

COMMUNICATION

La NADPH oxydase Nox4, une cible thérapeutique potentielle dans l'arthrose

MOTS-CLÉS : NADPH OXYDASE. METALLOPROTEASES. ARTHROSE/THÉRAPIE

NADPH oxidase Nox4, a putative therapeutic target in osteoarthritis

KEY-WORDS: NADPH OXIDASE. METALLOPROTEASES. OSTEOARTHRITIS/THERAPY

Françoise MOREL *, Francis ROUSSET **, Minh VU CHUONG NGUYEN *, Candice TROCME ***, Laurent GRANGE * et Bernard LARDY *

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en relation avec le contenu de cet article.

RÉSUMÉ

Les NADPH oxydases, Nox, sont des hémoprotéines transmembranaires dont l'unique fonction est de réduire l'oxygène moléculaire pour former l'anion superoxyde O₂^{•-} puis les espèces radicalaires hautement réactives, oxydantes et toxiques, qui en dérivent, les ROS. Parmi les 7 NADPH oxydases exprimées chez l'homme, Nox4 est la seule Nox présente dans les chondrocytes humains ; elle a été proposée comme l'un des acteurs de la dégénérescence cartilagineuse dans l'arthrose. La stimulation des chondrocytes, uniques cellules du cartilage articulaire, par l'interleukine IL-1 β , induit une activation de Nox4, une production augmentée de ROS et l'expression des gènes codant pour les métalloprotéases matricielles, MMP1, MMP9, MMP13 et l'adamalysine ADAMTS4. Une connaissance approfondie de la structure de Nox4 en lien avec sa fonction et ses mécanismes de régulation, devrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de développer des stratégies innovantes pour un traitement approprié de l'arthrose.

* GREPI, Université Joseph Fourier, EFS-Rhône-Alpes, Grenoble-France.

** PATIM, Université de Genève, Genève-Suisse.

*** DBTP, Institut de Biologie et Pathologie, CHU, Grenoble-France.

Tirés-à-part : Professeur émérite Françoise MOREL, GREPI, Université Joseph Fourier, EFS-Rhône-Alpes, 29 avenue du maquis du Grésivaudan, BP35, 38701 — La Tronche cedex ;
e-mail : Fr.Morel.enzymo@chu-grenoble.fr

Article reçu le 29 janvier 2015, accepté le 9 mars 2015.

SUMMARY

The NADPH oxidases, Nox, are transmembrane hemoproteins, whose exclusive function is to reduce molecular oxygen to produce superoxide anion O₂^{•-} and consequently highly reactive oxidant and toxic oxygen species, ROS. Among the 7 NADPH oxidases expressed in humans, Nox4 is the sole Nox isoform present in human primary chondrocytes. Nox4 was suggested as one of the main actors involved in cartilage degradation in osteoarthritis. The stimulation of chondrocytes, the only cell present in cartilage, by IL-1 β results in the activation of Nox4. This leads to an increase of ROS production which in turn could regulate signaling pathways sensitive to oxidative stress such as gene-encoding matrix metalloproteases MMP1, MMP13 and Adamalysin ADAMTS4. A deep understanding of Nox4 structure/function and mechanisms of regulation could lead both to the identification of new therapeutic targets and to the development of innovative strategies for appropriate osteoarthritis treatment.

INTRODUCTION

Les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) sont de petites molécules radicalaires ou non, dérivées de l'oxygène, et particulièrement réactives car oxydantes et toxiques. Dans les cellules et les tissus, ces dérivés jouent un rôle essentiel en tant qu'outils bactéricides au cours de la phagocytose. Dans les cellules non phagocytaires les ROS peuvent avoir un rôle de messagers de signalisation contribuant à l'équilibre redox. La réduction de l'oxygène en anion superoxyde, O₂^{•-}, chef de file des ROS, est catalysée par les NADPH oxydases, les Nox. Chez l'homme, il y a 7 NADPH oxydases, 5 Nox et 2 Duox (Dual oxydases) [1]. Dans les neutrophiles stimulés au cours de la phagocytose, la consommation d'oxygène est foudroyante mais transitoire. Elle est abolie dans une maladie familiale, la granulomatose septique chronique [2, 3]. À des concentrations faibles à modérées, les ROS contribuent à réguler d'importantes fonctions de la cellule comme la différenciation cellulaire, la migration, l'adhésion, la sénescence, la croissance cellulaire et l'apoptose. Mais l'une ou l'autre de ces fonctions est perturbée lorsque l'homéostasie redox n'est plus respectée, soit par une augmentation soudaine des ROS, soit par une défaillance des systèmes antioxydants ; on parle de « stress oxydant ». Ainsi, la production en excès des ROS est observée dans les pathologies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, et dans le vieillissement, comme dans certaines formes de cancer, l'arthrose, la néphropathie diabétique, l'hypertension, les maladies cardiovasculaires ou la dégénérescence neuronale [4]. La NADPH oxydase, Nox4, a été récemment proposée comme l'un des acteurs de la dégénérescence cartilagineuse dans l'arthrose [5]. L'arthrose est une maladie chronique extrêmement fréquente touchant le cartilage articulaire principalement de la population âgée en France (70 % des plus de 65 ans). Compte tenu du vieillissement et de l'augmentation de la prévalence de l'obésité, ce chiffre devrait augmenter dans les années à venir et conduire à des conséquences fonctionnelles et socio-économiques majeures. En dépit de la fréquence de l'arthrose, tous les traitements

médicamenteux proposés, qu'ils soient pharmacologiques ou non, ont des effets uniquement symptomatiques [6]. Dans cet article, nous mettons l'accent sur l'un des aspects qui pourrait permettre d'approfondir les connaissances mécanistiques conduisant à la destruction du cartilage dans l'arthrose et qui résultent de la présence de la NADPH oxydase Nox4 dans les chondrocytes humains. Les recherches réalisées, suggèrent que Nox4 pourrait être, par la production de ROS et la protéolyse matricielle qui en résulte, directement impliquée dans la dégénérescence cartilagineuse de l'arthrose, ouvrant la voie à une nouvelle approche thérapeutique potentielle.

La NADPH oxydase Nox4

Les Nox sont les principaux médiateurs de la production des ROS. L'anion $O_2^{\circ-}$ qui résulte de la réduction mono-électronique de l'oxygène, conduit à la formation successive, électron par électron, du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du radical hydroxyle ($^{\circ}OH$) [7]. Les Nox, sont des hémoprotéines et des transporteurs d'électrons [8, 1]. Ce sont des isoenzymes flaviniques qui ont une structure en domaines : un domaine transmembranaire avec 6 hélices α formant 6 piliers connectés par cinq boucles A, B, C, D et E ; l'autre domaine étant le domaine deshydrogénase, c'est-à-dire le domaine catalytique, avec 4 sites de liaison du NADPH et 2 sites de liaison du FAD. Le domaine transmembranaire porte les centres redox, en particulier 2 hèmes reliés par des liaisons de coordinences à 4 Histidines, présentes sur les piliers 3 et 5 et conservées entre les Nox. Ces deux hèmes ne sont pas identiques au plan du potentiel redox et sont directement impliqués dans le transfert d'électrons (Figure 1A). Ces isoenzymes catalysent une même réaction aboutissant à la production de $O_2^{\circ-}$; mais contrairement aux autres Nox, Nox4 génère de préférence H_2O_2 . La nature des ROS produits par Nox4 et la formation de H_2O_2 aux dépens d' $O_2^{\circ-}$ pourraient s'expliquer par des propriétés structurales spécifiques de Nox4, notamment sa boucle E (Figure 1A) [1].

L'activité catalytique débute par la liaison du NADPH, le donneur d'électrons, au niveau de sites spécifiques du domaine deshydrogénase en C terminal. Le transfert des électrons procède ensuite au travers du domaine transmembranaire, *via* le FAD et les 2 hèmes A et B. Les électrons sont alors transférés successivement jusqu'à l'oxygène, l'accepteur final d'électrons, qui est réduit en anion $O_2^{\circ-}$ pour donner H_2O_2 . Les isoenzymes Nox proviennent chacun d'un gène spécifique ayant évolué à partir d'un ancêtre commun [9]. Ils ont acquis au cours de l'évolution, des spécificités différentes selon leur localisation tissulaire ou subcellulaire et/ou selon les mécanismes d'activation et de régulation. Nox4 est ubiquitaire [10] : identifiée à l'origine dans le rein puis dans les tissus cardiovasculaires, on la retrouve en particulier dans le pancréas, les cellules endothéliales et les chondrocytes. Au niveau subcellulaire, Nox4 a été mise en évidence à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques, dans la région périnucléaire, le réticulum endoplasmique, mais aussi au niveau de la membrane plasmique [11]. Dans les chondrocytes primaires, seul

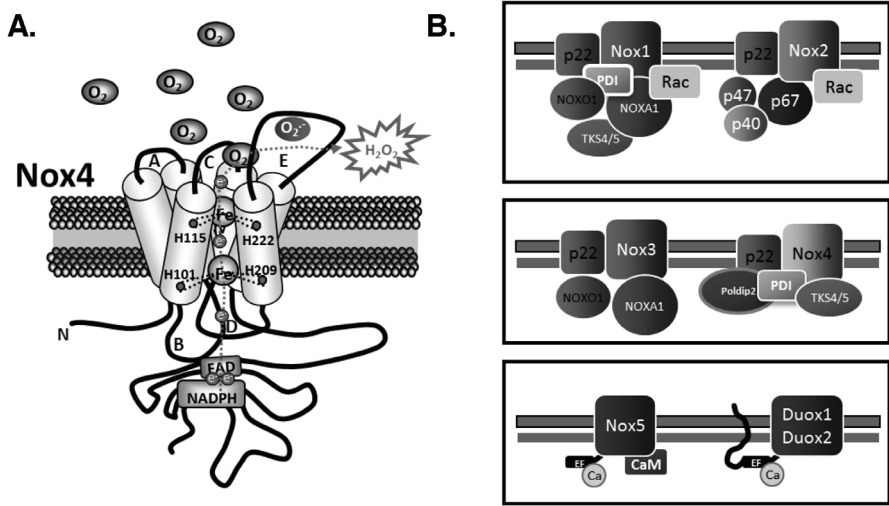


FIG. 1. — A. Nox4 : transfert d'électrons. B. Les Nox/Duox, mécanismes d'activation.

le gène de Nox4 est exprimé. Chez l'homme, on a pu identifier 5 formes variantes de Nox4 (A, B, C, D et E), présentant une spécificité tissulaire et d'espèce [12]. L'oxydase Nox4A est active ; c'est la forme native. Nox4B à laquelle il manque un site de fixation pour le NADPH, est en revanche inactive (Figure 2A). *La surexpression du gène de Nox4B a été décrite comme pouvant empêcher la formation des ROS par Nox4A en intervenant dans la régulation de l'activité de Nox4A, en tant que dominant négatif.*

Les mécanismes qui gouvernent l'activation des Nox et la production des ROS sont différents d'une oxydase à l'autre (Figure 1B). Contrairement aux autres Nox (Nox1, 2, 3), dont les mécanismes d'activation impliquent l'assemblage sur l'hétérodimère membranaire Nox/p22^{phox} de facteurs protéiques cytosoliques d'activation (p67^{phox}/NoxA1, p40^{phox}, p47^{phox}/NoxO1, et/ou d'une protéine G monomérique Rac1/2), en un édifice moléculaire actif, l'activation de Nox5 et des Duox dépend de la liaison du calcium sur la protéine Nox/Duox. L'activité NADPH oxydase de Nox4, est constitutive : ceci suggère qu'à l'état basal, Nox4 fonctionne en l'absence de facteurs d'activation, à l'exception de p22^{phox} (Figure 1) ; cependant, d'autres protéines ou enzymes pourraient intervenir [1]. La formation d'un hétérodimère non covalent entre Nox4 et p22^{phox} également partenaire transmembranaire des Nox1, 2 et 3, stabilise Nox4 et est essentielle à son activité [1]. La nature des ROS produits par Nox4 et la formation de H₂O₂ aux dépens de O₂⁻ pourraient s'expliquer par l'intégrité de la dernière boucle E extracellulaire du domaine transmembranaire de la protéine. Dans cette dernière, deux cystéines C226 et C270 pourraient réguler la nature et la quantité des ROS générés (O₂⁻ ou H₂O₂) ; par ailleurs,

une histidine H222, conservée entre les espèces, pourrait servir de source de protons pour accélérer la dismutation spontanée de $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 , avant sa libération dans le milieu extracellulaire [13]. Au plan structural, des données récentes suggèrent que l'activation des Nox et en particulier de Nox4, serait associée à un repliement de la séquence, la boucle B pouvant servir d'interface entre les domaines transmembranaire et deshydrogénase (Figure 1A). Cette interface favoriserait le rapprochement du FAD et de l'hème A et donc un transfert plus rapide d'électrons. Par ailleurs, compte tenu de son activité constitutive à l'état basal, Nox4 pourrait être considérée comme le modèle structural tridimensionnel de la conformation active des Nox.

L'activité NADPH oxydase de Nox4 à l'état basal est faible ; le niveau de transcription de son gène est l'étape limitante [10, 14]. Un mécanisme de régulation transcriptionnel impliquerait selon les tissus ou les cellules exprimant Nox4, différents facteurs, comme IL-1 β , TNF α , HIF1 α , etc... Des modifications épigénétiques ont été observées en particulier dans les cellules endothéliales où l'inhibition des histones déacétylases HDACs diminuerait la transcription de Nox4 en empêchant la liaison des facteurs de transcription et des polymérase au promoteur de l'enzyme [15]. *Par ailleurs, dans les chondrocytes articulaires humains en culture, stimulés par l'IL-1 β , un inhibiteur des HDACs diminue l'effet stimulant de l'IL-1 β sur l'expression des MMP1 et MMP13, ce qui suggère l'intervention possible de cet inhibiteur dans une thérapie appropriée de l'arthrose* [16].

L'activité de Nox4 est aussi inductible iNox : plusieurs protéines y participent dans un mécanisme de régulation post traductionnel. Une production accrue de ROS par Nox4 est observée, en présence de dérivés quinones et d'une NADPH quinone oxydo-reductase, NQO1 [17]. *Le dicoumarol en inhibant la NQO1 devrait pouvoir jouer un rôle dans une approche thérapeutique de l'arthrose.* La Delta polymérase, Poldip2, partenaire de p22^{phox}, activerait Nox4 dans les cellules musculaires lisses [18]. *Poldip2, mis en évidence dans les chondrocytes humains, pourrait être une nouvelle cible thérapeutique.* Des expériences de double hybride et de « pull down » ont révélé une interaction entre TLR4 « Toll like receptor 4 » et Nox4. TLR4 se lierait à l'extrémité de la séquence de Nox4 en C terminal, ce qui induirait la production de ROS en réponse à la stimulation cellulaire par le LPS. Une régulation négative de Nox4 a été observée dans les myofibroblastes. La protéine impliquée est « l'Hydrogène peroxyde-inducible clone5 », Hic-5, endogène, qui supprime la senescence de ces cellules et ses activités pro-fibrotiques en régulant négativement l'expression de Nox4 [19].

D'autres mécanismes de régulation interviennent en particulier l'hème oxygénase HO-1 qui est physiologiquement nécessaire au maintien d'un équilibre entre la synthèse des hémoprotéines et leur dégradation. HO-1 a été mis en évidence dans les chondrocytes humains. Produite en excès dans ces cellules, elle diminue de manière significative l'activité de Nox4 sans affecter son niveau d'expression. Ce changement d'activité oxydase de Nox4 induit par HO-1, conduirait à une diminution de synthèse des métalloprotéinases MMP1 et MMP13 attribuant alors à Nox4 un rôle d'acteur de la dégénérescence cartilagineuse (Figure 2) [20]. Le mécanisme d'action

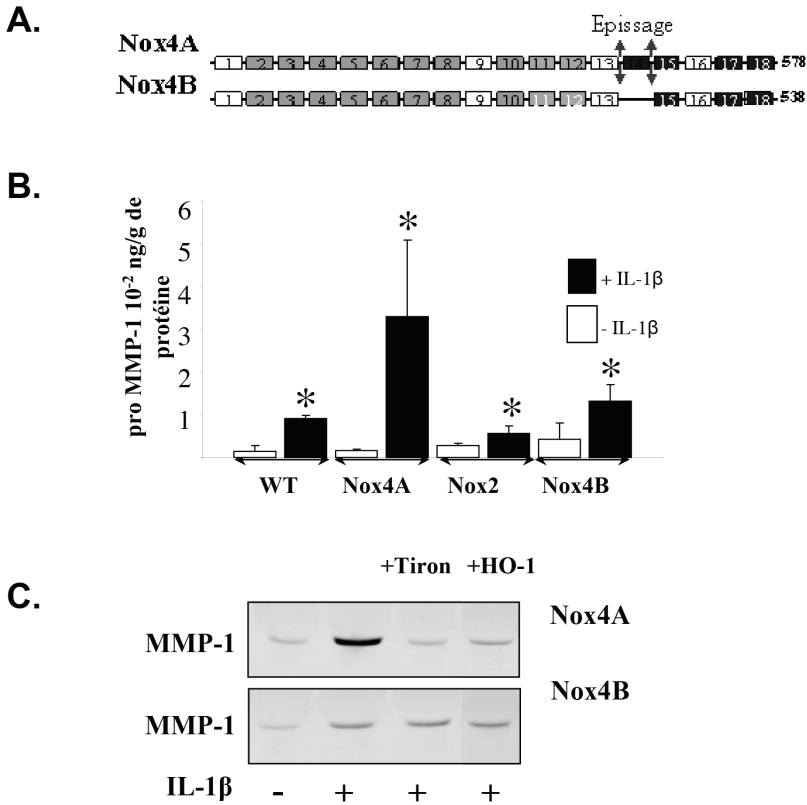


FIG. 2. — Rôle de Nox4 dans l'expression des métalloprotéases matricielles

— **A.** Schéma de deux isoformes de Nox4. Nox4A forme active. Nox4B forme inactive sans l'exon 14.
 — **B.** Dosage de la pro MMP1 par méthode ELISA dans le surnageant de culture de chondrocytes C-20/A4 surexprimant Nox4A, Nox4B, Nox2 ou sans surexpression (WT). Les cellules sont stimulées ou non par IL-1 β pendant 24 heures. — **C.** Electro-transfert de la MMP1 après migration électrophorétique en conditions dénaturantes, à partir du surnageant de culture de chondrocytes C20-A4 surexprimant Nox4A ou Nox4B, stimulées ou non par IL-1 β pendant 24 heures. Effet d'un antioxydant (tiron) ou d'un composé CoPP stimulant l'expression de l'hème oxygénase 1 (HO-1).

reste encore à débattre mais l'oxyde de carbone formé au cours de la réaction catalysée, pourrait être impliqué. Des substances induisant la synthèse de HO-1, comme l'hémine ou les dérivés porphyriques (CoPP) pourraient intervenir dans une thérapeutique dirigée contre l'arthrose. Enfin, des travaux récents ont montré que Nox4 comme toutes les autres Nox, est phosphorylable [21]. La phosphorylation de Nox4 sur le résidu tyrosine 491, localisé au sein du domaine deshydrogénase cytosolique, interviendrait dans une signalisation induite par le facteur de croissance IGF1.

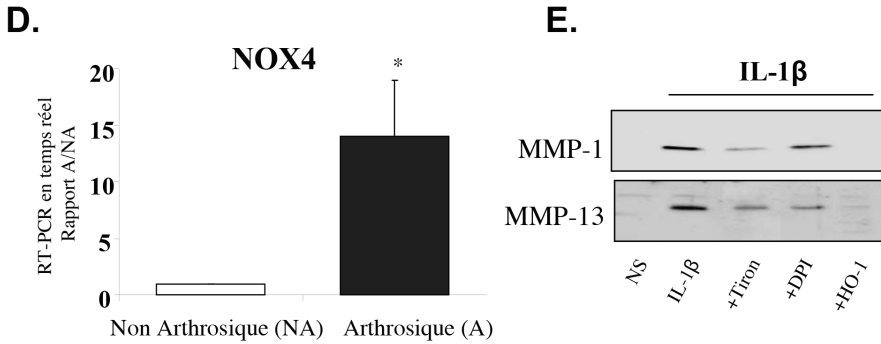


FIG. 2 (suite)

— **D.** RT-PCR en temps réel du transcrite codant pour Nox4, réalisée sur l'ARNm de chondrocytes primaires issus de 14 patients arthrosique ou non arthrosique. — **E.** Electro-transfert de la MMP1 et la MMP13 après migration électrophorétique en conditions dénaturantes d'un surnageant de culture de chondrocytes primaires stimulés ou non par IL-1 β pendant 24 heures et en présence ou non de tiron (antioxydant), DPI (inhibiteur des flavoenzymes), HO-1 (hème oxygénase-1).

Dégradation cartilagineuse dans l'arthrose: les métalloprotéases matricielles.

L'arthrose est le plus fréquent des rhumatismes, touchant environ 10 million de personnes en France. Sa physiopathologie implique une dégradation anormale du cartilage articulaire par protéolyse matricielle, entraînant douleur et gêne fonctionnelle. L'arthrose peut être la résultante de phénomènes mécaniques, d'une inflammation localisée, mais aussi d'un dérèglement métabolique voire d'une prédisposition génétique qui pourraient déstabiliser un équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous chondral (Figure 3) [22]. Le tissu articulaire n'est pas irrigué et les nutriments proviennent presque exclusivement du liquide synovial. Il est constitué d'un seul type cellulaire : le chondrocyte. Cette cellule maintient l'équilibre du cartilage par la synthèse et la dégradation des constituants de la matrice [23]. L'arthrose pourrait être considérée comme la maladie du chondrocyte [24], mais une autre hypothèse met aussi en avant l'os-sous chondral suggérant un rôle pour Nox4 à ce niveau [25]. Les chondrocytes consomment une quantité importante de glucose qui est transformé en glucosamine, nécessaire à la synthèse des protéoglycanes. Parmi les constituants du cartilage et de la matrice, les protéoglycanes sont des molécules hydrophiles de nature polysaccharidique, enchevêtrées dans un réseau de collagène. Ils jouent un rôle fondamental dans l'architecture du cartilage articulaire mais leur volume n'excède pas 1 % du volume total [24]. La majeure partie du volume du cartilage articulaire est conférée par de l'eau qui est retenue par les protéoglycanes au niveau de groupements sulfate. Le collagène de type II représente près de 95 % du collagène total de la matrice extracellulaire cartilagineuse (MEC). Il n'est presque pas renouvelé et la demi-vie des agrécanes, le protéoglycane majeur du cartilage articulaire, est d'environ 20 ans. De par sa faible irrigation, le cartilage est un tissu hypoxique et le métabolisme énergétique du chondrocyte est essentiellement basé sur la glycolyse.

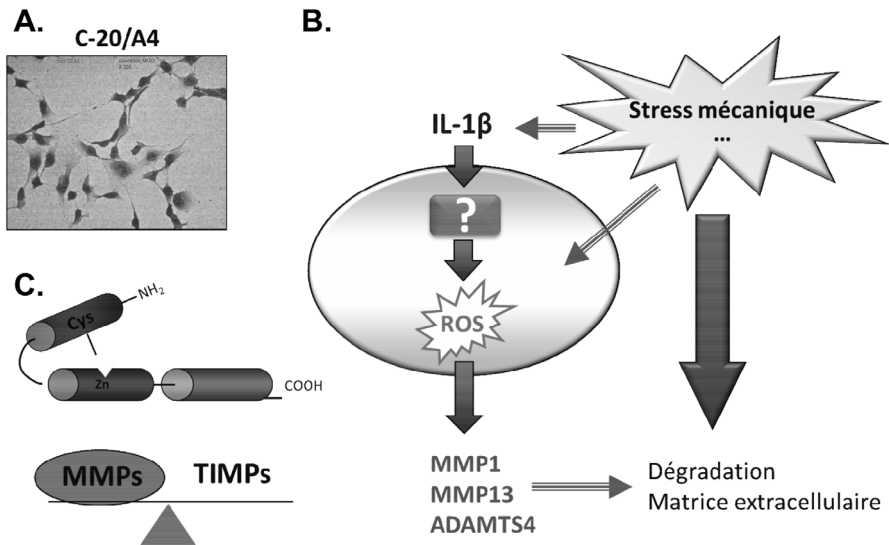


FIG. 3. — Principaux acteurs de la dégradation matricielle

A. Image d'une lignée de chondrocytes humains C20-A4 en culture. **B.** Lien entre un stress mécanique, la stimulation des cellules par l'IL-1 β et la dégradation matricielle. **C.** MMP: structure en domaine — Équilibre MMPs/TIMPs.

Les métalloprotéases matricielles à Zinc (MMPs) ou Matrixines, assurent une double fonction : elles dégradent les constituants de la matrice extracellulaire et contrôlent la réponse immune [26]. Les MMPs se présentent sous une forme latente avec une conformation repliée et une organisation en domaines : elles sont synthétisées sous la forme d'un zymogène et sont activées, après le clivage du peptide signal nécessaire à leur adressage, par la rupture de la liaison d'une cystéine du pro-domaine avec une molécule de Zinc du domaine catalytique [27]. Chez l'homme, l'expression des MMPs est associée dans la plupart des tissus, à celle de 4 inhibiteurs tissulaires, les TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteases). Dans les conditions physiologiques, il y a un équilibre entre la synthèse des constituants de la matrice extra cellulaire et l'activité des MMPs (Figure 3C) ; d'une manière générale, les MMPs sont largement impliquées dans le processus inflammatoire. Le chondrocyte possède le répertoire génétique lui permettant de synthétiser les différents constituants de la matrice extracellulaire et les MMPs, en particulier : les collagénases MMP1, MMP9, MMP13 et l'adamalysine ADAMTS4 [26]. Les Adamalysines appartiennent comme les MMPs à la superfamille des Metzincines.

Le chondrocyte est une cellule clé qui va orienter son métabolisme, en réponse à des stimuli cytokiniques principalement, l'IL-1 β , vers la voie catabolique, en induisant la synthèse des MMPs, via la production de ROS. En effet, les ROS, sont reconnus pour être des régulateurs potentiels de voies de signalisation sensibles au « stress

oxydant » ; les principales cibles sont les MAP kinases, mais aussi les facteurs de transcription, c-jun/c-fos formant le complexe AP1, NF- κ B et aussi HIF2 α . L'activation de ces facteurs dans les chondrocytes conduit à la transcription des gènes codant principalement pour les collagénases MMP1, MMP13 mais aussi la gélatinase MMP9 et l'Adamalysine ADAMTS4 [28, 29].

Les radicaux oxydants dans l'arthrose : rôle de la NADPH oxydase Nox4.

Une lignée de chondrocytes humain immortalisés C-20/A4, a été développée et validée pour étudier le rôle des chondrocytes dans l'arthrose (Figure 3A) [30]. Les chondrocytes de cette lignée, expriment Nox4 et son partenaire p22^{phox}. Malgré la présence d'ARNm en faible quantité codant pour Nox2, cette oxydase est totalement inactive dans ces cellules. Les chondrocytes C-20/A4 produisent des ROS sous un stress cytokinique de type IL-1 β [5]. Dans ces mêmes cellules, et après surexpression des gènes codant pour Nox4 actif (Nox4A), ou Nox4 inactif (Nox4B) (Figure 2A), on observe une augmentation significative de la production de ROS associée à une hausse de l'expression de la collagénase MMP1, uniquement pour les cellules C-20/A4 surexprimant Nox4A. La surexpression de l'isoforme Nox4B ou de l'oxydase Nox2 n'a pas d'impact sur la synthèse de MMP1 (Figure 2B et C). Ces résultats suggèrent l'existence dans la lignée cellulaire C-20/A4, d'une voie de signalisation stimulée par l'interleukine IL-1 β , dépendante de Nox4, ayant comme conséquence une protéolyse matricielle. On peut ainsi penser que dans l'arthrose, l'augmentation de la transcription du gène de la collagénase MMP1 est sous la dépendance d'un déséquilibre redox en faveur de la synthèse des ROS produits par Nox4 stimulée. Des résultats récents ont montré pour la première fois que Nox4 est non seulement exprimée dans la lignée cellulaire C-20/A4 mais aussi dans les chondrocytes primaires humains, isolés à partir de têtes fémorales. Dans ces cellules, seul l'hétérodimère Nox4/p22^{phox} est présent [31]. Dans les chondrocytes primaires, en réponse à l'IL-1 β , on observe une augmentation significative de la production de H₂O₂ et de la synthèse des MMP1, MMP13, augmentation réprimée par les inhibiteurs de Nox4 (Figure 2C et E). Nox4 a également été mis en évidence, par des expériences d'immunohistologie dans le cartilage de souris [32]. Pour confirmer l'implication possible de Nox4 dans l'arthrose, l'expression de l'ARNm de Nox4 a été comparée entre 2 cohortes de patients arthrosique (14 patients) et non arthrosique. Les résultats obtenus montrent non seulement une amplification de l'expression de l'ARNm de Nox4 dans l'arthrose (Figure 2D) mais aussi une production accrue de radicaux oxydants [31]. Ces données confirment le rôle essentiel joué par Nox4 dans l'arthrose. Par ailleurs, la mise en évidence de la sous-unité stabilisatrice, p22^{phox} et celle de Poldip2, le partenaire activateur de Nox4, dans les chondrocytes, suggèrent l'existence d'un complexe NADPH oxydase fonctionnel (Figure 4). La stimulation des chondrocytes par l'IL-1 β a pour effet d'augmenter sa propre synthèse. Cette amplification sous forme de rétrocontrôle positif, favoriserait la persistance d'une inflammation localisée au sein du cartilage (Figure 4) [33]. L'hétérodimère Nox4/p22^{phox} pourrait également être impliqué dans le maintien d'un environnement micro-inflammatoire nécessaire au processus arthrosique.

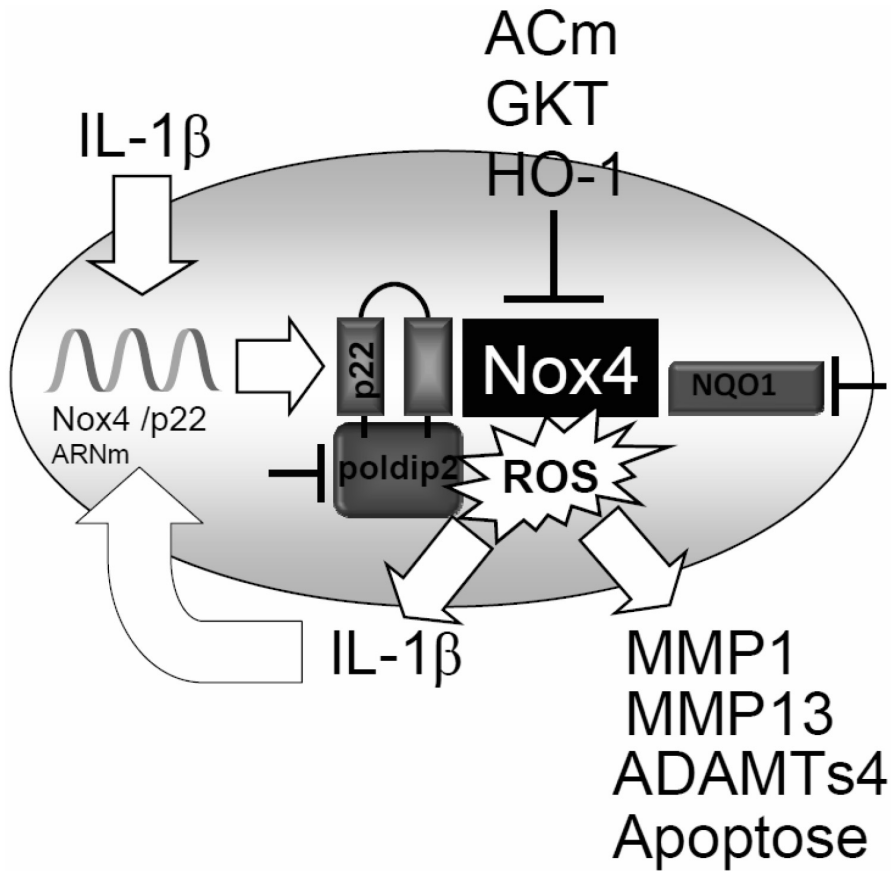


FIG. 4. — Approche thérapeutique dans l'arthrose. Rétrocontrôle positif de l' $IL-1\beta$.

Conclusion et perspectives thérapeutiques

L'arthrose est probablement une maladie d'origine systémique à retentissement localisé touchant de nombreux tissus, comme l'os, le cartilage, la membrane synoviale et les tissus adjacents ce qui rend particulièrement complexe un éventuel traitement.

À côté du traitement symptomatique de la douleur ou des médicaments anti arthrosiques symptomatiques à action lente ou AASAL, comme l'acide hyaluronique, les chondroïtine sulfates, les glucosamines, ou les insaponifiables de soja et d'avocat, médicaments dont l'efficacité est jugée faible à modérée et l'intérêt clinique encore discuté, différentes stratégies ont privilégié de maintenir ou de rétablir l'homéostasie du cartilage et de restaurer la matrice cartilagineuse avec l'étude des enzymes de biosynthèse des constituants matriciels. L'utilisation possible d'anti $TNF\alpha$ mais aussi l'injection intra articulaire de l'antagoniste de l' $IL1-\beta$ ($IL1-ra$)

ont également été rapportées [34, 35]. Mais le challenge actuel est la découverte et le développement de nouvelles molécules destinées à modifier la progression de l'arthrose et à empêcher la destruction du cartilage. Le développement d'inhibiteurs des métalloprotéases matricielles, et en particulier des TIMPs, a suscité beaucoup d'intérêt, leur invalidation dans des modèles murins, ayant démontré le rôle indispensable des MMPs dans le développement ostéoarticulaire [26]. Ils ont malgré tout été abandonnés compte tenu d'un manque réel de spécificité et de la manifestation d'effets secondaires. Plusieurs molécules sont actuellement en cours d'essai clinique de phase III, en particulier, des molécules agissant sur l'homéostasie calcique, comme la calcitonine, ou de phase II comme la vitamine D3, le facteur de croissance FGF18, des inhibiteurs de la NO synthase inductible iNOs [6].

La NADPH oxydase Nox4 demeure énigmatique par bien des aspects. De par l'ubiquité de sa distribution tissulaire et son activité constitutive, Nox4 génère des espèces réactives de l'oxygène, les ROS, dans de nombreux tissus au sein de l'organisme. Bien que le rôle physiologique de ces ROS soit bien souvent méconnu, leur production en excès est à l'origine de nombreuses pathologies tant au plan de la réponse inflammatoire que du vieillissement.

Les travaux réalisés sur Nox4 et les résultats montrant que les ROS générés pourraient servir de relai dans les voies de signalisation initiées par l'IL-1 β et conduire à la protéolyse matricielle dans l'arthrose, permettent de penser que cette oxydase pourrait être considérée comme une nouvelle cible thérapeutique potentielle (Figure 4) [31].

Parmi les nombreuses stratégies existantes pour empêcher la synthèse des ROS ou pour bloquer tel ou tel mécanisme de régulation ou d'activation, il faut retenir le rôle de Nox4B, qui pourrait réprimer par compétition les voies de signalisation dépendantes de Nox4A endogène, mais aussi l'effet du dicoumarol, inhibiteur de la NADPH quinone oxydo-réductase et enfin des molécules comme GKT 137831 (Genkyotex), ciblant Nox1/Nox4, premier inhibiteur de Nox, en phase de développement clinique. Par ailleurs, les observations recueillies sur la lignée C-20/A4 et les chondrocytes primaires, montrent que l'induction de l'expression de l'hème oxygénase HO-1, en réprimant l'activité de Nox4, pourrait rentrer dans une approche thérapeutique de l'arthrose. À l'image de la synthèse des peptides inhibiteurs développés avec succès pour Nox2, la NADPH oxydase des phagocytes [36], une analyse approfondie de la structure en lien avec la fonction de Nox4, pourrait ouvrir des pistes nouvelles et permettre d'identifier des cibles pour le développement d'inhibiteurs appropriés. Les résultats déjà obtenus sur la topologie de Nox4 sont prometteurs [Rousset *et al.* non publié]. Le champ des anticorps thérapeutiques, ouvre aussi des perspectives intéressantes : des anticorps monoclonaux récemment obtenus et dirigés contre Nox4 [11] et p22^{phox} [37] pourraient ouvrir la voie à une orientation thérapeutique prometteuse dans le traitement de l'arthrose. Ces hypothèses, formulées à partir de travaux réalisés sur des cultures cellulaires de chondrocytes humains, sont actuellement en cours de développement et de validation sur modèle animal.

RÉFÉRENCES

- [1] Nguyen MVC, Lardy B, Paquet MH, Rousset F, Berthier S, Baillet A, *et al.* Les NADPH oxydases, Nox : une nouvelle famille d'isoenzymes. Structure/fonction. Médecine / Sciences. 2015;31:43-52.
- [2] Morel F, Boulay F, Doussière J, Vignais PV. Bases moléculaires de la granulomatose septique chronique. Médecine/ Sciences. 1992;8:912-20.
- [3] Morel F. Molecular aspects of chronic granulomatous disease. " The NADPH oxidase complex ". Bull Acad Natl Med. 2007;191:377-90.
- [4] Lambeth JD. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. Free Radic Biol Med. 2007;43:332-47.
- [5] Grange L, Nguyen MVC, Lardy B, Derouazi M, Campion Y, Trocme C, *et al.* NAD(P)H oxidase activity of Nox4 in chondrocytes is both inducible and involved in collagenase expression. Antioxidants & redox signaling. 2006;8:1485-96.
- [6] Hunter DJ. Pharmacologic therapy for osteoarthritis-The era of disease modification. Nat.Rev.Rheumatol.2011;7:13-22.
- [7] Bedard K, Krause KH, The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiological reviews. 2007;87:245-313.
- [8] Morel F, Vignais PV. Examination of the oxidase function of the b-type cytochrome in human polymorphonuclear leucocytes. Biochim Biophys Acta. 1984;764:213-25.
- [9] Lardy B, Bof M, Aubry L, Paquet MH, Morel F, Satre M, *et al.* NADPH oxidase homologs are required for normal cell differentiation and morphogenesis in *Dictyostelium discoïdeum*. Biochim Biophys Acta. 2005;1744:199-212.
- [10] Chen F, Haigh S, Barman S, Fulton DJ. From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system. Front Physiol. 2012;3:1-12.
- [11] Zhang L, Nguyen MV, Lardy B, Jesaitis AJ, Grichine A F, Paquet MH, *et al.* New insight into the Nox4 subcellular localization in HEK293 cells: first monoclonal antibodies against Nox4. Biochimie. 2011;93:457-68.
- [12] Goyal P, Weissmann N, Rose F, Grimminger F, Schafers HJ, Seeger W, *et al.* Identification of novel Nox4 splice variants with impact on ROS levels in A549 cells. Biochem Biophys Res Com. 2005;329:32-9.
- [13] Takac I, Schroder K, Zhang L, Lardy B, Lambeth JM, Shah AM, *et al.* The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. J Biol Chem. 2011;286:13304-13.
- [14] Serrander L, Cartier L, Bedard K, Banfi B, Lardy B, Plastre O, *et al.* NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. Biochem J. 2007;406:105-14.
- [15] Siuda D, Zechner U, El Hajj N, Prawitt D, Langer D, Xia N, *et al.* Transcriptional regulation of Nox4 by histone deacetylases in human endothelial cells. Basic Res Cardiol. 2012;5:283.
- [16] Wang X, Song Y, Jacobi JL, Tuan RS. Inhibition of histone deacetylases antagonized FGF2 and IL-1beta effects on MMP expression in human articular chondrocytes. Growth Factors. 2009 Feb;27(1):40-9.
- [17] Nguyen MV, Lardy B, Rousset F, Hazane-Puch F, Zhang L, Trocme C, *et al.* Quinone compounds regulate the level of ROS production by the NADPH oxidase Nox4. Biochem Pharmacol. 2013;85:1644-54.

- [18] Lyle AN, Deshpande NN, Taniyama Y, Taniyama Y, Seidel-Rogol B, Pounkova L. Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2009;105:249-59.
- [19] Desai LP, Zhou Y, Estrada AV, Ding Q, Cheng G, Collawn JF, *et al.* Negative regulation of NADPH oxidase 4 by hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) protein. *J Biol Chem.* 2014; 26:18270-8.
- [20] Rousset F, Nguyen MV, Grange L, Morel F, Lardy B. Heme oxygenase-1 regulates matrix metalloproteinase MMP-1 secretion and chondrocyte cell death via Nox4 NADPH oxidase activity in chondrocytes. *PLoS One.* 2013;8:e66478.
- [21] XI G, Shen XC, Clemmons DR. Recruitment of Nox4 to a plasma membrane scaffold is required for localized reactive oxygen species generation and sustained Src activation in response to insulin-like growth factor-1. *J Biol Chem.* 2013;288:15641-53.
- [22] Rannou F, Sellam J, Berenbaum M. Physiopathologie de l'arthrose: conceptions actuelles. *Press med.* 2010;39:1159-63.
- [23] Adolphe M. Nouvelles stratégies dans les maladies du cartilage. Introduction. *Bull Acad Natl Med.* 2006;7:1383-4.
- [24] Goldring MB. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskel Dis.* 2012;4:269-85.
- [25] Hoff P, Buttgerit F. NADPH oxidase 4 represents a potential target for the treatment of osteoporosis. *Cell Mol Immunol.* 2014;11(4):317-9.
- [26] Khokha R, Murthy A, Weiss A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:649-65.
- [27] Gaudin P, Trocme C, Monier F, Zaoui P, Barro C, Polack B, *et al.* Protéolyse matricielle, protéolyse focalisée, et inflammation. *Ann Biol Clin.* 1998;56:661-9.
- [28] Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Zafarullah M. Inhibition of interleukin-1-stimulated kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappaB (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol.* 2002;21:251-62.
- [29] Kheradmand F, Werner E, Tremble P, Symons M, Werb Z. Role of rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science (New-York, NY).* 1998;280:898-902.
- [30] Finger F, Schörle C, Soder S, Zien A, Goldring MB, Aigner T. Phenotypic characterization of human chondrocyte cell line C-20/A4: a comparison between monolayer and alginate suspension culture. *Cells Tissues Organs.* 2004;178:65-77.
- [31] Rousset F, Hazane-Puch F, Pinosa C, Nguyen MVC, Grange L, Soldini L, *et al.* IL-1 β mediates MMP secretion and IL-1 β neosynthesis via regulation of p22^{phox} and Nox4 activity in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2015;23(11):1972-80.
- [32] Ambe K, Watanabe H, Takahashi S, Nakagawa T. Immunohistochemical localization of Nox1, Nox4 and Mn-SOD in mouse femur during endochondral ossification. *Tissue Cell.* 2014; 46:433-8.
- [33] Martin G, Andriamanalijaona R, Mathy-Hartert M, Henrotin Y, Pujol JP. Comparative effects of IL-1 β and hydrogen peroxide (H₂O₂) on catabolic and anabolic gene expression in juvenile bovine chondrocytes. *Osteoarthritis and cartilage/OARS, osteoarthritis Research Society.* 2005; 13:915-24.
- [34] Calich AL, Domiciano DS, Fuller R. Osteoarthritis: can anti-cytokine therapy play a role in treatment? *Clin Rheumatol.* 2010;5:451-5.
- [35] Chevalier X, Mugnier B, Bouvenot G. Targeted anti-cytokine therapies for osteoarthritis]. *Bull Acad Natl Med.* 2006;7:1411-20.

- [36] Czany G, Cifuentens-pagano E, Al Ghouleh I, Ranayhossaini DJ, Egana L, Lopez LR, *et al.* Nox2-B loop peptide, Nox2ds, specifically inhibits the NADPH oxidase Nox2. Free radic biol med. 2011;51:1116-25.
- [37] Champion Y, Jesaitis AJ, Nguyen MVC, Grichine A, Herenger Y, Baillet A, *et al.* New p22-phox monoclonal antibodies: identification of a conformational probe for Cytochrome b558. J Innate Immun. 2009;1:556-69.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec l'aide de l'UFR de Médecine, Université Joseph Fourier, Grenoble ; la fondation Arthritis Courtin, Paris ; la délégation à la recherche clinique et à l'innovation, DRCI, CHU-Grenoble ; la société Labrha, Lyon.

DISCUSSION

M. Daniel BONTOUX

Est-ce que dans le chondrocyte, l'intervention de Nox4 est une étape indispensable et incontournable pour l'activation des métalloprotéases ?

Nox4 est la seule NADPH oxydase exprimée dans les chondrocytes humains : elle génère O_2^-/H_2O_2 et les ROS qui en résultent. C'est l'unique voie enzymatique qui produit les ROS de façon professionnelle. Ces espèces réactives de l'oxygène peuvent cependant être générées de manière fortuite, à l'état basal, mais à faible taux, au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi environ 1 à 2 % du flux d'électrons pourrait être détourné dans la chaîne respiratoire et contribuer à la formation de O_2^- . Par contre, la suractivation de Nox4 par un stress cytokinique associé à des protéines inductibles, n'a d'effets que sur Nox4. Les ROS interviennent alors en aval des protéines kinases et phosphatases dans l'ultime étape de la transduction du signal, sur la modulation de facteurs de transcription régulés par l'état redox, en particulier, NF κ B ou AP-1 (c-fos /c-jun). Leur activation va conduire à la transcription des gènes codant dans les chondrocytes pour les collagénases MMP1, MMP13 et l'ADAMTS4. Ainsi dans la pathologie arthrosique, la surexpression de Nox4 contribue par les ROS qu'elle génère, à amplifier la dégradation cartilagineuse par les métalloprotéases matricielles activées.

Existe-t-il d'autres voies de signalisation susceptibles d'atténuer l'effet d'un inhibiteur de Nox4 si puissant soit-il ?

On est loin de connaître les mécanismes d'action des cibles proposées, directement ou non, comme des inhibiteurs potentiels de Nox4. Par ailleurs, les mécanismes mis en jeu dans l'activation et la régulation de Nox4 sont encore mal identifiés et impliquent des connaissances topologiques de Nox4/p22phox qui sont encore préliminaires. Toute molécule capable d'amplifier l'activité de Nox4 pourrait compenser l'effet d'un inhibiteur, mais encore faudrait-il connaître 1. la nature de l'inhibition de la réaction catalysée (compétitive, non compétitive, etc...), 2. le point d'impact de la molécule inhibitrice sur l'hétérodimère Nox4/p22phox. 3. Le mode d'administration de cet inhibiteur et ses

capacités à pénétrer dans les cellules. Par ailleurs l'association de tels inhibiteurs à celle de molécules directement impliquées dans une suractivation de Nox4 (par exemple NQO1, Poldip2, etc...) n'a pas encore été rapportée. Enfin il est clair que l'activation des métalloprotéases dépend pour une large part, des radicaux oxydant générés au sein de la cellule mais elle peut aussi résulter d'autres mécanismes associés à la réaction inflammatoire et conduisant à la surexpression de gènes spécifiquement impliqués. L'effet d'un inhibiteur de Nox4 sur la pathologie arthrosique est en cours d'investigation dans notre laboratoire sur un modèle murin.

Nox4 est la seule Nox active dans les chondrocytes humains, mais elle est ubiquitaire. En connaît-on assez sur le rôle physiologique qu'elle peut ou pourrait jouer et qui pourrait conduire à des effets indésirables dans un contexte d'inhibition et donc de perte de ses effets spécifiques ?

Le mode d'action des Nox et en particulier de Nox 4 dépend des cellules ou tissus dans lesquels ces oxydases sont exprimée. En effet on a pu montrer que l'activité de Nox4, la nature et la quantité des ROS générés et leur toxicité peuvent être différents d'une cellule à l'autre. Par ailleurs selon l'état physiopathologique des cellules, de la localisation subcellulaire des Nox, de la présence ou non de partenaires, une même protéine peut présenter des fonctions différentes voire opposées. Il existe aussi des formes variantes pour Nox4, certaines sont actives et d'autres non. Ces variants peuvent avoir une spécificité tissulaire et d'espèce. Enfin, à quelques exceptions près, dont les neutrophiles et les chondrocytes, les cellules expriment plusieurs Nox, avec pour certaines des effets redondants et pour d'autres des effets plus ciblés. Il est donc difficile à ce jour, d'affirmer qu'un inhibiteur de Nox4 dans les chondrocytes humains, proposé pour une thérapie potentielle de l'arthrose, ne puisse engendrer d'effets indésirables sur d'autres types cellulaires. Cependant, deux arguments seraient en faveur de l'inocuité d'un inhibiteur de Nox4 : l'absence de phénotype particulier chez les souris invalidées pour Nox4 et l'étude de phase I portant sur un inhibiteur de Nox4 n'ayant pas montré d'effets secondaires significatifs. Malgré tout, le rôle physiologique de Nox4 et le mode d'action des inhibiteurs, doivent être analysés en parallèle dans les cellules qui expriment majoritairement Nox4, en particulier les cellules vasculaires, les cellules endothéliales, et les cellules pancréatiques et rénales.

