à la fois liée au vieillissement mais aussi aux contraintes mécaniques et aux traumatismes articulaires. Il serait donc intéressant de décrire l'expression de  $\alpha$ -Klotho dans un modèle d'arthrose post-traumatique. Des premiers résultats préliminaires nous ont permis de montrer une augmentation de l'expression de  $\alpha$ -Klotho dans un modèle murin de déstabilisation du ménisque médial (DMM). Ces résultats sont donc en contradiction avec ceux observés chez la souris vieillissante, mais peuvent être liés à l'étiologie différente de la maladie. En effet, il a par exemple été démontré que la délétion de ATG5 spécifiquement dans le cartilage chez la souris entraînait une arthrose chez la souris vieillissante mais pas dans un modèle d'arthrose post-traumatique (Bouderlique et al., 2016). Les marqueurs d'autophagie et d'apoptose restent à évaluer afin de pouvoir établir des corrélations avec le profil d'expression de  $\alpha$ -Klotho. Par ailleurs, il sera intéressant de comparer le rôle de  $\alpha$ -Klotho dans les arthroses liées à l'âge et post-traumatique via l'utilisation des souris spécifiquement invalidées pour  $\alpha$ -Klotho dans le cartilage.



Enfin, l'étude du rôle de  $\alpha$ -Klotho pourrait être complétée chez l'Homme, par une analyse de l'expression de  $\alpha$ -Klotho et des marqueurs d'autophagie et d'apoptose dans des échantillons de cartilage arthrosique. Dans le cadre de mon projet de thèse nous avons pu avoir accès à des échantillons humains dans lesquels nous avons observé une augmentation de l'expression de  $\alpha$ -Klotho et de l'autophagie dans des échantillons atteints d'arthrose sévère, mais pour lesquels nous ne connaissons pas l'étiologie. La comparaison de ces résultats avec des échantillons de cartilage non arthrosiques ou atteints d'arthrose modérée permettrait de préciser le profil d'expression de  $\alpha$ -Klotho au cours de l'arthrose chez l'Homme.

## LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### Articles originaux :

- **Assessment of osteoarthritic damages in aging mice following nutraceutical supplementation using a combination of gait and radiographic analyses**

Elodie Le Tilly, Vincent Hivernaud, Sophie Sourice, Jérôme Abadie, Jérôme Guicheux, Laurent Beck

*En révision dans la revue Scientific Reports*

- **Involvement of the anti-aging protein Klotho in chondrocyte autophagy and apoptosis during osteoarthritis**

Elodie Le Tilly, Tatiana Ong, Jérôme Abadie, Jérôme Guicheux, Claire Vinatier, Laurent Beck

*En révision dans la revue Cellular Physiology and Biochemistry*

- **Interleukin-33 and RANK-L Interplay in the Alveolar Bone Loss Associated to Periodontitis**

Olivier Lapérine, Alexandra Cloitre, Jocelyne Caillon, Olivier Huck, Isaac Maximiliano Bugueno, Paul Pilet, Sophie Sourice, Elodie Le Tilly, Gaby Palmer, Jean-Luc Davideau, Valérie Geoffroy, Jérôme Guicheux, Sarah Beck-Cormier, Philippe Lesclous

*Publié dans la revue PLoS ONE (2016)*

### Revue (en préparation) :

- **The anti-aging factor Klotho: a potential target in osteoarthritis**

Elodie Le Tilly, Jérôme Guicheux, Laurent Beck, Claire Vinatier

Communications orales :

- **Non-invasive and functional evaluation of osteoarthritis by radiographic and gait analyses: application to the anti-inflammatory and anti-catabolic effects of a combination of natural molecules**

Elodie Le Tilly, Vincent Hivernaud, Jérôme Guicheux, Laurent Beck

18èmes Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés – 1<sup>er</sup> au 3 juin 2016, Nancy, France

- **Towards a role for the anti-aging factor Klotho in osteoarthritis and autophagy in chondrocytes**

Elodie Le Tilly, Claire Vinatier, Tatiana Ong, Jérôme Guicheux, Laurent Beck

19èmes Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés – 18 au 20 mai 2017, Lyon, France

Communications affichées :

- **Evaluation de l'arthrose chez la souris vieillissante par une approche non-invasive et fonctionnelle par radiologie et analyse de la marche**

Elodie Le Tilly, Vincent Hivernaud, Jérôme Guicheux, Laurent Beck

Journée d'études du projet LMA « Longévité, Mobilité, Autonomie » dans le cadre des Journées Scientifiques de l'Université de Nantes – 12 juin 2015, Nantes, France

- **Role of the anti-aging protein Klotho in the autophagy and senescence-associated development of osteoarthritis**

Elodie Le Tilly, Claire Vinatier, Tatiana Ong, Jérôme Guicheux, Laurent Beck

18èmes Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés – 1<sup>er</sup> au 3 juin 2016, Nancy, France

- **Non-invasive and functional evaluation of osteoarthritis by radiographic and gait analyses: application to the anti-inflammatory and anti-catabolic effects of a combination of natural molecules**  
Elodie Le Tilly, Vincent Hivernaud, Jérôme Guicheux, Laurent Beck  
Congrès OARSI « Osteoarthritis Research Society International » - 31 mars au 3 avril 2016, Amsterdam, Pays-Bas
- **Role of the anti-aging protein Klotho in the autophagy and senescence-associated development of osteoarthritis**  
Elodie Le Tilly, Claire Vinatier, Tatiana Ong, Jérôme Guicheux, Laurent Beck  
Congrès OARSI « Osteoarthritis Research Society International » - 31 mars au 3 avril 2016, Amsterdam, Pays-Bas
- **Towards a role for the anti-geronic factor Klotho in osteoarthritis and autophagy in chondrocytes**  
Elodie Le Tilly, Claire Vinatier, Tatiana Ong, Jérôme Guicheux, Laurent Beck  
Congrès OARSI « Osteoarthritis Research Society International » - 27 au 30 avril 2017, Las Vegas, Etats-Unis
- **Vers un rôle de la protéine anti-vieillessement Klotho dans l'arthrose et l'autophagie des chondrocytes**  
Elodie Le Tilly, Claire Vinatier, Tatiana Ong, Jérôme Guicheux, Laurent Beck  
Journée d'études du projet LMA « Longévité, Mobilité, Autonomie » dans le cadre des Journées Scientifiques de l'Université de Nantes – 2 juin 2017, Nantes, France
- **The anti-aging protein Klotho regulates cell death in osteoarthritic chondrocytes**  
Elodie Le Tilly, Tatiana Ong, Jérôme Abadie, Jérôme Guicheux, Claire Vinatier, Laurent Beck  
BBC2 meeting « Basic research in Bone and Cartilage Biology » - 5 et 6 octobre 2017, Nantes, France

## ANNEXE : TRAVAUX COLLABORATIFS

### **Interleukin-33 and RANK-L Interplay in the Alveolar Bone Loss Associated to Periodontitis - Publié dans la revue PLoS ONE (2016)**

Olivier Lapérine, Alexandra Cloitre, Jocelyne Caillon, Olivier Huck, Isaac Maximiliano Bugueno, Paul Pilet, Sophie Sourice, Elodie Le Tilly, Gaby Palmer, Jean-Luc Davideau, Valérie Geoffroy, Jérôme Guicheux, Sarah Beck-Cormier, Philippe Lesclous

La parodontite chronique est une maladie inflammatoire d'origine bactérienne qui résulte en une destruction de l'os alvéolaire. *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) est un des principaux pathogènes impliqué dans la pathologie. Il initie une cascade inflammatoire responsable du recrutement et de l'activation des ostéoclastes, les cellules qui résorbent le tissu osseux, via la production du facteur ostéoclastogénique RANK-L. Cette étude démontre que l'IL-33 est surexprimée au cours de la parodontite chronique, et qu'elle possède des propriétés pro-inflammatoires entraînant une augmentation de la résorption osseuse induite par *Pg*.

Au cours de cette étude, j'ai participé aux chirurgies chez la souris, qui consistaient à placer une ligature imprégnée ou non de *Pg* au niveau de la première molaire, 2 fois par semaine pendant 28 jours, ainsi qu'aux sacrifices des animaux à la fin de l'étude.

RESEARCH ARTICLE

# Interleukin-33 and RANK-L Interplay in the Alveolar Bone Loss Associated to Periodontitis

Olivier Lapérine<sup>1,2,3‡</sup>, Alexandra Cloitre<sup>1,2,3,4‡</sup>, Jocelyne Caillon<sup>5</sup>, Olivier Huck<sup>6,7</sup>, Isaac Maximiliano Bugueno<sup>6</sup>, Paul Pilet<sup>1,2,3,4</sup>, Sophie Sourice<sup>1,2,3</sup>, Elodie Le Tilly<sup>1,2,3</sup>, Gaby Palmer<sup>8,9</sup>, Jean-Luc Davideau<sup>6,7</sup>, Valérie Geoffroy<sup>10,11</sup>, Jérôme Guicheux<sup>1,2,3,4\*</sup>, Sarah Beck-Cormier<sup>1,2,3</sup>, Philippe Lesclous<sup>1,2,3,4\*</sup>

**1** INSERM, U791, LIOAD, Nantes, France, **2** Université de Nantes, UMR-S 791, LIOAD, Nantes, France, **3** UFR Odontologie, Nantes, France, **4** ONIRIS, UMR-S 791, LIOAD, Nantes, France, **5** EA 3826 Thérapeutiques cliniques et expérimentales des infections, Nantes, France, **6** INSERM, U1109 Osteoarticular & Dental Regenerative Nanomedicine, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, France, **7** Département de Parodontologie, Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, Strasbourg, France, **8** Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine Specialties, University Hospitals of Geneva, Geneva, Switzerland, **9** Department of Pathology-Immunology, University of Geneva, School of Medicine, Geneva, Switzerland, **10** INSERM U1132 BIOSCAR, Hôpital Lariboisière, Paris, France, **11** Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

‡ These authors are co-first authors on this work.

\* [jerome.guicheux@inserm.fr](mailto:jerome.guicheux@inserm.fr) (JG); [philippe.lesclous@univ-nantes.fr](mailto:philippe.lesclous@univ-nantes.fr) (PL)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Lapérine O, Cloitre A, Caillon J, Huck O, Bugueno IM, Pilet P, et al. (2016) Interleukin-33 and RANK-L Interplay in the Alveolar Bone Loss Associated to Periodontitis. PLoS ONE 11(12): e0168080. doi:10.1371/journal.pone.0168080

**Editor:** Özlem Yilmaz, Medical University of South Carolina, UNITED STATES

**Received:** September 20, 2016

**Accepted:** November 27, 2016

**Published:** December 19, 2016

**Copyright:** © 2016 Lapérine et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** Support was provided by Région des pays de la Loire (grant 2012-05775-05776) [<http://www.paysdelaloire.fr/>]. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

### Introduction

Chronic Periodontitis (CP) is an inflammatory disease of bacterial origin that results in alveolar bone destruction. *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), one of the main periopathogens, initiates an inflammatory cascade by host immune cells thereby increasing recruitment and activity of osteoclasts, the bone resorbing cells, through enhanced production of the crucial osteoclastogenic factor, RANK-L. Antibodies directed against some cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) failed to exhibit convincing therapeutic effect in CP. It has been suggested that IL-33, could be of interest in CP.

### Objective

the present study aims to analyze whether and how IL-33 and RANK-L and/or their interplay are involved in the bone destruction associated to CP.

### Material and Methods

mRNAs and protein expressions of IL-33 and RANK-L were analyzed in healthy and CP human gingival samples by immunohistochemistry (IHC) and RT-qPCR. Murine experimental periodontitis (EP) was induced using *Pg* infected ligature and *Pg* free ligature around the first maxillary molar. Alveolar bone loss was recorded by  $\mu$ CT. Mouse gingival explants were stimulated for 24 hours with IL-33 and RANK-L mRNA expression investigated by RT-qPCR. Human oral epithelial cells were infected by *Pg* for 6, 12; 24 hours and IL-33 and RANK-L mRNA expressions were analyzed by RT-qPCR.

## Results

IL-33 is overexpressed in gingival epithelial cells in human affected by CP as in the murine EP. In human as in murine gingival cells, RANK-L was independently induced by *Pg* and IL-33. We also showed that the *Pg*-dependent RANK-L expression in gingival epithelial cells occurred earlier than that of IL-33.

## Conclusion

Our results evidence that IL-33 overexpression in gingival epithelial cells is associated with CP and may trigger RANK-L expression in addition to a direct effect of *Pg*. Finally, IL-33 may act as an extracellular alarmin (danger signal) showing proinflammatory properties in CP perpetuating bone resorption induced by *Pg* infection.

## Introduction

Periodontitis refers to an inflammatory disease of bacterial origin that affects tissues surrounding and supporting the tooth ie gingiva, periodontal ligament, cementum and alveolar bone. The hallmark of periodontitis is a destruction of alveolar bone resulting ultimately in extended tooth loss and oral disability [1]. Growing evidence indicates that periodontitis is highly prevalent in adult population according to a 2012 US survey underlining that 47% of this population is affected by periodontitis, 8.5% in its severe form. This rate increased to 64% in aging persons older than 65 years and is expected to increase with age [2]. Periodontitis is a major health challenge particularly affecting the elderly where the disease is the primary cause of tooth loss but also because periodontitis interplays with systemic health, particularly by increasing the patients' risk and morbidity for atherosclerosis, rheumatoid arthritis (RA) and diabetes mellitus [3, 4]

An anaerobic bacterium, *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), is traditionally considered a major causative agent of periodontitis, based on its virulence properties and strong association with diseased sites. However, *Pg*-induced periodontitis required the presence of commensal microbiota for the onset of periodontitis [5]. In a recently proposed definition, periodontitis may result not from individual pathogens, but rather from polymicrobial synergy and dysbiosis, a condition characterized by an imbalance in the relative abundance or influence of species within a microbial community [3].

It is now well acknowledged that the presence of bacterial species is necessary but not sufficient for the onset and progression of periodontitis. The recognition of microbial components as "danger signals" by host immune cells and subsequent production of inflammatory mediators is an essential step in periodontitis pathogenesis [6]. Production of pro-inflammatory cytokines (including IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ ) by resident and recruited inflammatory cells acting synergistically seemed to be of particular importance in this process. Indeed, these cytokines increase the recruitment and activity of the bone resorbing cells, the osteoclasts, through enhanced production of a crucial osteoclastogenic factor, the Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand (RANK-L) and favor bone destruction [7]. However antibodies directed against these 3 cytokines did not exhibit a convincing therapeutic effect in periodontitis, thereby strongly suggesting that others mediators could be involved in the pathogenesis of this disease [8]. Recently, it has been suggested that among inflammatory mediators involved in

chronic periodontitis (CP), a member of the IL-1 family, IL-33, could play a role in the initiation and the progression of CP [9].

IL-33 has been described to regulate innate and adaptive immunity [10]. IL-33 is constitutively expressed as a nuclear factor in many cell types including epithelial cells, fibroblasts and endothelial cells. Sequestered in the nucleus of these cells, IL-33 is considered as an endogenous molecule that allows the maintenance of the crucial transcription factor NF $\kappa$ B and thus reduces the expression of genes encoding for proinflammatory cytokines thereby ensuring tissue homeostasis. When released in the extracellular medium upon cell damage or stress, IL-33 acts as an alarmin (also known as danger signal) showing proinflammatory properties [11–13]. IL-33 acts through its ST2 receptor, widely expressed on many cell types of innate and adaptive immunity such as mastocytes, Th2 lymphocytes and B cells leading to pro-inflammatory cytokines production [10, 14, 15]. Interestingly, some studies have highlighted a potential role for IL-33 in the regulation of inflammatory process related to RA, a disease sharing many immunopathological similarities with periodontitis [16]. In mice, inhibition of IL-33 signaling with a soluble isoform of ST2 (sST2) acting as a decoy receptor or deletion of ST2 has been shown to attenuate the severity of induced arthritis in part by blocking RANK-L expression [17]. However, ST2 deletion in a mouse model of K/BxN serum transfer-induced arthritis did not protect animals from inflammation and bone resorption [18]. These contradictory results suggest that the role of IL-33 in inflammatory process leading to bone destruction is highly questionable, probably local or even focal and timely regulated depending of the inflammatory microenvironment.

The potential role for IL-33 in the onset and progression of periodontal disease is emerging and mostly considered as a proinflammatory factor. In a rat model of ligature induced-periodontitis, IL-33 expression was upregulated concomitantly to RANK-L [19]. In human, high IL-33 overexpression was recorded in the gingiva of patients affected by CP and may act as a triggering factor for the recruitment of B and T lymphocytes expressing RANK-L [20]. But in gingival crevicular fluid (an inflammatory exudate collected in the periodontal pocket) conflicting results regarding IL-33 levels have been reported in patients affected by CP [21–23]. Interestingly, *Pg* has been described to upregulate IL-33 mRNA expression in gingival epithelial cells through the PAR-2 signaling pathway [24]. But to date, it is still unclear whether bacterial or pro-inflammatory stimulus first triggers IL-33 expression in the gingival tissue. Contrasting with its positive effect on RANK-L expression, IL-33 has also been reported to inhibit osteoclast differentiation *in vitro*, suggesting a protective effect on bone [25–27]. Taken together, these data suggest a multiple and contrasting role for IL-33 during inflammatory diseases associated to bone resorption such as CP that need to be clarified.

In periodontitis, multiple sources of RANK-L have been proposed such as osteoblasts, B and T lymphocytes or epithelial cells [28, 29]. Interestingly, gingival epithelial cells, the first-line cell population in contact with periopathogens, can produce various pro-inflammatory cytokines and basal level of RANK-L to support osteoclastogenesis [30–32]. Malcolm et al described an increased expression of IL-33 in gingival epithelial cells from patient affected by CP. However, the contribution of this cell type cell to the onset and the progression of the disease through RANK-L expression have not been elucidated.

The present study aims to analyze whether and how IL-33 and RANK-L and/or their interplay are involved in the bone destruction associated to CP.

We showed in this study that IL-33 is overexpressed in gingival epithelial cells in human affected by CP as in a murine model of experimental periodontitis (EP). Moreover, in human as in murine gingival cells, we showed that RANK-L expression can be independently induced by *Pg* and IL-33. These results strengthen a potent role for IL-33 in the pathogenesis of



periodontitis and suggest that both *Pg* and IL-33 induce overexpression of RANK-L and subsequently increase alveolar bone loss.

## Materials and Methods

### Patients

The human study protocol, consent forms and consent procedure were reviewed and approved by the Institutional Medical Ethic Committee of the University Hospital of Nantes (SVTO:DC-2011-1399). All patients provided their written consent to participate to this study. Detailed medical and periodontal histories of each patient were recorded (Table 1). According to the American Association of Periodontology, criteria for CP, were i) probing pocket depth > 5 mm, ii) clinical attachment level > 3 mm and iii) bleeding on probing periodontal pockets [33].

In patients diagnosed for CP (n = 13), gingival samples between 5 to 8 mm sides and 3 to 5 mm deep were obtained during the surgical treatment, an open flap debridement combined with dental extractions and gingival regularization. Healthy gingival samples were harvested from patients (n = 9) without any periodontal diseases undergoing oral surgical procedures needing gingival regularization such as extraction of impacted third molars. No patients had taken any anti-inflammatory medication for 2 weeks before surgical procedures. The gingival samples were used for RT-qPCR and/or histology.

### Murine model of alveolar bone loss

Animal studies were approved by the Ethic Committee for Animal Experiment of Pays de la Loire (CEEA 2012.187). Mice were housed in specific-pathogen-free facilities, and under light- (12h light/dark cycle), temperature- (22–25°C) and humidity- (50–60%) controlled conditions. To avoid any gingival effect of estrogens, we only used 12 week-old male CD1 Swiss mice (Janvier). All animals were fed with regular diet. A wash-out period was first performed in which mice were treated with water diluted sulfamethoxazole-trimethoprim 0.2mg/mL (Roche) for ten days followed by a 3 days antibiotic-free period [34]. For periodontal procedures, mice were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg, Imalgene

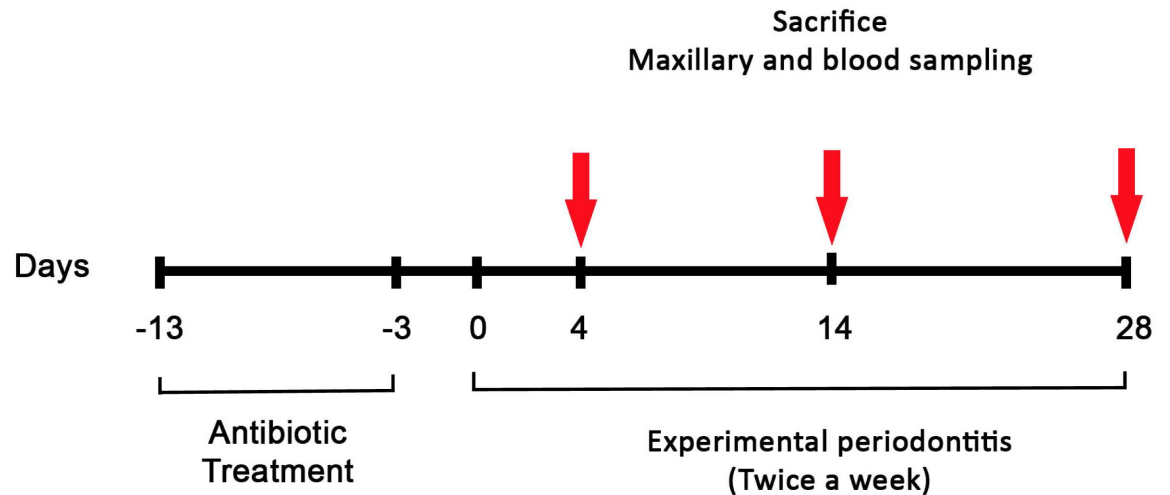
**Table 1. Characteristics of the patients.**

Variables	Chronic periodontitic patients		Healthy patients	
	Number	%	Number	%
<b>Gender</b>				
Male	10	76.9	3	33.3
Female	3	23.1	6	66.7
<b>Age (years)</b>	48.3 ± 8.5		20.33 ± 3.6	
<b>Tobacco</b>				
User	8	61.5	4	44.4
Non-user	5	38.5	5	55.6
<b>Probing pocket depth (mm)</b>	5.3 ± 1.9		NA*	
<b>Clinical attachment level (mm)</b>	7.8 ± 1.9		NA*	
<b>Bleeding on probing</b>	13	100	0	0

\* NA: Not applicable

Variables: mean values [SD]

doi:10.1371/journal.pone.0168080.t001



**Fig 1. Study design of the murine model of experimental periodontitis.**

doi:10.1371/journal.pone.0168080.g001

1000, Merial) and xylazine (10mg/kg, Rompun 2%, Bayer). *Pg*-infected and control mice were placed in separated cages and kept in the same environment. Mice were monitored in order to evaluate pain stress, and weighed on a daily basis.

A time course experiment was conducted with 90 animals randomly distributed in 9 experimental groups of 10 mice. EP was induced by placement of a 6.0 silk ligature soaked with *Pg* (*Pg* Lig) or not (L) in the gingival crevice (so called sulcus) around the first maxillary molar for 4, 14 or 28 days. This procedure was repeated twice a week (Fig 1). Control mice received a slight incision into the sulcular epithelium to mimic the ligature placement (Sham). At every time periods, mice were sacrificed by cardiac exsanguination under the same anesthesia procedure as previously described for periodontal procedure.

Blood samples were collected by cardiac puncture and sera were prepared by centrifugation at 2000xg for 2 minutes.

Micro-computed tomography and histological analyses were performed on sampled maxilla fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C for 24 hours.

### Bacterial and strain culture

*Pg* (ATCC 33277) was cultured at 37°C on Shaedler agar plated with sheep blood (BD), in an oxygen-free atmosphere. After 10 days of culture, *Pg* colonies were selected and resuspended in brain-heart broth at 10<sup>9</sup> CFU/mL for ligature placement or at 10<sup>5</sup> CFU/mL for *Pg* injection. A 6–0 silk thread was placed in the suspension 24 hours before EP procedure.

### Gingival explant culture

Palatal mucosa from 3 C57BL/6J mice was harvested and placed connective face in contact with plate for 1 hour to allow cell adhesion. Explants were then cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, 50U/ml Penicillin and 50 mg/ml Streptomycin for 24 hours. They were then stimulated with 100ng/mL of recombinant murine IL-33 (3626-ML-010, R&D) in serum-free DMEM supplemented with 50U/ml Penicillin and 50 mg/ml Streptomycin for 24 hours. Three independent experiments were performed.

## Micro-computed tomography ( $\mu$ CT)

Two and three dimensional analyses of the maxilla were performed using a Skyscan 1272 (Skyscan). Acquisition parameters were 60 kV, 80 mA, 0.25-mm aluminium filter. The NRecon software (Skyscan) was used for reconstruction. For the two-dimensional analyses, distance between the palatal cementum-enamel junction of the first molar and the alveolar bone crest (CEJ-ABC) was measured to assess alveolar bone loss on the coronal plan. Five sections per animal were analyzed when radicular canal for each tooth were fully visible. For the three-dimensional analyses, bone mineral volume/tissue volume (MBV/TV) was assessed in an elliptical region of interest (ROI) between CEJ and the root apices of the first molar in the axial plan. The fraction of MBV/TV was calculated using CTan software and data are presented as percentage of ROI area. Evaluations were performed by two independent operators.

## Immunohistochemistry (IHC)

Fixed maxilla were decalcified in EDTA 0.5M at 4°C for three weeks. Human and mouse samples were then dehydrated and embedded in paraffin. IHC were performed on 4  $\mu$ m-thick sections. Antigens were retrieved by boiling slides for 30 minutes in citrate buffer pH 6. Sections were then incubated in blocking solution (S2022, Dako) for 45 minutes at RT. Incubation with primary antibodies was performed in the blocking solution at 4°C over-night. Sections were rinsed three times (0.05% tween in PBS) and endogenous peroxidase activity was quenched with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS for 20 minutes. Specific binding was detected using DAB (Dako). Sections were counterstained with Harris Hematoxylin, dehydrated and mounted in Eukitt. Primary and secondary antibodies used are: polyclonal goat anti-IL-33 (AF3626 and AF3625; R&D systems), polyclonal goat anti-RANK-L (sc7628, clone N-19, 1/100; Santa Cruz) and monoclonal rat anti-human CD3 (clone CD3-12, 1/200; AbD Serotec), anti-goat HRP antibody (1:500; sc-2961, Santa Cruz Biotechnology), anti-rat HRP antibody (1:500, Jackson Immunoresearch inc.). Specificity of IL-33 antibody was assessed using maxilla samples from IL-33 KO mice. Automated whole slide imaging was performed using the NanoZoomer 2.0 (Hamamatsu). All analyses were performed in multiple randomly selected high-power microscopic fields (magnification x200). Staining quantification on four sections per sample was performed using Fiji software (NIH).

## RT-qPCR

Total RNA was extracted from human gingival samples and mouse gingival explants using the Nucleospin RNA isolation kit (Macherey Nagel). cDNA were synthesized using SuperScript III First-strand Synthesis System (Life Technologies). Twenty nanograms of cDNA were used to assess mRNA expression by using TaqMan gene expression assays (Life technologies). The probe and primer sets for Human *IL33* (Hs01125943\_m1), RANK-L (*Tnfrsf11*, Hs00243522\_m1), *TNF- $\alpha$*  (Hs01113624\_g1), *IL-6* (Hs00985639\_m1) and mouse RANK-L (*Tnfrsf11*, Mm01313943\_m1) and the normalizers human *Ppia* (Hs99999904\_m1) and mouse *GusB* (Mm01197698\_m1) were obtained from Applied Biosystems. Measurements were performed in triplicate. Relative quantification was determined using the Biorad CFX manager software (Biorad).

## Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Serum IL-33 concentrations were measured according to manufacturer's instructions (Kit duoset DY3626-05 ELISA R&D). Briefly, plates were coated with a goat anti-mouse IL-33 antibody overnight. Then samples were incubated during 1 hour. A biotinylated goat anti-mouse

IL-33 antibody was added for 2 hours. Streptavidin-HRP was added for 20 minutes and the reaction was visualized by the addition of 50  $\mu$ l chromogenic substrate (TMB) for 30 minutes. The reaction was stopped with 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and absorbance at 450 nm was measured using an ELISA plate reader (Victor3, Wallac 1420, PerkinElmer). All procedures were performed at room temperature.

## Cell culture

Oral epithelial cells (OECs) derived from Human oral keratinocyte cell line TERT-2 OKF-6 (BWH Cell Culture and Microscopy Core) were cultured in defined Keratinocyte-SFM basal medium (KSFM) supplemented with growth supplements (Invitrogen).

**Infection and stimulation of OECs.** Twenty-four hours before infection with *Pg*,  $3 \times 10^5$  cells per well were seeded in 24-well plate. On the day of the infection or stimulation, cells were washed with PBS and medium without antibiotics containing *Pg* (MOI 100:1 or MOI 10:1) was added for 24 hours.

**Quantitative RT-qPCR analysis.** RT-qPCR was performed to quantify RNA expression. PCR amplification and analysis were achieved using the CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Amplification was performed using iTaq Universal SYBR Green Supermix. Beta-actin was used as endogenous control in the samples. Primers sequences related to *IL-33* (5' -GGTGTACTGAGTTATATGAG-3', 3' -GGAGCTCCACAGAGTGTTCCTTG-5') and RANKL (*Tnfsf11*) (5' -GCCAGTGGGAGATGTTAG-3', 3' -CCCTTTTGAACGTCGATT-5') were synthesized by Eurofins (Ebersberg). Relative quantification was determined using the Biorad CFX manager software (Biorad). Three separate sets of experiments were performed for each procedure.

## Statistical analysis

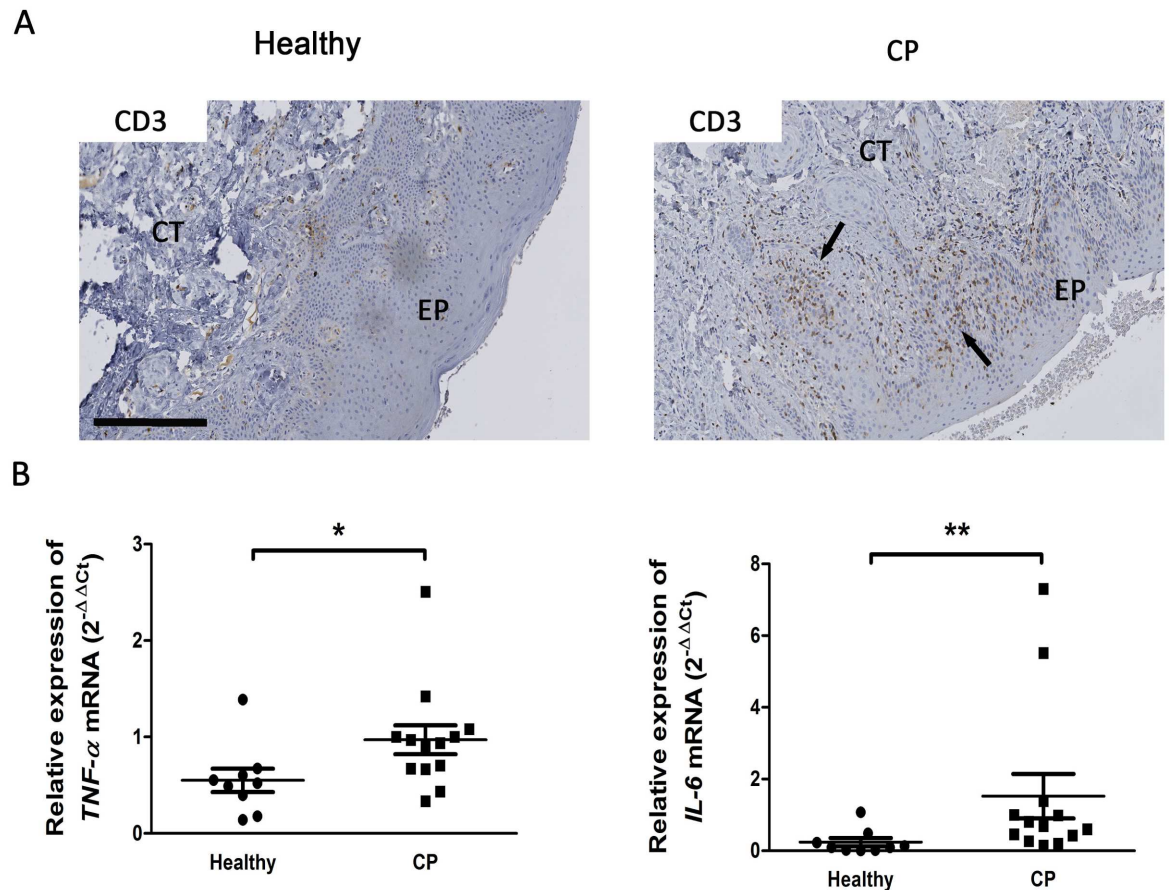
Data were compared using non-parametric tests (Kruskal-Wallis test followed, if significant, by group comparisons with the Mann-Whitney test or the unpaired student t-test. Differences were considered significant if  $p \leq 0.05$ . Results are given as means  $\pm$  SEM or means  $\pm$  SD for patient's characteristics.

## Results

### IL-33 and RANK-L are overexpressed in human chronic periodontitis

First, we analyzed clinical parameters to determine the inflammatory status of CP samples (Table 1) and expression of well documented inflammatory markers such as CD3, IL-6 and TNF- $\alpha$  by IHC. We observed a strong positive CD3 immunostaining in CP samples both in connective tissue and in gingival epithelium (Fig 2A). Expression mRNA of the pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 was investigated by RT-qPCR. Significant overexpression of mRNA encoding for both cytokines was recorded in CP compared to healthy samples ( $p < 0.05$ ) (Fig 2B). No differences were recorded according to the gender or the tobacco habit.

We then determine whether IL-33 and RANK-L can also be overexpressed in CP gingival samples when compared to healthy gingival samples. As indicated in Fig 3A, IL-33 mRNA was significantly increased in CP samples ( $p < 0.001$ ). Immunolabeling for IL-33 was also increased in CP compared to healthy samples ( $p < 0.001$ ) (Fig 3B). Interestingly, quantification of IL-33 positives cells revealed a drastic 8-fold increase in the gingival epithelium and a slighter but significant 1.5-fold increase in the connective tissue of CP samples ( $p < 0.01$ ). As expected, transcript coding for RANK-L was significantly higher in CP samples ( $p < 0.05$ ) (Fig 3C) and IHC revealed a 3-fold RANK-L overexpression in CP samples but only in the epithelial



**Fig 2. Characterization of human gingival samples in healthy and patients affected by chronic periodontitis. A.** Samples were stained for the T lymphocytes marker CD3 (arrows). Sections were counterstained with Harris Hematoxylin staining. EP: Epithelium; CT: Connective Tissue. **B.** TNF- $\alpha$  and IL-6 expression in healthy and CP patients were measured by RT-qPCR. Data are shown as mean  $\pm$  SD. Healthy samples n = 9; chronic periodontitis samples n = 13. Bar = 250 $\mu$ m. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

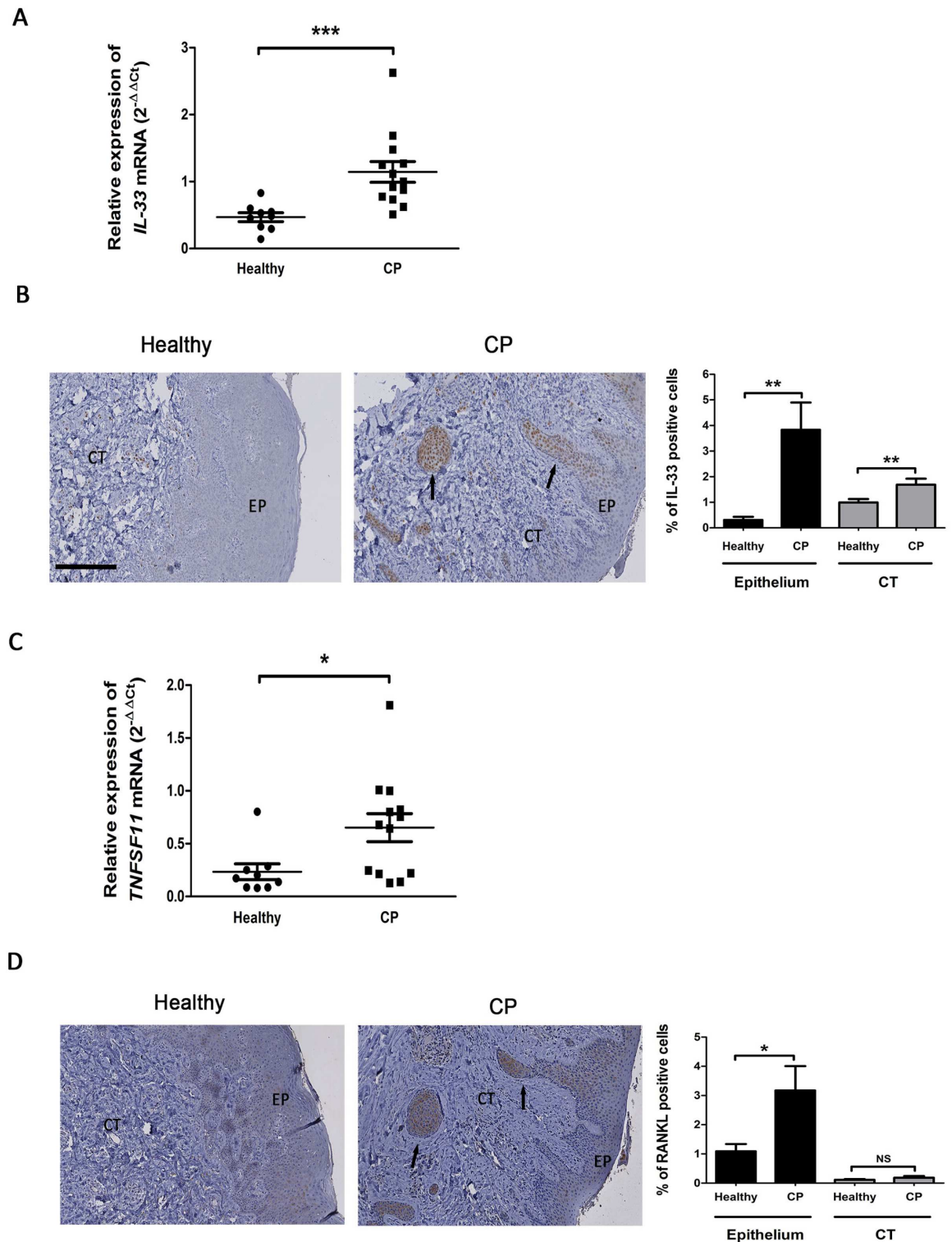
doi:10.1371/journal.pone.0168080.g002

compartment (p<0.05) (Fig 3D). Interestingly, this epithelial RANK-L overexpression appeared in parallel with that of IL-33.

### Bone loss is associated with IL-33 overexpression in a murine model of experimental periodontitis

We used a murine model of EP to determine whether IL-33 may be associated to the alveolar bone loss occurring in CP in a time course study with three experimental groups “Pg ligature” (Pg L), “Ligature” (Lig) and “Sham” mimicking the ligature apposition. Alveolar bone loss induced by Pg ligature was significant as early as 14 days following surgery and persisting until day 28 when compared to sham group (p<0.05) (Fig 4A and 4B). Pg free ligature failed to induce significant alveolar bone loss compared to sham group (Fig 4A and 4B). After having confirmed that Pg ligature induced significant alveolar bone loss, we further addressed if IL-33 may be implicated in this process. Immunostaining revealed an increase of IL-33 positive cells in the connective tissue of Pg ligature group when compared to sham group 4 days after surgery (p<0.05). We also recorded such higher IL-33 positive cells in ligature and Pg ligature groups when compared to sham at 28 days (p<0.01) (Fig 5A and 5B). Interestingly, increases





**Fig 3. IL-33 and RANK-L expressions in gingival samples of healthy and patients affected by chronic periodontitis.** A. mRNA encoding for IL-33 was quantified by RT-qPCR. B. Healthy and CP gingival samples were immunostained for IL-33 (arrows). The percentage of cells positive for IL-33 was quantified using Fiji software and defined as a percentage of DAB positive staining area per region of interest. C. mRNA encoding for RANK-L was quantified by RT-qPCR. D. Healthy and CP gingival samples were immunostained for RANK-L (arrows). The percentage of cells positive for RANK-L was quantified using Fiji software and defined as a percentage of DAB positive staining area per region of interest. EP: Epithelium; CT: Connective

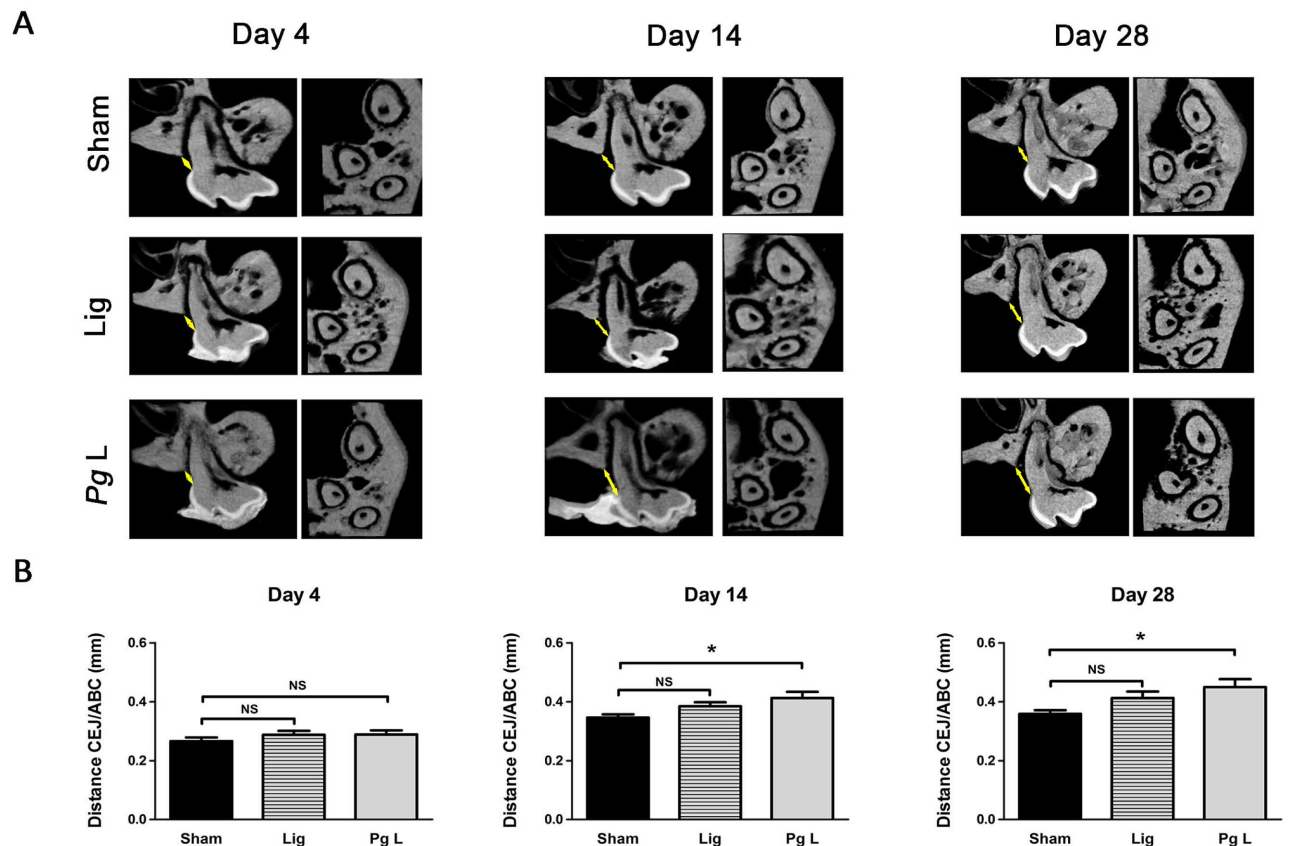
Tissue. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Healthy samples  $n = 9$ ; Chronic periodontitis samples (CP)  $n = 13$ . Bar =  $250\mu\text{m}$ . \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

doi:10.1371/journal.pone.0168080.g003

of IL-33 positive cells were also recorded in the gingival epithelium of the ligature and *Pg* ligature groups at 4 and 14 days after surgery ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  respectively at 4 days;  $p < 0.05$  and  $p < 0.05$  respectively at 14 days) (Fig 5A and 5B). Significant increase of IL-33 positive cells was sustained in *Pg* ligature group at 28 days ( $p < 0.001$ ) but not in ligature group compared to sham at this time, indicating that *Pg* is necessary for a continuous expression of IL-33 in gingival cells (Fig 5A and 5B). Globally, our data indicates that IL-33 increased in mice in epithelial and in connective compartments, as observed in human samples, before the onset of alveolar bone loss and that *Pg* sustained IL-33 expression in gingival epithelial cells during EP.

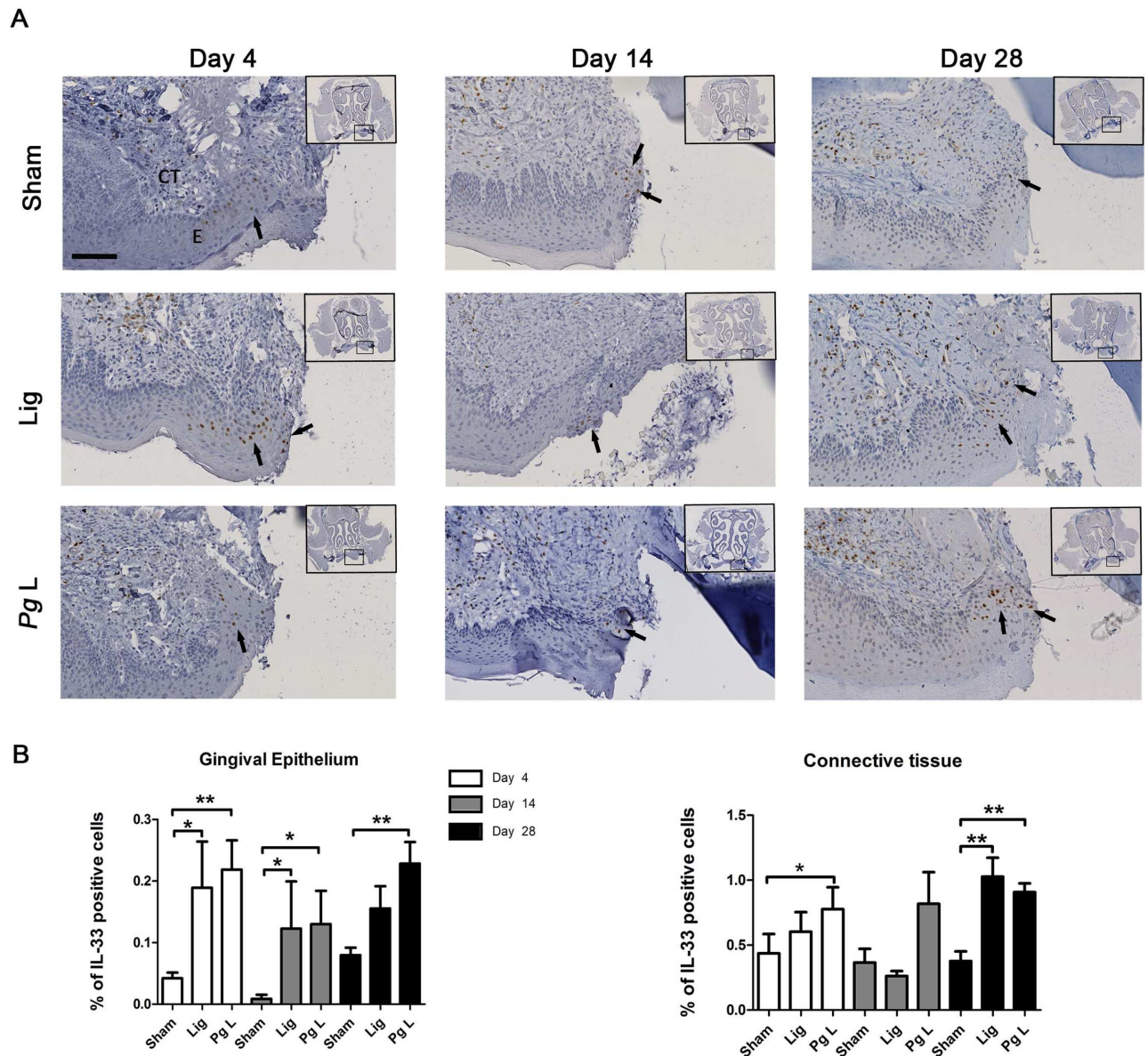
### IL-33 increased RANK-L expression in mouse gingival explants

To further analyze whether IL-33 can be involved in the increased alveolar bone loss associated to periodontitis, we used mouse gingival explants treated with IL-33 for 24 hours. RT-qPCR



**Fig 4. Time-course of alveolar bone loss in the ligature-induced murine model of experimental periodontitis.** CD1 Swiss mice ( $n = 90$ ) were subjected to experimental periodontitis for 4, 14 and 28 days. At each time point, animals were sacrificed and maxillary samples were harvested. A. After 4, 14 and 28 days,  $\mu\text{CT}$  analysis was performed. Longitudinal sections through the middle of the palatal root of the first maxillary molar (left images) and transversal sections from the apices of the three roots of the first maxillary molar to the summit of the alveolar bone crest (right images) are presented for each time points. B. Alveolar bone loss was assessed using 2D  $\mu\text{CT}$ . At each time point, data of ligatured groups (Lig and *Pg* L) were compared to their respective Sham groups. Data are shown as means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ .

doi:10.1371/journal.pone.0168080.g004



**Fig 5. Time-course of IL-33 expression in the ligature-induced murine model of experimental periodontitis.** A. IL-33 expression was assessed by IHC and sections were counterstained with Harris Hematoxylin staining (arrows). B. The percentage of IL-33 was quantified in gingival epithelium and in connective tissue using Fiji software and defined as a percentage of DAB positive staining area per region of interest. At each time point, data of ligatured groups (Lig and Pg L) were compared to their respective Sham groups. EP: Epithelium, CT: Connective tissue. Data are shown as means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . Scale bar = 100  $\mu$ m.

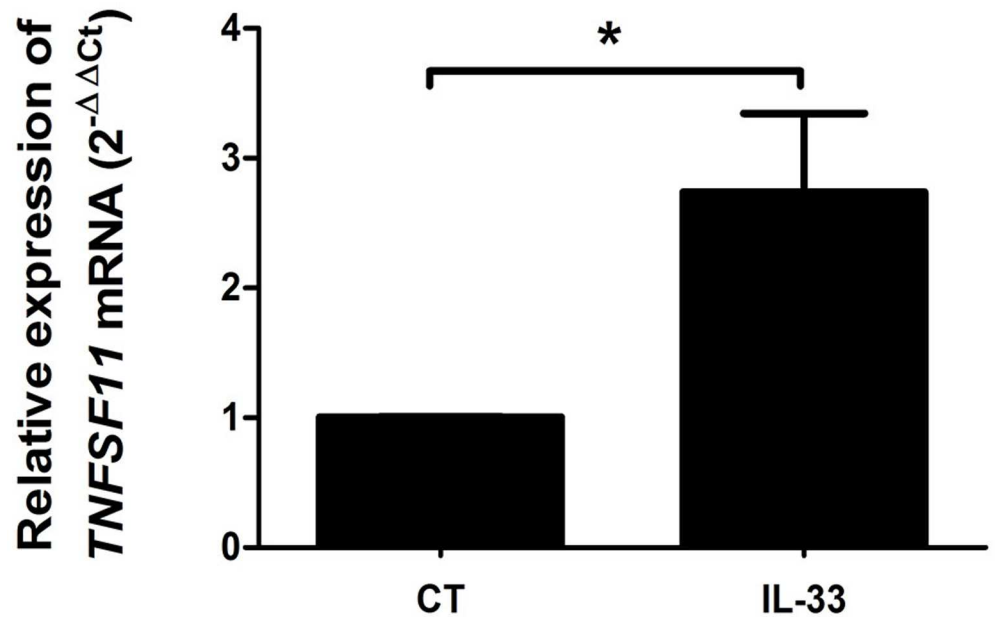
doi:10.1371/journal.pone.0168080.g005

analyses evidenced a significant increase of RANK-L mRNA expression 24 hours after IL-33 stimulation ( $p < 0.05$ ) (Fig 6). This demonstrates the ability of IL-33 to induce RANK-L expression in murine gingival cells.

### *Pg* infection resulted in an overexpression of RANK-L mRNA but was a weak inducer of IL-33 mRNA in human oral epithelial cells

We also investigated whether *Pg* could be the triggering factor to induce IL-33 and RANK-L in human OECs. OECs were infected by *Pg* for 6, 12 and 24 hours at MOI of 10:1 or 100:1. RT-





**Fig 6. IL-33 induced RANK-L expression in mouse gingival explants.** Explants from palatal mucosa of C57BL/6 mice were culture overnight at 37°C. These explants were then stimulated with 100ng/mL of recombinant murine IL-33 for 24 hours. Total tissue RNA was extracted and RANK-L transcript was quantified by RT-qPCR. Three separate experiments were performed. Data are shown are means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ .

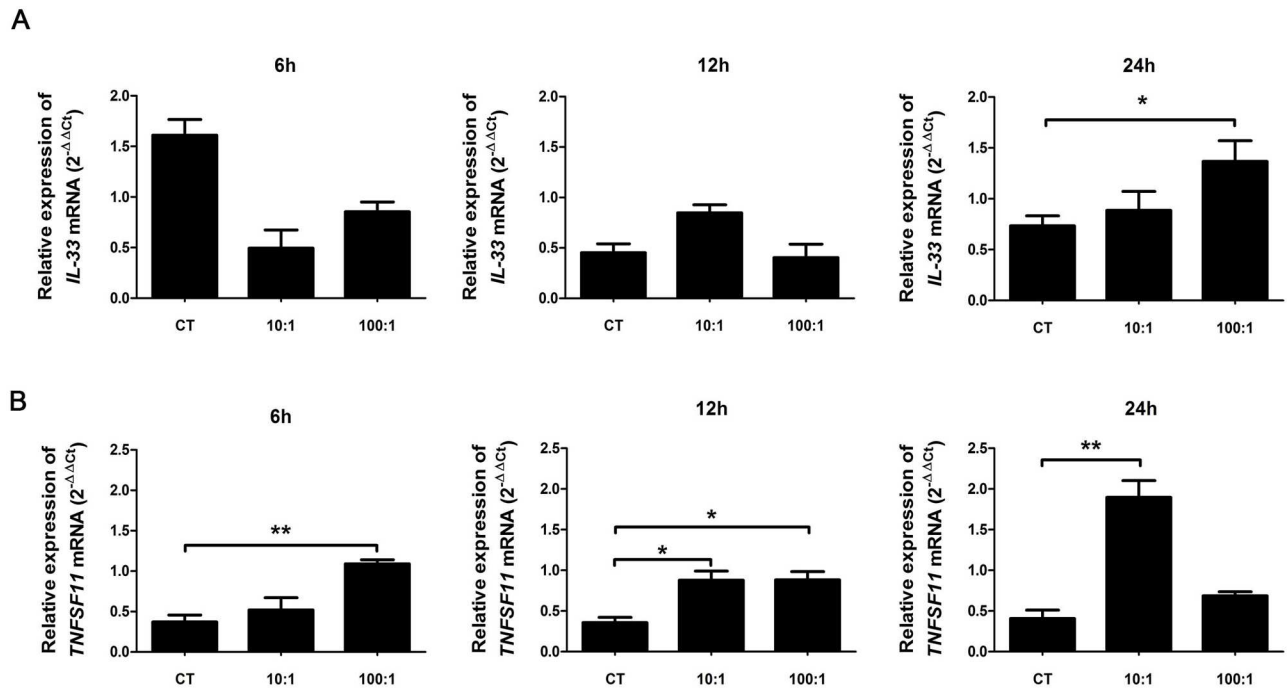
doi:10.1371/journal.pone.0168080.g006

qPCR analysis revealed that IL-33 mRNA expression was only significantly increased at MOI of 100:1 24 hours after *Pg* infection ( $p < 0.05$ ) (Fig 7A). Expression of RANK-L was stable throughout the experiment in control cells. After *Pg* infection, this RANK-L expression increased from 6 to 24 hours at MOI 10:1 but was quite stable at MOI 100:1. A significant over-expression of RANK-L was evidenced for each time of infection (6 hours: MOI 100:1,  $p < 0.01$ ; 12 hours: MOI 100:1 and 10:1,  $p < 0.05$ ; 24 hours: MOI 10:1,  $p < 0.01$ ) (Fig 7B). These results suggest that *Pg* may trigger RANK-L expression in gingival epithelial cells but is a weak inducer of IL-33 expression.

## Discussion

In this study, we demonstrated that gingival epithelial cells could play an undescribed role in the alveolar bone loss associated to periodontal disease throughout RANK-L production. We also evidenced that RANK-L overexpression could be mediated by *Pg* and/or through IL-33 expression in gingival epithelial cells.

IL-33 protein expression was increased in gingival epithelial cells both in human and mouse. IL-33 expression in CP in human has recently been described by Malcolm et al. in gingival epithelial cells and our results confirmed this observation [20]. This is of particular interest because differences of IL-33 expression in skin have been reported between species [35]. Notably in human and porcine keratinocytes, IL-33 expression is low but rapidly induced after skin wounding whereas it is the opposite in mice. Here, we evidenced in a murine model of EP induced by the apposition of a *Pg*-soaked ligature that IL-33 expression was increased in gingival epithelial cells similarly as in human CP. This sustains the reliability of this experimental model to mimic the alveolar bone loss related to periodontitis in human and so, to investigate the potent role of IL-33 in the inflammatory cascade associated to the CP pathogenesis.



**Fig 7. *Pg* infection increased the expression of RANK-L and IL-33 mRNAs in human oral epithelial cells.** Human oral epithelial cells (OKF6/TERT2) were cultured with *Pg* at 10:1 or 100:1 MOI for 6, 12 or 24 hours. mRNAs encoding for IL-33 (A) and RANK-L (B) were quantified by RT-qPCR. Three separate sets of experiment were performed. Data are shown as mean ± SEM. \**p*<0.05; \*\**p*<0.01.

doi:10.1371/journal.pone.0168080.g007

We have confirmed that IL-33 expression is increased in human gingiva from CP patients and we have also evidenced this increase in a ligature-induced model of EP. Two major models of EP are described in the literature. The oral gavage model is useful for addressing a wide variety of hypotheses related to periodontal pathogenesis, ranging from the role of the host response to virulence traits of pathogens and to the interconnections of those factors with systemic parameters. The silk ligature model is more relevant to investigate mechanistic and inflammatory aspects of the host immune response to bacterial stimulus and to identify potent therapeutic targets of particular interest in this inflammatory cascade [36]. This experimental model is also the most appropriate as it mimics the start point of periodontitis, a local gingival infection where oral epithelial cells are the first-line defense. Indeed, in our study, the inflammatory process seems strictly localized to the stimulated area because no alveolar bone loss was recorded elsewhere. We didn't evidence any increase in serum concentration of IL-33 in mice subjected to ligatures impregnated or not with *Pg*. This hardly suggests that IL-33 is not involved in a systemic inflammatory process but rather in a gingival localized one to possibly trigger alveolar bone loss.

The first key factor for the onset of periodontitis is the presence of pathogen species such as *Pg*. Increased expression of inflammatory cytokines and particularly IL-33 has been previously described *in vitro* after *Pg* infection of gingival epithelial cells [24, 31]. We also recorded such increase 24 hours after *Pg* infection of human epithelial cells. However, as we also recorded an increased IL-33 expression *in vivo* independently of *Pg* infection, it is tempting to speculate that the ligature apposition is an inflammatory stimulus sufficient to induce the increase of IL-33 expression in gingival epithelial cells, directly or throughout other pro-inflammatory cytokines such as TNF-α or IFN-γ [35, 37]. Consistently, we have also observed an IL-33 expression in Sham animals subjected to a slight incision suggesting that this mechanical

stimulus may trigger the production of IL-33 in gingival epithelial cell and that *Pg* may be not the major factor needed for IL-33 expression.

In CP, increased osteoclast activity is related to increased production of RANK-L. Several sources of RANK-L have been described notably B and T lymphocytes [28]. In our study, we showed a concomitant increase in CD3 and RANK-L positive cells and in RANK-L expression in gingival epithelial cells of patients affected by CP. RANK-L-producing lymphocytes are recruited towards inflammatory sites following *Pg* infection [38]. *Pg* can also stimulate RANK-L production by other cells such as bone alveolar osteoblasts and periodontal ligament fibroblasts notably via TLR2 signaling [39]. Mice deficient for TLR2 were protected from *Pg*-induced alveolar bone loss indicating that *Pg* is a crucial factor for the increase in RANK-L expression observed in CP [39]. Gingival epithelial cells, the first cells in contact with bacterial stimulus, are also able to produce RANK-L when stimulated by TNF- $\alpha$  [32]. In patients affected by CP, we recorded an increase in RANK-L expression in epithelial cells at the close vicinity of inflammatory sites, supporting a potential role to trigger the recruitment of osteoclast precursors, the osteoclast differentiation and activity as suggested by others [29].

IL-33-induced RANK-L expression in lymphocytes of the gingival tissue has been observed in EP induced by oral gavage and treatment with IL-33 [20]. We showed, using RT-qPCR quantification, that RANK-L was stimulated before IL-33 expression after *Pg* infection of gingival epithelial cells. This finding suggests that overexpression of RANK-L in CP is not primarily caused by IL-33 and that this cytokine may act as a secondary factor able to promote bone resorption through RANK-L after gingival infection by *Pg*. We can also hypothesize that IL-33 could be required for the perpetuation of alveolar bone loss in CP and we propose that alveolar bone loss related to CP is induced by the combination of *Pg* infection and IL-33.

EP applied to IL-33 knock-out mice will be needed to decipher the potent role of IL-33 in alveolar bone loss associated to CP. Taken together, these data highlight the ability of IL-33 to induce RANK-L expression in gingival cells and the interplay between both factors in CP.

## Conclusion

Our results provide evidences that IL-33 overexpression in gingival epithelial cells is associated with CP and can trigger RANK-L expression in addition to the direct effect of *Pg*. Finally, IL-33 may act as an extracellular alarmin showing proinflammatory properties in CP by perpetuating bone resorption induced by *Pg* infection.

## Acknowledgments

The authors were supported by the SFBTM (Société Française de Biologie des Tissus Minéralisés) for technical support, UTE-IRS-UN for animal facilities and “Région des pays de la Loire” (grant 2012-05775-05776).

## Author Contributions

**Conceptualization:** PL JG.

**Funding acquisition:** PL.

**Investigation:** OL AC EL SS PP.

**Methodology:** OL SBC PP SS.

**Project administration:** JG.

**Resources:** OH IMB JLD JC GP.

**Supervision:** PL JG SBC VG.

**Writing – original draft:** OL AC.

**Writing – review & editing:** OL PL VG JG GP SBC.

## References

1. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *The Lancet*. 2005; 366(9499): 1809–20.
2. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ, Cdc Periodontal Disease Surveillance work-group: James Beck GDRP. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *Journal of dental research*. 2012; 91(10):914–20. doi: [10.1177/0022034512457373](https://doi.org/10.1177/0022034512457373) PMID: [22935673](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22935673/)
3. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2015; 15(1):30–44. doi: [10.1038/nri3785](https://doi.org/10.1038/nri3785) PMID: [25534621](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25534621/)
4. Eke PI, Dye BA, Wei L, Slade GD, Thornton-Evans GO, Borgnakke WS, et al. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *Journal of periodontology*. 2015; 86(5):611–22. doi: [10.1902/jop.2015.140520](https://doi.org/10.1902/jop.2015.140520) PMID: [25688694](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25688694/)
5. Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskan MA, et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell host & microbe*. 2011; 10(5):497–506.
6. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of oral microbiology*. 2011; 3:5304–19.
7. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *Journal of immunology research*. 2015; 2015:615486–95. doi: [10.1155/2015/615486](https://doi.org/10.1155/2015/615486) PMID: [26065002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26065002/)
8. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *Journal of clinical periodontology*. 2011; 38 Suppl 11:60–84.
9. da Luz FA, Oliveira AP, Borges D, Brigido PC, Silva MJ. The physiopathological role of IL-33: new highlights in bone biology and a proposed role in periodontal disease. *Mediators of inflammation*. 2014; 2014:342410–7. doi: [10.1155/2014/342410](https://doi.org/10.1155/2014/342410) PMID: [24692848](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24692848/)
10. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005; 23(5):479–90. doi: [10.1016/j.immuni.2005.09.015](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.09.015) PMID: [16286016](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16286016/)
11. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One*. 2008; 3(10):e3331. doi: [10.1371/journal.pone.0003331](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003331) PMID: [18836528](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18836528/)
12. Byers DE, Alexander-Brett J, Patel AC, Agapov E, Dang-Vu G, Jin X, et al. Long-term IL-33-producing epithelial progenitor cells in chronic obstructive lung disease. *The Journal of clinical investigation*. 2013; 123(9):3967–82. doi: [10.1172/JCI65570](https://doi.org/10.1172/JCI65570) PMID: [23945235](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23945235/)
13. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007; 104(1):282–7. doi: [10.1073/pnas.0606854104](https://doi.org/10.1073/pnas.0606854104) PMID: [17185418](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17185418/)
14. Moulin D, Donze O, Talabot-Ayer D, Mezin F, Palmer G, Gabay C. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. *Cytokine*. 2007; 40(3):216–25. doi: [10.1016/j.cyto.2007.09.013](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.09.013) PMID: [18023358](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18023358/)
15. Komai-Koma M, Gilchrist DS, McKenzie AN, Goodyear CS, Xu D, Liew FY. IL-33 activates B1 cells and exacerbates contact sensitivity. *J Immunol*. 2011; 186(4):2584–91. doi: [10.4049/jimmunol.1002103](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002103) PMID: [21239718](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21239718/)
16. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nature reviews Immunology*. 2010; 10(2):103–10. doi: [10.1038/nri2692](https://doi.org/10.1038/nri2692) PMID: [20081870](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20081870/)
17. Palmer G, Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Toy D, Seemayer CA, Viatte S, et al. Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2009; 60(3): 738–49. doi: [10.1002/art.24305](https://doi.org/10.1002/art.24305) PMID: [19248109](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19248109/)
18. Martin P, Talabot-Ayer D, Seemayer CA, Vigne S, Lamacchia C, Rodriguez E, et al. Disease severity in K/BxN serum transfer-induced arthritis is not affected by IL-33 deficiency. *Arthritis research & therapy*. 2013; 15(1):R13.

19. Koseoglu S, Hatipoglu M, Saglam M, Enhos S, Esen HH. Interleukin-33 could play an important role in the pathogenesis of periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2015; 50(4):525–34. doi: [10.1111/jre.12235](https://doi.org/10.1111/jre.12235) PMID: [25266494](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25266494/)
20. Malcolm J, Awang RA, Oliver-Bell J, Butcher JP, Campbell L, Adrados Planell A, et al. IL-33 Exacerbates Periodontal Disease through Induction of RANKL. *Journal of dental research*. 2015; 94:968–75. doi: [10.1177/0022034515577815](https://doi.org/10.1177/0022034515577815) PMID: [25808546](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25808546/)
21. Kursunlu SF, Ozturk VO, Han B, Atmaca H, Emingil G. Gingival crevicular fluid interleukin-36beta (-1F8), interleukin-36gamma (-1F9) and interleukin-33 (-1F11) levels in different periodontal disease. *Archives of oral biology*. 2015; 60(1):77–83. doi: [10.1016/j.archoralbio.2014.08.021](https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.08.021) PMID: [25247780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25247780/)
22. Papatthanasou E, Teles F, Griffin T, Arguello E, Finkelman M, Hanley J, et al. Gingival crevicular fluid levels of interferon-gamma, but not interleukin-4 or -33 or thymic stromal lymphopoietin, are increased in inflamed sites in patients with periodontal disease. *Journal of periodontal research*. 2014; 49(1): 55–61. doi: [10.1111/jre.12078](https://doi.org/10.1111/jre.12078) PMID: [23550893](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23550893/)
23. Saglam M, Koseoglu S, Aral CA, Savran L, Pekbagriyanik T, Cetinkaya A. Increased levels of interleukin-33 in gingival crevicular fluids of patients with chronic periodontitis. *Odontology / the Society of the Nippon Dental University*. 2016; *Odontology*.
24. Tada H, Matsuyama T, Nishioka T, Hagiwara M, Kiyoura Y, Shimauchi H, et al. Porphyromonas gingivalis Gingipain-Dependently Enhances IL-33 Production in Human Gingival Epithelial Cells. *PLoS One*. 2016; 11(4):e0152794. doi: [10.1371/journal.pone.0152794](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152794) PMID: [27058037](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27058037/)
25. Saidi S, Bouri F, Lencel P, Duplomb L, Baud'huin M, Delplace S, et al. IL-33 is expressed in human osteoblasts, but has no direct effect on bone remodeling. *Cytokine*. 2011; 53(3):347–54. doi: [10.1016/j.cyto.2010.11.021](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.11.021) PMID: [21190867](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21190867/)
26. Kiyomiya H, Ariyoshi W, Okinaga T, Kaneuji T, Mitsugi S, Sakurai T, et al. IL-33 inhibits RANKL-induced osteoclast formation through the regulation of Blimp-1 and IRF-8 expression. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015; 460(2):320–6. doi: [10.1016/j.bbrc.2015.03.033](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.033) PMID: [25795135](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25795135/)
27. Palmer G, Gabay C. Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases. *Nature reviews Rheumatology*. 2011; 7(6):321–9. doi: [10.1038/nrrheum.2011.53](https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.53) PMID: [21519352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21519352/)
28. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *The American journal of pathology*. 2006; 169(3):987–98. doi: [10.2353/ajpath.2006.060180](https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060180) PMID: [16936272](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16936272/)
29. Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *International journal of molecular medicine*. 2003; 11(1):17–21. PMID: [12469211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12469211/)
30. Usui M, Sato T, Yamamoto G, Okamatsu Y, Hanatani T, Moritani Y, et al. Gingival epithelial cells support osteoclastogenesis by producing receptor activator of nuclear factor kappa B ligand via protein kinase A signaling. *Journal of periodontal research*. 2015; 51(4):462–70. doi: [10.1111/jre.12323](https://doi.org/10.1111/jre.12323) PMID: [26432443](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26432443/)
31. Zhao JJ, Feng XP, Zhang XL, Le KY. Effect of Porphyromonas gingivalis and Lactobacillus acidophilus on secretion of IL1B, IL6, and IL8 by gingival epithelial cells. *Inflammation*. 2012; 35(4):1330–7. doi: [10.1007/s10753-012-9446-5](https://doi.org/10.1007/s10753-012-9446-5) PMID: [22382516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22382516/)
32. Fujihara R, Usui M, Yamamoto G, Nishii K, Tsukamoto Y, Okamatsu Y, et al. Tumor necrosis factor-alpha enhances RANKL expression in gingival epithelial cells via protein kinase A signaling. *Journal of periodontal research*. 2014; 49(4):508–17. doi: [10.1111/jre.12131](https://doi.org/10.1111/jre.12131) PMID: [24102429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24102429/)
33. Holtfreter B, Albandar JM, Dietrich T, Dye BA, Eaton KA, Eke PI, et al. Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies: Proposed standards from the Joint EU/ USA Periodontal Epidemiology Working Group. *Journal of clinical periodontology*. 2015; 42(5):407–12. doi: [10.1111/jcpe.12392](https://doi.org/10.1111/jcpe.12392) PMID: [25808877](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25808877/)
34. Saadi-Thiers K, Huck O, Simonis P, Tilly P, Fabre JE, Tenenbaum H, et al. Periodontal and systemic responses in various mice models of experimental periodontitis: respective roles of inflammation duration and Porphyromonas gingivalis infection. *Journal of periodontology*. 2013; 84(3):396–406. doi: [10.1902/jop.2012.110540](https://doi.org/10.1902/jop.2012.110540) PMID: [22655910](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22655910/)
35. Sundnes O, Pietka W, Loos T, Sponheim J, Rankin AL, Pflanz S, et al. Epidermal Expression and Regulation of Interleukin-33 during Homeostasis and Inflammation: Strong Species Differences. *The Journal of investigative dermatology*. 2015; 135(7):1771–80. doi: [10.1038/jid.2015.85](https://doi.org/10.1038/jid.2015.85) PMID: [25739051](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25739051/)
36. Laperine O, Guicheux J, Lesclous P. Periostin-deficient mice, a relevant animal model to investigate periodontitis or not? *BoneKey reports*. 2016; 5:794. doi: [10.1038/bonekey.2016.21](https://doi.org/10.1038/bonekey.2016.21) PMID: [27087940](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27087940/)
37. Balato A, Di Caprio R, Canta L, Mattii M, Lembo S, Raimondo A, et al. IL-33 is regulated by TNF-alpha in normal and psoriatic skin. *Archives of dermatological research*. 2014; 306(3):299–304. doi: [10.1007/s00403-014-1447-9](https://doi.org/10.1007/s00403-014-1447-9) PMID: [24522896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24522896/)

38. Han X, Lin X, Yu X, Lin J, Kawai T, LaRosa KB, et al. Porphyromonas gingivalis infection-associated periodontal bone resorption is dependent on receptor activator of NF-kappaB ligand. *Infection and immunity*. 2013; 81(5):1502–9. doi: [10.1128/IAI.00043-13](https://doi.org/10.1128/IAI.00043-13) PMID: [23439308](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23439308/)
39. Lin J, Bi L, Yu X, Kawai T, Taubman MA, Shen B, et al. Porphyromonas gingivalis Exacerbates Ligature-Induced, RANKL Dependent Alveolar Bone Resorption via Differential Regulation of Toll-Like Receptor 2 (TLR2) and TLR4. *Infection and immunity*. 2014; 82:4127–34. doi: [10.1128/IAI.02084-14](https://doi.org/10.1128/IAI.02084-14) PMID: [25047844](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25047844/)

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abramovitz, L.; Rubinek, T.; Ligumsky, H.; Bose, S.; Barshack, I.; Avivi, C.; Kaufman, B.; Wolf, I., 2011: KL1 internal repeat mediates klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research.*, **17**, 4254–4266

Abramson, S. B., 2008: Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy.*, **10 Suppl 2**, S2

Adams, C. S.; Horton, W. E., 1998: Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. *Anatomical Record.*, **250**, 418–425

Adcocks, C.; Collin, P.; Buttle, D. J., 2002: Catechins from green tea (*Camellia sinensis*) inhibit bovine and human cartilage proteoglycan and type II collagen degradation in vitro. *The Journal of Nutrition.*, **132**, 341–346

Ahmed, S.; Rahman, A.; Hasnain, A.; Lalonde, M.; Goldberg, V. M.; Haqqi, T. M., 2002: Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 beta-induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes. *Free Radical Biology & Medicine.*, **33**, 1097–1105

Ahmed, S.; Wang, N.; Lalonde, M.; Goldberg, V. M.; Haqqi, T. M., 2004: Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) differentially inhibits interleukin-1beta-induced expression of matrix metalloproteinase-1 and -13 in human chondrocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.*, **308**, 767–773

Aigner, T.; Aigner, T.; Hemmel, M.; Hemmel, M.; Neureiter, D.; Neureiter, D.; Gebhard, P. M.; Gebhard, P. M.; Zeiler, G.; Zeiler, G.; Kirchner, T.; Kirchner, T.; McKenna, L.; McKenna, L., 2001: Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritic human articular knee cartilage. *Arthritis and Rheumatism.*, **44**, 1304–1312

Aigner, T.; Stöve, J., 2003: Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, **55**, 1569–1593

Aigner, T.; Kim, H. A.; Roach, H. I., 2004: Apoptosis in osteoarthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America.*, **30**, 639–653

Akhtar, N.; Haqqi, T. M., 2011: Epigallocatechin-3-gallate suppresses the global interleukin-1beta-induced inflammatory response in human chondrocytes. *Arthritis research & therapy.*, **13**, R93

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P., 2014: *Cell Junction and the Extracellular Matrix. Molecular Biology of the Cell.* 6th edn. Elsevier Current Trends

- Alcorta, D. A.; Xiong, Y.; Phelps, D.; Hannon, G.; Beach, D.; Barrett, J. C., 1996: Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **93**, 13742–13747
- Almeida, O. P.; Morar, B.; Hankey, G. J.; Yeap, B. B.; Golledge, J.; Jablensky, A.; Flicker, L., 2017: Longevity Klotho gene polymorphism and the risk of dementia in older men. *Maturitas.*, **101**, 1–5
- Almonte-Becerril, M.; Navarro-Garcia, F.; Gonzalez-Robles, A.; Vega-Lopez, M. A.; Lavalle, C.; Kouri, J. B., 2010: Cell death of chondrocytes is a combination between apoptosis and autophagy during the pathogenesis of Osteoarthritis within an experimental model. *Apoptosis.*, **15**, 631–638
- Ameye, L. G.; Chee, W. S. S., 2006: Osteoarthritis and nutrition. From nutraceuticals to functional foods: a systematic review of the scientific evidence. *Arthritis Research & Therapy.*, **8**, R127
- Andriamanalijaona, R.; Baugé, C.; Renard, E.; Legendre, F.; Raoudi, M.; Kyriotou, M.; Boumediene, K.; Gatto, H.; Monginoux, P.; Pujol, J. P., 2005: Comparative effects of 2 antioxidants, selenomethionine and epigallocatechin-gallate, on catabolic and anabolic gene expression of articular chondrocytes. *Journal of Rheumatology.*, **32**, 1958–1967
- Appelqvist, H.; Wäster, P.; Kågedal, K.; Öllinger, K., 2013: The lysosome: From waste bag to potential therapeutic target. *Journal of Molecular Cell Biology.*, **5**, 214–226
- Archer, C. W.; Francis-West, P., 2003: The chondrocyte. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.*, **35**, 401–404
- Arking, D. E.; Krebsova, A.; Macek, M.; Arking, A.; Mian, I. S.; Fried, L.; Hamosh, A.; Dey, S.; McIntosh, I.; Dietz, H. C., 2002: Association of human aging with a functional variant of klotho. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **99**, 856–861
- Arking, D. E.; Becker, D. M.; Yanek, L. R.; Fallin, D.; Judge, D. P.; Moy, T. F.; Becker, L. C.; Dietz, H. C., 2003: KLOTHO Allele Status and the Risk of Early-Onset Occult Coronary Artery Disease. *The American Journal of Human Genetics.*, **72**, 1154–1161
- Ashkenazi, A.; Dixit, V. M., 1998: Death receptors: Signaling and modulation. *Science.*, **281**, 1305–1308
- Aspberg, A., 2012: The different roles of aggrecan interaction domains. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.*, **60**, 987–996
- Ayhan, E.; Kesmezacar, H.; Akgun, I., 2014: Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis. *World Journal of Orthopedics.*, **5**, 351–361



Baker, D. J.; Childs, B. G.; Durik, M.; Wijers, M. E.; Sieben, C. J.; Zhong, J.; A. Saltness, R.; Jeganathan, K. B.; Verzosa, G. C.; Pezeshki, A.; Khazaie, K.; Miller, J. D.; van Deursen, J. M., 2016: Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature.*, **530**, 184–189

Bartke, A.; List, E. O.; Kopchick, J. J., 2016: The somatotrophic axis and aging: Benefits of endocrine defects. *Growth Hormone and IGF Research.*, **27**, 41–45

Bell, B. D.; Leverrier, S.; Weist, B. M.; Newton, R. H.; Arechiga, A. F.; Luhrs, K. A.; Morrissette, N. S.; Walsh, C. M., 2008: FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **105**, 16677–16682

Bento, C. F.; Renna, M.; Ghislat, G.; Puri, C.; Ashkenazi, A.; Vicinanza, M.; Menzies, F. M.; Rubinsztein, D. C., 2016: Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annual Review of Biochemistry.*, **85**, 685–713

Benya, P. D.; Padilla, S. R.; Nimni, M. E., 1978: Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell.*, **15**, 1313–1321

Berenbaum, F., 2013: Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis and Cartilage.*, **21**, 16–21

Berg, T. O.; Fengsrud, M.; Strømhaug, P. E.; Berg, T.; Seglen, P. O., 1998: Isolation and Characterization of Rat Liver Amphisomes. *The Journal of Biological Chemistry.*, **273**, 21883

Bertrand, J.; Cromme, C.; Umlauf, D.; Frank, S.; Pap, T., 2010: Molecular mechanisms of cartilage remodelling in osteoarthritis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.*, **42**, 1594–1601

Bianchi, A.; Guibert, M.; Cailotto, F.; Gasser, A.; Presle, N.; Mainard, D.; Netter, P.; Kempf, H.; Jouzeau, J. Y.; Reboul, P., 2016: Fibroblast Growth Factor 23 drives MMP13 expression in human osteoarthritic chondrocytes in a Klotho-independent manner. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **24**, 1961–1969

Biazik, J.; Ylä-Anttila, P.; Vihinen, H.; Jokitalo, E.; Eskelinen, E. L., 2015: Ultrastructural relationship of the phagophore with surrounding organelles. *Autophagy.*, **11**, 439–451

Blanco, F. J.; Ochs, R. L.; Schwarz, H.; Lotz, M., 1995: Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *The American Journal of Pathology.*, **146**, 75–85

Blanco, F. J.; Guitian, R.; Vazquez-Martul, E.; De Toro, F. J.; Galdo, F., 1998: Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis: A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis and Rheumatism.*, **41**, 284–289

Blanco, F. J.; Rego, I.; Ruiz-Romero, C., 2011: The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology.*, **7**, 161–169

- Bloch, L.; Sineshchekova, O.; Reichenbach, D.; Reiss, K.; Saftig, P.; Kuro-o, M.; Kaether, C., 2009: Klotho is a substrate for alpha, beta- and gamma-secretase. *FEBS Letters.*, **583**, 3221–3224
- Blom, A. B.; Brockbank, S. M.; Van Lent, P. L.; Van Beuningen, H. M.; Geurts, J.; Takahashi, N.; Van Der Kraan, P. M.; Van De Loo, F. A.; Schreurs, B. W.; Clements, K.; Newham, P.; Van Den Berg, W. B., 2009: Involvement of the Wnt signaling pathway in experimental and human osteoarthritis: Prominent role of Wnt-induced signaling protein 1. *Arthritis and Rheumatism.*, **60**, 501–512
- Blommaart, E. F.; Krause, U.; Schellens, J. P.; Vreeling-Sindelárová, H.; Meijer, a J., 1997: The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *European Journal of Biochemistry.*, **243**, 240–246
- Bohensky, J.; Terkhorn, S. P.; Freeman, T. A.; Adams, C. S.; Garcia, J. A.; Shapiro, I. M.; Srinivas, V., 2009: Regulation of autophagy in human and murine cartilage: Hypoxia-inducible factor 2 suppresses chondrocyte autophagy. *Arthritis and Rheumatism.*, **60**, 1406–1415
- Bonapace, L.; Bornhauser, B. C.; Schmitz, M.; Cario, G.; Ziegler, U.; Niggli, F. K.; Schaefer, B. W.; Schrappe, M.; Stanulla, M.; Bourquin, J. P., 2010: Induction of autophagy-dependent necroptosis is required for childhood acute lymphoblastic leukemia cells to overcome glucocorticoid resistance. *Journal of Clinical Investigation.*, **120**, 1310–1323
- Bouderlique, T.; Vuppalapati, K. K.; Newton, P. T.; Li, L.; Barenus, B.; Chagin, A. S., 2016: Targeted deletion of Atg5 in chondrocytes promotes age-related osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases.*, **75**, 627–631
- Boya, P.; Reggiori, F.; Codogno, P., 2013: Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology.*, **15**, 713–720
- Brown, R. a; Tomlinson, I. W.; Hill, C. R.; Weiss, J. B.; Phillips, P.; Kumar, S., 1983: Relationship of angiogenesis factor in synovial fluid to various joint diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases.*, **42**, 301–307
- Brunet, A.; Bonni, A.; Zigmund, M. J.; Lin, M. Z.; Juo, P.; Hu, L. S.; Anderson, M. J.; Arden, K. C.; Blenis, J.; Greenberg, M. E., 1999: Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell.*, **96**, 857–868
- Buckwalter, J. A.; Martin, J. A., 2006: Osteoarthritis. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, **58**, 150–167
- Buendía, P.; Carracedo, J.; Soriano, S.; Madueño, J. A.; Ortiz, A.; Martín-Malo, A.; Aljama, P.; Ramírez, R., 2015: Klotho Prevents NFκB Translocation and Protects Endothelial Cell from Senescence Induced by Uremia. *Journals of Gerontology - Series A, Biological Sciences and Medical Sciences.*, **70**, 1198–1209

- Buhrmann, C.; Mobasher, A.; Matis, U.; Shakibaei, M., 2010a: Curcumin mediated suppression of nuclear factor- $\kappa$ B promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a high-density co-culture microenvironment. *Arthritis Research & Therapy*, **12**, R127
- Buhrmann, C.; Mobasher, A.; Matis, U.; Shakibaei, M., 2010b: Curcumin mediated suppression of nuclear factor- $\kappa$ B promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a high-density co-culture microenvironment. *Arthritis research & therapy*, **12**, R127
- Burr, D. B.; Gallant, M. A., 2012: Bone remodelling in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, **8**, 665–673
- Burton-Wurster, N.; Lust, G.; Macleod, J. N., 1997: Cartilage fibronectin isoforms: in search of functions for a special population of matrix glycoproteins. *Matrix Biology*, **15**, 441–454
- Bush, J. R.; Beier, F., 2013: TGF- $\beta$  and osteoarthritis—the good and the bad. *Nature Medicine*, **19**, 667–669
- Campisi, J.; d'Adda di Fagagna, F., 2007: Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**, 729–740
- Canty, E.; Kadler, K., 2005: Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *Journal of Cell Science*, **118**, 1341–1353
- Caramés, B.; Taniguchi, N.; Otsuki, S.; Blanco, F. J.; Lotz, M., 2010: Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **62**, 791–801
- Caramés, B.; Taniguchi, N.; Seino, D.; Blanco, F. J.; D'Lima, D.; Lotz, M., 2012a: Mechanical injury suppresses autophagy regulators and pharmacologic activation of autophagy results in chondroprotection. *Arthritis and Rheumatism*, **64**, 1182–1192
- Caramés, B.; Hasegawa, A.; Taniguchi, N.; Miyaki, S.; Blanco, F. J.; Lotz, M., 2012b: Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **71**, 575–581
- Caramés, B.; Olmer, M.; Kiosses, W. B.; Lotz, M. K., 2015: The Relationship of Autophagy Defects to Cartilage Damage During Joint Aging in a Mouse Model. *Arthritis and Rheumatology*, **67**, 1568–1576
- Cawston, T. E.; Young, D. A., 2010: Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone breakdown. *Cell and Tissue Research*, **339**, 221–235
- Cha, S. K.; Hu, M. C.; Kurosu, H.; Kuro-o, M.; Moe, O.; Huang, C. L., 2009: Regulation of Renal Outer Medullary Potassium Channel and Renal K(+) Excretion by Klotho. *Molecular Pharmacology*, **76**, 38–46

- Chang, J.; Wang, W.; Zhang, H.; Hu, Y.; Wang, M.; Yin, Z., 2013: The dual role of autophagy in chondrocyte responses in the pathogenesis of articular cartilage degeneration in osteoarthritis. *International Journal of Molecular Medicine.*, **32**, 1311–1318
- Chang, Q.; Hoefs, S.; van der Kemp, A. W.; Topala, C. N.; Bindels, R. J.; Hoenderop, J. G., 2005: The  $\beta$ -Glucuronidase Klotho Hydrolyzes and Activates the TRPV5 Channel. *Science.*, **310**, 490–493
- Charlier, E.; Relic, B.; Deroyer, C.; Malaise, O.; Neuville, S.; Collée, J.; Malaise, M. G.; De Seny, D., 2016: Insights on molecular mechanisms of chondrocytes death in osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences.*, **17**
- Chautan, M.; Chazal, G.; Cecconi, F.; Gruss, P.; Golstein, P., 1999: Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase- independent pathway. *Current Biology.*, **9**, 967–970
- Chen, B.; Wang, X.; Zhao, W.; Wu, J., 2010: Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.*, **29**, 99
- Chen, B.; Ma, X.; Liu, S.; Zhao, W.; Wu, J., 2012: Inhibition of lung cancer cells growth, motility and induction of apoptosis by Klotho, a novel secreted Wnt antagonist, in a dose-dependent manner. *Cancer Biology & Therapy.*, **13**, 1221–1228
- Chen, C.; Tambe, D. T.; Deng, L.; Yang, L., 2013: Biomechanical properties and mechanobiology of the articular chondrocyte. *American Journal of Physiology - Cell Physiology.*, **305**, C1202-8
- Chen, C. D.; Podvin, S.; Gillespie, E.; Leeman, S. E.; Abraham, C. R., 2007: Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **104**, 19796–19801
- Chen, C. T.; Burton-Wurster, N.; Borden, C.; Hueffer, K.; Bloom, S. E.; Lust, G., 2001: Chondrocyte necrosis and apoptosis in impact damaged articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Research.*, **19**, 703–711
- Chen, K.; Zhou, X.; Sun, Z., 2015: Haplodeficiency of Klotho gene causes arterial stiffening via upregulation of scleraxis expression and induction of autophagy. *Hypertension.*, **66**, 1006–1013
- Chen, L.; Willis, S. N.; Wei, A.; Smith, B. J.; Fletcher, J. I.; Hinds, M. G.; Colman, P. M.; Day, C. L.; Adams, J. M.; Huang, D. C. S., 2005: Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular Cell.*, **17**, 393–403
- Chen, Z. H.; Kim, H. P.; Sciruba, F. C.; Lee, S. J.; Feghali-Bostwick, C.; Stolz, D. B.; Dhir, R.; Landreneau, R. J.; Schuchert, M. J.; Yousem, S. A.; Nakahira, K.; Pilewski,

- J. M.; Lee, J. S.; Zhang, Y.; Ryter, S. W.; Choi, A. M. K., 2008: Egr-1 regulates autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS ONE.*, **3**, e3316
- Chen, C. Di; Tung, T. Y.; Liang, J.; Zeldich, E.; Tucker Zhou, T. B.; Turk, B. E.; Abraham, C. R., 2014: Identification of cleavage sites leading to the shed form of the anti-aging protein klotho. *Biochemistry.*, **53**, 5579–5587
- Chia, S. L.; Sawaji, Y.; Burleigh, A.; McLean, C.; Inglis, J.; Saklatvala, J.; Vincent, T., 2009: Fibroblast growth factor 2 is an intrinsic chondroprotective agent that suppresses ADAMTS-5 and delays cartilage degradation in murine osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism.*, **60**, 2019–2027
- Chin, K. Y., 2016: The spice for joint inflammation: Anti-inflammatory role of curcumin in treating osteoarthritis. *Drug Design, Development and Therapy.*, **10**, 3029–3042
- Cho, Y. S.; Challa, S.; Moquin, D.; Genga, R.; Ray, T. D.; Guildford, M.; Chan, F. K. M., 2009: Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell.*, **137**, 1112–1123
- Christakos, S.; Dhawan, P.; Verstuyf, A.; Verlinden, L.; Carmeliet, G., 2016: Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiological Reviews.*, **96**, 365–408
- Clements, K. M.; Bee, Z. C.; Crossingham, G. V.; Adams, M. A.; Sharif, M., 2001: How severe must repetitive loading be to kill chondrocytes in articular cartilage? *Osteoarthritis and Cartilage.*, **9**, 499–507
- Clements, K. M.; Price, J. S.; Chambers, M. G.; Visco, D. M.; Poole, A. R.; Mason, R. M., 2003: Gene Deletion of Either Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-1 $\beta$ -Converting Enzyme, Inducible Nitric Oxide Synthase, or Stromelysin 1 Accelerates the Development of Knee Osteoarthritis in Mice after Surgical Transection of the Medial Collateral Ligament and Partia. *Arthritis and Rheumatism.*, **48**, 3452–3463
- Clouet, J.; Vinatier, C.; Merceron, C.; Pot-vaucel, M.; Maugars, Y.; Weiss, P.; Grimandi, G.; Guicheux, J., 2009: From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage. *Drug Discovery Today.*, **14**, 913–925
- Clutterbuck, A. L.; Mobasheri, A.; Shakibaei, M.; Allaway, D.; Harris, P., 2009: Interleukin-1 $\beta$ -induced extracellular matrix degradation and glycosaminoglycan release is inhibited by curcumin in an explant model of cartilage inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences.*, **1171**, 428–435
- Clutterbuck, A. L.; Allaway, D.; Harris, P.; Mobasheri, A., 2013: Curcumin reduces prostaglandin E2, matrix metalloproteinase-3 and proteoglycan release in the secretome of interleukin 1 $\beta$ -treated articular cartilage. *F1000Research.*, **2**, 147
- Colwell Jr., C. W.; D'Lima, D. D.; Hoenecke, H. R.; Fronek, J.; Pulido, P.; Morris, B. A.; Chung, C.; Resnick, D.; Lotz, M., 2001: In Vivo Changes After Mechanical Injury.

*Clinical Orthopaedics and Related Research.*, 116–123

Comblain, F.; Sanchez, C.; Lespoune, I.; Balligand, M.; Serisier, S.; Henrotin, Y., 2015: Curcuminoids extract, hydrolyzed collagen and green tea extract synergically inhibit inflammatory and catabolic mediator's synthesis by normal bovine and osteoarthritic human chondrocytes in monolayer. *PLoS ONE.*, **10**, e0121654

Constant, J., 1997: Alcohol, ischemic heart disease, and the French paradox. *Clinical Cardiology.*, **20**, 420–424

Cory, S.; Adams, J. M., 2002: The bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer.*, **2**, 647–656

Costa, C.; Tsatsakis, A.; Mamoulakis, C.; Teodoro, M.; Briguglio, G.; Caruso, E.; Tsoukalas, D.; Margina, D.; Dardiotis, E.; Kouretas, D.; Fenga, C., 2017: Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. *Food and Chemical Toxicology.*, **110**, 286–299

Crichton, D.; Wilkinson, S.; O'Prey, J.; Syed, N.; Smith, P.; Harrison, P. R.; Gasco, M.; Garrone, O.; Crook, T.; Ryan, K. M., 2006: DRAM, a p53-Induced Modulator of Autophagy, Is Critical for Apoptosis. *Cell.*, **126**, 121–134

Csaki, C.; Keshishzadeh, N.; Fischer, K.; Shakibaei, M., 2008: Regulation of inflammation signalling by resveratrol in human chondrocytes in vitro. *Biochemical Pharmacology.*, **75**, 677–687

Csaki, C.; Mobasheri, A.; Shakibaei, M., 2009a: Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1beta-induced NF-kappaB-mediated inflammation and apoptosis. *Arthritis Research & Therapy.*, **11**, R165

Csaki, C.; Mobasheri, A.; Shakibaei, M., 2009b: Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1beta-induced NF-kappaB-mediated inflammation and apoptosis. *Arthritis research & therapy.*, **11**, R165

Cuervo, A. M.; Dice, J. F., 2000: Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *The Journal of Biological Chemistry.*, **275**, 31505–31513

Cuervo, A. M., 2004: Impaired Degradation of Mutant alpha-Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy. *Science.*, **305**, 1292–1295

Cuervo, A. M.; Wong, E., 2014: Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Research.*, **24**, 92–104

d'Adda di Fagagna, F., 2008: Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature Reviews Cancer.*, **8**, 512–522

D'Lima, D.; Hermida, J.; Hashimoto, S.; Colwell, C.; Lotz, M., 2006: Caspase inhibitors

reduce severity of cartilage lesions in experimental osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism.*, **54**, 1814–1821

D’Lima, D. D.; Hashimoto, S.; Chen, P. C.; Colwell, C. W.; Lotz, M. K., 2001a: Human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **9**, 712–719

D’Lima, D. D.; Hashimoto, S.; Chen, P. C.; Colwell Jr., C. W.; Lotz, M. K., 2001b: Impact of mechanical trauma on matrix and cells. *Clinical Orthopaedics and Related Research.*, S90-9

Dai, D.; Wang, Q.; Li, X.; Liu, J.; Ma, X.; Xu, W., 2016: Klotho inhibits human follicular thyroid cancer cell growth and promotes apoptosis through regulation of the expression of stanniocalcin-1. *Oncology Reports.*, **35**, 552–558

Dai, S. M.; Shan, Z. Z.; Nakamura, H.; Masuko-Hongo, K.; Kato, T.; Nishioka, K.; Yudoh, K., 2006: Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: Possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism.*, **54**, 818–831

Dang, A. C.; Warren, A. P.; Kim, H. T., 2006: Beneficial effects of intra-articular caspase inhibition therapy following osteochondral injury. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **14**, 526–532

Das, L.; Bhaumik, E.; Raychaudhuri, U.; Chakraborty, R., 2012: Role of nutraceuticals in human health. *Journal of Food Science and Technology.*, **49**, 173–183

Das, S.; Banquy, X.; Zappone, B.; Greene, G. W.; Jay, G. D.; Israelachvili, J. N., 2013: Synergistic interactions between grafted hyaluronic acid and lubricin provide enhanced wear protection and lubrication. *Biomacromolecules.*, **14**, 1669–1677

Dave, M.; Attur, M.; Palmer, G.; Al-Mussawir, H. E.; Kennish, L.; Patel, J.; Abramson, S. B., 2008: The antioxidant resveratrol protects against chondrocyte apoptosis via effects on mitochondrial polarization and ATP production. *Arthritis and Rheumatism.*, **58**, 2786–2797

De Duve, C., 1963: The lysosome. *Scientific American.*, **208**, 64–72

Deahl, S. T.; Oberley, L. W.; Oberley, T. D.; Elwell, J. H., 1992: Immunohistochemical identification of superoxide dismutases, catalase, and glutathione-s-transferases in rat femora. *Journal of Bone and Mineral Research.*, **7**, 187–198

de Oliveira, R. M., 2006: Klotho RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway. *FEBS letters.*, **580**, 5753–5758

Degterev, A.; Huang, Z.; Boyce, M.; Li, Y.; Jagtap, P.; Mizushima, N.; Cuny, G. D.; Mitchison, T. J.; Moskowitz, M. A.; Yuan, J., 2005: Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology.*

1, 112–119

Del Carlo, M.; Loeser, R. F., 2002: Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. *Arthritis and Rheumatism.*, **46**, 394–403

Di Bartolomeo, S.; Corazzari, M.; Nazio, F.; Oliverio, S.; Lisi, G.; Antonioli, M.; Pagliarini, V.; Matteoni, S.; Fuoco, C.; Giunta, L.; D'Amelio, M.; Nardacci, R.; Romagnoli, A.; Piacentini, M.; Cecconi, F.; Fimia, G. M., 2010: The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *Journal of Cell Biology.*, **191**, 155–168

Di Leonardo, A.; Linke, S. P.; Clarkin, K.; Wahl, G. M., 1994: DNA damage triggers a prolonged p53- dependent G arrest and long-term induction of Cipl in normal human fibroblasts. *Genes & Development.*, **8**, 2540–2551

Dice, J. F., 2007: Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy.*, **3**, 295–299

Droge, W., 2002: Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Review.*, **82**, 47–95

Dudhia, J., 2005: Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cellular and Molecular Life Sciences.*, **62**, 2241–2256

Ellman, M. B.; Yan, D.; Ahmadinia, K.; Chen, D.; An, H. S.; Im, H. J., 2013: Fibroblast growth factor control of cartilage homeostasis. *Journal of Cellular Biochemistry.*, **114**, 735–742

Elmali, N.; Esenkaya, I.; Harma, A.; Ertem, K.; Turkoz, Y.; Mizrak, B., 2005: Effect of resveratrol in experimental osteoarthritis in rabbits. *Inflammation Research.*, **54**, 158–162

Elmore, S., 2007: Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology.*, **35**, 495–516

Eltawil, N. M.; Bari, C. De; Achan, P.; Pitzalis, C.; Accio, F. D., 2009: A novel in vivo murine model of cartilage regeneration. Age and strain-dependent outcome after joint surface injury. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **17**, 695–704

Eren, M.; Boe, A. E.; Murphy, S. B.; Place, A. T.; Nagpal, V.; Morales-Nebreda, L.; Urich, D.; Quaggin, S. E.; Budinger, G. R. S.; Mutlu, G. M.; Miyata, T.; Vaughan, D. E., 2014: PAI-1-regulated extracellular proteolysis governs senescence and survival in Klotho mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **111**, 7090–7095

Erlich, S.; Mizrachi, L.; Segev, O.; Lindenboim, L.; Zmira, O.; Adi-Harel, S.; Hirsch, J. A.; Stein, R.; Pinkas-Kramarski, R., 2007: Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members. *Autophagy.*, **3**, 561–568



- Fadok, V. A.; De Cathelineau, A.; Daleke, D. L.; Henson, P. M.; Bratton, D. L., 2001: Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry.*, **276**, 1071–1077
- Fan, W.; Nassiri, A.; Zhong, Q., 2011: Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **108**, 7769–7774
- Ferland, C. E.; Laverty, S.; Beaudry, F.; Vachon, P., 2011: Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior.*, **97**, 603–610
- Fernandes, L.; Hagen, K. B.; Bijlsma, J. W. J.; Andreassen, O.; Christensen, P.; Conaghan, P. G.; Doherty, M.; Geenen, R.; Hammond, A.; Kjekken, I.; Lohmander, L. S.; Lund, H.; Mallen, C. D.; Nava, T.; Oliver, S.; Pavelka, K.; Pitsillidou, I.; da Silva, J. A.; de la Torre, J. et al., 2013: EULAR recommendations for the non-pharmacological core management of hip and knee osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases.*, **72**, 1125–1135
- Ferreira-Gomes, J.; Adães, S.; Castro-Lopes, J. M., 2008: Assessment of movement-evoked pain in osteoarthritis by the knee-bend and CatWalk tests: a clinically relevant study. *The Journal of Pain.*, **9**, 945–954
- Fimia, G. M.; Stoykova, A.; Romagnoli, A.; Giunta, L.; Di Bartolomeo, S.; Nardacci, R.; Corazzari, M.; Fuoco, C.; Ucar, A.; Schwartz, P.; Gruss, P.; Piacentini, M.; Chowdhury, K.; Cecconi, F., 2007: Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature.*, **447**
- Flannery, C. R.; Little, C. B.; Caterson, B.; Hughes, C. E., 1999: Effects of culture conditions and exposure to catabolic stimulators (IL-1 and retinoic acid) on the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and disintegrin metalloproteinases (ADAMs) by articular cartilage chondrocytes. *Matrix Biology.*, **18**, 225–237
- Fox, A. J. S.; Wanivenhaus, F.; Burge, A. J.; Warren, R. F.; Rodeo, S. A., 2014: The human meniscus: A review of anatomy, function, injury, and advances in treatment. *Clinical Anatomy.*, **28**, 269–287
- Franceschi, C.; Bonafè, M.; Valensin, S.; Benedictis, G. D. E., 2000: Inflamm-aging An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences.*, **908**, 244–254
- Frémont, L., 2000: Biological effects of resveratrol. *Life Sciences.*, **3**, 1041–1064
- Fuerst, M.; Bertrand, J.; Lammers, L.; Dreier, R.; Echtermeyer, F.; Nitschke, Y.; Rutsch, F.; Schäfer, F. K. W.; Niggemeyer, O.; Steinhagen, J.; Lohmann, C. H.; Pap, T.; Rütther, W., 2009: Calcification of articular cartilage in human osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism.*, **60**, 2694–2703

- Fukui, N.; Zhu, Y.; Maloney, W. J.; Clohisy, J.; Sandell, L. J., 2003: Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. *The Journal of Bone and Joint Surgery.*, **85–A Suppl**, 59–66
- Fulda, S.; Debatin, K. M., 2006: Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.*, **25**, 4798–4811
- Funderburk, S. F.; Wang, Q. J.; Yue, Z., 2010: The Beclin 1-VPS34 complex - at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends in Cell Biology.*, **20**, 355–362
- Furuzawa-Carballeda, J.; Macip-Rodríguez, P. M.; Cabral, A. R., 2008: Osteoarthritis and rheumatoid arthritis pannus have similar qualitative metabolic characteristics and pro-inflammatory cytokine response. *Clinical and Experimental Rheumatology.*, **26**, 554–560
- Gabay, O.; Oppenheimer, H.; Meir, H.; Zaal, K.; Sanchez, C.; Dvir-Ginzberg, M., 2012: Increased apoptotic chondrocytes in articular cartilage from adult heterozygous SirT1 mice. *Annals of the Rheumatic Diseases.*, **71**, 613–616
- Gabay, O.; Zaal, K. J.; Sanchez, C.; Dvir-Ginzberg, M.; Gagarina, V.; Song, Y.; He, X. H.; McBurney, M. W., 2013: Sirt1-deficient mice exhibit an altered cartilage phenotype. *Joint Bone Spine.*, **80**, 613–620
- Galluzzi, L.; Maiuri, M.; Vitale, I.; Zischka, H.; Castedo, M.; Zitvogel, L.; Kroemer, G., 2007: Cell death modalities: classification and pathophysiological implications Morphological Characterization of Cell Death. *Cell Death and Differentiation.*, **14**, 1237–1243
- Ganley, I. G.; Lam, D. H.; Wang, J.; Ding, X.; Chen, S.; Jiang, X., 2009: ULK1-ATG13-FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *The Journal of Biological Chemistry.*, **284**, 12297–12305
- Gao, Y.; Liu, S.; Huang, J.; Guo, W.; Chen, J.; Zhang, L.; Zhao; Peng, J.; Wang, A.; Wang, Y.; Xu, W.; Lu, S.; Yuan, M.; Guo, Q., 2014: The ECM-Cell Interaction of Cartilage Extracellular Matrix on Chondrocytes. *BioMed Research International.*, **2014**
- Gavenis, K.; Pufe, T.; Brandenburg, L. O.; Schiffl, K.; Schmidt-Rohlfing, B., 2011: Effects of controlled released BMP-7 on markers of inflammation and degradation during the cultivation of human osteoarthritic chondrocytes. *Journal of Biomaterials Applications.*, **26**, 419–433
- Gelse, K.; Pöschl, E.; Aigner, T., 2003: Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, **55**, 1531–1546
- Geng, J.; Klionsky, D. J., 2008a: The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. *EMBO reports.*, **9**, 859–864
- Geng, J.; Klionsky, D. J., 2008b: The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems

in macroautophagy. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. *EMBO reports.*, **9**, 859–864

Gerland, L. M.; Peyrol, S.; Lallemand, C.; Branche, R.; Magaud, J. P.; Ffrench, M., 2003: Association of increased autophagic inclusions labeled for  $\beta$ -galactosidase with fibroblastic aging. *Experimental Gerontology.*, **38**, 887–895

Gewirtz, D. a., 2013: Autophagy and senescence: A partnership in search of definition. *Autophagy.*, **9**, 808–812

Gibson, G., 1998: Active role of chondrocyte apoptosis in endochondral ossification. *Microscopy Research and Technique.*

Girkontaite, I.; Frischholz, S.; Lammi, P.; Wagner, K.; Swoboda, B.; Aigner, T.; Von der Mark, K., 1996: Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies. *Matrix Biology.*, **15**, 231–238

Glyn-Jones, S.; Palmer, A. J. R.; Agricola, R.; Price, A. J.; Vincent, T. L.; Weinans, H.; Carr, A. J., 2015: Osteoarthritis. *Lancet.*, **386**, 376–387

Goebel, J. C.; Bolbos, R.; Pham, M.; Galois, L.; Rengle, A.; Loeuille, D.; Netter, P.; Gillet, P.; Beuf, O.; Watrin-Pinzano, A., 2010: In vivo high-resolution MRI (7T) of femoro-tibial cartilage changes in the rat anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis: a cross-sectional study. *Rheumatology.*, **49**, 1654–1664

Goldring, M. B.; Berenbaum, F., 2004a: The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide. *Clinical Orthopaedics and Related Research.*, **427 Suppl**, S37-46

Goldring, S. R.; Goldring, M. B., 2004b: The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Research.*, **427 Suppl**, S27-36

Golstein, P.; Kroemer, G., 2007: Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences.*, **32**, 37–43

Gosselin, K.; Deruy, E.; Martien, S.; Vercamer, C.; Bouali, F.; Dujardin, T.; Slomianny, C.; Houel-Renault, L.; Chelli, F.; De Launoit, Y.; Abbadie, C., 2009: Senescent Keratinocytes Die by Autophagic Programmed Cell Death. *The American Journal of Pathology.*, **174**, 423–435

Gosset, M.; Berenbaum, F.; Thirion, S.; Jacques, C., 2008: Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nature Protocols.*, **3**, 1253–1260

Greene, M. A.; Loeser, R. F., 2015: Aging-related inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **23**, 1966–1971

Grogan, S. P.; Miyaki, S.; Asahara, H.; D'Lima, D. D.; Lotz, M. K., 2009: Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes

in osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy.*, **11**, R85

Gu, H.; Li, K.; Li, X.; Yu, X.; Wang, W.; Ding, L.; Liu, L., 2016: Oral resveratrol prevents osteoarthritis progression in C57BL/6J mice fed a High-Fat Diet. *Nutrients.*, **8**, 1–11

Gump, J. M.; Thorburn, A., 2011: Autophagy and apoptosis: What is the connection? *Trends in Cell Biology.*, **21**, 387–392

Guo, Y.; Zhuang, X.; Huang, Z.; Zou, J.; Yang, D.; Hu, X.; Du, Z.; Wang, L.; Liao, X., 2017: Klotho protects the heart from hyperglycemia-induced injury by inactivating ROS and NF- $\kappa$ B-mediated inflammation both in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta.*

Hailey, D. W.; Rambold, A. S.; Satpute-Krishnan, P.; Mitra, K.; Sougrat, R.; Kim, P. K.; Lippincott-Schwartz, J., 2010: Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation. *Cell.*, **141**, 656–667

Hall, K. C.; Hill, D.; Otero, M.; Plumb, D. A.; Froemel, D.; Dragomir, C. L.; Maretzky, T.; Boskey, A.; Crawford, H. C.; Selleri, L.; Goldring, M. B.; Blobel, C. P., 2013: ADAM17 Controls Endochondral Ossification by Regulating Terminal Differentiation of Chondrocytes. *Molecular and Cellular Biology.*, **33**, 3077–3090

Hameed, F.; Ihm, J., 2012: Injectable medications for osteoarthritis. *PM & R: the Journal of Injury, Function, and Rehabilitation.*, **4**, S75-81

Hampel, B.; Malisan, F.; Niederegger, H.; Testi, R.; Jansen-Dürr, P., 2004: Differential regulation of apoptotic cell death in senescent human cells. *Experimental Gerontology.*, **39**, 1713–1721

Hanada, T.; Noda, N. N.; Satomi, Y.; Ichimura, Y.; Fujioka, Y.; Takao, T.; Inagaki, F.; Ohsumi, Y., 2007: The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *The Journal of Biological Chemistry.*, **282**, 37298–37302

Hanahan, D.; Weinberg, R. A., 2011: Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.*, **144**, 646–674

Hao, Q.; Ding, X.; Gao, L.; Yang, M.; Dong, B., 2016: G-395A polymorphism in the promoter region of the KLOTHO gene associates with reduced cognitive impairment among the oldest old. *Age.*, **38**, 7

Haruna, Y.; Kashihara, N.; Satoh, M.; Tomita, N.; Namikoshi, T.; Sasaki, T.; Fujimori, T.; Xie, P.; Kanwar, Y. S., 2007: Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **104**, 2331–2336

Hashimoto, H.; Tanaka, M.; Suda, T.; Tomita, T.; Hayashida, K.; Takeuchi, E.; Kaneko, M.; Takano, H.; Nagata, S.; Ochi, T., 1998a: Soluble Fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism.*, **41**, 657–662

Hashimoto, S.; Setareh, M.; Ochs, R. L.; Lotz, M., 1997: FAS/FAS ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes. *Arthritis and Rheumatism.*, **40**, 1749–1755

Hashimoto, S.; Ochs, R. L.; Komiyama, S.; Lotz, M., 1998b: Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism.*, **41**, 1632–1638

Hashimoto, S.; Takahashi, K.; Amiel, D.; Coutts, R. D.; Lotz, M., 1998c: Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism.*, **41**, 1266–1274

Hasima, N.; Ozpolat, B., 2014: Regulation of autophagy by polyphenolic compounds as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cell Death and Disease.*, **5**, e1509

Häuselmann, H. J.; Stefanovic-Racic, M.; Michel, B. a; Evans, C. H., 1998: Differences in Nitric Oxide Production by Superficial and Deep Human Articular Chondrocytes: Implications for Proteoglycan Turnover in Inflammatory Joint Diseases. *The Journal of Immunology.*, **160**, 1444–1448

Haversath, M.; Catelas, I.; Li, X.; Tassemeier, T.; Jäger, M., 2012: PGE<sub>2</sub> and BMP-2 in bone and cartilage metabolism: 2 intertwining pathways. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.*, **90**, 1434–1445

Hayashi-Nishino, M.; Fujita, N.; Noda, T.; Yamaguchi, A.; Yoshimori, T.; Yamamoto, A., 2009: A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nature Cell Biology.*, **11**, 1433–1437

Hayflick, L.; Moorhead, P., 1961: The serial cultivation of human cell strains. *Experimental Cell Research.*, **621**, 585–621

Haywood, L.; McWilliams, D. F.; Pearson, C. I.; Gill, S. E.; Ganesan, A.; Wilson, D.; Walsh, D. A., 2003: Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism.*, **48**, 2173–2177

He, C.; Levine, B., 2010: The Beclin 1 interactome. *Current Opinion in Cell Biology.*, **22**, 140–149

He, S.; Wang, L.; Miao, L.; Wang, T.; Du, F.; Zhao, L.; Wang, X., 2009: Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- $\alpha$ . *Cell.*, **137**, 1100–1111

Hedbom, E.; Antonsson, P.; Hjerpe, A.; Aeschlimann, D.; Paulsson, M.; Rosa-Pimentel, E.; Sommarin, Y.; Wendel, M.; Oldberg, Å.; Heinegård, D., 1992: Cartilage matrix proteins: An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *The Journal of Biological Chemistry.*, **267**, 6132–6136

Heinecke, L. F.; Grzanna, M. W.; Au, A. Y.; Mochal, C. A.; Rashmir-Raven, A.; Frondoza, C. G., 2010: Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E<sub>2</sub> production in chondrocytes by avocado soybean unsaponifiables and

epigallocatechin gallate. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **18**, 220–227

Heinegård, D.; Saxne, T., 2011: The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology.*, **7**, 50–56

Henrotin, Y.; Kurz, B.; Aigner, T., 2005: Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: Friends or foes? *Osteoarthritis and Cartilage.*, **13**, 643–654

Henrotin, Y.; Lambert, C.; Couchourel, D.; Ripoll, C.; Chiotelli, E., 2011: Nutraceuticals: do they represent a new era in the management of osteoarthritis? - a narrative review from the lessons taken with five products. *Osteoarthritis and cartilage.*, **19**, 1–21

Héraud, F.; Héraud, A.; Harmand, M. F., 2000: Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Annals of the Rheumatic Diseases.*, **59**, 959–965

Holler, N.; Zaru, R.; Micheau, O.; Thome, M.; Attinger, A.; Valitutti, S.; Bodmer, J. L.; Schneider, P.; Seed, B.; Tschopp, J., 2000: Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature Immunology.*, **1**, 489–495

Holzenberger, M.; Dupont, J.; Ducos, B.; Leneuve, P.; Géloën, A.; Even, P. C.; Cervera, P.; Le Bouc, Y., 2003: IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature.*, **421**, 182–187

Homandberg, G. A.; Meyers, R.; Xie, D. L., 1992: Fibronectin fragments cause chondrolysis of bovine articular cartilage slices in culture. *The Journal of Biological Chemistry.*, **267**, 3597–3604

Homandberg, G. A.; Hui, F.; Wen, C.; Purple, C.; Bewsey, K.; Koepp, H.; Huch, K.; Harris, A., 1997: Fibronectin-fragment-induced cartilage chondrolysis is associated with release of catabolic cytokines. *Biochemical Journal.*, **757**, 751–757

Honda, K.; Ohno, S.; Tanimoto, K.; Ijuin, C.; Tanaka, N.; Doi, T.; Kato, Y.; Tanne, K., 2000: The effects of high magnitude cyclic tensile load on cartilage matrix metabolism in cultured chondrocytes. *European Journal of Cell Biology.*, **79**, 601–609

Hoshiyama, Y.; Otsuki, S.; Oda, S.; Kurokawa, Y.; Nakajima, M.; Jotoku, T.; Tamura, R.; Okamoto, Y.; Lotz, M. K.; Neo, M., 2015: Chondrocyte clusters adjacent to sites of cartilage degeneration have characteristics of progenitor cells. *Journal of Orthopaedic Research.*, **33**, 548–555

Hosokawa, N.; Hara, T.; Kaizuka, T.; Kishi, C.; Takamura, A.; Miura, Y.; Iemura, S. ichiro; Natsume, T.; Takehana, K.; Yamada, N.; Guan, J. lin; Oshiro, N.; Mizushima, N., 2009: Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1 – Atg13 – FIP200 Complex Required for Autophagy. *Molecular Biology of the Cell.*, **20**, 1981–1991

Hotchkiss, R. S.; Strasser, A.; McDunn, J. E.; Swanson, P. E., 2009: Cell death. *The New England Journal of Medicine.*, **361**, 1570–1583

Hu, M. C.; Shi, M.; Zhang, J.; Addo, T.; Cho, H. J.; Barker, S. L.; Ravikumar, P.; Gillings, N.; Bian, A.; Sidhu, S. S.; Kuro-O, M.; Moe, O. W., 2016: Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating  $\alpha$ Klotho. *Journal of the American Society of Nephrology.*, **27**, 79–90

Huang, H.; Liu, Q.; Liu, L.; Wu, H.; Zheng, L., 2015: Effect of epigallocatechin-3-gallate on proliferation and phenotype maintenance in rabbit articular chondrocytes in vitro. *Experimental and Therapeutic Medicine.*, **9**, 213–218

Hui, W.; Young, D. A.; Rowan, A. D.; Xu, X.; Cawston, T. E.; Proctor, C. J., 2016: Oxidative changes and signalling pathways are pivotal in initiating age-related changes in articular cartilage. *Annals of the Rheumatic Diseases.*, **75**, 449–458

Iida, R. H.; Kanko, S.; Suga, T.; Morito, M.; Yamane, A., 2011: Autophagic-lysosomal pathway functions in the masseter and tongue muscles in the klotho mouse, a mouse model for aging. *Molecular and Cellular Biochemistry.*, **348**, 89–98

Ikushima, M.; Rakugi, H.; Ishikawa, K.; Maekawa, Y.; Yamamoto, K.; Ohta, J.; Chihara, Y.; Kida, I.; Ogihara, T., 2006: Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, **339**, 827–832

Im, H. J.; Muddasani, P.; Natarajan, V.; Schmid, T. M.; Block, J. A.; Davis, F.; van Wijnen, A. J.; Loeser, R. F., 2007: Basic fibroblast growth factor stimulates matrix metalloproteinase-13 via the molecular cross-talk between the mitogen-activated protein kinases and protein kinase Cdelta pathways in human adult articular chondrocytes. *The Journal of Biological Chemistry.*, **282**, 11110–11121

Imura, A.; Iwano, A.; Tohyama, O.; Tsuji, Y.; Nozaki, K.; Hashimoto, N.; Fujimori, T.; Nabeshima, Y. I., 2004: Secreted Klotho protein in sera and CSF: Implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Letters.*, **565**, 143–147

Inoue, S.; Sato, T.; Suzuki-Utsunomiya, K.; Komori, Y.; Hozumi, K.; Chiba, T.; Yahata, T.; Nakai, K.; Inokuchi, S., 2013: Sepsis-induced hypercytokinemia and lymphocyte apoptosis in aging-accelerated Klotho knockout mice. *Shock.*, **39**, 311–316

Intema, F.; Sniekers, Y. H.; Weinans, H.; Vianen, M. E.; Yocum, S. A.; Zuurmond, A. M. M.; DeGroot, J.; Lafeber, F. P.; Mastbergen, S. C., 2010: Similarities and discrepancies in subchondral bone structure in two differently induced canine models of osteoarthritis. *Journal of Bone and Mineral Research.*, **25**, 1650–1657

Ioan-Facsinay, A.; Kloppenburg, M., 2013: An emerging player in knee osteoarthritis: the infrapatellar fat pad. *Arthritis Research & Therapy.*, **15**, 225

Ishii, M.; Yamaguchi, Y.; Yamamoto, H.; Hanaoka, Y.; Ouchi, Y., 2008: Airspace enlargement with airway cell apoptosis in klotho mice: a model of aging lung. *The Journal of Gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences.*, **63**, 1289–1298

Jacobson, M.; Weil, M.; Raff, M., 1997: Programmed cell death in animal development. *Cell.*, **88**, 347–354

Jeon, O. H.; Kim, C.; Laberge, R. M.; Demaria, M.; Rathod, S.; Vasserot, A. P.; Chung, J. W.; Kim, D. H.; Poon, Y.; David, N.; Baker, D. J.; van Deursen, J. M.; Campisi, J.; Elisseeff, J. H., 2017: Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nature Medicine.*, **23**, 775–781

Jiang, L. B.; Liu, H. X.; Zhou, Y. L.; Sheng, S. R.; Xu, H. Z.; Xue, E. X., 2017: An ultrastructural study of chondroptosis: programmed cell death in degenerative intervertebral discs *in vivo*. *Journal of Anatomy.*, **231**, 129–139

Jung, C. H.; Jun, C. B.; Ro, S. H.; Kim, Y. M.; Otto, N. M.; Cao, J.; Kundu, M.; Kim, D. H., 2009: ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Molecular Biology of the Cell.*, **20**, 1992–2003

Kabeya, Y.; Mizushima, N.; Ueno, T.; Yamamoto, A.; Kirisako, T.; Noda, T.; Kominami, E.; Ohsumi, Y.; Yoshimori, T., 2000: LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal.*, **19**, 5720–5728

Kaeberlein, M.; Mcvey, M.; Guarente, L., 1999: Saccharomyces cerevisiae by two different mechanisms promote longevity in Saccharomyces cerevisiae by two different mechanisms. *Genes & Development.*, 2570–2580

Kalra, E. K., 2003: Nutraceutical - Definition and Introduction. *AAPS Pharmsci.*, **5**, E25

Kapoor, M.; Martel-Pelletier, J.; Lajeunesse, D.; Pelletier, J. P.; Fahmi, H., 2011: Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology.*, **7**, 33–42

Kato, Y.; Arakawa, E.; Kinoshita, S.; Shirai, A.; Furuya, A.; Yamano, K.; Nakamura, K.; Iida, A.; Anazawa, H.; Koh, N.; Iwano, A.; Imura, A.; Fujimori, T.; Kuro-o, M.; Hanai, N.; Takeshige, K.; Nabeshima, Y. ichi, 2000: Establishment of the Anti-Klotho Monoclonal Antibodies and Detection of Klotho Protein in Kidneys. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, **267**, 597–602

Kawaguchi, H.; Manabe, N.; Miyaura, C.; Chikuda, H.; Nakamura, K.; Kuro-o, M., 1999: Independent impairment of osteoblast and osteoclast differentiation in klotho mouse exhibiting low-turnover osteopenia. *Journal of Clinical Investigation.*, **104**, 229–237

Kawai, M.; Kinoshita, S.; Kimoto, A.; Hasegawa, Y.; Miyagawa, K.; Yamazaki, M.; Ohata, Y.; Ozono, K.; Michigami, T., 2013: FGF23 suppresses chondrocyte proliferation in the presence of soluble  $\alpha$ -klotho both *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry.*, **288**, 2414–2427

Kawano, K. I.; Ogata, N.; Chiano, M.; Molloy, H.; Kleyn, P.; Spector, T. D.; Uchida, M.; Hosoi, T.; Suzuki, T.; Orimo, H.; Inoue, S.; Nabeshima, Y.; Nakamura, K.; Kuro-O, M.;



- Kawaguchi, H., 2002: Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research.*, **17**, 1744–1751
- Kempe, D. S.; Ackermann, T. F.; Fischer, S. S.; Koka, S.; Boini, K. M.; Mahmud, H.; Föller, M.; Rosenblatt, K. P.; Kuro-O, M.; Lang, F., 2009: Accelerated suicidal erythrocyte death in Klotho-deficient mice. *European Journal of Physiology.*, **458**, 503–512
- Kennedy, O. D.; Herman, B. C.; Laudier, D. M.; Majeska, R. J.; Sun, H. B.; Schaffler, M. B., 2012: Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active pro-osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations. *Bone.*, **50**, 1115–1122
- Kenyon, C.; Chang, J.; Gensch, E.; Rudner, A.; Tabtiang, R., 1993: A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature.*, **366**, 461–464
- Kerr, J. F. R.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R., 1972: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer.*, **258**, 479–517
- Kim, H. A.; Suh, D. I.; Song, Y. W., 2001: Relationship between chondrocyte apoptosis and matrix depletion in human articular cartilage. *Journal of Rheumatology.*, **28**, 2038–2045
- Kim, H. J.; Chang, H.; Han, S.; Lee, M.; Jung, J. Y.; An, S.; Baek, S. Y.; Lee, J.; Lee, J.; Lee, T.; Shin, D.; Kim, H., 2014: Epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl)-gallate-induced Differentiation of Human Keratinocytes Involves Klotho-Mediated Regulation of Protein Kinase-cAMP Responsive Element-Binding Protein Signaling. *International Journal of Molecular Sciences.*, **15**, 5749–5761
- Kim, H. T.; Lo, M. Y.; Pillarisetty, R., 2002: Chondrocyte apoptosis following intraarticular fracture in humans. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **10**, 747–749
- Kim, J.; Xu, M.; Xo, R.; Mates, A.; Wilson, G. L.; Pearsall IV, A. W.; Grishko, V., 2010: Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **18**, 424–432
- Kim, J.; Kundu, M.; Viollet, B.; Guan, K. L., 2011: AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology.*, **13**, 132–141
- Kim, S. J.; Cheresh, P.; Eren, M.; Jablonski, R. P.; Yeldandi, A.; Ridge, K. M.; Budinger, G. S.; Kim, D. H.; Wolf, M. S.; Vaughan, D.; Kamp, D. W., 2017: Klotho, an anti-aging molecule, attenuates oxidant-induced alveolar epithelial cell mtDNA damage and apoptosis. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.*, **313**, L16–L26
- Kimura, S.; Noda, T.; Yoshimori, T., 2008: Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Structure and Function.*, **33**, 109–122

- Kirisako, T.; Ichimura, Y.; Okada, H.; Kabeya, Y.; Mizushima, N.; Yoshimori, T.; Ohsumi, M.; Takao, T.; Noda, T.; Ohsumi, Y., 2000: The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Journal of Cell Biology.*, **151**, 263–275
- Kirstetter, P.; Anderson, K.; Porse, B. T.; Jacobsen, S. E. W.; Nerlov, C., 2006: Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nature Immunology.*, **7**, 1048–1056
- Kischkel, F. C.; Hellbardt, S.; Behrmann, I.; Germer, M.; Pawlita, M.; Krammer, P. H.; Peter, M. E., 1995: Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal.*, **14**, 5579–5588
- Kitani, K.; Osawa, T.; Yokozawa, T., 2007: The effects of tetrahydrocurcumin and green tea polyphenol on the survival of male C57BL/6 mice. *Biogerontology.*, **8**, 567–573
- Klatt, A. R.; Becker, A. K. A.; Neacsu, C. D.; Paulsson, M.; Wagener, R., 2011: The matrilins: modulators of extracellular matrix assembly. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.*, **43**, 320–330
- Klionsky, D. J.; Cregg, J. M.; Dunn, W. A.; Emr, S. D.; Sakai, Y.; Sandoval, I. V.; Sibirny, A.; Subramani, S.; Thumm, M.; Veenhuis, M.; Ohsumi, Y., 2003: A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental Cell.*, **5**, 539–545
- Knudson, C. B.; Knudson, W., 2001: Cartilage proteoglycans. *Seminars in Cell & Developmental Biology.*, **12**, 69–78
- Kobayashi, M.; Squires, G. R.; Mousa, A.; Tanzer, M.; Zukor, D. J.; Antoniou, J.; Feige, U.; Poole, A. R., 2005: Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis and Rheumatism.*, **52**, 128–135
- Kon, M.; Kiffin, R.; Koga, H.; Chachochnick, J.; Macian, F.; Varticovski, L.; Cuervo, A. M., 2011: Chaperone-Mediated Autophagy Is Required for Tumor Growth. *Science Translational Medicine.*, **3**, 109–117
- Kono, H.; Rock, K. L., 2008: How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology.*, **8**, 279–289
- Kouri, J. B.; Argüello, C.; Luna, J.; Mena, R., 1998: Use of microscopical techniques in the study of human chondrocytes from osteoarthritic cartilage: An overview. *Microscopy Research and Technique.*, **40**, 22–36
- Kraus, V. B.; Burnett, B.; Coindreau, J.; Cottrell, S.; Eyre, D.; Gendreau, M.; Gardiner, J.; Garner, P.; Hardin, J.; Henrotin, Y.; Heinegård, D.; Ko, A.; Lohmander, L. S.; Matthews, G.; Menetski, J.; Moskowitz, R.; Persiani, S.; Poole, A. R.; Rousseau, J. C. et al., 2011: Application of biomarkers in the development of drugs intended for the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage.*, **19**, 515–542

- Krishnan, V.; Byrant, H. U.; MacDougald, O. A., 2006: Regulation of bone mass by Wnt signaling. *Journal of Clinical Investigation.*, **116**, 1202–1209
- Kroemer, G.; Martin, S. J., 2005: Caspase-independent cell death. *Nature Medicine.*, **11**, 725–730
- Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Vandenabeele, P.; Abrams, J.; Alnemri, E.; Baehrecke, E.; Blagosklonny, M.; El-Deiry, W.; Golstein, P.; Green, D.; Hengartner, M.; Knight, R.; Kumar, S.; Lipton, S. a; Malorni, W.; Nuñez, G.; Peter, M.; Tschopp, J.; Yuan, J. et al., 2009: Classification of Cell Death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation.*, **16**, 3–11
- Krysko, D. V.; Vanden Berghe, T.; D’Herde, K.; Vandenabeele, P., 2008: Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods.*, **44**, 205–221
- Kühn, K.; Hashimoto, S.; Lotz, M., 2000: IL-1 $\beta$  Protects Human Chondrocytes from CD95-Induced Apoptosis. *Journal of Immunology.*, **164**, 2233–2239
- Kühn, K.; Lotz, M., 2003: Mechanisms of sodium nitroprusside-induced death in human chondrocytes. *Rheumatology International.*, **23**, 241–247
- Kühn, K.; D’Lima, D. D.; Hashimoto, S.; Lotz, M., 2004: Cell death in cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **12**, 1–16
- Kuilman, T.; Michaloglou, C.; Mooi, W. J.; Peeper, D. S., 2010: The essence of senescence. *Genes & Development.*, **24**, 2463–2479
- Kuro-o, M.; Matsumura, Y.; Aizawa, H.; Kawaguchi, H.; Suga, T.; Utsugi, T.; Ohyama, Y.; Kurabayashi, M.; Kaname, T.; Kume, E.; Iwasaki, H.; Iida, a; Shiraki-Iida, T.; Nishikawa, S.; Nagai, R.; Nabeshima, Y. I., 1997: Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.*, **390**, 45–51
- Kuro-o, M., 2010: Klotho. *European Journal of Physiology.*, **459**, 333–343
- Kurosu, H.; Yamamoto, M.; Clark, J. D.; Pastor, J. V; Nandi, A.; Gurnani, P.; McGuinness, O. P.; Chikuda, H.; Yamaguchi, M.; Kawaguchi, H.; Shimomura, I.; Takayama, Y.; Herz, J.; Kahn, C. R.; Rosenblatt, K. P.; Kuro-o, M., 2005: Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science.*, **309**, 1829–1833
- Kurz, B.; Lemke, A. K.; Fay, J.; Pufe, T.; Grodzinsky, A. J.; Schünke, M., 2005: Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury. *Annals of Anatomy.*, **187**, 473–485
- Lamb, C. A.; Yoshimori, T.; Tooze, S. A., 2013: The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.*, **14**, 759–774
- Laplante, M.; Sabatini, D. M., 2013: Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *Journal of Cell Science.*, **126**, 1713–1719

Le Pen, C.; Reygrobelle, C.; Gérentes, I., 2005: Financial cost of osteoarthritis in France. The 'COART' France study. *Joint Bone Spine.*, **72**, 567–570

Lee, J. S.; Li, Q.; Lee, J. Y.; Lee, S. H.; Jeong, J. H.; Lee, H. R.; Chang, H.; Zhou, F. C.; Gao, S. J.; Liang, C.; Jung, J. U., 2009: FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nature Cell Biology.*, **11**, 1355–1362

Lee, S. Y.; Niikura, T.; Reddi, A. H., 2008: Superficial zone protein (lubricin) in the different tissue compartments of the knee joint: modulation by transforming growth factor beta 1 and interleukin-1 beta. *Tissue engineering: Part A.*, **14**, 1799–1808

Lefebvre, V.; Peeters-Joris, C.; Vaes, G., 1990: Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta.*, **1052**, 366–378

Lei, M.; Wang, J. G.; Xiao, D. M.; Fan, M.; Wang, D. P.; Xiong, J. Y.; Chen, Y.; Ding, Y.; Liu, S. L., 2012: Resveratrol inhibits interleukin 1 $\beta$ -mediated inducible nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes by activating SIRT1 and thereby suppressing nuclear factor-kappaB activity. *European Journal of Pharmacology.*, **674**, 73–79

Lemaire, C.; Andréau, K.; Souvannavong, V.; Adam, A., 1998: Inhibition of caspase activity induces a switch from apoptosis to necrosis. *FEBS Letters.*, **425**, 266–270

Leonard, C. M.; Fuld, H. M.; Frenz, D. A.; Downie, S. A.; Massague, J.; Newman, S. A., 1991: Role of Transforming Growth-Factor-Beta in Chondrogenic Pattern-Formation in the Embryonic Limb - Stimulation of Mesenchymal Condensation and Fibronectin Gene-Expression By Exogenous Tgf-Beta and Evidence for Endogenous Tgf-Beta-Like Activity. *Developmental Biology.*, **145**, 99–109

Leong, D. J.; Choudhury, M.; Hanstein, R.; Hirsh, D. M.; Kim, S. J.; Majeska, R. J.; Schaffler, M. B.; Hardin, J. a; Spray, D. C.; Goldring, M. B.; Cobelli, N. J.; Sun, H. B., 2014: Green tea polyphenol treatment is chondroprotective, anti-inflammatory and palliative in a mouse post-traumatic osteoarthritis model. *Arthritis Research & Therapy.*, **16**, 508

Lepetsos, P.; Papavassiliou, A. G., 2016: ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochimica et Biophysica Acta.*, **1862**, 576–591

Levine, B.; Yuan, J., 2005: Autophagy in cell death: An innocent convict? *Journal of Clinical Investigation.*, **115**, 2679–2688

Levine, B.; Abrams, J., 2008: p53: The Janus of autophagy? *Nature Cell Biology.*, **10**, 637–639

Lewis, J. L.; Deloria, L. B.; Oyen-Tiesma, M.; Thompson, R. C.; Ericson, M.; Oegema, T. R., 2003: Cell death after cartilage impact occurs around matrix cracks. *Journal of Orthopaedic Research.*, **21**, 881–887

- Li, B.; Aspden, R. M., 1997: Composition and Mechanical Properties of Cancellous Bone from the Femoral Head of Patients with Osteoporosis or Osteoarthritis. *Journal of Bone and Mineral Research.*, **12**, 641–651
- Li, L.; Newton, P. T.; Boudierlique, T.; Sejnohova, M.; Zikmund, T.; Kozhemyakina, E.; Xie, M.; Krivanek, J.; Kaiser, J.; Qian, H.; Dyachuk, V.; Lassar, A. B.; Warman, M. L.; Barenis, B.; Adameyko, I.; Chagin, A. S., 2017a: Superficial cells are self-renewing chondrocyte progenitors, which form the articular cartilage in juvenile mice. *FASEB Journal.*, **31**, 1067–1084
- Li, L.; Zhang, M.; Zhang, L.; Cheng, Y.; Tu, X.; Lu, Z., 2017b: Klotho Regulates Cigarette Smoke-Induced Autophagy: Implication in Pathogenesis of COPD. *Lung.*, **195**, 295–301
- Li, S. A.; Watanabe, M.; Yamada, H.; Nagai, A.; Kinuta, M.; Takei, K., 2004: Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. *Cell Structure and Function.*, **29**, 91–99
- Li, W.; Cai, L.; Zhang, Y.; Cui, L.; Shen, G., 2015: Intra-articular resveratrol injection prevents osteoarthritis progression in a mouse model by activating SIRT1 and thereby silencing HIF-2 $\alpha$ . *Journal of Orthopaedic Research.*, **33**, 1061–1070
- Li, W. W.; Li, J.; Bao, J. K., 2012: Microautophagy: Lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences.*, **69**, 1125–1136
- Li, Y.; Lacerda, D. A.; Warman, M. L.; Beier, D. R.; Yoshioka, H.; Ninomiya, Y.; Oxford, J. T.; Morris, N. P.; Andrikopoulos, K.; Ramirez, F., 1995: A fibrillar collagen gene, Col11a1, is essential for skeletal morphogenesis. *Cell.*, **80**, 423–430
- Liang, Q.; Wang, X. P.; Chen, T. S., 2014: Resveratrol protects rabbit articular chondrocyte against sodium nitroprusside-induced apoptosis via scavenging ROS. *Apoptosis.*, **19**, 1354–1363
- Liang, X. H.; Kleeman, L. K.; Jiang, H. H.; Gordon, G.; Goldman, J. E.; Berry, G.; Herman, B.; Levine, B., 1998: Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *Journal of Virology.*, **72**, 8586–8596
- Lin, Y.; Sun, Z., 2015: Antiaging gene Klotho attenuates pancreatic  $\beta$ -cell apoptosis in type 1 diabetes. *Diabetes.*, **64**, 4298–4311
- Lindberg, K.; Amin, R.; Moe, O. W.; Hu, M. C.; Erben, R. G.; Ostman Wernerson, A.; Lanske, B.; Olauson, H.; Larsson, T. E., 2014: The Kidney Is the Principal Organ Mediating Klotho Effects. *Journal of the American Society of Nephrology.*, **25**, 2169–2175
- Little, C. B.; Flannery, C. R.; Hughes, C. E.; Mort, J. S.; Roughley, P. J.; Dent, C.; Caterson, B., 1999: Aggrecanase versus matrix metalloproteinases in the catabolism of the interglobular domain of aggrecan in vitro. *Biochemical Journal.*, **68**, 61–68

- Liu, F.; Wu, S.; Ren, H.; Gu, J., 2011: Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. *Nature Cell Biology.*, **13**, 254–262
- Liu, F. C.; Hung, L. F.; Wu, W. L.; Chang, D. M.; Huang, C. Y.; Lai, J. H.; Ho, L. J., 2010: Chondroprotective effects and mechanisms of resveratrol in advanced glycation end products-stimulated chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy.*, **12**, R167
- Liu, H.; Fergusson, M. M.; Castilho, R. M.; Liu, J.; Cao, L.; Chen, J.; Malide, D.; Rovira, I. I.; Schimel, D.; Kuo, C. J.; Gutkind, J. S.; Hwang, P. M.; Finkel, T., 2007a: Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science.*, **317**, 803–806
- Liu, S.; Gupta, A.; Quarles, L. D., 2007b: Emerging role of fibroblast growth factor 23 in a bone-kidney axis regulating systemic phosphate homeostasis and extracellular matrix mineralization. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension.*, **16**, 329–335
- Liu, X.; Machado, G.; Eyles, J.; Ravi, V.; Hunter, D., 2017: Dietary Supplements for Treating Osteoarthritis: a Systematic Review and Meta-analysis. *British Journal of Sports Medicine.*, **25**, S292–S293
- Lockshin, R. A.; Zakeri, Z., 2004: Apoptosis, autophagy, and more. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.*, **36**, 2405–2419
- Locksley, R. M.; Killeen, N.; Lenardo, M. J., 2001: The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell.*, **104**, 487–501
- Loeser, R. F.; Shanker, G.; Carlson, C. S.; Gardin, J. F.; Shelton, B. J.; Sonntag, W. E., 2000: Reduction in the chondrocyte response to insulin-like growth factor 1 in aging and osteoarthritis: studies in a non-human primate model of naturally occurring disease. *Arthritis and Rheumatism.*, **43**, 2110–2120
- Loeser, R. F., 2009: Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis and cartilage.*, **17**, 971–979
- Loeser, R. F., 2011: Aging and osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology.*, **23**, 492–496
- Loeser, R. F., 2014: Integrins and chondrocyte-matrix interactions in articular cartilage. *Matrix Biology.*, **39**, 11–16
- Lopez De Figueroa, P.; Lotz, M. K.; Blanco, F. J.; Caramés, B., 2015: Autophagy activation and protection from mitochondrial dysfunction in human chondrocytes. *Arthritis and Rheumatology.*, **67**, 966–976
- Lorin, S.; Pierron, G.; Ryan, K. M.; Codogno, P.; Djavaheri-Mergny, M., 2010: Evidence for the interplay between JNK and p53-DRAM signalling pathways in the regulation of autophagy. *Autophagy.*, **6**, 153–154
- Lotz, M.; Loeser, R. F., 2012: Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone.*, **51**, 241–248

- Lotz, M. K.; Otsuki, S.; Grogan, S. P.; Sah, R.; Terkeltaub, R.; D'Lima, D., 2010: Cartilage cell clusters. *Arthritis and Rheumatism.*, **62**, 2206–2218
- Lucchinetti, E.; Adams, C. S.; Horton, W. E.; Torzilli, P. A., 2002: Cartilage viability after repetitive loading: A preliminary report. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **10**, 71–81
- Mackie, E. J.; Ahmed, Y. A.; Tatarczuch, L.; Chen, K. S.; Mirams, M., 2008: Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.*, **40**, 46–62
- Maekawa, Y.; Ishikawa, K.; Yasuda, O.; Oguro, R.; Hanasaki, H.; Kida, I.; Takemura, Y.; Ohishi, M.; Katsuya, T.; Rakugi, H., 2009: Klotho suppresses TNF- $\alpha$ -induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF- $\kappa$ B activation. *Endocrine.*, **35**, 341–346
- Maekawa, Y.; Ohishi, M.; Ikushima, M.; Yamamoto, K.; Yasuda, O.; Oguro, R.; Yamamoto-Hanasaki, H.; Tatara, Y.; Takeya, Y.; Rakugi, H., 2011: Klotho protein diminishes endothelial apoptosis and senescence via a mitogen-activated kinase pathway. *Geriatrics and Gerontology International.*, **11**, 510–516
- Magne, D.; Bluteau, G.; Faucheux, C.; Palmer, G.; Pilet, P.; Rouillon, T.; Caverzasio, J.; Weiss, P.; Daculsi, G.; Guicheux, J., 2003: Apoptosis-Associated Mineralization: Possible Implication of Apoptosis in the Regulation of Endochondral Ossification. *Journal of Bone and Mineral Research.*, **18**, 1430–1442
- Maiuri, M. C.; Zalckvar, E.; Kimchi, A.; Kroemer, G., 2007a: Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.*, **8**, 741–752
- Maiuri, M. C.; Le Toumelin, G.; Criollo, A.; Rain, J. C.; Gautier, F.; Juin, P.; Tasdemir, E.; Pierron, G.; Troulinaki, K.; Tavernarakis, N.; Hickman, J. A.; Geneste, O.; Kroemer, G., 2007b: Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1. *The EMBO Journal.*, **26**, 2527–2539
- Malavolta, M.; Costarelli, L.; Giacconi, R.; Piacenza, F.; Basso, A.; Pierpaoli, E.; Marchegiani, F.; Cardelli, M.; Provinciali, M.; Mocchegiani, E., 2014: Modulators of cellular senescence: Mechanisms, promises, and challenges from in vitro studies with dietary bioactive compounds. *Nutrition Research.*, **34**, 1017–1035
- Manning, J.; Roberts, J. C., 2009: Analysis of Catechin Content of Commercial Green Tea Products. *Journal of Herbal Pharmacotherapy.*, **3**, 19–32
- Marino, G.; Niso-Santano, M.; Baehrecke, E. H.; Kroemer, G., 2014: Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.*, **15**, 81–94
- Martel-Pelletier, J.; Boileau, C.; Pelletier, J. P.; Roughley, P. J., 2008: Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology.*, **22**, 351–384

Martins, R.; Lithgow, G. J.; Link, W., 2016: Long live FOXO: Unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging Cell.*, **15**, 196–207

Massicotte, F.; Lajeunesse, D.; Benderdour, M.; Pelletier, J. P.; Hilal, G.; Duval, N.; Martel-Pelletier, J., 2002: Can altered production of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, transforming growth factor- $\beta$  and prostaglandin E2 by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **10**, 491–500

Mathy-Hartert, M.; Jacquemond-Collet, I.; Priem, F.; Sanchez, C.; Lambert, C.; Henrotin, Y., 2009: Curcumin inhibits pro-inflammatory mediators and metalloproteinase-3 production by chondrocytes. *Inflammation Research.*, **58**, 899–908

Matsumura, Y.; Aizawa, H.; Shiraki-Iida, T.; Nagai, R.; Kuro-o, M.; Nabeshima, Y. ichi, 1998: Identification of the Human Klotho Gene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and Secreted Klotho Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, **242**, 626–630

Matsushita, T.; Sasaki, H.; Takayama, K.; Ishida, K.; Matsumoto, T.; Kubo, S.; Matsuzaki, T.; Nishida, K.; Kurosaka, M.; Kuroda, R., 2013: The overexpression of SIRT1 inhibited osteoarthritic gene expression changes induced by interleukin-1 $\beta$  in human chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Research.*, **31**, 531–537

Matsuzaki, T.; Matsushita, T.; Takayama, K.; Matsumoto, T.; Nishida, K.; Kuroda, R.; Kurosaka, M., 2014: Disruption of Sirt1 in chondrocytes causes accelerated progression of osteoarthritis under mechanical stress and during ageing in mice. *Annals of the Rheumatic Diseases.*, **73**, 1397–1404

Mazières, B., 2011, August 1: Epidémiologie de l'arthrose en 2011. *Rhumatologie pratique.*

McAlinden, A.; Johnstone, B.; Kollar, J.; Kazmi, N.; Hering, T. M., 2008: Expression of two novel alternatively spliced COL2A1 isoforms during chondrocyte differentiation. *Matrix Biology.*, **27**, 254–266

McCarberg, B.; Tenzer, P., 2013: Complexities in the pharmacologic management of osteoarthritis pain. *Current Medical Research and Opinion.*, **29**, 539–548

Melchiorri, C.; Meliconi, R.; Frizziero, L.; Silvestri, T.; Pulsatelli, L.; Mazzetti, I.; Borzi, R. M.; Ugucconi, M.; Facchini, A., 1998: Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism.*, **41**, 2165–2174

Mitobe, M.; Yoshida, T.; Sugiura, H.; Shiota, S.; Tsuchiya, K.; Nihei, H., 2005: Oxidative stress decreases klotho expression in a mouse kidney cell line. *Nephron - Experimental Nephrology.*, **101**, 67–74

Mitrovic, D.; Quintero, M.; Stankovic, A.; Ryckewaert, A., 1983: Cell density of adult



human femoral condylar articular cartilage. Joints with normal and fibrillated surfaces. *Laboratory Investigation.*, **49**, 309–316

Mizushima, N.; Noda, T.; Yoshimori, T.; Tanaka, Y.; Ishii, T.; George, M. D.; Klionsky, D. J.; Ohsumi, M.; Ohsumi, Y., 1998: A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature.*, **395**, 395–398

Mizushima, N., 2007: Autophagy: Process and function. *Genes and Development.*, **21**, 2861–2873

Mizushima, N.; Yoshimori, T.; Levine, B., 2010: Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell.*, **140**, 313–326

Mizushima, N., 2010: The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current Opinion in Cell Biology.*, **22**, 132–139

Mohan, G.; Perilli, E.; Kuliwaba, J. S.; Humphries, J. M.; Parkinson, I. H.; Fazzalari, N. L., 2011: Application of in vivo micro-computed tomography in the temporal characterisation of subchondral bone architecture in a rat model of low-dose monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy.*, **13**, R210

Moon, M. H.; Jeong, J. K.; Lee, Y. J.; Seol, J. W.; Jackson, C. J.; Park, S. Y., 2013: SIRT1, a class III histone deacetylase, regulates TNF- $\alpha$ -induced inflammation in human chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **21**, 470–480

Moreno, J. A.; Izquierdo, M. C.; Sanchez-Niño, M. D.; Suárez-Alvarez, B.; Lopez-Larrea, C.; Jakubowski, A.; Blanco, J.; Ramirez, R.; Selgas, R.; Ruiz-Ortega, M.; Egido, J.; Ortiz, A.; Sanz, A. B., 2011: The inflammatory cytokines TWEAK and TNF $\alpha$  reduce renal klotho expression through NF $\kappa$ B. *Journal of the American Society of Nephrology.*, **22**, 1315–1325

Moscat, J.; Diaz-Meco, M. T., 2009: p62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer. *Cell.*, **137**, 1001–1004

Moskowitz, R. W., 2000: Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Seminars in Arthritis and Rheumatism.*, **30**, 87–99

Mueller, M. B.; Tuan, R. S., 2011: Anabolic/Catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets. *PM & R: the journal of injury, function, and rehabilitation.*, **3**, S3-11

Murad, F., 2006: Nitric Oxide and Cyclic GMP in Cell Signaling and Drug Development. *The New England Journal of Medicine.*, **355**, 2003–2011

Musumeci, G.; Szychlińska, M. A.; Mobasher, A., 2015: Age-related degeneration of articular cartilage in the pathogenesis of osteoarthritis: molecular markers of senescent chondrocytes. *Histology and Histopathology.*, **30**, 1–12

- Myers, S. L.; Brandt, K. D.; Ehlich, J. W.; Braunstein, E. M.; Shelbourne, K. D.; Heck, D. A.; Kalasinski, L. A., 1990: Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee. *Journal of Rheumatology*, **17**, 1662–1669
- Na, J. Y.; Song, K.; Kim, S.; Kwon, J., 2016: Rutin protects rat articular chondrocytes against oxidative stress induced by hydrogen peroxide through SIRT1 activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **473**, 1301–1308
- Nagai, T.; Yamada, K.; Kim, H. chun; Kim, Y. sun; Noda, Y.; Nabeshima, Y. ichi; Nabeshima, T.; Korea, S.; Science, L., 2002: Cognition impairment in the genetic model of aging. *FASEB Journal*, **17**, 50–52
- Nagase, H.; Woessner, J., 1999: Matrix Metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 21491–21494
- Nakamura, H.; Yoshino, S.; Kato, T.; Tsuruha, J.; Nishioka, K., 1999: T-cell mediated inflammatory pathway in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, **7**, 401–402
- Nakashima, T.; Hayashi, M.; Fukunaga, T.; Kurata, K.; Oh-hora, M.; Feng, J. Q.; Bonewald, L. F.; Kodama, T.; Wutz, A.; Wagner, E. F.; Penninger, J. M.; Takayanagi, H., 2011: Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature Medicine*, **17**, 1231–1234
- Nakatani, S.; Mano, H.; Sampei, C.; Shimizu, J.; Wada, M., 2009: Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage in vitro and in vivo. *Osteoarthritis and Cartilage*, **17**, 1620–1627
- Nascimbeni, A. C.; Codogno, P.; Morel, E., 2017: Phosphatidylinositol-3-phosphate in the regulation of autophagy membrane dynamics. *FEBS Journal*, **284**, 1267–1278
- Naugler, W. E.; Karin, M., 2008: NF- $\kappa$ B and cancer - identifying targets and mechanisms. *Current Opinion in Genetics & Development*, **18**, 19–26
- Neame, P. J.; Tapp, H.; Azizan, A., 1999: Noncollagenous, nonproteoglycan macromolecules of cartilage. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **55**, 1327–1340
- Ng, L. J.; Tam, P. P.; Cheah, K. S., 1993: Preferential expression of alternatively spliced mRNAs encoding type II procollagen with a cysteine-rich amino-propeptide in differentiating cartilage and nonchondrogenic tissues during early mouse development. *Developmental Biology*, **159**, 403–417
- Nietfeld, J. J.; Wilbrink, B.; Den Otter, W.; Huber, J.; Huber-Bruning, O., 1990: The effect of human interleukin 1 on proteoglycan metabolism in human and porcine cartilage explants. *Journal of Rheumatology*, **17**, 818–826
- Niu, Y.; Na, L.; Feng, R.; Gong, L.; Zhao, Y.; Li, Q.; Li, Y.; Sun, C., 2013: The phytochemical, EGCG, extends lifespan by reducing liver and kidney function damage and improving age-associated inflammation and oxidative stress in healthy rats. *Ageing Cell*, **12**, 1041–1049

- Nixon, R. A., 2013: The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature Medicine.*, **19**, 983–997
- Norman, J. M.; Cohen, G. M.; Bampton, E. T. W., 2010: The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases. *Autophagy.*, **6**, 1042–1056
- Oesser, S.; Seifert, J., 2003: Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell and Tissue Research.*, **311**, 393–399
- Oesser, S.; Proksch, E.; Schunck, M., 2008: Prophylactic Treatment With a Special Collagen Hydrolysate Decreases Cartilage Tissue Degeneration in the Knee Joints. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **16**, S45
- Olauson, H.; Mencke, R.; Hillebrands, J. L.; Larsson, T. E., 2017: Tissue expression and source of circulating  $\alpha$ Klotho. *Bone.*, **100**, 19–35
- Pan, J.; Wang, B.; Li, W.; Zhou, X.; Scherr, T.; Yang, Y.; Price, C.; Wang, L., 2012: Elevated cross-talk between subchondral bone and cartilage in osteoarthritic joints. *Bone.*, **51**, 212–217
- Panesso, M. C.; Shi, M.; Cho, H. J.; Paek, J.; Ye, J.; Moe, O. W.; Hu, M. C., 2014: Klotho has dual protective effects on cisplatin-induced acute kidney injury. *Kidney International.*, **85**, 855–870
- Pataki, A.; Fries, R.; Ochsner, K.; Witzemann, E., 1987: Qualitative radiographic diagnosis of osteo-arthritis of the knee joint in the C57BL mouse. *Agents and actions.*, **22**, 123–130
- Pataki, A.; Reife, R.; Witzemann, E.; Graf, H. P.; Schweizer, A., 1990: Quantitative radiographic diagnosis of osteo-arthritis of the knee-joint in the C57BL mouse. *Agents and Actions.*, **29**, 201–209
- Pattingre, S.; Tassa, A.; Qu, X.; Garuti, R.; Xiao, H. L.; Mizushima, N.; Packer, M.; Schneider, M. D.; Levine, B., 2005: Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.*, **122**, 927–939
- Pavlatou, M. G.; Remaley, A. T.; Gold, P. W., 2016: Klotho: a humeral mediator in CSF and plasma that influences longevity and susceptibility to multiple complex disorders, including depression. *Translational Psychiatry.*, **6**, e876
- Pelletier, J. P.; Jovanovic, D.; Fernandes, J. C.; Manning, P.; Connor, J. R.; Currie, M. G.; Di Battista, J. A.; Martel-Pelletier, J., 1998: Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis and Rheumatism.*, **41**, 1275–1286
- Pfander, D.; Swoboda, B.; Kirsch, T., 2001: Expression of Early and Late Differentiation Markers (Proliferating Cell Nuclear Antigen, Syndecan-3, Annexin VI, and Alkaline Phosphatase) by Human Osteoarthritic Chondrocytes. *The American Journal of*

*Pathology.*, **159**, 1777–1783

Pop, C.; Salvesen, G. S., 2009: Human caspases: Activation, specificity, and regulation. *The Journal of Biological Chemistry.*, **284**, 21777–21781

Portron, S.; Hivernaud, V.; Merceron, C.; Lesoeur, J.; Masson, M.; Gauthier, O.; Vinatier, C.; Beck, L.; Guicheux, J., 2015: Inverse Regulation of Early and Late Chondrogenic Differentiation by Oxygen Tension Provides Cues for Stem Cell-Based Cartilage Tissue Engineering. *Cellular Physiology and Biochemistry.*, **35**, 841–857

Presle, N.; Pottie, P.; Dumond, H.; Guillaume, C.; Lopicque, F.; Pallu, S.; Mainard, D.; Netter, P.; Terlain, B., 2006: Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **14**, 690–695

Prokhorova, E. A.; Zamaraev, A. V.; Kopeina, G. S.; Zhivotovsky, B.; Lavrik, I. N., 2015: Role of the nucleus in apoptosis: Signaling and execution. *Cellular and Molecular Life Sciences.*

Pulai, J. I.; Del Carlo, M.; Loeser, R. F., 2002: The  $\alpha 5\beta 1$  integrin provides matrix survival signals for normal and osteoarthritic human articular chondrocytes in vitro. *Arthritis and Rheumatism.*, **46**, 1528–1535

Pyo, J. O.; Jang, M. H.; Kwon, Y. K.; Lee, H. J.; Jun, J. II; Woo, H. N.; Cho, D. H.; Choi, B.; Lee, H.; Kim, J. H.; Mizushima, N.; Oshumi, Y.; Jung, Y. K., 2005: Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: Dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *The Journal of Biological Chemistry.*, **280**, 20722–20729

Radoshevich, L.; Murrow, L.; Chen, N.; Fernandez, E.; Roy, S.; Fung, C.; Debnath, J., 2010: ATG12 conjugation to ATG3 regulates mitochondrial homeostasis and cell death. *Cell.*, **142**, 590–600

Rahmati, M.; Nalesso, G.; Mobasheri, A.; Mozafari, M., 2017: Aging and Osteoarthritis: Central Role of the Extracellular Matrix. *Ageing Research Reviews.*, **40**, 20–30

Raimann, A.; Ertl, D. A.; Helmreich, M.; Sagmeister, S.; Egerbacher, M.; Haeusler, G., 2013: Fibroblast growth factor 23 and Klotho are present in the growth plate. *Connective Tissue Research.*, **54**, 108–117

Rakugi, H.; Matsukawa, N.; Ishikawa, K.; Yang, J.; Imai, M.; Ikushima, M.; Maekawa, Y.; Kida, I.; Miyazaki, J. I.; Ogihara, T., 2007: Anti-oxidative effect of Klotho on endothelial cells through cAMP activation. *Endocrine.*, **31**, 82–87

Rasheed, Z.; Anbazhagan, A. N.; Akhtar, N.; Ramamurthy, S.; Voss, F. R.; Haqqi, T. M., 2009: Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits advanced glycation end product-induced expression of tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase-13 in human chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy.*, **11**, R71

- Ravikumar, B.; Moreau, K.; Jahreiss, L.; Puri, C.; Rubinsztein, D. C., 2010: Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nature Cell Biology.*, **12**, 747–757
- Ravikumar, P.; Ye, J.; Zhang, J.; Pinch, S. N.; Hu, M. C.; Kuro-o, M.; Hsia, C. C. W.; Moe, O. W., 2014:  $\alpha$ -Klotho protects against oxidative damage in pulmonary epithelia. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.*, **307**, L566–L575
- Redini, F.; Galera, P.; Mauviel, A.; Loyau, G.; Pujol, J. P., 1988: Transforming growth factor beta stimulates collagen and glycosaminoglycan biosynthesis in cultured rabbit articular chondrocytes. *FEBS Letters.*, **234**, 172–176
- Renaud, S.; de Lorgeril, M., 1993: The French Paradox: Dietary Factors and Cigarette Smoking-Related Health Risks. *Annals of the New York Academy of Sciences.*, **686**, 299–309
- Reya, T.; Duncan, A. W.; Ailles, L.; Domen, J.; Scherer, D. C.; Willert, K.; Hintz, L.; Nusse, R.; Weissman, I. L., 2003: A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature.*, **423**, 409–414
- Rhee, D. K.; Marcelino, J.; Baker, M.; Gong, Y.; Smits, P.; Lefebvre, V.; Jay, G. D.; Stewart, M.; Wang, H.; Warman, M. L.; Carpten, J. D., 2005: The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *Journal of Clinical Investigation.*, **115**, 622–631
- Roach, H. I.; Aigner, T.; Kouri, J. B., 2004: Chondroptosis: A variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis.*, **9**, 265–277
- Rodier, F.; Campisi, J., 2011: Four faces of cellular senescence. *The Journal of Cell Biology.*, **192**, 547–556
- Rohn, T. T.; Wirawan, E.; Brown, R. J.; Harris, J. R.; Masliah, E.; Vandenabeele, P., 2011: Depletion of Beclin-1 due to proteolytic cleavage by caspases in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiology of Disease.*, **43**, 68–78
- Roughley, P. J., 2001: Articular cartilage and changes in arthritis: noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Research & Therapy.*, **3**, 342–347
- Ruoslahti, E., 1997: Stretching is good for a cell. *Science.*, **276**, 1345–1346
- Sachet, M.; Liang, Y. Y.; Oehler, R., 2017: The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis.*, epub
- Saelens, X.; Festjens, N.; Walle, L. Vande; Gurp, M. van; Loo, G. van; Vandenabeele, P., 2004: Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.*, **23**, 2861–2874

- Sandy, J. D.; Neame, P. J.; Boynton, R. E.; Flanner, C. R., 1991: Catabolism of aggrecan in cartilage explants. *The Journal of Biological Chemistry.*, **266(14)**, 8683–8685
- Sarbassov, D. D.; Ali, S. M.; Kim, D. H.; Guertin, D. A.; Latek, R. R.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Sabatini, D. M., 2004: Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current Biology.*, **14**, 1296–1302
- Sasaki, H.; Takayama, K.; Matsushita, T.; Ishida, K.; Kubo, S.; Matsumoto, T.; Fujita, N.; Oka, S.; Kurosaka, M.; Kuroda, R., 2012: Autophagy modulates osteoarthritis-related gene expression in human chondrocytes. *Arthritis and Rheumatism.*, **64**, 1920–1928
- Sasaki, K.; Hattori, T.; Fujisawa, T.; Takahashi, K.; Inoue, H.; Takigawa, M., 1998: Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. *The Journal of Biochemistry.*, **123**, 431–439
- Sato, S.; Kawamata, Y.; Takahashi, A.; Imai, Y.; Hanyu, A.; Okuma, A.; Takasugi, M.; Yamakoshi, K.; Sorimachi, H.; Kanda, H.; Ishikawa, Y.; Sone, S.; Nishioka, Y.; Ohtani, N.; Hara, E., 2015: Ablation of the p16INK4a tumour suppressor reverses ageing phenotypes of klotho mice. *Nature Communications.*, **6**, 7035
- Schalkwijk, J.; Joosten, L. A. B.; van, den B.; van Wyk, J. J.; van, de P., 1989: Insulin-like growth factor stimulation of chondrocyte proteoglycan synthesis by human synovial fluid. *Arthritis and Rheumatism.*, **32**, 66–70
- Scheller, M.; Huelsken, J.; Rosenbauer, F.; Taketo, M. M.; Birchmeier, W.; Tenen, D. G.; Leutz, A., 2006: Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive  $\beta$ -catenin activation. *Nature Immunology.*, **7**, 1037–1047
- Schulz, R. M.; Bader, A., 2007: Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *European Biophysics Journal.*, **36**, 539–568
- Schulze-Tanzil, G.; Mobasheri, A.; Sendzik, J.; John, T.; Shakibaei, M., 2004: Effects of curcumin (diferuloylmethane) on nuclear factor  $\kappa$ B signaling in interleukin-1 $\beta$ -stimulated chondrocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences.*, **1030**, 578–586
- Schunck, M.; Schulze, C.; Oesser, S., 2006: Disparate efficacy of collagen hydrolysate and glucosamine on the extracellular matrix metabolism of articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **8220**, 8220
- Seglen, P. O.; Gordon, P. B., 1982: 3-Methyladenine: Specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **79**, 1889–1892

Séguin, C. A.; Bernier, S. M., 2003: TNF $\alpha$  suppresses link protein and type II collagen expression in chondrocytes: Role of MEK1/2 and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Journal of Cellular Physiology.*, **197**, 356–369

Seibel, M. J.; Robins, S. P.; Bilezikian, J. P., 2006: *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism : Principles and Clinical Applications*. Academic Press

Sellam, J.; Berenbaum, F., 2010: The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology.*, **6**, 625–635

Seluanov, A.; Gorbunova, V.; Falcovitz, A.; Milyavsky, M.; Zurer, I.; Shohat, G.; Sigal, A.; Goldfinger, N.; Rotter, V., 2001: Change of the Death Pathway in Senescent Human Fibroblasts in Response to DNA Damage Is Caused by an Inability To Change of the Death Pathway in Senescent Human Fibroblasts in Response to DNA Damage Is Caused by an Inability To Stabilize p53. *Molecular and Cellular Biology.*, **21**, 1552–1564

Serra, R.; Johnson, M.; Filvaroff, E. H.; Laborde, J.; Sheehan, D. M.; Derynck, R.; Moses, H. L., 1997: Expression of a Truncated, Kinase-Defective TGF- $\beta$  Type II Receptor in Mouse Skeletal Tissue Promotes Terminal Chondrocyte Differentiation and Osteoarthritis Rosa. *Journal of Cell Biology.*, **139**, 541–552

Serrano, M.; Lin, A.; McCurrach, M.; Beach, D.; Lowe, S., 1997: Oncogenic ras provokes premature cell senescence associ. *Cell.*, **88**, 593–602

Shaid, S.; Brandts, C. H.; Serve, H.; Dikic, I., 2013: Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death and Differentiation.*, **20**, 21–30

Shakibaei, M.; Schulze-Tanzil, G.; John, T.; Mobasheri, A., 2005: Curcumin protects human chondrocytes from IL-1 $\beta$ -induced inhibition of collagen type II and  $\beta$ 1-integrin expression and activation of caspase-3: An immunomorphological study. *Annals of Anatomy.*, **187**, 487–497

Shakibaei, M.; John, T.; Schulze-Tanzil, G.; Lehmann, I.; Mobasheri, A., 2007a: Suppression of NF- $\kappa$ B activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochemical Pharmacology.*, **73**, 1434–1445

Shakibaei, M.; John, T.; Seifarth, C.; Mobasheri, A., 2007b: Resveratrol inhibits IL-1 $\beta$ -induced stimulation of caspase-3 and cleavage of PARP in human articular chondrocytes in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences.*, **1095**, 554–563

Shakibaei, M.; Csaki, C.; Nebrich, S.; Mobasheri, A., 2008: Resveratrol suppresses interleukin-1 $\beta$ -induced inflammatory signaling and apoptosis in human articular chondrocytes: Potential for use as a novel nutraceutical for the treatment of osteoarthritis. *Biochemical Pharmacology.*, **76**, 1426–1439

Shakibaei, M.; Mobasheri, A.; Buhrmann, C., 2011: Curcumin synergizes with

resveratrol to stimulate the MAPK signaling pathway in human articular chondrocytes in vitro. *Genes and Nutrition.*, **6**, 171–179

Shapiro, I. M.; Adams, C. S.; Freeman, T.; Srinivas, V., 2005: Fate of the hypertrophic chondrocyte: Microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate. *Birth Defects Research Part C.*, **75**, 330–339

Sharif, M.; Whitehouse, A.; Sharman, P.; Perry, M.; Adams, M., 2004: Increased Apoptosis in Human Osteoarthritic Cartilage Corresponds to Reduced Cell Density and Expression of Caspase-3. *Arthritis and Rheumatism.*, **50**, 507–515

Shen, G., 2005: The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthodontics & Craniofacial Research.*, **8**, 11–17

Shimada, T.; Kakitani, M.; Yamazaki, Y.; Hasegawa, H.; Takeuchi, Y.; Fujita, T.; Fukumoto, S.; Tomizuka, K.; Yamashita, T., 2004a: Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *Journal of Clinical Investigation.*, **113**, 561–568

Shimada, T.; Hasegawa, H.; Yamazaki, Y.; Muto, T.; Hino, R.; Takeuchi, Y.; Fujita, T.; Nakahara, K.; Fukumoto, S.; Yamashita, T., 2004b: FGF-23 Is a Potent Regulator of Vitamin D Metabolism and Phosphate Homeostasis. *Journal of Bone and Mineral Research.*, **19**, 429–435

Shimizu, S.; Kanaseki, T.; Mizushima, N.; Mizuta, T.; Arakawa-Kobayashi, S.; Thompson, C. B.; Tsujimoto, Y., 2004: Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature Cell Biology.*, **6**, 1221–1228

Shintani, T.; Mizushima, N.; Ogawa, Y.; Matsuura, A.; Noda, T.; Ohsumi, Y., 1999: Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *The EMBO Journal.*, **18**, 5234–5241

Shiozaki, M.; Yoshimura, K.; Shibata, M.; Koike, M.; Matsuura, N.; Uchiyama, Y.; Gotow, T., 2008: Morphological and biochemical signs of age-related neurodegenerative changes in klotho mutant mice. *Neuroscience.*, **152**, 924–941

Shiraki-Iida, T.; Aizawa, H.; Matsumura, Y.; Sekine, S.; Iida, A.; Anazawa, H.; Nagai, R.; Kuro-O, M.; Nabeshima, Y. I., 1998: Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Letters.*, **424**, 6–10

Shu, G.; Xie, B.; Ren, F.; Liu, D. cai; Zhou, J.; Li, Q.; Chen, J.; Yuan, L.; Zhou, J., 2013: Restoration of klotho expression induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. *Cellular Oncology.*, **36**, 121–129

Shukunami, C.; Ishizeki, K.; Atsumi, T.; Ohta, Y.; Suzuki, F.; Hiraki, Y., 1997: Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research.*, **12**, 1174–1188



- Singh, B. N.; Shankar, S.; Srivastava, R. K., 2011: Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical Pharmacology.*, **82**, 1807–1821
- Singh, R.; Ahmed, S.; Islam, N.; Goldberg, V. M.; Haqqi, T. M., 2002: Epigallocatechin-3-Gallate Inhibits Interleukin-1 $\beta$  – Induced Expression of Nitric Oxide Synthase and Production of Nitric Oxide in Human Chondrocytes Suppression of Nuclear Factor kappaB Activation by Degradation of the Inhibitor of Nuclear Factor kappaB. *Arthritis and Rheumatism.*, **46**, 2079–2086
- Singh, R.; Ahmed, S.; Malesud, C. J.; Haqqi, T. M.; Goldberg, V. M.; Dillicion, M., 2003: Epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced activation of mitogen activated protein kinase subgroup c-Jun N-terminal kinase in human osteoarthritis chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Research.*, **21**, 102–109
- Sitte, I.; Kathrein, A.; Pfaller, K.; Pedross, F.; Roberts, S., 2009: Intervertebral Disc Cell Death in the Porcine and Human Injured Cervical Spine After Trauma. *Spine.*, **34**, 131–140
- Sitte, I.; Kathrein, A.; Pedross, F.; Freund, M. C.; Pfaller, K.; Archer, C. W., 2012: Morphological changes in disc herniation in the lower cervical spine: An ultrastructural study. *European Spine Journal.*, **21**, 1396–1409
- Smith, M. D.; Triantafillou, S.; Parker, A.; Youssef, P. P.; Coleman, M., 1997: Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *Journal of Rheumatology.*
- Sofat, N., 2009: Analysing the role of endogenous matrix molecules in the development of osteoarthritis. *International Journal of Experimental Pathology.*, **90**, 463–479
- Sokoloff, L., 1956: Natural history of degenerative joint disease in small laboratory animals. I. Pathological anatomy of degenerative joint disease in mice. *A.M.A. Archives of Pathology.*, **62**, 118–128
- Sokolove, J.; Lepus, C. M., 2013: Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease.*, **5**, 77–94
- Stamler, J. S.; Lamas, S.; Fang, F. C., 2001: Nitrosylation: The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell.*, **106**, 675–683
- Stefanovic-Racic, M.; Mollers, M. O.; Miller, L. A.; Evans, C. H., 1997: Nitric oxide and proteoglycan turnover in rabbit articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Research.*, **15**, 442–449
- Stroupe, C., 2011: Autophagy: Cells SNARE selves. *Current Biology.*, **21**, R697–R699
- Sugiura, H.; Yoshida, T.; Tsuchiya, K.; Mitobe, M.; Nishimura, S.; Shirota, S.; Akiba, T.; Nihei, H., 2005: Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute renal

failure. *Nephrology Dialysis Transplantation.*, **20**, 2636–2645

Sugiura, H.; Yoshida, T.; Mitobe, M.; Yoshida, S.; Shiohira, S.; Nitta, K.; Tsuchiya, K., 2010: Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute kidney injury via HSP-70. *Nephrology Dialysis Transplantation.*, **25**, 60–68

Sun, H.; Gao, Y.; Lu, K.; Zhao, G.; Li, X.; Li, Z.; Chang, H., 2015: Overexpression of Klotho suppresses liver cancer progression and induces cell apoptosis by negatively regulating wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *World Journal of Surgical Oncology.*, **13**, 307

Sun, Y.; Liu, W.; Zhang, H.; Li, H.; Liu, J.; Zhang, F.; Jiang, T.; Jiang, S., 2017: Curcumin Prevents Osteoarthritis by Inhibiting the Activation of Inflammasome NLRP3. *Journal of Interferon & Cytokine Research.*, **37**, 449–455

Suzuki, H.; Amizuka, N.; Oda, K.; Noda, M.; Ohshima, H.; Maeda, T., 2008: Histological and elemental analyses of impaired bone mineralization in klotho-deficient mice. *Journal of Anatomy.*, **212**, 275–285

Takayama, K.; Kawakami, Y.; Kobayashi, M.; Greco, N.; Cummins, J. H.; Matsushita, T.; Kuroda, R.; Kurosaka, M.; Fu, F. H.; Huard, J., 2014: Local intra-articular injection of rapamycin delays articular cartilage degeneration in a murine model of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy.*, **16**, 482

Takehige, K.; Baba, M.; Tsuboi, S.; Noda, T.; Ohsumi, Y., 1992: Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *Journal of Cell Biology.*, **119**, 301–311

Tanida, I.; Mizushima, N.; Kiyooka, M.; Ohsumi, M.; Ueno, T.; Ohsumi, Y.; Kominami, E., 1999: Apg7p/Cvt2p: A Novel Protein-activating Enzyme Essential for Autophagy. *Molecular Biology of the Cell.*, **10**, 1367–1379

Taniguchi, N.; Caramés, B.; Ronfani, L.; Ulmer, U.; Komiyama, S.; Bianchi, M. E.; Lotz, M., 2009: Aging-related loss of the chromatin protein HMGB2 in articular cartilage is linked to reduced cellularity and osteoarthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **106**, 1181–1186

Tasdemir, E.; Maiuri, M. C.; Morselli, E.; Criollo, A.; D'Amelio, M.; Djavaheri-Mergny, M.; Cecconi, F.; Tavernarakis, N.; Kroemer, G., 2008: A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy.*, **4**, 810–814

Taskiran, D.; Stefanovicracic, M.; Georgescu, H.; Evans, C., 1994: Nitric-Oxide Mediates Suppression of Cartilage Proteoglycan Synthesis by Interleukin-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, **200**, 142–148

Tatar, M.; Bartke, A.; Antebi, A., 2003: The Endocrine Regulation of Aging by Insulin-like Signals. *Science.*, **299**, 1346–1351

Teixeira, C. C.; Ischiropoulos, H.; Leboy, P. S.; Adams, S. L.; Shapiro, I. M., 2005:

Nitric oxide-nitric oxide synthase regulates key maturational events during chondrocyte terminal differentiation. *Bone.*, **37**, 37–45

Telci, D.; Dogan, A. U.; Ozbek, E.; Polat, E. C.; Simsek, A.; Cakir, S. S.; Yeloglu, H. O.; Sahin, F., 2011: KLOTHO gene polymorphism of G395A is associated with kidney stones. *American Journal of Nephrology.*, **33**, 337–343

Thannickal, V. J.; Fanburg, B. L., 2000: Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.*, **279**, L1005–L1028

Thomas, C. M.; Fuller, C. J.; Whittles, C. E.; Sharif, M., 2007: Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **15**, 27–34

Thomas, J. T.; Cresswell, C. J.; Rash, B.; Nicolai, H.; Jones, T.; Solomon, E.; Grant, M. E.; Boot-Handford, R. P., 1991: The human collagen X gene. Complete primary translated sequence and chromosomal localization. *Biochemical Journal.*, **280**, 617–623

Thompson, C. B., 1995: Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science.*, **267**, 1456–1462

Thurston, R. D.; Larmonier, C. B.; Majewski, P. M.; Ramalingam, R.; Midura-Kiela, M.; Laubitz, D.; Vandewalle, A.; Besselsen, D. G.; Mühlbauer, M.; Jobin, C.; Kiela, P. R.; Ghishan, F. K., 2010: Tumor Necrosis Factor and Interferon- $\gamma$  Down-regulate Klotho in Mice With Colitis. *Gastroenterology.*, **138**, 1384–1394.e2

Todd Allen, R.; Robertson, C. M.; Harwood, F. L.; Sasho, T.; Williams, S. K.; Pomerleau, B. A.; Amiel, D., 2004: Characterization of mature vs aged rabbit articular cartilage: Analysis of cell density, apoptosis-related gene expression and mechanisms controlling chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **12**, 917–923

Toegel, S.; Wu, S. Q.; Piana, C.; Unger, F. M.; Wirth, M.; Goldring, M. B.; Gabor, F.; Viernstein, H., 2008: Comparison between chondroprotective effects of glucosamine, curcumin, and diacerein in IL-1 $\beta$ -stimulated C-28/I2 chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **16**, 1205–1212

Toussaint, O.; Medrano, E. E.; Von Zglinicki, T., 2000: Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid broblasts and melanocytes. *Experimental Gerontology.*, **35**, 927–945

Troeberg, L.; Nagase, H., 2011: Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochimica et Biophysica Acta.*, **1824**, 133–145

Tsaprás, P.; Nezis, I. P., 2017: Caspase involvement in autophagy. *Cell Death and Differentiation.*, **24**, 1369–1379

Tsezou, A.; Furuichi, T.; Satra, M.; Makrythanasis, P.; Ikegawa, S.; Malizos, K. N.,

- 2008: Association of KLOTHO gene polymorphisms with knee osteoarthritis in Greek population. *Journal of Orthopaedic Research.*, **26**, 1466–1470
- Tsujikawa, H.; Kurotaki, Y.; Fujimori, T.; Fukuda, K.; Nabeshima, Y. I., 2003: Klotho, a Gene Related to a Syndrome Resembling Human Premature Aging, Functions in a Negative Regulatory Circuit of Vitamin D Endocrine System. *Molecular Endocrinology.*, **17**, 2393–2403
- Umlauf, D.; Frank, S.; Pap, T.; Bertrand, J., 2010: Cartilage biology, pathology, and repair. *Cellular and Molecular Life Sciences.*, **67**, 4197–4211
- Urakawa, I.; Yamazaki, Y.; Shimada, T.; Iijima, K.; Hasegawa, H.; Okawa, K.; Fujita, T.; Fukumoto, S.; Yamashita, T., 2006: Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature.*, **444**, 770–774
- Utsugi, T.; Ohno, T.; Ohyama, Y.; Uchiyama, T.; Saito, Y.; Matsumura, Y.; Aizawa, H.; Itoh, H.; Kurabayashi, M.; Kawazu, S.; Tomono, S.; Oka, Y.; Suga, T.; Kuro-o, M.; Nabeshima, Y.; Nagai, R., 2000: Decreased insulin production and increased insulin sensitivity in the klotho mutant mouse, a novel animal model for human aging. *Metabolism.*, **49**, 1118–1123
- van Caam, A.; Madej, W.; Thijssen, E.; Garcia de Vinuesa, A.; van den Berg, W.; Goumans, M. J.; ten Dijke, P.; Blaney Davidson, E.; van der Kraan, P. M., 2016: Expression of TGF $\beta$ -family signalling components in ageing cartilage: Age-related loss of TGF $\beta$  and BMP receptors. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **24**, 1235–1245
- van der Rest, M.; Garrone, R., 1991: Collagen family of proteins. *FASEB Journal.*, **5**, 2814–2823
- Vandenabeele, P.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B., 2005: Serine proteases and calpains fulfill important supporting roles in the apoptotic tragedy of the cellular opera. *Cell Death and Differentiation.*, **12**, 1219–1224
- Vankemmelbeke, M. N.; Jones, G. C.; Fowles, C.; Ilic, M. Z.; Handley, C. J.; Day, A. J.; Knight, C. G.; Mort, J. S.; Buttle, D. J., 2003: Selective inhibition of ADAMTS-1, -4 and -5 by catechin gallate esters. *European Journal of Biochemistry.*, **270**, 2394–2403
- Verma, P.; Dalal, K., 2011: ADAMTS-4 and ADAMTS-5: key enzymes in osteoarthritis. *Journal of Cellular Biochemistry.*, **112**, 3507–3514
- Vilím, V.; Olejárová, M.; Macháček, S.; Gatterová, J.; Kraus, V. B.; Pavelka, K., 2002: Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **10**, 707–713
- Vincent, T. L.; McLean, C. J.; Full, L. E.; Peston, D.; Saklatvala, J., 2007: FGF-2 is bound to perlecan in the pericellular matrix of articular cartilage, where it acts as a chondrocyte mechanotransducer. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **15**, 752–763
- Vucic, D.; Dixit, V. M.; Wertz, I. E., 2011: Ubiquitylation in apoptosis: a post-

- translational modification at the edge of life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.*, **12**, 439–452
- Wajant, H., 2003: Death receptors. *Essays in Biochemistry.*, **39**, 53–71
- Walczak, H.; Krammer, P. H., 2000: The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) Apoptosis Systems. *Experimental Cell Research.*, **256**, 58–66
- Walrand, S.; Chiotelli, E.; Noirt, F.; Mwewa, S.; Lassel, T., 2008: Consumption of a functional fermented milk containing collagen hydrolysate improves the concentration of collagen-specific amino acids in plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, **56**, 7790–7795
- Walsh, D. A.; Bonnet, C. S.; Turner, E. L.; Wilson, D.; Situ, M.; McWilliams, D. F., 2007: Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **15**, 743–751
- Walton, M., 1977: Degenerative joint disease in the mouse knee; radiological and morphological observations. *The Journal of Pathology.*, **123**, 97–107
- Wang, E., 1995: Senescent Human Fibroblasts Resist Programmed Cell Death, and Failure to Suppress bcl 2 Is Involved. *Cancer Research.*, **55**, 2284–2292
- Wang, H.; Sun, L.; Su, L.; Rizo, J.; Liu, L.; Wang, L. F.; Wang, F. S.; Wang, X., 2014: Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Causes Necrotic Membrane Disruption upon Phosphorylation by RIP3. *Molecular Cell.*, **54**, 133–146
- Wang, J.; Gao, J. S.; Chen, J. W.; Li, F.; Tian, J., 2012: Effect of resveratrol on cartilage protection and apoptosis inhibition in experimental osteoarthritis of rabbit. *Rheumatology International.*, **32**, 1541–1548
- Wang, X.; Chen, B.; Xu, W.; Liu, S.; Zhao, W.; Wu, J., 2011: Combined effects of klotho and soluble CD40 ligand on A549 lung cancer cells. *Oncology Reports.*, **25**, 1465–1472
- Wang, Y.; Chen, L.; Huang, G.; He, D.; He, J.; Xu, W.; Zou, C.; Zong, F.; Li, Y.; Chen, B.; Wu, S.; Zhao, W.; Wu, J., 2013: Klotho Sensitizes Human Lung Cancer Cell Line to Cisplatin via PI3k/Akt Pathway. *PLoS ONE.*, **8**, 1–10
- Wei, L.; Sun, X. juan; Wang, Z.; Chen, Q., 2006: CD95-induced osteoarthritic chondrocyte apoptosis and necrosis: dependency on p38 mitogen-activated protein kinase. *Arthritis Research & Therapy.*, **8**, R37
- White, E.; Mehnert, J. M.; Chan, C. S., 2015: Autophagy, Metabolism, and Cancer. *Clinical Cancer Research.*, **21**, 5037–5046
- Wiesner, S.; Legate, K. R.; Fässler, R., 2005: Integrin-actin interactions. *Cellular and Molecular Life Sciences.*, **62**, 1081–1099

- Willert, K.; Nusset, R., 1998:  $\beta$ -catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Current Opinion in Genetics & Development.*, **8**, 95–102
- Willis, S. N.; Fletcher, J. I.; Kaufmann, T.; van Delft, M. F.; Chen, L.; Czabotar, P. E.; Ierino, H.; Lee, E. F.; Fairlie, W. D.; Bouillet, P.; Strasser, A.; Kluck, R. M.; Adams, J. M.; Huang, D. C. S., 2007: Apoptosis Initiated When BH3 Ligands Engage Multiple Bcl-2 Homologs, Not Bax or Bak. *Science.*, **315**, 856–859
- Wisłowska, M.; Jabłońska, B., 2004: Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in rheumatoid arthritis and knee osteoarthritis. *Clinical Rheumatology.*, **24**, 278–284
- Wolf, I.; Levanon-Cohen, S.; Bose, S.; Ligumsky, H.; Sredni, B.; Kanety, H.; Kuro-o, M.; Karlan, B.; Kaufman, B.; Koeffler, H. P.; Rubinek, T., 2008: Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene.*, **27**, 7094–7105
- Woods Jr., V. L.; Schreck, P. J.; Gesink, D. S.; Pacheco, H. O.; Amiel, D.; Akeson, W. H.; Lotz, M., 1994: Integrin expression by human articular chondrocytes. *Arthritis and Rheumatism.*, **37**, 537–544
- Xie, B.; Zhou, J.; Shu, G.; Liu, D. C.; Zhou, J.; Chen, J.; Yuan, L., 2013: Restoration of klotho gene expression induces apoptosis and autophagy in gastric cancer cells: tumor suppressive role of klotho in gastric cancer. *Cancer Cell International.*, **13**, 18
- Xie, Z.; Klionsky, D. J., 2007: Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology.*, **9**, 1102–1109
- Xie, Z.; Nair, U.; Klionsky, D. J., 2008: Atg8 Controls Phagophore Expansion during Autophagosome Formation. *Molecular Biology of the Cell.*, **19**, 3290–3298
- Yamamoto, H.; Kakuta, S.; Watanabe, T. M.; Kitamura, A.; Sekito, T.; Kondo-Kakuta, C.; Ichikawa, R.; Kinjo, M.; Ohsumi, Y., 2012: Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *Journal of Cell Biology.*, **198**, 219–233
- Yamamoto, M.; Clark, J. D.; Pastor, J. V.; Gurnani, P.; Nandi, A.; Kurosu, H.; Miyoshi, M.; Ogawa, Y.; Castrillon, D. H.; Rosenblatt, K. P.; Kuro-O, M., 2005: Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *The Journal of Biological Chemistry.*, **280**, 38029–38034
- Yamashita, T.; Nifuji, A.; Furuya, K.; Nabeshima, Y.; Noda, M., 1998: Elongation of the epiphyseal trabecular bone in transgenic mice carrying a klotho gene locus mutation that leads to a syndrome resembling aging. *Journal of Endocrinology.*, **159**, 1–8
- Yang, C.; Li, S. W.; Helminen, H. J.; Khillan, J. S.; Bao, Y.; Prockop, D. J., 1997: Apoptosis of chondrocytes in transgenic mice lacking collagen II. *Experimental Cell Research.*, **235**, 370–373
- Yang, K.; Nie, L.; Huang, Y.; Zhang, J.; Xiao, T.; Guan, X.; Zhao, J., 2012: Amelioration

- of uremic toxin indoxyl sulfate-induced endothelial cell dysfunction by Klotho protein. *Toxicology Letters.*, **215**, 77–83
- Yang, L.; Tsang, K. Y.; Tang, H. C.; Chan, D.; Cheah, K. S. E., 2014: Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **114**, 13
- Yang, Q.; Wu, S.; Mao, X.; Wang, W.; Tai, H., 2013: Inhibition Effect of Curcumin on TNF- $\alpha$  and MMP-13 Expression Induced by Advanced Glycation End Products in Chondrocytes. *Pharmacology.*, **91**, 77–85
- Yang, Z.; Klionsky, D. J., 2010: Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature Cell Biology.*, **12**, 814–822
- Yen, W. L.; Shintani, T.; Nair, U.; Cao, Y.; Richardson, B. C.; Li, Z.; Hughson, F. M.; Baba, M.; Klionsky, D. J., 2010: The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy. *Journal of Cell Biology.*, **188**, 101–114
- Yin, X. M.; Wang, K.; Gross, A.; Zhao, Y.; Zinkel, S.; Klocke, B.; Roth, K. A.; Korsmeyer, S. J., 1999: Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature.*, **400**, 886–891
- Youle, R. J.; Strasser, A., 2008: The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.*, **9**, 47–59
- Young, A. R. J.; Narita, M.; Ferreira, M.; Kirschner, K.; Sadaie, M.; Darot, J. F. J.; Tavaré, S.; Arakawa, S.; Shimizu, S.; Watt, F. M.; Narita, M., 2009: Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes & Development.*, **23**, 798–803
- Yousefi, S.; Perozzo, R.; Schmid, I.; Ziemiecki, A.; Schaffner, T.; Scapozza, L.; Brunner, T.; Simon, H. U., 2006: Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature Cell Biology.*, **8**, 1124–1132
- Yu, L.; Alva, A.; Su, H.; Dutt, P.; Freundt, E.; Welsh, S.; Baehrecke, E.; Lenardo, M. J., 2004: Regulation of an ATG7-beclin 1 Program of Autophagic Cell Death by Caspase-8. *Science.*, **304**, 1500–1502
- Yu, L.; Wan, F.; Dutta, S.; Welsh, S.; Liu, Z.; Freundt, E.; Baehrecke, E. H.; Lenardo, M., 2006: Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **103**, 4952–4957
- Zalckvar, E.; Berissi, H.; Mizrachy, L.; Idelchuk, Y.; Koren, I.; Eisenstein, M.; Sabanay, H.; Pinkas-Kramarski, R.; Kimchi, A., 2009: DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO reports.*, **10**, 285–292

- Zamli, Z.; Sharif, M., 2011: Chondrocyte apoptosis: a cause or consequence of osteoarthritis? *International Journal of Rheumatic Disease.*, **14**, 159–166
- Zeisel, S. H., 1999: Regulation of 'Nutraceuticals'. *Science.*, **285**
- Zemmyo, M.; Meharra, E. J.; Kühn, K.; Creighton-Achermann, L.; Lotz, M., 2003: Accelerated, Aging-Dependent Development of Osteoarthritis in  $\alpha 1$  Integrin-Deficient Mice. *Arthritis and Rheumatism.*, **48**, 2873–2880
- Zeng, Y.; Wang, P. H.; Zhang, M.; Du, J. R., 2016: Aging-related renal injury and inflammation are associated with downregulation of Klotho and induction of RIG-I/NF- $\kappa$ B signaling pathway in senescence-accelerated mice. *Aging Clinical and Experimental Research.*, **28**, 69–76
- Zhang, C.; Cuervo, A. M., 2008a: Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nature Medicine.*, **14**, 959–965
- Zhang, D. W.; Shao, J.; Lin, J.; Zhang, N.; Lu, B. J.; Lin, S. C.; Dong, M. Q.; Han, J., 2009a: RIP3, an Energy Metabolism Regulator That Switches TNF-Induced Cell Death from Apoptosis to Necrosis. *Science.*, **325**, 332–336
- Zhang, F.; Zhai, G.; Kato, B. S.; Hart, D. J.; Hunter, D.; Spector, T. D.; Ahmadi, K. R., 2007: Association between KLOTHO gene and hand osteoarthritis in a female Caucasian population. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **15**, 624–629
- Zhang, H.; Wang, H.; Zeng, C.; Yan, B.; Ouyang, J.; Liu, X.; Sun, Q.; Zhao, C.; Fang, H.; Pan, J.; Xie, D.; Yang, J.; Zhang, T.; Bai, X.; Cai, D., 2017: mTORC1 activation downregulates FGFR3 and PTH/PTHrP receptor in articular chondrocytes to initiate osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage.*, **25**, 952–963
- Zhang, L.; Jie, G.; Zhang, J.; Zhao, B., 2009b: Significant longevity-extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress. *Free Radical Biology & Medicine.*, **46**, 414–421
- Zhang, W.; Robertson, J.; Jones, A. C.; Dieppe, P. A.; Doherty, M., 2008b: The placebo effect and its determinants in osteoarthritis: meta-analysis of randomised controlled trials. *Annals of the Rheumatic Diseases.*, **67**, 1716–1723
- Zhang, Y.; Vasheghani, F.; Li, Y. H.; Blati, M.; Simeone, K.; Fahmi, H.; Lussier, B.; Roughley, P.; Lagares, D.; Pelletier, J. P.; Martel-Pelletier, J.; Kapoor, M., 2015: Cartilage-specific deletion of mTOR upregulates autophagy and protects mice from osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases.*, 1432–1440
- Zhang, Z.; Leong, D. J.; Xu, L.; He, Z.; Wang, A.; Navati, M.; Kim, S. J.; Hirsh, D. M.; Hardin, J. A.; Cobelli, N. J.; Friedman, J. M.; Sun, H. B., 2016: Curcumin slows osteoarthritis progression and relieves osteoarthritis-associated pain symptoms in a post-traumatic osteoarthritis mouse model. *Arthritis Research & Therapy.*, **18**, 128



- Zhao, C. Q.; Wang, L. M.; Jiang, L. S.; Dai, L. Y., 2007: The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration. *Ageing Research Reviews.*, **6**, 247–261
- Zhao, Y.; Zhao, M. M.; Cai, Y.; Zheng, M. F.; Sun, W. L.; Zhang, S. Y.; Kong, W.; Gu, J.; Wang, X.; Xu, M. J., 2015: Mammalian target of rapamycin signaling inhibition ameliorates vascular calcification via Klotho upregulation. *Kidney International.*, **88**, 711–721
- Zhen, G.; Wen, C.; Jia, X.; Li, Y.; Crane, J. L.; Mears, S. C.; Askin, F. B.; Frassica, F. J.; Chang, W.; Yao, J.; Carrino, J. A.; Cosgarea, A.; Artemov, D.; Chen, Q.; Zhao, Z.; Zhou, X.; Riley, L.; Sponseller, P.; Wan, M. et al., 2013: Inhibition of TGF- $\beta$  signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis. *Nature Medicine.*, **19**, 704–712
- Zhen, G.; Cao, X., 2014: Targeting TGF $\beta$  signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis. *Trends in Pharmacological Sciences.*, **35**, 227–236
- Zheng, W.; Feng, Z.; You, S.; Zhang, H.; Tao, Z.; Wang, Q.; Chen, H.; Wu, Y., 2017: Fisetin inhibits IL-1 $\beta$ -induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes through activating SIRT1 and attenuates the progression of osteoarthritis in mice. *International Immunopharmacology.*, **45**, 135–147
- Zhou, L.; Li, Y.; Zhou, D.; Tan, R. J.; Liu, Y., 2013: Loss of Klotho Contributes to Kidney Injury by Derepression of Wnt/beta-Catenin Signaling. *Journal of the American Society of Nephrology.*, **24**, 771–785
- Zhu, M.; Tang, D.; Wu, Q.; Hao, S.; Chen, M.; Xie, C.; Rosier, R. N.; O’Keefe, R. J.; Zuscik, M.; Chen, D., 2009: Activation of  $\beta$ -Catenin Signaling in Articular Chondrocytes Leads to Osteoarthritis-Like Phenotype in Adult  $\beta$ -Catenin Conditional Activation Mice. *Journal of Bone and Mineral Research.*, **24**, 12–21
- Zhu, Y.; Zhao, L.; Liu, L.; Gao, P.; Tian, W.; Wang, X.; Jin, H.; Xu, H.; Chen, Q., 2010: Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis. *Protein and Cell.*, **1**, 468–477
- Zong, W. X.; Thompson, C. B., 2006: Necrotic death as a cell fate. *Genes & Development.*, **20**, 1–15

# Thèse de Doctorat

Elodie LE TILLY

## Homéostasie du cartilage articulaire lors de l'arthrose liée au vieillissement : étude des rôles de la protéine Klotho et d'un cocktail de molécules anti-oxydantes

Articular cartilage homeostasis during age-related osteoarthritis: study on the roles of the Klotho protein and a cocktail of anti-oxidant molecules

### Résumé

L'arthrose, affection chronique dégénérative de l'articulation, est intimement liée au vieillissement au cours duquel les fonctions tissulaires et physiologiques de l'organisme se détériorent progressivement. Parmi les mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathogénie de l'arthrose, la perturbation de l'homéostasie cartilagineuse (changement des propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire, mort des chondrocytes, augmentation du stress oxydant) joue un rôle prépondérant. Ainsi, lors de ce travail nous avons étudié l'effet de molécules anti-oxydantes et d'une protéine anti-vieillessement sur le développement de l'arthrose. Dans un premier temps, nous avons évalué un traitement à base de molécules naturelles anti-oxydantes et pro-anaboliques *in vivo* dans un modèle murin d'arthrose spontanée liée à l'âge. Pour cela, nous avons développé une approche non-invasive combinant la radiographie et l'analyse de la marche, et observé une amélioration des scores radiologiques et de la démarche des souris après quatre mois de traitement. Dans un deuxième temps, nous avons étudié le rôle de la protéine anti-vieillessement Klotho dans les mécanismes de mort des chondrocytes au cours de l'arthrose liée à l'âge. Nous avons montré une corrélation entre l'expression de Klotho et le processus autophagique dans le cartilage de la souris arthrosique vieillissante, ainsi qu'un rôle protecteur de Klotho vis à vis de la mort cellulaire, via l'inhibition de l'autophagie et l'apoptose des chondrocytes. Nos données suggèrent que l'utilisation de thérapeutiques ciblant les voies du vieillissement dans le cartilage représente une approche prometteuse dans le traitement de l'arthrose.

### Mots clés

**Arthrose – Vieillessement – Klotho – Mort cellulaire – Autophagie – Apoptose – Stress oxydant – Chondrocyte**

### Abstract

Osteoarthritis (OA) is a chronic and degenerative joint disease. It is closely linked with aging, which can be defined as a time-related deterioration of physiological functions. The molecular mechanisms involved in OA pathogenesis include the disruption of cartilage homeostasis (loss of biomechanical properties of the extracellular matrix, chondrocyte death, and increase in oxidative stress). In this work, we evaluated the effect of either a cocktail of anti-oxidant molecules or an anti-aging protein on OA development. Firstly, we tested the effect of a natural molecules-based treatment characterized by its anti-oxidant and pro-anabolic properties *in vivo* in an age-related murine model of spontaneous OA. To this aim we developed a non-invasive approach combining radiographic and gait analyses, and found an improvement in the radiological score and gait parameters after treatment. Secondly, the role of the anti-aging protein Klotho in articular chondrocyte death was evaluated in aging mice. We demonstrated a correlation between Klotho expression and the autophagic process in the articular cartilage of aging mice, as well as a protective role of Klotho against cellular death, through the inhibition of chondrocyte autophagy and apoptosis. These data suggest that the use of therapeutics targeting age-related pathways in articular cartilage could represent a promising approach in OA treatment.

### Key Words

**Osteoarthritis – Aging – Klotho – Cellular death – Autophagy – Apoptosis – Oxidative stress – Chondrocyte**