

Université de Montréal

**IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES
PRINCIPAUX FRAGMENTS DE COLLAGÈNE DE
TYPE II DU CARTILAGE ÉQUIN, PRODUIT
IN VITRO PAR L'ENZYMÉ CATHEPSINE K**

par

Kathleen THÉROUX

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires

option sciences cliniques

Décembre 2010

© Kathleen Thérooux, 2010

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES
PRINCIPAUX FRAGMENTS DU COLLAGÈNE DE
TYPE II DU CARTILAGE ÉQUIN, PRODUIT
IN VITRO PAR L'ENZYME CATHEPSINE K**

présenté par
Kathleen THÉROUX

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pascal Vachon, président-rapporteur
Sheila Laverty, directeur de recherche
Francis Beaudry, codirecteur
Younès Chorfi, membre du jury

Résumé

La dégradation protéolytique du collagène de type II est considérée comme étant un facteur majeur dans le processus irréversible de dégradation de la matrice cartilagineuse lors d'ostéoarthrose. Outre les collagénases de la famille des métalloprotéinases de la matrice (MMP-1, -8, -13), la cathepsine K est parmi les seules enzymes susceptibles de dégrader la triple hélice intacte du collagène de type II, devenant ainsi un élément pertinent pour les recherches sur l'ostéoarthrose.

L'objectif à court terme de notre étude consiste en l'identification et la caractérisation de sites de clivage spécifiques de la cathepsine K sur le collagène de type II équin. La technique d'électrophorèse SDS-PAGE 1D permet la visualisation des produits de digestion et la validation des résultats de la caractérisation moléculaire des fragments protéolytiques. La caractérisation est réalisée en combinant la digestion trypsique précédant l'analyse HPLC-ESI/MS. Les résultats ont permis d'établir les sites, présents sur la carte peptidique de la molécule de collagène de type II équin, des 48 résidus prolines (P) et 5 résidus lysines (K) supportant une modification post-traductionnelle. De plus, 6 fragments majeurs, différents de ceux produits par les MMPs, sont observés par SDS-PAGE 1D puis confirmés par HPLC-ESI/MS, correspondant aux sites suivants : F₁ [G¹⁸⁹-K¹⁹⁰], F₂ [G²⁵²-P²⁵³], F₃ [P³²⁶-G³²⁷], F₄ [P⁴²⁸-G⁴²⁹], F₅ [P⁵⁶³-G⁵⁶⁴] et F₆ [P⁸²⁴-G⁸²⁵].

Le fragment F₁ nouvellement identifié suggère un site de clivage différent de l'étude antérieure sur le collagène de type II bovin et humain. L'objectif à long terme serait le développement d'anticorps spécifiques au site identifié, permettant de suivre l'activité protéolytique de la cathepsine K par immunohistochimie et ÉLISA, dans le cadre du diagnostic de l'ostéoarthrose.

Mots-clés : Cathepsine K, Cheval, Collagénase, Collagène de type II, HPLC-ESI/MS, Ostéoarthrose, Peptides

Abstract

The proteolytic degradation of type II collagen is believed to be mainly an irreversible event in the process of cartilage matrix degradation in osteoarthritis. Cathepsin K is the most active enzyme protease outside the matrix metalloproteinase (MMP) family (MMP 13, -8, -1) capable of degrading the intact triple helical type II collagen.

The short term objective of our study was to characterize the specific cleavage sites of CK on type II collagen. Our long term goal is to develop antibodies specific to these sites to develop biomarkers to detect its cleavage, for the early diagnosis of OA. Thus, in order to achieve our first goal, Cathepsin K cleavage of equine type II collagen was first examined by SDS-PAGE electrophoresis. Molecular characterization of proteolytic fragments, and therefore cleavage sites, was performed using tryptic digestion followed by LC-ESI/MS analysis to establish a comprehensive peptide map which was used as a template to identify specific proteolytic cleavage by cathepsin K. Comprehensive peptide mapping provided information on post-translational modifications and permitted the identification of 48 proline (P) and 5 lysine (K) residues that were subject to post translational modification. Six major fragments were observed on 1D SDS-PAGE and confirmed by HPLC-ESI/MS including F₁ [189-190], F₂ [252-253], F₃ [326-327], F₄ [428-429], F₅ [563-564] and F₆ [824-825]. The observed F₁ fragment showed that cleavage was three residues N-terminal to the site reported previously for bovine type II collagen.

These new findings will be used to develop new analytical methods to quantify biomarkers associate to equine type II collagen degradation in osteoarthritis patient and/or to support the development of new treatments.

Key words : Cathepsin K, Collagenase, Horse, HPLC-ESI/MS, Osteoarthritis, Peptides,
Type II collagen

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	V
Liste des tableaux.....	X
Liste des figures.....	xi
Liste des sigles et des abréviations.....	xv
Dédicace.....	xviii
Remerciements.....	xix
Introduction.....	1
Premier chapitre : Recension de la littérature.....	3
1.1 Le cheval comme modèle pour l'ostéoarthrose	3
1.2 Anatomie de l'articulation synoviale.....	3
1.2.1 La membrane synoviale	5
1.2.2 Le liquide synovial	5
1.2.3 L'os sous-chondral	6
1.2.4 Le cartilage hyalin	6
1.3 La matrice du cartilage articulaire.....	6
1.3.1 Les chondrocytes.....	7
1.3.2 Le collagène.....	7
1.3.2.1 Le collagène de type II.....	8
1.3.3 Les aggrécans	10

1.3.4	Autres protéines et molécules	11
1.4	L'ostéoarthrose	12
1.4.1	Changements macroscopiques du cartilage articulaire lors d'OA.....	13
1.4.2	Changements histologiques du cartilage articulaire lors d'OA	14
1.5	Déséquilibre de l'homéostasie du cartilage articulaire	15
1.5.1	Homéostasie	15
1.5.2	Phénomènes anaboliques	16
1.5.3	Phénomènes cataboliques.....	17
1.5.4	Les protéases du cartilage.....	18
1.6	La cathepsine K.....	23
1.6.1	Caractérisation de l'enzyme.....	23
1.6.2	Activité physiologique et pathologique.....	25
1.6.3	Dégradation des glycosaminoglycanes (GAG's).....	26
1.6.4	Dégradation du cartilage par la cathepsine K.....	26
	Deuxième chapitre : Techniques analytiques.....	29
2.1	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide 1D	29
2.1.1	Principe de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide 1D	29
2.1.2	Matériel électrophorétique	29
2.1.3	Le gel de polyacrylamide	30
2.1.4	Préparation de l'échantillon	31

2.1.5 La coloration de gel de polyacrylamide	33
2.1.5.1 Le bleu Coomassie	33
2.1.5.2 Le nitrate d'argent	33
2.2 Analyse par HPLC et spectrométrie de masse.....	35
2.2.1 Chromatographie liquide à haute performance.....	35
2.2.2 La spectrométrie de masse	37
2.2.3 Déconvolution des résultats HPLC-ESI/MS et corrélation de séquences d'aa	41
2.2.4 Stratégie alternative.....	41
2.2.4.1 Stratégie alternative.....	42
2.2.5 Analyse en mode de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).....	42
2.3 Hypothèse et objectifs.....	45
2.3.1 Problématiques de l'étude.....	45
2.3.2 Hypothèse.....	45
2.3.3 Les objectifs.....	46
Troisième Chapitre : Article.....	47
3.1 Abstract.....	49
3.2 Introduction.....	50
3.3 Materials and methods.....	54
3.3.1 Materials.....	54
3.3.2 Digestion of native equine Collagen type II by CK.....	54
3.3.3 SDS-PAGE electrophoresis.....	55

3.3.4 Tryptic Digestion	56
3.3.5 Peptids analysis	56
3.3.6 Chromatographic conditions.....	56
3.3.7 Mass spectrometry.....	57
3.3.8 Peptide mapping and identification of CK cleavage sites.....	57
3.4 Results and discussion.....	58
3.4.1 Digestion of native equine Collagen type II by CK.....	58
3.4.2 Peptide mapping of native equine Collagen type II.....	58
3.4.3 Identification of non tryptic peptide in helical equine Collagen type II sample digested by CK.....	59
3.4.4 Molecular characterization of the principal proteolytic Fragment (F ₁).....	59
3.5 Conclusion.....	60
3.6 References.....	62
3.7 Figures legends.....	66
3.8 Table legends.....	67
Quatrième chapitre : Discussion.....	73
4.1 Étude préliminaire de la digestion du collagène de type II natif équin par la CK.....	73
4.2 Étude de la digestion du collagène de type II natif équin par la CK.....	73
4.3 Étude de la spécificité des sites de la digestion de la CK comparativement à ceux de la MMP 13.....	75
4.4 Cartographie des peptides provenant du collagène de type II natif équin.....	76

4.5 Identification des fragments produits par l'activité protéolytique de la CK sur le collagène de type II équin	77
4.6 Caractérisation moléculaire du principal fragment protéolytique (^E F ₁).....	77
4.7 Investigation sur l'homologie et la spécificité d'un potentiel biomarqueur	80
4.8 Études futures	81
Cinquième chapitre: Conclusion.....	82
Bibliographie.....	I
Annexes	X
Annexe 1.....	X
Annexe 2.....	XI

Liste des tableaux

Premier chapitre : Recension des écrits

Tableau I.I :	Présentation des quatre sous-groupes de la famille des MMPs ayant un rôle dans la dégradation des constituants du cartilage	21
----------------------	---	----

Deuxième chapitre : Techniques analytiques

Tableau II.I :	Concentration de gel de polyacrylamide nécessaire pour la séparation distincte des protéines dépendamment de leur poids moléculaire.	32
-----------------------	--	----

Liste des figures

Premier chapitre : Recension des écrits

- Figure 1.1 :** Anatomie de l'articulation métacarpo-phalangienne d'un membre thoracique équin (Photo du laboratoire de Dre Laverty). 4
- Figure 1.2 :** Voies intracellulaire et extracellulaire de la synthèse des molécules de collagène de type I (similaire au type II). A) Les voies intracellulaires et extracellulaires de la synthèse des molécules de collagène de type I (image modifiée d'après : Van Der Rest M, 1991) et B) Liaisons entre les collagènes de type II, IX et XI (Eyre *et al.*, 2006). 9
- Figure 1.3 :** Agencement moléculaire et structural de la matrice du cartilage (image modifiée de Poole *et al.*, 2001). 12
- Figure 1.4 :** Coupes histologiques de cartilage articulaire métacarpien équin sain (A), près d'une lésion (B) et dans la lésion (C) d'OA, colorées avec Safranine O-Fast Green et Picrosirius red (image tirée de Vinardell *et al.*, 2009). 15
- Figure 1.5 :** Voie catabolique d'une molécule de collagène de type II clivée par des collagénases, tel que MMP-13. Les collagénases clivent dans la région hélicoïdale suivie par des clivages secondaires par d'autres MMPs. Ainsi que le suivi de la formation des épitopes sont libérés suivant l'activité des collagénases (biomarqueurs). 22

- Figure 1.6 :** Représentation graphique à ruban de la CK. Image provenant de la banque de données : Protein data bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). 24
- Figure 1.7 :** Image de gel de polyacrylamide avec fragments produits lors de la digestion du collagène de type I par la CK (20nM) en présence de molécules de C4S (20nM) (image modifiée de Selent *et al.*, 2007) 28
- Figure 1.8 :** Images des gels de 6% SDS-PAGE avec fragments produits lors de la digestion du collagène de type II (20µM) par différentes enzymes. Ligne 1: collagène de type II. Ligne 2: collagène clivé par la CK (100nM). Ligne 3: collagène clivé par les MMP-13. 28
- (A) Détection d'un épitope CB11B à l'aide d'un anticorps COL2-3/4m, sur gel de 6% SDS-PAGE. (B) Détection d'un épitope AH11L3 en N-terminal du collagène de type II, sur. (C) Détection d'un épitope AH9L2 en C-terminal du collagène de type II, sur gel de 12% SDS-PAGE.

Deuxième chapitre : Techniques analytiques

- Figure 2.1 :** Le matériel électrophorétique a) dispositif d'électrophorèse à l'horizontale b) dispositif d'électrophorèse à la verticale c) un générateur de courant continu « *power supply* » (Bio Rad laboratory). 30
- Figure 2.2 :** Addition d'acrylamide $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ et de méthylène bis acrylamide $(\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH})_2\text{CH}_2$, formant un réseau de polymérisation, le gel (image modifiée d'internet http://www.nationaldiagnostics.com/article_info.php/articles_id/6). 32

Figure 2.3 :	Exemple de gradient de phase mobile pour HPLC (Laboratoire de Dr Beaudry).	36
Figure 2.4 :	Exemple de chromatogramme de masse ESI-MS; balayage complet du spectre de la Substance P (Laboratoire de Dr Beaudry).	37
Figure 2.5 :	Visualisation du champ électrique de la section de l'électrospray (électronébulisation).	40
Figure 2.6 :	Mécanisme d'ionisation et désorption par électrospray (électronébulisation).	40
Figure 2.7 :	Schéma de la stratégie d'identification des positions de clivages par l'utilisation de la digestion trypsique.	43
Figure 2.8 :	Patron de fragmentation CID typique des peptides.	44

Troisième chapitre : Article

Figure 3.1 :	Analysis of <i>in vitro</i> digestion of native equine type II collagen by CK (350nM) using a 6% SDS PAGE gel. 1. MW ladder, 2. Native Equine type II collagen and 3. Equine type II collagen digested 24h by CK.	67
Figure 3.2 :	Identification strategy used to reveal specific proteolysis fragments of equine type II collagen digested by CK.	68
Figure 3.3 :	CK primary cleavage site in bovine type II collagen and sequence alignment of corresponding human and equine sequences (Bornstein and Sage 1980; Richardson et Dodge, 1997)	69

- Figure 3.4 :** Typical collision-induced peptide fragmentation pattern observed with tandem mass spectrometry (MS). This figure illustrates the accepted nomenclature for peptide fragment ions. 70
- Figure 3.5 :** CID Spectrum of proteolytic fragment KPGKSGERGPGPQGAR [190-206] at m/z 847 $[M+2H]^{2+}$ 71
- Figure 3.6 :** CID Spectrum of proteolytic fragment F1' ; GPP(OH)GPP(OH)GKPGDDGEAG [174-189] at m/z 719 $[M+2H]^{2+}$ 72

Liste des sigles, code et des abréviations

A	Alanine (Ala)
Aa	<i>Acide aminé</i>
ADAMTs	<i>A disintegrin and a metalloproteinase with thrombospondin motifs</i> – Désintégrine et métalloprotéases avec un motif thrombospondin
C	Cystéine (Cys)
C1,2C	<i>Collagenase cleavage of type I collagen as well as type II collagen</i> – Clivage par les collagénases du collagène de type I et II
C2C	<i>Collagenase cleavage of type II collagen</i> – Clivage par les collagénases du collagène de type II
CK	Cathepsine K
CTX-II	<i>C-terminal crosslinked telopeptide of type II collagen</i> – Télopeptide C-terminal du collagène de type II
C4S et C6S	<i>Chondroitin (4 and 6) Sulfate</i> – Sulphates de chondroïtine 4 et 6
D	Aspartate (Asp)
E	Glutamate (Glu)
ESI	<i>Electrospray ionisation</i> – Ionisation par électrospray (électronébulisation)
F	Phénylalanine (Phe)
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> – Facteur de croissance des fibroblastes
G	Glycine (Gly)
GAG(s)	<i>Glycosaminoglycan(s)</i> – Glycosaminoglycane(s)
H	Histidine (His)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> – Chromatographie liquide à haute performance

I	Isoleucine (Ile)
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor 1</i> – Facteur de croissance insulino-mimétique de type I
IL-1 α (β), (6, 8, 10)	<i>Interleukin-1 alpha (bêta)</i> – Interleukine-1 alpha (bêta) et (6, 8, 10)
K	Lysine (Lys)
L	Leucine (Leu)
M	Méthionine (Met)
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> – Métalloprotéinase de la matrice
MS	<i>Mass Spectrometry</i> – Spectrométrie de masse
MT-MMP	<i>A membrane-type MMP</i> – Type de MMP dans la membrane
N	Asparagine (Asn)
NC-IUBMB	Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology – Comité de nomenclature de l'union internationale de biochimie et de biologie moléculaire
OA	<i>Osteoarthritis</i> – Ostéoarthrose
P	Proline (Pro)
P_(OH)	Prolines hydroxylées
PGE₂	<i>Prostaglandin E₂</i> – Prostaglandine E ₂
Q	Glutamine (Gln)
R	Arginine (Arg)
S	Sérine (Ser)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> – Électrophorèse sur gel d'acrylamide de sulfate dodécylique de sodium

T	Thréonine (Thr)
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i> – Facteur de croissance transformant beta
TIINE	<i>Type II collagen neoepitope</i> – Néo-épitope du collagène de type II
TIMPs	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i> – Inhibiteur de métalloprotéinase tissulaire
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> – Facteur de nécrose tumorale alpha
V	Valine (Val)
V	Volt
W	Tryptophane (Trp)
Y	Tyrosine (Tyr)

À ma grand-mère : Réjanne Roy

*«Il n'y a pas de mauvaises ou de bonnes expériences,
que des situations pour nous faire grandir»*

Réjanne Roy

Remerciements

Au Dre Sheila Laverty, *directrice*

Merci de m'avoir offert cette place au sein de votre groupe de recherche et pour la patience dont vous avez fait preuve envers moi. J'ai beaucoup appris, tant sur le monde vétérinaire et de la recherche, que sur moi-même. Vous représentez un modèle d'intégrité et de rigueur.

À Francis Beaudry, *codirecteur*

Mille mercis pour tout, particulièrement pour votre présence, votre appui, votre écoute et pour le partage de vos connaissances.

À Hélène Richard, Nadine Bouchard, ainsi qu'à mes coéquipier(ère)s de local (Céline Bourzac, Catherine Ferland, Pascal Fontaine, Marie-Pier Binette et Colombe Otis)

Merci pour votre présence, votre aide de tout genre, les bonnes discussions et la bonne humeur que vous apportiez. Bonne continuation à tous.

Au Dr John Mort et Dr Poole

Merci pour votre écoute et vos idées, afin de mener à bien cette recherche.

À ma famille et ami(e)s : ma mère Carole Couture, Patrick Allard, Annie Couture et Laurence Hablani

Merci pour votre soutien, votre présence et vos encouragements.

Aux donateurs des bourses : la FMV, Vétoquinol et le CAN

Merci, car grâce à votre soutien financier, j'ai pu améliorer ma qualité de vie lors de cette étude

Introduction

L'ostéoarthrose (OA) est une maladie articulaire chronique, dégénérative, complexe et caractérisée par des changements affectant la totalité des tissus de l'articulation, y compris une dégradation progressive et irréversible du cartilage. Elle se manifeste le plus souvent par de l'inflammation et des douleurs articulaires d'intensités variables, ainsi qu'une perte de la mobilité (Sharma et Kapoor, 2007). Chez les humains, elle mène à une diminution de la qualité de vie (Caron, 2003; Sharma et Kapoor, 2007).

Il a été estimé que plus de 80% de la population humaine âgée de 55 à 65 ans serait atteinte d'OA, symptomatique ou non (Sharma et Kapoor, 2007). Cette pathologie est également observée chez d'autres mammifères, comme le chien, le chat et plus particulièrement chez les chevaux (Céleste *et al.*, 2005). Chez les chevaux de compétition, l'OA est très fréquemment responsable d'une diminution de leur performance et de leur retrait prématuré dû à des boiteries chroniques (Caron, 2003; Riggs, 2006). Ceci se traduit par des pertes économiques importantes pour l'industrie équestre (Goodrich et Nixon, 2006). Selon certains chercheurs, nous retrouvons plusieurs similitudes entre le cheval et l'humain au niveau des composants de la matrice cartilagineuse articulaire et de ses mécanismes de guérison (Richardson et Dodge, 1997; Frisbie *et al.*, 2006; Frisbie *et al.*, 2007). Le cheval peut donc être un modèle intéressant pour l'expérimentation et la recherche sur l'OA (Frisbie *et al.*, 2006).

L'une des hypothèses émises concernant le déclenchement du processus dégénératif de la matrice du cartilage, caractéristique de l'OA, serait la conséquence d'un déséquilibre de l'homéostasie métabolique favorisant les voies cataboliques dans ce tissu (Sharma et Kapoor, 2007). Ce dérèglement causerait une augmentation de l'expression de certaines protéases entraînant la dégradation des composants essentiels du cartilage articulaire et engendrant à long terme des dommages irréversibles (Caron, 2003; Jones *et al.*, 2008).

La matrice cartilagineuse articulaire est principalement composée de collagène de type II, qui est l'un des composants responsable de sa résistance aux forces mécaniques (Meyer et Wiesmann, 2006). La dénaturation du collagène de type II, causée par l'action des protéases, est associée à un affaiblissement de la structure matricielle et est considérée comme étant un évènement clé dans le processus irréversible de dégradation de la matrice

cartilagineuse, lors d'OA (Dodge et Poole, 1989; Garnero, 2007). La molécule de collagène de type II est composée d'une triple hélice normalement résistante à dégradation protéolytique. Cependant, seulement certaines enzymes ont la capacité de dégrader cette protéine sous sa forme intacte. Les collagénases (MMP-1, -8, -13) de la famille des MMPs sont capable d'initier le premier clivage de la molécule du collagène de type II (Caron, 2003; Garnero, 2007). La cathepsine K (CK), une enzyme présente chez les vertébrés, est aussi susceptible de dégrader, *in vivo*, la molécule intacte de collagène de type II (Kafienah *et al.*, 1998; Vinardell *et al.*, 2008). Selon la littérature, les deux joueurs principaux de la dégradation du collagène de type I et II, lors de pathologies de l'articulation, seraient certains MMPs et la CK (Salminen-Mankonen *et al.*, 2007). De plus, une étude a bien démontré que la CK était effectivement active dans le processus de dégradation du cartilage articulaire équin (Vinardell *et al.*, 2008). L'action de la MMP-13 sur le collagène de type II a largement été étudiée ces dernières décennies (Tardif *et al.*, 2004; Sumer *et al.*, 2006). Par contre, le mécanisme d'action de la CK sur le collagène de type II est peu connue (Salminen-Mankonen *et al.*, 2007).

L'objectif de cette étude est d'identifier et de caractériser, *in vitro*, les fragments les plus abondamment produits par l'activité enzymatique de la CK sur le collagène de type II équin. Une investigation approfondie du profil catabolique du collagène de type II par la CK pourrait mener à une éventuelle identification d'un néoépitope : celui-ci pouvant être un biomarqueur spécifique de l'activité enzymatique de la CK et identifié, ou retrouvé, dans le liquide synovial, dans l'urine ou les tissus (Voet et Voet, 1995). L'identification d'un biomarqueur spécifique à l'activité de CK pourrait, potentiellement, permettre l'établissement d'un test ELISA quantitatif. Ce qui pourrait permettre un suivi métabolique en réponse à un agent thérapeutique, de fournir un pronostic approprié ainsi que des diagnostics précoces d'OA (Sumer *et al.*, 2006).

Premier chapitre : Recension de la littérature

1.1 Le cheval comme modèle pour l'ostéoarthrose

La recherche sur les problèmes médicaux humains se fait régulièrement par l'utilisation d'animaux comme modèles. En effet, la souris, le rat, le lapin, le chien et le cheval ont tous été employés comme modèles expérimentaux pour l'étude de l'OA (Céleste *et al.*, 2005; Bouchgua *et al.*, 2008; Poole *et al.*, 2010).

Le cheval n'est pas un modèle expérimental d'OA fréquemment utilisé (McIlwraith, 1996). Pourtant, certaines de ses caractéristiques articulaires sont semblables à celles de l'homme. Il y a une homologie de la séquence d'acides aminés (aa) du collagène de type II de 97% entre les deux espèces, de même que des similitudes au niveau de la physiologie, le mécanisme de réparation tissulaire, ainsi que la physiopathologie du cartilage, dont celui de la progression de l'OA (Frisbie, Cross et McIlwraith., 2006; Frisbie *et al.*, 2007).

De tous les modèles animaux, l'épaisseur du cartilage articulaire du fémur distal équin se rapproche le plus de l'humain (Frisbie, Cross et McIlwraith, 2006). L'observation arthroscopique est aussi facilitée par la grosseur de l'articulation équine comparativement aux autres modèles utilisés. Enfin, l'une des articulations les plus atteintes par l'OA chez les chevaux, est celle du boulet, et celle-ci correspond à l'articulation métacarpo-phalangienne chez l'homme, qui est régulièrement atteinte par cette maladie (Cantley et al, 1999; Cruz et Hurting, 2008). Ces données représentent des arguments justifiant l'utilisation de l'articulation équine comme modèle d'étude sur l'OA.

1.2 Anatomie de l'articulation synoviale

Une articulation synoviale est une organisation tissulaire qui relie des extrémités osseuses adjacentes. Elle permet des mouvements variés et lors d'un choc, de distribuer les forces mécaniques subies sur les différentes structures de l'articulation, afin de diminuer l'impact global (Todhunter, 1996; Marieb et Hoehn, 2007).

La figure 1.1 représente une articulation constituée des extrémités osseuses recouvertes d'une fine couche de cartilage hyalin. Ce dernier baigne dans un liquide synovial, à l'intérieur d'une cavité tapissée par la membrane synoviale et stabilisée par les

ligaments de la capsule fibreuse (Frisbie, 2006; Marieb et Hoehn, 2007). Les propriétés de chacun des composants de l'articulation sont responsables de la fluidité des mouvements et de la capacité à résister aux différentes contraintes mécaniques. Cependant, ce sont les attributs du cartilage qui jouent un rôle primordial parmi les constituants (Todhunter, 1996; Frisbie, 2006; Marieb et Hoehn, 2007).

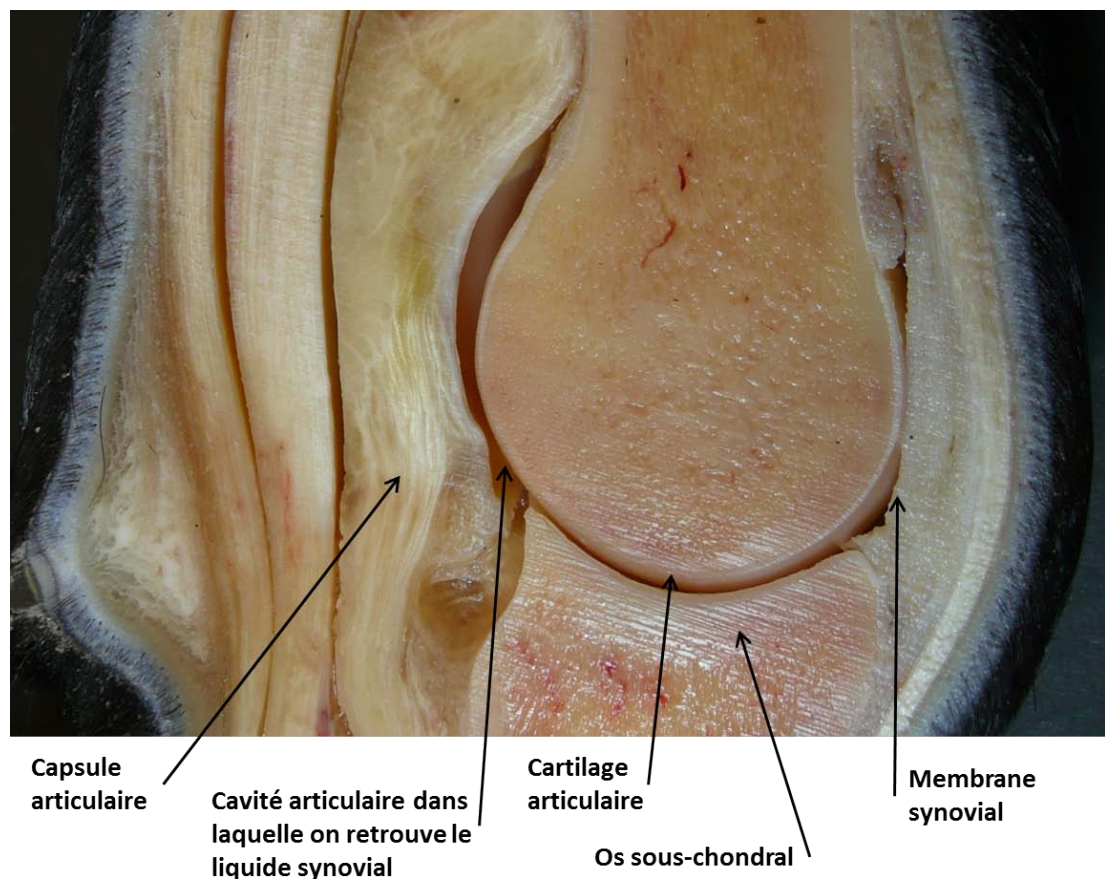


Figure 1.1 : Anatomie de l'articulation métacarpo-phalangienne d'un membre thoracique équin (Photo du laboratoire de Dre Laverty).

1.2.1 La membrane synoviale

La membrane synoviale possède des propriétés structurales qui lui permettent non seulement de résister aux forces hydrauliques, mais aussi de gérer les phénomènes osmotiques dans l'articulation (Todhunter, 1996). Elle est composée de deux couches, la sous-intimale qui est constituée d'un tissu conjonctif gras bien vascularisé et innervé (Leeson et Leeson, 1980; Frisbie, 2006). Cette couche est responsable de l'immunité articulaire car elle gère le passage des monocytes, macrophages et lymphocytes présents dans le sang vers le liquide synovial. En conséquence, lors d'inflammation, il y a augmentation de la perméabilité membranaire, permettant un accès facilité aux cellules du système immunitaire vers l'intérieur de l'articulation (McIlwraith, 1996; Dewire et Einhorn, 2001). La seconde couche, l'intima, tapisse la surface interne de la membrane et elle est composée d'une à quatre couches de cellules synoviales (synoviocytes) de type A, B et C (Dewire et Einhorn, 2001; Frisbie, 2006). Les synoviocytes de type A sont responsables des fonctions phagocytaires. Les cellules de type B produisent des macromolécules composant le liquide synovial. Les synoviocytes de type C seraient l'intermédiaire entre les synoviocytes de type A et B, et leur rôle est moins bien connu (Dewire et Einhorn, 2001; Frisbie, 2006).

1.2.2 Le liquide synovial

Le liquide synovial agit comme lubrifiant de la cavité articulaire. Il est composé de plasma filtré par la membrane synoviale et il a un pH physiologique de 7.1 +/- 0.4 (Konttinen *et al.*, 2002). Le liquide synovial est constitué, entre autres, d'eau, d'électrolytes, de protéines, de glycoprotéines, d'acide hyaluronique, de lubricine et de phospholipides (Frisbie, 2006; Altman, 2007). Mais ce sont les concentrations en acide hyaluronique et en lubricine qui sont principalement responsables de la viscosité et de la réduction de la friction entre les surfaces (Frisbie, 2006). C'est grâce à la diffusion du liquide synovial au travers de la membrane synoviale qu'il y a distribution des nutriments et

des médiateurs cellulaires aux chondrocytes, de même que l'évacuation des déchets cellulaires (Todhunter, 1996; Dewire et Einhorn, 2001; Caron, 2003; Meyer et Wiesmann, 2006).

1.2.3 L'os sous-chondral

L'os sous-chondral forme une fine plaque de tissu osseux, entre la zone du cartilage articulaire et l'os épiphysaire. L'os sous-chondral permet de fournir un support structural et une stabilité au cartilage articulaire. Il joue un rôle dans la distribution mécanique des forces absorbées (Frisbie, 2006; Todhunter, 1996). Cette région osseuse est considérée comme étant, elle aussi, une porte d'entrée pour les nutriments. Il est donc impliqué dans le métabolisme des cellules de la membrane synoviale et du cartilage articulaire, telles les chondrocytes (Frisbie, 2006; Hulejova *et al.*, 2007; Sandell, Heinegard et Hering., 2007).

1.2.4 Le cartilage hyalin

Le cartilage articulaire en santé apparaît lisse et solide, d'un blanc opaque rosâtre, présent à la surface de l'os sous-chondral (Meyer et Wiesmann, 2006). Il est constitué d'une matrice où résident les chondrocytes. Cette matrice est non vascularisée et non innervée. Ceci explique l'importance de l'apport nutritionnel par diffusion de la membrane synoviale et de l'os sous-chondral, afin de subvenir aux besoins des cellules présentes dans le cartilage (Meyer et Wiesmann, 2006).

1.3 La matrice du cartilage articulaire

La matrice extracellulaire du cartilage présente une architecture composée de différentes combinaisons de molécules. L'abondance de ces composants varie en fonction de leur localisation spatiale dans l'articulation, de l'âge et de l'espèce de l'animal (Todhunter, 1996; Meyer and Wiesmann, 2006). Chez le cheval, comme chez l'homme, le

cartilage mature est constitué d'environ 70% d'eau, de molécules de collagène, des aggrécans, des protéoglycanes, des glycoprotéines ainsi que plus de 400 autres protéines distinctes (Todhunter, 1996; Meyer and Wiesmann, 2006; Wu *et al.*, 2007). Par ailleurs, les chondrocytes, les cellules responsables de cette organisation matricielle, y sont retrouvées de façon clairsemée. L'ensemble forme une organisation complexe qui contribue à l'efficacité des propriétés caractéristiques de l'articulation synoviale (Hay, 1982).

1.3.1 Les chondrocytes

Le chondrocyte est le seul type cellulaire présent dans le cartilage. Les chondrocytes occupent de façon hétérogène entre 2 à 5% de la matrice cartilagineuse mature. Ils ont la capacité de synthétiser et de dégrader les composants de la matrice, afin de maintenir l'intégrité de celle-ci (Poole *et al.*, 2001; Caron, 2003). Le métabolisme des chondrocytes peut être influencé par plusieurs types de stimuli intrinsèques et extrinsèques, afin de maintenir l'homéostasie de l'environnement cartilagineux. L'homéostasie correspond à l'équilibre entre les phénomènes de synthèse (anabolisme) et de dégradation (catabolisme), afin que l'un n'excède pas l'autre, tout en permettant un renouvellement des composants matriciels altérés (Caron, 2003; Meyer et Wiesmann, 2006). Par contre, étant donnée la nature anaérobie prédominante de la matrice, la vitesse du métabolisme des chondrocytes est évaluée à environ 2% d'une cellule normalement vascularisée (Todhunter, 1996). La synthèse du collagène de type II (figure 1.2), des aggrécans ainsi que de certaines enzymes cataboliques sont des sujets qui seront plus amplement discutés ultérieurement (section 1.5).

1.3.2 Le collagène

Le collagène est une protéine extracellulaire représentant environ 60% du poids sec de la matrice du cartilage articulaire mature (Voet et Voet, 1995; Eyre, 2002). Les différents types de collagènes retrouvés dans la matrice cartilagineuse sont de types II, III,

VI, IX, X, XI, XII et XIV (Poole *et al.*, 2001; Eyre *et al.*, 2006;). Le collagène de type II représente environ 90% de la composition en collagène total de la matrice cartilagineuse (Todhunter, 1996), alors que le collagène de type IX et XI occupe respectivement environ 1% et 3% du cartilage adulte (Eyre *et al.*, 2006). Les autres types de collagène sont présents à des pourcentages inférieurs de 1% (Eyre, 2002; Poole, 2004). La partie matricielle du cartilage est principalement composée de copolymère de collagène de type II, IX et XI avec d'autres molécules (Eyre, 2002) (figure 1.2).

1.3.2.1 Le collagène de type II

Le collagène de type II est une glycoprotéine hélicoïdale composée de trois chaînes polypeptidiques identiques, enchevêtrées et tressées, pour former une triple hélice de pas droit (Hay, 1982; Voet et Voet, 1995). Le collagène de type II est une molécule, un monomère, représenté par le symbole $([\alpha_1(\text{II})]_3)$ (Hay, 1982). La chaîne native est composée de 1487 aa chez l'espèce humaine et bovine et de 1418 aa chez l'espèce équine (Su *et al.*, 1989; Richardson et Dodge, 1997). Elles sont caractérisées par la répétition d'un triplet d'aa Gly-X-Y, où le X est une proline et le Y une hydroxyproline, dans 13% et 9% des cas, respectivement. (Voet et Voet, 1995; Hay, 1982).

Le collagène de type II est synthétisé et sécrété par les chondrocytes (Hay, 1981) (figure 1.2). Cependant, avant d'être sécrété, le collagène doit subir quelques modifications post-traductionnelles afin de stabiliser la protéine. En effet, il y aura hydroxylation de quelques résidus proline et lysine, ainsi que quelques glycosylations sur certains résidus lysines hydroxylés et portera le nom de procollagène (Hay, 1982; Voet et Voet, 1995; Todhunter, 1996). Une fois les chaînes assemblées, cette néo-protéine est composée de trois domaines; deux domaines globulaires aux extrémités (amino et carboxyl terminal) ainsi qu'un domaine central, la partie hélicoïdale (figure 1.2). Ces trois chaînes sont retenues par quelques ponts disulfures situés dans les domaines globulaires, alors que dans la partie hélicoïdale, elles sont retenues par des forces de Van der Waals et des ponts hydrogènes (Pelmont, 1995; Voet et Voet, 1995).

Une fois sécrétés dans la matrice, les domaines globulaires amino (N) et carboxy (C) terminaux seront clivés, par les procollagènes peptidases pour former la molécule de tropocollagène (Hay, 1981; Todhunter, 1996) (figure 1.2). Cette modification extracellulaire permet les réticulations, le rassemblement longitudinal et transversal de plusieurs tropocollagènes, afin de former une structure quaternaire complexe, rigide et peu soluble, nommée fibrille, fibre de collagène ou collagène mature (figure 1.2) (Voet et Voet, 1995). Fibrille est le nom donné aux fibres de collagène n'étant pas observables au microscope optique (Van Der Rest et Garrone, 1991). Les molécules de collagène sont retenues ensemble par des liens covalents hydroxypyridinines situés aux extrémités des domaines hélicoïdaux, ainsi que des liens de réticulation des résidus lysine (Voet et Voet, 1995). D'ailleurs, les zones hydrophobiques de la partie hélicoïdale des molécules s'attirent entre elles, ce qui confère à la structure une stabilité, une rigidité et une résistance importante aux protéases (Voet et Voet, 1995; Poole *et al.*, 2001). Par contre, les fibrilles de collagène nouvellement formées lors du processus de réparation ne présentent pas exactement les mêmes propriétés que celles générées lors du processus de croissance. Elles sont plus fragiles et moins résistantes à la dégradation enzymatique (Sandell, Heinegard et Hering., 2007).

Diverses ramifications de collagène de type IX et XI se lient à la structure quaternaire des fibres de collagène par des liens covalents en plus de quelques autres protéines et molécules du cartilage (figure 1.2). Ceci démontre la complexité du réseau fibrillaire présent dans la matrice (Poole *et al.*, 2001; Meyer and Wiesmann, 2006). Cette organisation tridimensionnelle complexe est un élément clé de sa résistance générale aux enzymes protéolytiques et de la capacité d'absorption des chocs par le cartilage (Poole *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2010).

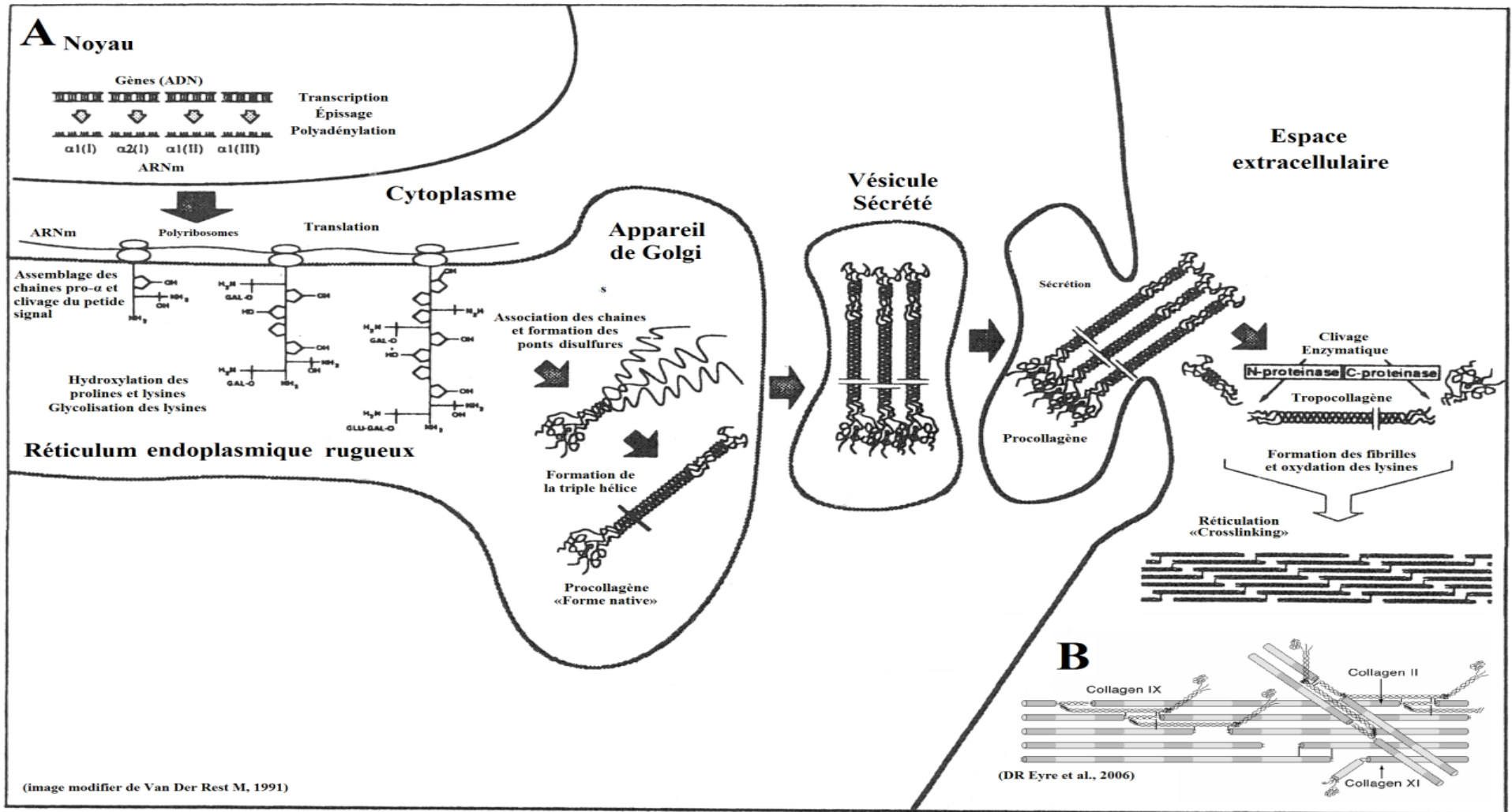


Figure 1.2 La voie intracellulaire et extracellulaire de la synthèse des molécules de collagène de type I (similaire pour type II). A) Les voies intracellulaires et extracellulaires de la synthèse des molécules de collagène de type I (image modifiée d'après : Van Der Rest M, 1991) et B) Liaisons entre les collagènes de type II, IX et XI (Eyre *et al.*, 2006).

1.3.3 *Les agrécanes*

Les agrécanes représentent plus de 85% des protéoglycanes du cartilage articulaire, ce qui correspond à environ 25% du poids sec de la matrice (Poole, 1986; Frisbie, 2006). Par contre, l'abondance des agrécanes dans la matrice varie en fonction de l'âge de l'individu et de sa localisation spatiale dans l'épaisseur du cartilage (Meyer et Wiesmann, 2006). Ces macromolécules d'environ 200 kDa, de la famille des protéoglycanes, sont constituées de glycosaminoglycanes (GAGs) liées à une protéine centrale, assemblées sous une forme de goupillon. Les agrécanes sont unis par des liaisons non-covalentes (forces de Van der Waals, ioniques et d'hydrogènes) aux fils d'acide hyaluronique qui passent entre les molécules de collagène de type II et des autres protéines (Poole, 1986; Zhu et al, 1996; Meyer et Wiesmann, 2006) (figure 1.3). Les agrécanes sont des molécules chargées négativement, ce qui leur donne une grande capacité de rétention des molécules d'eau. Ceci joue un rôle prédominant dans l'aptitude de la structure à supporter diverses forces de compressions. (Knudson et Knudson, 2001; Meyer et Wiesmann, 2006).

1.3.4 *Autres protéines et molécules*

D'autres types de protéoglycanes moins complexes et autres petites protéines composent la matrice extracellulaire (Poole *et al.*, 2001). Jusqu'à présent, un peu plus de 400 protéines extra-matriciellees distinctes ont été identifiées dans le cartilage articulaire (Wu *et al.*, 2007).

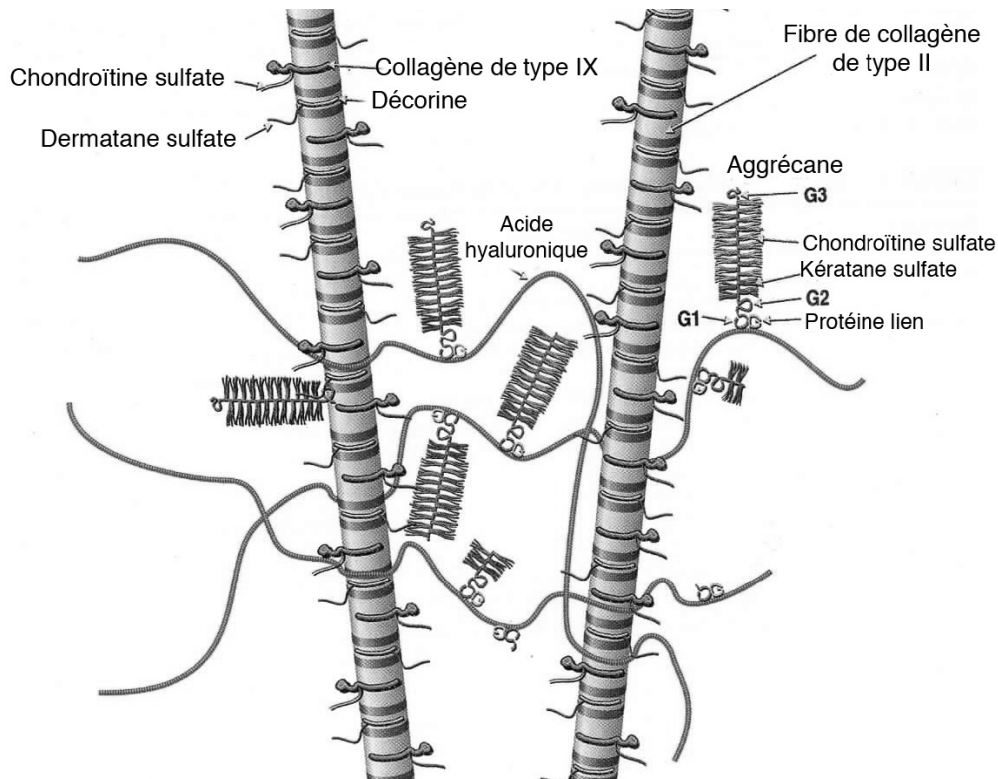


Figure 1.3 : Agencement moléculaire et structural de la matrice (image modifiée de Poole *et al.*, 2001).

1.4 L'ostéoarthrose

L'OA est une affection musculo-squelettique chronique très répandue, tant chez l'homme que chez les autres animaux, et plus particulièrement chez les chevaux (Frisbie, 2006; Sharma et Kapoor, 2007). Près de 80% de la population humaine âgée d'au moins 65 ans en serait affectée de façon clinique ou non. Ce qui représente plus de 20 millions d'Américains, et en fait la forme la plus répandue d'arthrite (Sharma et Kapoor, 2007). Malgré le fait que cette maladie soit associée au vieillissement, elle peut être observée prématurément, pouvant même s'observer avant la maturité, comme chez l'homme et les chevaux (Frisbie, 2006).

Trois grandes hypothèses pourraient expliquer l'étiopathologie de l'OA. La première serait un défaut génétique qui résulte en une matrice cartilagineuse anormale, donc plus susceptible aux forces mécaniques physiologiques. La seconde serait des changements morphologiques suite à des traumatismes (unique ou répétitifs) qui engendreraient subséquemment des dommages cartilagineux mécaniques. La troisième, la plus populaire, serait que l'OA proviendrait de déséquilibre homéostatique du système métabolique du cartilage articulaire. C'est-à-dire qu'un stress mécanique très important ou répétitif sur le cartilage articulaire stimulerait les enzymes cataboliques du cartilage causant des dommages plus élevés que la capacité réparatrice du cartilage (Caron, 2003).

Cependant, l'OA est une maladie multifactorielle dont la physiopathologie n'est pas totalement élucidée et dont les implications exactes de chaque composant de l'articulation sont encore mal connues (Goldring et Goldring, 2007).

1.4.1 Changements macroscopiques du cartilage articulaire lors d'OA

Du point de vue macroscopique, la progression de l'OA est caractérisée par la perte graduelle de l'aspect lisse de la surface du cartilage et l'apparition d'érosion du cartilage hyalin. Des fissures de différentes profondeurs et des érosions focales peuvent être observées. Selon la sévérité, l'érosion du cartilage hyalin peut atteindre des étendues importantes et aller jusqu'à exposer l'os sous-chondral (Cantley, 1999; Frisbie, 2006; Aubrey et Hough, 2007). La perte de la matrice cartilagineuse affecte également les capacités d'amortissement et de dispersion des forces mécaniques, causant une sclérose de l'os sous-chondral, associé à l'OA avancé (Frisbie, 2006; Aubrey et Hough, 2007). Également, lors d'OA avancé, il est possible d'observer une lyse de l'os sous-chondral (Cantley, 1999).

1.4.2 *Changements histologiques du cartilage articulaire lors d'OA*

Les changements morphologiques et structurels subis par la matrice du cartilage lors de la progression de la pathologie peuvent être confirmés par l'utilisation de coloration histologique (figure 1.4). Par exemple, les protéoglycanes présents dans la matrice sont mis en évidence par une coloration Safranin O-Fast Green (Mankin *et al.*, 1971). La coloration au Picosirius red permet d'observer l'épaisseur et l'orientation des fibres de collagène sous une lumière polarisée (Dayan *et al.*, 1989).

L'un des premiers signes de dégénérescence de l'articulation atteinte par l'OA est une perte des protéoglycanes. Elle s'observe par une diminution de la coloration rougeâtre du cartilage coloré avec Safranin O-Fast Green (figure 1.4). Cette perte s'observe particulièrement en surface du cartilage articulaire, mais l'érosion de la matrice progresse en profondeur selon la progression des dommages de la structure. La coloration avec Picosirus Red peut révéler une perte et une désorganisation tridimensionnelle des fibrilles de collagène (figure 1.4) (Vinardell *et al.*, 2008).

Au niveau cellulaire, les chondrocytes, présents dans le quart inférieur de l'épaisseur du cartilage, sont regroupés sous l'apparence linéaire, soit perpendiculairement à la base de l'os sous-chondral (Aubrey et Hough, 2007). Or, lors de la pathologie, plusieurs chondrocytes se rassemblent par groupes de trois à quatre cellules, nommés «*cluster*», dans l'objectif de se multiplier. Ils perdent ainsi leur arrangement en colonne (Aubrey et Hough, 2007). De plus, lorsque le cartilage est affaibli par l'érosion, la capacité de la structure à retenir les chondrocytes à l'intérieur de la matrice diminue et une réduction des nombres de chondrocytes est remarquée. Cette perte cellulaire entraîne aussi une diminution de la capacité réparatrice de la matrice (Sandell, Heinegard et Hering., 2007).

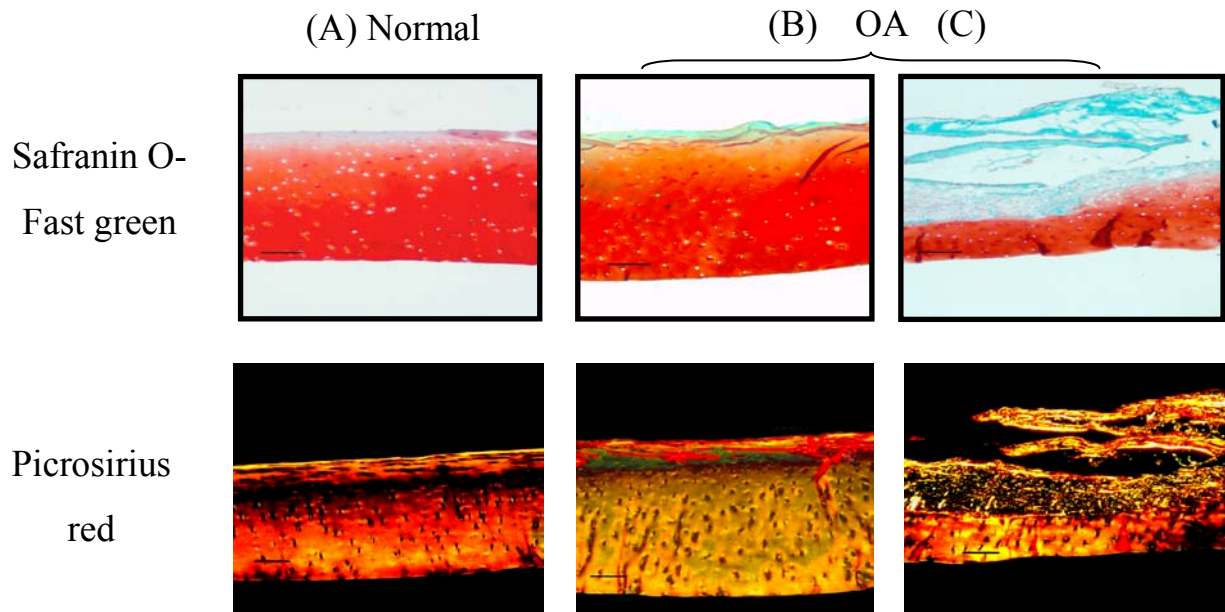


Figure 1.4 : Coupes histologiques de cartilage articulaire métacarpien équin sain (A), près d'une lésion (B) et dans la lésion (C) d'OA, colorées avec Safranin O-Fast Green et Picrosirius red (image tirée de Vinardell *et al.*, 2009).

1.5 Déséquilibre de l'homéostasie du cartilage articulaire

1.5.1 *Homéostasie*

Bien que l'articulation soit un environnement anaérobique, le cartilage est une structure dynamique où les chondrocytes ont comme fonction de maintenir l'intégrité de la structure (Meyer et Wiesmann, 2006). Cette tâche consiste à gérer l'équilibre métabolique entre les interactions complexes des différents agents des phénomènes anaboliques et cataboliques, quelle que soit l'espèce (Caron, 2003; Meyer et Wiesmann, 2006). Afin d'accomplir cette fonction, les chondrocytes possèdent différents types de récepteurs membranaires. Certains permettent la régulation des activités métaboliques cellulaires en fonction du besoin situationnel (Homandberg, 2001). Par exemple, suivant un stress

mécanique important, il y a altération de la matrice, ainsi que le détachement de fragments de fibronectine et de collagène type II principalement. Ceux-ci seront alors reconnus par des récepteurs spécifiques et ils activeront les voies métaboliques selon la concentration de ces fragments (Homandberg, 2001; Yasuda *et al.*, 2006). Une petite concentration stimulerait le système anabolique afin de procéder à la réparation tissulaire. Au-delà d'un certain seuil, les phénomènes cataboliques seraient stimulés. Une communication autocrine est envisageable afin de stimuler des activités cataboliques ou anaboliques, ainsi que stimuler les chondrocytes environnants, afin d'optimiser la réparation tissulaire (Homandberg, 2001; Yasuda *et al.*, 2006).

1.5.2 Phénomènes anaboliques

L'anabolisme est une subdivision du métabolisme qui consiste en des actes physico-chimiques participant à la croissance et à la réparation cellulaire (Voet et Voet, 1995). Étant donné que l'apport en oxygène aux chondrocytes est faible, leur métabolisme est très lent. Ainsi, le temps de renouvellement complet pour les protéoglycanes est évalué à 280 jours, alors qu'il serait d'environ 400 ans pour le collagène de type II (Werb et Alexander, 1994;). Par contre, lors de la phase aiguë de réparation de la matrice cartilagineuse, les chondrocytes peuvent atteindre jusqu'à dix fois leur activité normale, pour une période de deux semaines (Eyre *et al.*, 1980).

La synthèse des constituants du cartilage par les chondrocytes serait initiée par des stimuli biomécaniques, par la présence de cytokines et de facteurs de croissance (Platt, 1996). Les cytokines sont des peptides, des protéines ou des glycoprotéines, sécrétés par les chondrocytes. Leur rôle est de procéder à la signalisation cellulaire afin de stimuler la croissance, la différenciation et la survie cellulaire (Voet et Voet, 1995). L'inhibition des activités cataboliques est produite par les certaines interleukines (IL) : IL-10 et IL-13, particulièrement (Caron, 2003). Alors que les facteurs de croissance identifiés dans le cartilage sont : le TGF- β , l'IGF-I et le β -FGF (Goldring, 2006; Hashimoto *et al.*, 2007).

Les chondrocytes ont aussi la capacité de réguler la dégradation de certains constituants du cartilage articulaire, par la sécrétion d'inhibiteurs protéiques spécifiques. Par exemple, les chondrocytes sécrètent des inhibiteurs appelés TIMPs afin d'inhiber les collagénases (de la famille des MMPs) ainsi que les aggrecanases (les ADAMTs) (Caron, 2003; Hashimoto *et al.*, 2007; Sandell, Heinegard et Hering., 2007). Les chondrocytes libèrent également des inhibiteurs de l'activité des cystéines, des sérines et des protéinases aspartiques. Ils font partie des familles des cystatines et des calpastatines (Lecaille *et al.*, 2007; Sandell, Heinegard et Hering., 2007).

1.5.3 *Phénomènes cataboliques*

Les principaux médiateurs des phénomènes cataboliques, observés dans l'articulation, sont les cytokines pro-inflammatoires, les radicaux libres, de même que plusieurs types de protéases (Caron, 2003; Hashimoto *et al.*, 2007; Sandell, Heinegard et Hering., 2007). Les cytokines pro-inflammatoires, IL-1 α et β ainsi que TNF- α , jouent un rôle dans la différenciation et la modulation cellulaire, mais plus particulièrement dans l'induction de l'inflammation (Voet et Voet, 1995; Caron, 2003). Par exemple, la liaison de l'IL-1 α et β à leurs récepteurs IL-1Rs respectifs, présents à la surface des chondrocytes, inhiberait la synthèse des protéoglycanes et des molécules de collagènes type II (Platt, 1996). Ils stimulent aussi la libération de l'IL-6 et de la PGE₂, un acteur important dans les mécanismes inflammatoires (Platt, 1996). Ces médiateurs stimulent donc la synthèse de plusieurs types de protéases, telles les MMPs, les ADAMTs et les cystéines protéases (dont la CK).

1.5.4 Les protéases du cartilage

L'activité catabolique serait possiblement nécessaire à l'élimination des fragments ou résidus libres, présents dans l'articulation, car la fragmentation de ces résidus pourrait permettre leur évacuation de l'articulation par diffusion aux travers de la membrane synoviale (Meyer et Wiesmann, 2006). Les médiateurs de l'activité catabolique, les enzymes, peuvent être retrouvés sous différentes formes dans le cartilage. Certains sont présents sous forme inactive, nommée zymogènes (précurseur inactif d'une enzyme) (Pelmont, 1995). D'autres sont synthétisés de façon ubiquitaire en très petite concentration, de façon à ce que la médiation anabolique inhibe leur action. Certaines ne sont synthétisées que pour répondre à un ou des stimuli spécifiques (Pelmont, 1995).

La dégradation de la matrice cartilagineuse au sein d'une articulation atteinte d'OA est principalement attribuée à l'activité protéolytique des MMPs, des ADAMTs et de la CK (Werb et Alexander, 1993; Garnero, 2007). La famille des MMPs en particulier a été identifiée comme un joueur important dans la dégradation des constituants du cartilage (Werb et Alexander, 1993). Cette famille regroupe 23 membres identifiés chez l'humain, répertoriés en quatre sous-groupes selon leurs types d'activité (Visse et Nagase, 2003). Seul le sous-groupe des collagénases a démontré la capacité de cliver les molécules de collagène de type II intactes (non dénaturées), car cette dernière est une protéine généralement très résistante aux protéases. Par contre, certains autres ont la capacité de cliver la molécule de collagène de type II dénaturée (Caron, 2003).

Le clivage dans la partie hélicoïdale intacte du collagène de type II peut être initié par la collagénase 1 (MMP-1), la collagénase 2 (MMP-8) et la collagénase 3 (MMP-13). Cependant, la MMP-13 est la plus active des trois (Caron, 2003; Garnero, 2007). En plus d'être une étape importante dans le processus d'initiation de l'OA, cette action protéolytique est aussi potentiellement un événement irréversible dans la dégradation du cartilage (Garnero, 2007). En effet, une fois initié, ce premier clivage est responsable de la diminution de la résistance des fibrilles de collagène aux autres protéases, permettant la dénaturation du collagène (Visse et Nagase, 2003; Garnero, 2007). Le site spécifique de

clivage par les MMPs -1, -8 et -13 est situé entre les aa G⁷⁷⁵-L/I⁷⁷⁶, de tropocollagène humain. Ce qui cause la formation de deux fragments, l'un Col2-3/4 (de trois quarts de long) et l'autre Col2-1/4 (d'un quart) (Billinghurst *et al.*, 1997) (figure 1.5).

Il a été démontré que la collagénase 3 (MMP-13), joue un rôle clé dans la dégradation des molécules de collagène de type II, impliqué dans l'OA (Billinghurst *et al.*, 1997; Sandell, Heinegard et Hering., 2007). Cette découverte a mené à des travaux sur l'identification de biomarqueurs permettant de suivre le profil métabolique du collagène de type II au sein du cartilage articulaire (Sumer, 2006; Garnero, 2007). Quelques biomarqueurs ont été proposés, afin de suivre l'évolution de la synthèse ou de la dégradation du collagène de type II dont le C2C, le CTX-II et le TIINE (figure 1.5) (Sugiyama *et al.*, 2003; Poole *et al.*, 2004; Sumer, 2006; Henrotin *et al.*, 2007). Selon certaines observations, une corrélation semble exister entre les concentrations de certains biomarqueurs et la sévérité de l'OA, mais rien de parfaitement concluant n'a été obtenu (Sumer, 2006; Henrotin *et al.*, 2007; Garnero, 2007).

Les autres membres de la famille des MMPs, n'ont pas la capacité d'initier la dégradation du collagène de type II (tableau I.I). Par contre, une fois que le clivage de la molécule de collagène type II est entamé par les collagénases, la molécule se dénature partiellement et certains autres groupes d'MMPs ont la capacité de cliver les fragments générés par le clivage primaire (Visse et Nagase, 2003; Garnero, 2007; Sandell, Heinegard et Hering., 2007). Il s'agit des gélatinases : Gélatinase A (MMP-2) et gélatinase B (MMP-9), ainsi que les stromelysines : stromelysines 1 (MMP-3) et stromelysines 2 (MMP-10) de même que les métallo-protéinases de type de membrane (MT-MMP) : le MT1-MMP ou MMP-14. Il y a une exception pour le MMP-3 dont une activité collagénase lui a aussi été attribuée. Par contre, il présente une moins grande affinité pour ce substrat (McIlwraith, 1996; Nagase et Woessner, 1999; Caron, 2003; Visse et Nagase, 2003)

Un autre type de métalloprotéases a été identifié en 1991. Ce groupe d'enzymes est responsable de la dégradation des aggrécans présents dans le cartilage, ce qui lui a valu le nom d'aggrécanasés en 1999 (Sandy *et al.*, 1992; Tortorella *et al.*, 1999; Nagase et

Kashiwagi, 2003). Les aggrecanases -1 et -2 ont été répertoriées jusqu'à présent, aussi connues sous le nom d'ADAMTS-4 et -5, respectivement (Nagase and Kashiwagi, 2003). La dégradation des aggrecanes présents dans les articulations arthritiques serait principalement attribuée à l'activité protéolytique de ces aggrecanases (Jones *et al.*, 2008).

Parmi les autres protéases pouvant être présentes dans le cartilage articulaire, il y a diverses protéases à cystéines (les cathepsines B, H, K et L) ainsi que des protéases à aspartate et à sérines (Sandell, Heinegard et Hering., 2007). De ces dernières protéases, seule la CK joue un rôle important dans la dégradation du collagène de type II intact et est présente dans le cartilage atteint ou non d'OA (Drake et al., 1996; Kafienah *et al.*, 1998; Ruettinger, 2008; Vinardell *et al.*, 2008). Donc, la CK est une enzyme importante dans la pathophysiologie de l'ostéoarthrose.

Tableau I.I : Présentation des quatre sous-groupes de la famille des MMPs impliqués dans la dégradation des constituants du cartilage.

Sous-groupe	Nom	Substrat	Référence
Collagénases	MMP-1, MMP-8 et MMP-13	Le collagène natif de type I et II	Caron, 2003
Gélatinases	MMP-2 et MMP-9	Le collagène dénaturé, les aggrécanes, les fibronectines, le collagène de type IX et XI, les protéines de liens, les décorines et élastines	Caron, 2003 Visse et Nagase, 2003 McIlwraith CW, 1996
Stromelysines	MMP-3 et MMP-10	Les aggrécanes, les fibronectines, les protéoglycanes (aggrécanes) et le collagène de type IX. Les MMP-3 ont aussi démontré la capacité de cliver les molécules de collagène de type II ainsi que d'activer les collagénases	Caron, 2003 Nagase et Woessner, 1999 Visse et Nagase, 2003
MT-MMP	MT1-MMP ou MMP-14	Les aggrécanes, les fibronectines et le collagène dénaturé	Caron, 2003

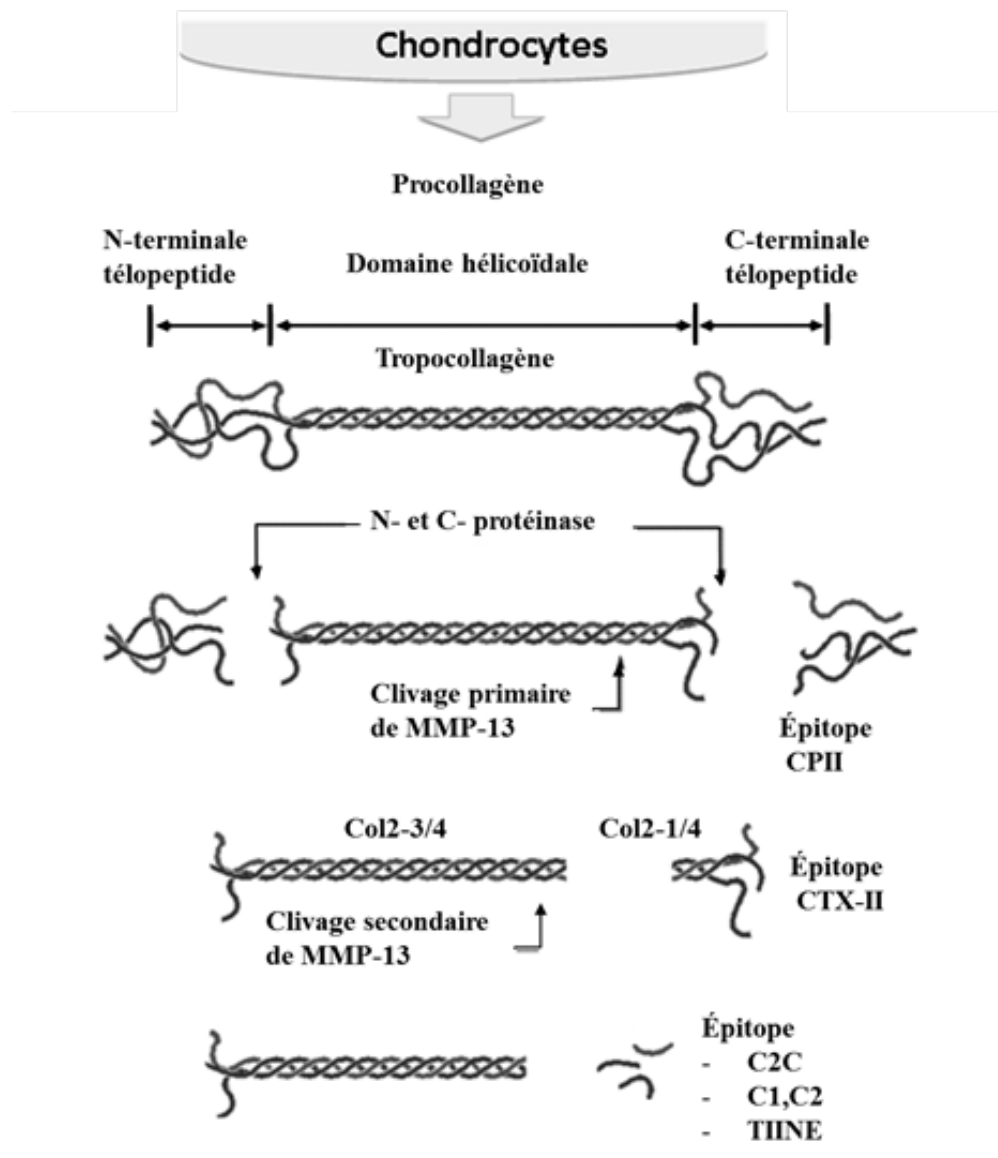


Figure 1.5 : Voie catabolique d'une molécule de collagène de type II clivée par des collagénases, tel que MMP-13. Les collagénases clivent dans la région hélicoïdale suivie par des clivages secondaires par d'autres MMPs. Ainsi que le suivi de la formation des épitopes sont libérés suivant l'activité des collagénases (biomarqueurs).

1.6 Cathepsine K

La CK est l'une des onze enzymes de la sous-famille des cystéines protéases, de la grande famille des papaines protéases (Salminen-Mankonen et al, 2007). Parmi ces onze enzymes, cinq sont reconnues pour leur activité protéolytique; les cathepsines B, H, K, L et S (Bossard *et al.*, 1996; Salminen-Mankonen et al, 2007). La CK a été découverte dans la matrice osseuse en 1995 puis décrite comme étant une enzyme clé dans le processus de résorption osseuse (Inaoka *et al.*, 1995; Bromme *et al.*, 1996).

Il existe différentes appellations pour cette enzyme : OC2, puis cathepsine O, X, O2 et JTAP-1, mais suite à un consensus, le nom de CK lui a été attribué en 1996 (Bromme *et al.*, 1996; Drake *et al.*, 1996; Salminen-Mankonen et al, 2007;). La CK est identifiée par le numéro EC : 3.4.22.38 et est classée sous le titre de cystéine endopeptidase selon la commission des enzymes du NC-IUBMB.

1.6.1 *Caractéristiques de l'enzyme*

L'enzyme est codée par un seul gène d'une longueur de 12,1 kb retrouvé sur le chromosome 1q21 (Lecaille *et al.*, 2007). Chez l'humain, sa forme native est un zymogène monomérique le pro-CK, de 37 kDa. Son activation se produit suite au sectionnement d'une séquence de la protéine par les pepsines, sécrétées par les chondrocytes, ce qui lui confère sa forme active de 29 kDa. Il semblerait que l'activation de l'enzyme serait possible par l'auto-protéolyse ainsi que l'activation par d'autres CK actives (Bromme *et al.*, 1996; McQueney, 1997).

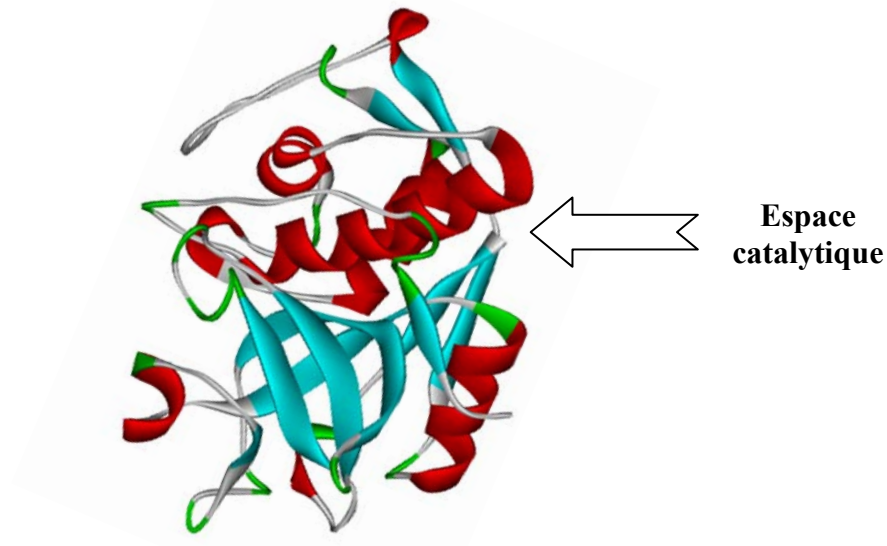


Figure 1.6 : Représentation graphique à ruban de la CK, active, avec identification de l'espace catalytique. Image provenant de la banque de données : Protein data bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

La conformation tridimensionnelle de la CK est composée de deux domaines globulaires. Son espace catalytique est placé entre ces deux domaines (figure 1.6). À l'opposé de ce site, une grande surface composée d'aa basiques (K et R) lui confère une charge positive (Bromme *et al.*, 1996; Gelb *et al.*, 1996; Lecaille *et al.*, 2007). La triade catalytique est composée par les trois aa C²⁵, H¹⁵⁹ et N¹⁷⁵, présents dans l'espace tridimensionnel en forme de V, prêt à accueillir les aa complémentaires à l'activation de l'activité enzymatique (Lecaille *et al.*, 2007). Cet espace présente une activité enzymatique optimale entre les pH 4 à 7.5, mais une activité optimale à un pH de 6,1 (Merops database : <http://merops.sanger.ac.uk>). L'activité enzymatique présente une spécificité dite "moyenne" pour son substrat, ce qui correspond aux activités collagénase, gélatinase, élastase et aggrécanease identifiées, provenant de la CK. Cette diversité enzymatique expliquerait l'omniprésence de la CK dans différents types de tissus (Bromme *et al.*, 1996 ; Kafienah *et al.*, 1998 ; Lecaille *et al.*, 2007).

1.6.2 *Activité physiologique et pathologique*

Suite à son identification, la CK a été observée principalement dans les lysosomes cellulaires des ostéoclastes, des chondrocytes, ainsi que dans les fibroblastes et les macrophages synoviaux chez différentes espèces (Kafienah *et al.*, 1998; Brix *et al.*, 2007; Vinardell *et al.*, 2008). Il a été démontré que la CK était présente dans plusieurs autres tissus tels : les ovaires, le cœur, le placenta, les poumons, les muscles squelettiques, le colon, les petits intestins et même, il serait impliqué dans la libération des hormones thyroïdiennes (Tepel *et al.*, 2000; Lecaille *et al.*, 2007). Au plan pathologique, la CK a été reconnue pour son implication dans l'ostéoporose, une maladie caractérisée par une diminution de la masse osseuse, causée par une suractivité des ostéoclastes (Bromme *et al.*, 1996; Lecaille *et al.*, 2007).

Afin de mieux connaître l'implication physiologique de la CK dans le métabolisme, des études génétiques ont été réalisées chez la souris, telles que l'inactivation et la multiplication de l'expression du gène. Ainsi, la souris knockout pour le gène de la CK présenterait un phénotype pathologique d'ostéopétrose semblable à la pycnodysostose chez l'homme (Gelb *et al.*, 1996; Gowen *et al.*, 1999; Salminen-Mankonen *et al.*, 2007). Cette maladie provoque une déficience dans le processus de résorption osseuse et un ralentissement des fonctions métaboliques des ostéoclastes (Gelb *et al.*, 1996; Gowen *et al.*, 1999; Salminen-Mankonen *et al.*, 2007). La souris transgénique UTU17 possède plusieurs séquences du gène de la CK. La conséquence de la surexpression de l'enzyme chez la souris provoque l'apparition de fibrose de la membrane synoviale, ainsi qu'une érosion prématurée du cartilage articulaire et de la structure osseuse (Kiviranta *et al.*, 2001; Morko *et al.*, 2005). Ces dommages observés sont très semblables aux lésions décrites dans les articulations atteintes d'OA (Kiviranta *et al.*, 2001; Morko *et al.*, 2005; Vinardell *et al.*, 2008).

Ces travaux ont permis l'identification de la présence de CK dans les lysosomes des chondrocytes, dans la matrice cartilagineuse, ainsi que dans le liquide synovial des articulations atteintes d'OA (Wou *et al.*, 2002; Morko *et al.*, 2004). En effet, une

corrélation a été observée entre le taux d'ARNm codant pour la CK et la sévérité d'OA chez des patients humains ainsi que chez le modèle de souris transgénique de l'OA (souris transgénique Del1) (Konttinen *et al.*, 2002; Morko *et al.*, 2004). D'ailleurs, une corrélation entre la distribution de la CK présente dans le cartilage articulaire, la présence des fragments produits par la CK et la sévérité des lésions du cartilage, a été mise en évidence lors d'OA chez le cheval (Vinardell *et al.*, 2008).

Ces observations ont permis de conclure que la CK joue un rôle physiologique important, non seulement au niveau du remodelage osseux, mais aussi active dans l'environnement des articulations atteintes d'OA (Kiviranta *et al.*, 2001; Morko *et al.*, 2005; Vinardell *et al.*, 2008).

1.6.3 Dégradation des glycosaminoglycanes (GAGs)

Comme il a été mentionné précédemment, la CK a aussi la capacité de cliver les macromolécules d'aggrécanes présentes dans la matrice cartilagineuse (Brome, 2003). Cette digestion libère des fragments composés de GAGs dont des sulfates de chondroïtine, comme les C4S et les C6S (Hou *et al.*, 2003). Il a été mis en évidence que la CK peut former un complexe avec ces sulfates et particulièrement avec le fragment C4S (Li *et al.*, 2002). Ce complexe permet d'augmenter la stabilité et l'activité enzymatique de la CK (Li *et al.*, 2002). Par un réarrangement intermoléculaire allant jusqu'à plus de six CK pour un C4S. Par contre, un ratio 1:1 permettrait d'obtenir la meilleure optimisation de l'activité enzymatique de la CK, car un effet inhibiteur se manifeste en présence d'un taux de C4S supérieur à ce ratio (Tao *et al.*, 2008).

1.6.4 Dégradation du collagène par la cathepsine K

La CK a été premièrement identifiée comme une enzyme de dégradation du collagène de type I, qui est impliquée dans le processus de renouvellement osseux (Figure 1.7) (Yasuda *et al.*, 2006; Lecaille *et al.*, 2007). Suite à cette découverte, certains groupes

de recherche ont investigué la capacité de cette enzyme à cliver le collagène de type II. Une étude sur les produits de dégradations induits par l'activité enzymatique de la CK sur le collagène de type II bovin, a été publiée (Kafienah *et al.*, 1998). Cette étude a identifié quatre fragments principaux résultant de l'activité enzymatique, les fragments F₁ à F₄ (figure 1.8). De plus, elle a permis d'identifier le site de clivage du fragment F₁, situé entre les aa G⁵⁸ et K⁵⁹ de la molécule de collagène sous sa forme tropocollagène bovin (Kafienah *et al.*, 1998).

Par la suite, les travaux de Dejica et ses collaborateurs ont présenté le développement ainsi que la validation d'un immunoessai sensible et spécifique à un néoépitope libéré suite au clivage du site F₁ sur le collagène de type II humain, puisqu'il y a une grande corrélation entre la molécule de collagène de type II bovin et humain (Dejica *et al.*, 2008). L'épitope reconnu par l'anticorps est appelé C2K et est composé des aa suivants : EAGKPG⁵⁸ (Dejica *et al.*, 2008). À la lumière de ces résultats, cet anticorps a été utilisé pour des analyses immunohistochimiques sur du tissu articulaire équin ayant des lésions d'OA. Les résultats de ces dernières analyses ont permis de mettre en évidence que l'activité enzymatique de la CK semble proportionnelle à l'avancement de la pathologie de l'OA chez l'espèce équine (Vinardell *et al.*, 2008). Cependant, il reste d'autres fragments et néoépitopes qui n'ont pas été soumis à l'investigation. Ceux-ci pourraient offrir une meilleure corrélation entre l'activité de la CK et la pathophysiologie de l'OA, tant chez le modèle équin que celui de l'humain, en raison du fort pourcentage d'homologie au plan de leur séquence d'aa.

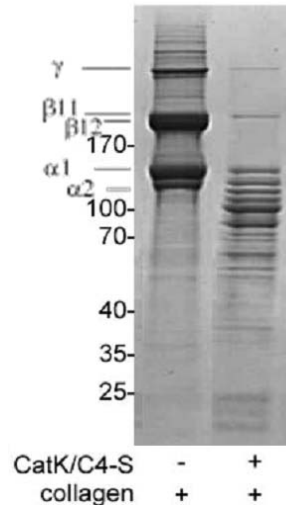


Figure 1.7 : Image de gel de représentant la comparaison de la molécule de collagène type I bovin intacte avec les fragments produits lors de la digestion du collagène de type I bovin par la CK (20nM) en présence de molécules de C4S (20nM) (image modifiée de Selent *et al.*, 2007).

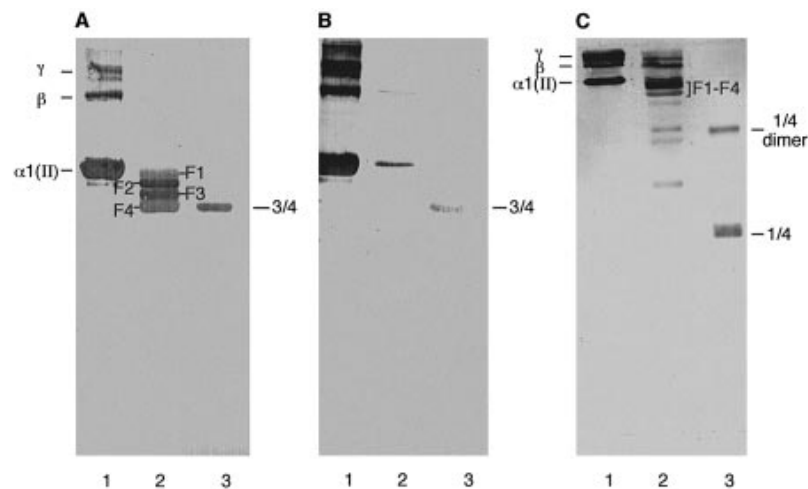


Figure 1.8 : Images des gels de 6% SDS-PAGE avec fragments produits lors de la digestion du collagène type II (20 μ M) par différentes enzymes (Kafienah *et al.*, 2007). Ligne 1: collagène type II. Ligne 2: collagène clivé par la CK (100nM). Ligne 3: collagène clivé par les MMP-13. (A) Détection d'un épitope CB11B à l'aide d'un anticorps COL2-3/4m, sur gel de 6% SDS-PAGE. (B) Détection d'un épitope AH11L3 en N-terminal du collagène type II, sur gel de 6% SDS-PAGE. (C) Détection d'un épitope AH9L2 en C-terminal du collagène type II, sur gel de 12% SDS-PAGE.

Deuxième chapitre : Techniques analytiques employées

2.1 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide 1D

2.1.1 Principe de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide 1D

Le principe de base de cette technique de séparation repose sur le fait que les ions et les protéines chargés, lorsque placés sous l'effet d'un champ électrique, vont migrer vers l'électrode de charge opposée (Plummer, 1989; Meril et Washart, 1998; Manz *et al.*, 2004). La vitesse de migration varie en fonction de la force du champ électrique appliqué, la composition du milieu dans lequel ils migrent ainsi que de la densité de la charge des protéines. La charge totale dépend du point isoélectrique de la protéine et du pH de la solution dans lequel elle baigne (Plummer, 1989; Meril et Washart, 1998; Manz *et al.*, 2004).

Lorsque le sulfate dodécylque de sodium (SDS) est ajouté à la préparation du gel et de l'échantillon, la séparation des protéines chargées se produit seulement en fonction de la longueur de leur chaîne d'acides aminés (aa) (Plummer, 1989; Meril et Washart, 1998; Manz *et al.*, 2004). Le SDS est un détergent anionique puissant qui neutralise la densité de charge positive des protéines, allant jusqu'à leur attribuer un surplus de charges négatives (Plummer, 1989; Meril et Washart, 1998; Manz *et al.*, 2004). Le SDS se lie aux aa avec un rapport de 1.4 g de SDS pour 1g de protéines. Par sa présence, il favorise le dépliement des protéines en conformation linéaire (dénaturé) et attribue une charge négative identique par unité de masse à toutes les protéines (Plummer, 1989; Meril et Washart, 1998; Manz *et al.*, 2004). Ainsi, les molécules migrent uniquement en fonction de la longueur de la chaîne polypeptidique, permettant ainsi une approximation de la masse (Plummer, 1989; Meril et Washart, 1998; Manz *et al.*, 2004).

Le principe de séparation se base sur la migration des protéines de charge (q) sous l'influence d'un champ électrique de force (E). Celle-ci donne la force électrostatique d'accélération résultante (F_{ef}), principe symbolisé par l'équation 2.1 (Plummer, 1989; Manz *et al.*, 2004). Ce phénomène peut aussi être expliqué par l'équation 2.2 : les protéines se déplacent dans le gel (mobilité électrophorétique) à une vitesse (v) en fonction de la

force du champ électrique (E) et de la charge nette de la protéine (q) sous l'influence de la force de friction (f). Cette friction résulte de la résistance au passage des protéines à travers des pores présents dans le gel. La résistance provient du réseau de polymère et varie en fonction de la concentration du gel en acrylamide (Plummer, 1989; Meril et Washart, 1998; Manz *et al.*, 2004).

$$\text{(Équation 2.1)} \quad F_{ef} = q \cdot E$$

$$\text{(Équation 2.2)} \quad v = (E \cdot z) / f$$

2.1.2 *Le matériel électrophorétique*

Il existe deux types de dispositifs pour procéder à des électrophorèses sur gel. L'un propose un arrangement d'électrophorèse sur gel à l'horizontale, alors que l'autre, à la verticale (figure 2.1 a et b). Dans le premier cas, ce dispositif est utilisé principalement avec des gels d'agarose afin de procéder à des analyses d'acides nucléiques ou des protéines de plus de 500 kDa. Il est également utilisé lors de diagnostics biologiques (immunoélectrophorèse) (Meril et Washart, 1998; Liebler, 2002; Manz *et al.*, 2004). L'appareil vertical est dédié particulièrement aux analyses des protéines (<500 kDa) et polypeptides. Cependant, il peut aussi être utilisé pour l'analyse de petits fragments d'acide nucléique. De plus, ce type d'appareil permet l'analyse en parallèle de plusieurs gels simultanément (Meril et Washart, 1998; Liebler, 2002; Manz *et al.*, 2004). L'appareil vertical est composé de plusieurs éléments. Il y a deux réservoirs de tampon de migration, dotés chacun d'une électrode (l'une cathode et l'autre anode), placée à chacune des extrémités supérieures et inférieures (respectivement) d'un support de gel d'électrophorèse. Le gel prend place à l'intérieur du support qui est composé de deux plaques de verre, serrées l'une contre l'autre, équipées d'espaceurs entre les deux plaques. Cet arrangement laisse deux ouvertures au gel; l'une à l'extrémité supérieure et l'autre à l'extrémité inférieure du support. Ainsi le gel est en contact avec chacun des réservoirs de tampon de migration. Un générateur de courant continu, «*power supply*» (figure 2.1 c), est relié aux

deux électrodes présentes dans les réservoirs et crée un champ électrique. Celui-ci, allant de l'extrémité cathodique (négative) vers l'électrode de polarité opposée, l'anode (positive), permettant la migration dans le même sens pour les molécules chargées négativement (Meril et Washart, 1998; Liebler, 2002).



Figure 2.1 : Le matériel électrophorétique a) dispositif d'électrophorèse à l'horizontale b) dispositif d'électrophorèse à la verticale c) un générateur de courant continu (Bio Rad laboratory).

2.1.3 *Le gel de polyacrylamide*

Le gel de polyacrylamide est obtenu par la co-polymérisation de monomères d'acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) et un agent de liaison, le N,N'-méthylène-bisacrylamide (bis acrylamide : $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH})_2\text{CH}$). La polymérisation de l'acrylamide forme des chaînes et le bis acrylamide forme des réticulations (des ponts entre les chaînes d'acrylamide). Celle-ci forme un réseau de pores de grandeur standardisée selon le pourcentage de bis acrylamide dans le gel (figure 2.2). Par conséquent, plus la concentration du gel est élevée en bis acrylamide, plus les pores seront petits, et inversement (Meril et Washart, 1998; Liebler, 2002; Manz *et al.*, 2004).

La réaction de polymérisation est initiée par le persulfate d'ammonium (APS) et catalysée par le tétraméthyléthylènediamine (TEMED). Le TEMED accélère la

décomposition de l'APS en radicaux libres. Ces derniers se lient à des monomères d'acrylamide, ce qui initie la polymérisation des monomères libres (Meril et Washart, 1998; Liebler, 2002).

Le gel de migration utilisé est composé de deux portions, l'une nommée le gel d'entassement et l'autre, le gel de séparation. La première partie du gel sert à concentrer la portion protéique de l'échantillon en une mince bande, par l'entremise d'agents dits « frontaux » (Cl⁻) et l'agent dit « de traîne » (glycine) présent dans le tampon d'échantillon. Ces agents se rattrapent au fil de la migration de l'échantillon dans le gel d'entassement, ce qui entraîne l'accumulation des protéines en une petite bande lorsque les ions arrivent à la fin du gel d'entassement (Meril et Washart, 1998; Liebler, 2002).

La seconde partie du gel sert à la séparation des protéines. Dans cette portion, la grosseur des pores a un impact direct sur la vitesse de migration des protéines, ainsi que la résolution. Ainsi, si le pourcentage de bis acrylamide est élevé, un réseau de mailles serrées (pores) est formé, ce qui crée une résistance lors du déplacement des protéines à travers le gel et inversement. Donc, le pourcentage de polyacrylamide pourrait être ajusté en fonction du poids moléculaire des protéines d'intérêts. (Meril et Washart, 1998; Manz *et al.*, 2004) (tableau II.I).

2.1.4 Préparation de l'échantillon

La préparation de l'échantillon consiste en la dénaturation des protéines et l'ajout du tampon d'échantillon. L'étape de dénaturation nécessite un agent réducteur, comme le dithiothreitol (DTT), qui est utilisé afin de réduire les ponts disulfures, retenant les sous-unités et les repliements des protéines. L'iodoacétamide, un agent alkylateur du groupement sulfhydryle, est ajouté à la solution d'analyse et empêche la reformation de liens disulfure. Le tampon d'échantillon contient du SDS et du glycérol. Ce dernier augmente la densité de l'échantillon pour qu'il se loge facilement dans le fond du puits, minimisant sa diffusion dans le tampon de migration. Le détergent SDS dénature les protéines en neutralisant la charge initiale, comme mentionné précédemment (Plummer,

1989; Meril et Washart, 1998; Manz *et al.*, 2004). Un marqueur de progression, comme le bleu de bromophénol, est ajouté à la solution afin de suivre la progression de la migration du front de solvant lors de l'électrophorèse (Liebler, 2002).

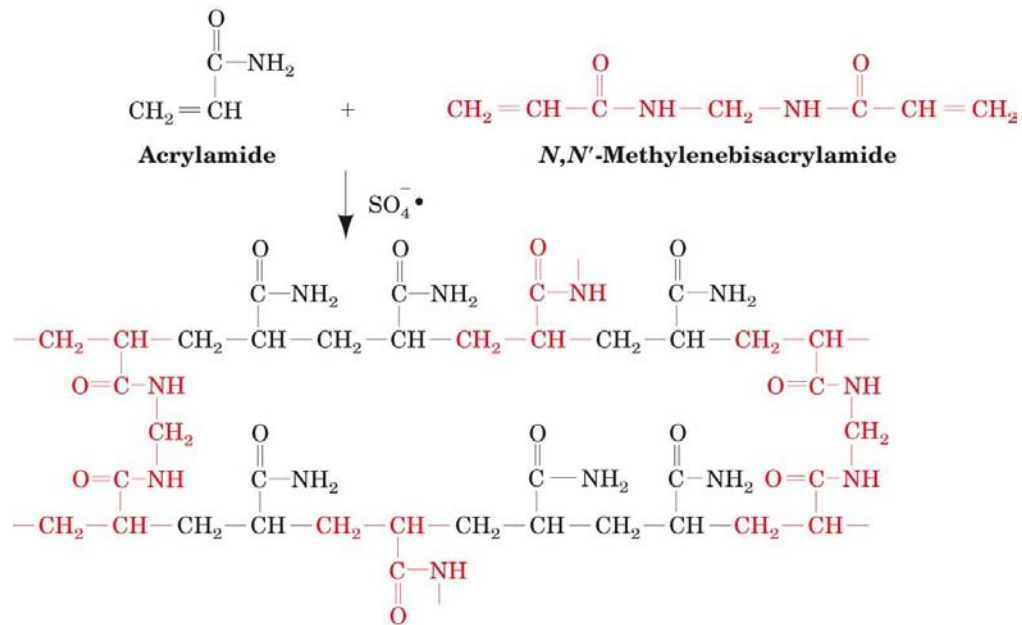


Figure 2.2 : Addition d'acrylamide $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ et de méthylène bis acrylamide $(\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH})_2\text{CH}_2$, formant un réseau de polymérisation, le gel (image modifiée d'internet http://www.nationaldiagnostics.com/article_info.php/articles_id/6).

Tableau II.I : Concentration de gel de polyacrylamide nécessaire pour la séparation distincte des protéines de poids moléculaire variables.

Polyacrylamide (%)	Poids moléculaire (Kd)
15-20	1-40
10-15	40-100
5-10	100-300
5	300-500

2.1.5 La coloration de gel de polyacrylamide

Il existe plusieurs techniques de révélation des protéines présentes dans les gels de polyacrylamide. Par exemple, les techniques de coloration au bleu de Coomassie ainsi que celle au nitrate d'argent. Ce sont deux colorations, non spécifiques, régulièrement utilisées qui visent à révéler la présence de protéines dans le gel de polyacrylamide (Meril et Washart, 1998; Liebler, 2002)

2.1.5.1 Le bleu de Coomassie

Le bleu de Coomassie est un colorant organique, non polaire, permettant la détection des protéines présentes dans les gels de polyacrylamide. Ce colorant nécessite un environnement acide afin d'accroître son interaction avec les aa basiques présents dans les protéines. Ce milieu acide favorise aussi les interactions de type secondaires avec le reste de la protéine, tels : les liens hydrogènes, les forces hydrophobiques et de Van der Waals (Wirth et Romano, 1995). La capacité de détection de la coloration de bleu de coomassie est d'environ de 0.3 à 0.5 μ g de protéine par bande et possiblement jusqu'à 0.038 μ g selon la qualité des produits utilisés (Meril et Washart, 1998; Saase et Gallagher, 2003). De plus, cette coloration offre une relation directement proportionnelle entre l'intensité de la coloration et la quantité de protéines présentes dans la bande (Meril et Washart, 1998). Cette technique de coloration est semi-quantitative.

2.1.5.2 Le nitrate d'argent

La technique de coloration au nitrate d'argent offre une grande sensibilité de détection des protéines, jusqu'à 100 fois plus sensibles pour certaines protéines que la technique utilisant le bleu de Coomassie. Cette coloration permet la détection de la présence de bandes contenant jusqu'à 1ng de protéines (Wirth et Romano, 1995; Meril et Washart, 1998). La réaction de coloration des protéines se produit lorsqu'il y a réduction des ions d'argent en argent élémentaire, par le formaldéhyde dans une solution alcaline. Par

contre, la réaction n'est pas encore totalement comprise (Wirth et Romano, 1995; Meril et Washart, 1998).

D'autre part, il y a une incompatibilité entre l'utilisation du gel coloré, par certaines techniques de coloration au nitrate d'argent, dans les étapes d'analyse par spectrométrie de masse. La coloration pourrait interférer avec le mécanisme d'ionisation utilisé lors de l'analyse par spectrométrie de masse (Wirth et Romano, 1995; Meril et Washart, 1998). Alors, il est recommandé d'utiliser un protocole de coloration au nitrate d'argent permettant une décoloration après visualisation.

2.1.6 Analyse des gels et du poids moléculaire

Le calcul de la masse moléculaire des différentes protéines présentes dans la solution à analyser se fait indirectement., c'est-à-dire par comparaison de la distance de migration de fragments de référence et de la masse moléculaire connue (MW), présentes dans une solution dite « *standard* ». La solution standard est déposée dans un puits, sur le gel, à proximité des échantillons à analyser et ils subiront les mêmes conditions de migration que les protéines d'intérêts (Manz *et al.*, 2004). Divers appareils et programmes permettent d'obtenir une évaluation des masses moléculaires des protéines contenues dans les bandes sur le gel, par l'entremise de la capture de l'image digitale du gel. Les programmes évaluent l'attribution des poids moléculaires par extrapolation en comparant les distances parcourues par les bandes de protéines, comparativement à celles des bandes représentant les standards de poids moléculaires. Cette déduction des poids moléculaires est basée sur la formation d'une droite de calibration construite selon le modèle de Fergusson ($\text{Log}(\text{Mr}) = a + b * \text{Rf}$), où le "Mr" est la masse moléculaire de la protéine, le "a" est la valeur de l'abscisse de la droite, le "b" étant la valeur de la pente de la droite, et le "Rf" représente la mobilité relative. La mobilité relative est le quotient de la distance parcourue par une protéine à partir du haut du gel de séparation, divisé par la distance parcourue lors de la migration de l'ion en front de solvant (Manz *et al.*, 2004; Meril et Washart, 1998).

2.2. Analyse par HPLC et spectrométrie de masse

La stratégie analytique a été d'analyser les échantillons par HPLC-ESI/MS, une technique joignant la technologie de l'appareil de HPLC et de la spectrométrie de masse. Cette dernière est l'une des technologies qui contribuent aux découvertes et au développement de nouveaux médicaments par sa capacité de caractériser et quantifier des biomarqueurs de processus biologiques ou pathologiques (Bischoff and Luider, 2004; Guerrero and Kleiner, 2005). L'analyse par HPLC-ESI/MS est une technique qui permet la caractérisation moléculaire des molécules organiques et biomolécules. Grâce à la grande sensibilité de cette technologie, elle permet d'analyser d'infimes quantités de molécules présentes dans des matrices complexes, comme des matrices biologiques (Khalsa-Moyers et McDonald, 2006; Fang *et al.*, 2008).

2.2.1 Chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une technique de séparation, par laquelle les composants d'une solution à analyser sont séparés en fonction de leurs interactions physico-chimiques avec la phase mobile et la phase stationnaire (Liebler, 2002; Manz *et al.*, 2004).

La technique consiste en l'injection d'un échantillon à analyser dans une phase mobile (l'éluant), un solvant dans lequel l'échantillon est miscible. Il y aura élution à travers une phase stationnaire (une colonne) sous l'influence d'une pression déterminée, pour l'obtention d'un débit connu. La phase stationnaire se retrouve à l'intérieur de la colonne et elle possède des caractéristiques physico-chimiques permettant une interaction moléculaire spécifique avec les échantillons d'intérêts (Liebler, 2002; Manz *et al.*, 2004). Cette interaction altère la vitesse d'élution des molécules, allant du ralentissement jusqu'à la rétention complète, dépendamment de leur degré d'interaction avec la phase stationnaire. Ce qui permet une séparation des différents constituants d'une matrice complexe (Liebler, 2002; Manz *et al.*, 2004). Le temps de rétention est représenté par le temps d'élution

compris entre le moment de l'injection de l'échantillon et celui de la détection de la molécule d'intérêt lors de leur contact avec le détecteur.

Selon les besoins, il est possible d'agir sur certains paramètres afin d'améliorer la résolution de la séparation des molécules. Ainsi, le choix des caractéristiques de la phase stationnaire, telle que la force de la polarité de la phase, de même que la longueur et le diamètre de la colonne (Liebler, 2002; Manz *et al.*, 2004). Le choix des caractéristiques de la phase mobile, comme la composition du solvant, le volume de l'échantillon injecté, ainsi que le débit utilisé, ont leur importance (Plummer, 1989; Liebler, 2002). Il est possible d'appliquer un gradient de pourcentage du solvant, lors de l'élution, afin d'obtenir une plus grande résolution de séparation (Liebler, 2002; Manz *et al.*, 2004) (figure 2.3).

Cette technique, couplée à un appareil de spectrométrie de masse, permet une séparation primaire des éléments. Ce processus est présenté sous la forme d'un chromatogramme de masse (Figure 2.4), ce qui facilite ensuite l'identification des molécules d'intérêts avec l'analyse par spectrométrie de masse (Liebler, 2002).

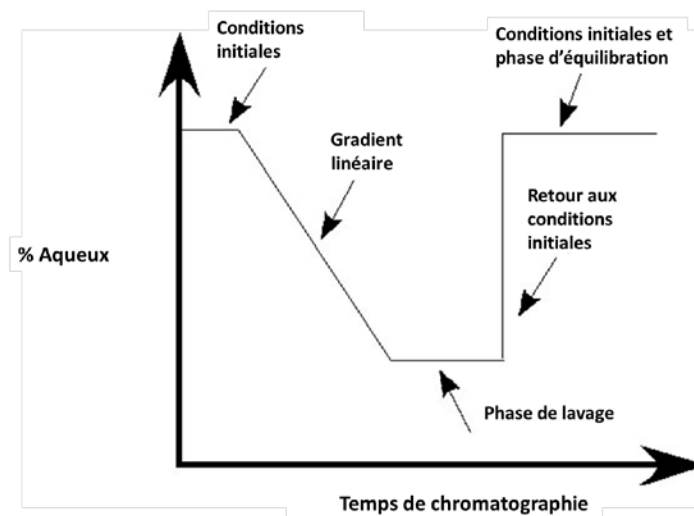


Figure 2.3 : Exemple de gradient de phase mobile pour HPLC (Laboratoire de Dr Beaudry)

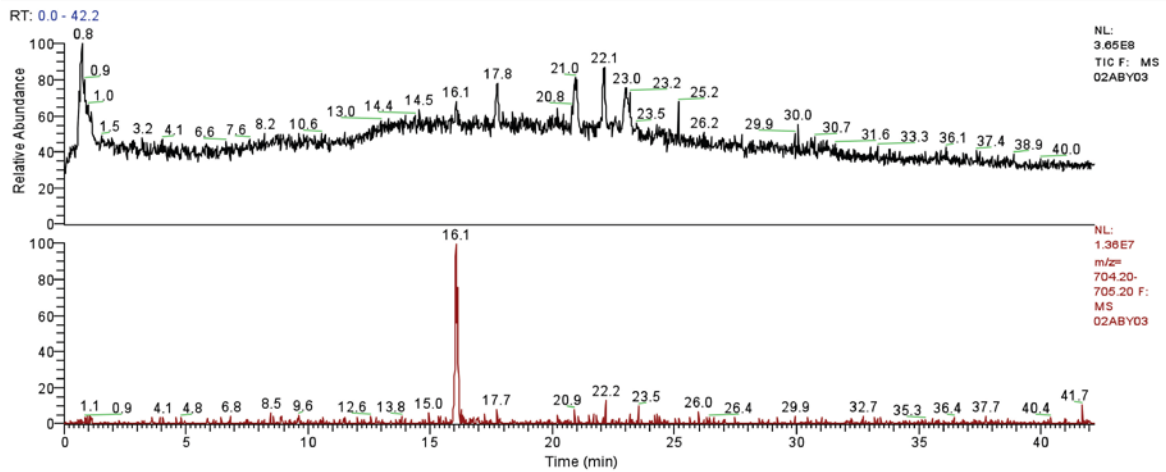


Figure 2.4 : Exemple de chromatogramme de masse ESI-MS; Scan complet du spectre de la Substance P (Laboratoire de Dr Beaudry)

2.2.2 *La spectrométrie de masse*

Il existe différentes techniques de caractérisation et quantification dans le domaine de la protéomique qui ont été développées, incluant la spectrométrie de masse. Cette technologie est connue pour ses diverses applications de caractérisation d'entités chimiques et biologiques (Manz *et al.*, 2004; De Hoffmann et Stroobant, 2007). Elle permet aussi d'analyser d'infimes quantités de molécules dans une matrice complexe. De façon simplifiée, l'appareil de spectrométrie de masse comprend quatre éléments. Le premier élément est la source d'ionisation. Il y a introduction de la substance à analyser dans un solvant, permettant la transformation de la phase mobile (substance dans le solvant) à l'état gazeux sous forme d'ions, par ionisation et désorption selon l'appareil utilisé. Le second élément est l'analyseur qui permet de séparer les divers ions précédemment produits. Le troisième élément, le détecteur, compte les ions transmis. Enfin, le système de pilotage et de traitement des données est le quatrième élément de l'appareil de spectrométrie de masse. Les résultats sont présentés sous la forme d'un spectre de masse, c'est-à-dire un diagramme bidimensionnel présentant le rapport masse/charge à l'abscisse et l'abondance des ions à

l'ordonnée (Manz *et al.*, 2004; De Hoffmann et Stroobant, 2007). Cependant, il existe quelques variantes du système de spectrométrie de masse, qui sont différenciées par le choix de la technique d'ionisation, la technique de séparation des ions ainsi que celle de détection (Manz *et al.*, 2004; De Hoffmann et Stroobant, 2007).

L'appareil utilisé est premièrement composé d'une source d'ionisation par électrospray (électronébulisation). Le mécanisme permet l'électronébulisation de la phase mobile à la pression atmosphérique, peut être présenté en quelques étapes. Les molécules introduites dans le MS sont solvatées dans une mixture aqueuse dont la mobilité protique est favorisée. Ensuite, la solution passe au travers un capillaire ayant une extrémité placée devant une contre-électrode, munie d'un orifice (De Hoffmann et Stroobant, 2007) (Figure 2.5). Une différence de potentiel d'une valeur de 4000V à 6000V entre le capillaire et la contre-électrode est appliquée, ce qui crée un puissant champ électrique. Le capillaire étant la borne positive, les protons présents dans la solution sont attirés par la contre-électrode, les forces électrostatiques et la tension de surface de la solution causent la déformation du liquide jusqu'à l'atteinte d'une forme de cône; déformation portant le nom de cône de Taylor (De Hoffmann et Stroobant, 2007). Sous la force de tension du champ électrique, il y a libération de gouttelettes fortement chargées se déplaçant vers la contre-électrode (1-50 μm) (Figure 2.6). Les protons fortement représentés dans les gouttelettes hautement chargées positivement s'attachent sur les aa basiques présents sur les chaînes polypeptidiques présentes dans la solution et peuvent former des espèces multichargées. Sous l'influence du champ électrique, les gouttelettes chargées sont attirées vers l'orifice (De Hoffmann et Stroobant, 2007). Au cours du trajet, sous l'influence du gaz nébuliseur chauffé (l'azote : N_2), il y a évaporation du solvant. L'évaporation cause une augmentation de la répulsion électrostatique des charges présentes dans les gouttelettes, jusqu'à excéder la force d'attraction (la tension de surface) des gouttelettes, ce qui provoque une explosion coulombienne. Cette explosion provoque la libération d'un nuage de microgouttelettes (ions en phase gazeuse), composé d'espèces ioniques simplement chargées ou multichargées $[\text{M}+\text{nH}]^{n+}$ (m/z) (De Hoffmann et Stroobant, 2007) (Figure 2.6). Seules les

particules chargées passant à travers l'orifice atteindront la seconde section de l'appareil; les autres seront éliminées (Manz *et al.*, 2004; De Hoffmann et Stroobant, 2007).

La partie suivante comprend l'analyseur, opérant sous vide, et qui a le rôle de trier les ions selon leur rapport masse et le nombre de charges noté m/z . La trappe ionique est le type d'analyseur présent dans l'appareil utilisé. Celui-ci correspond à un espace de transport du matériel chargé vers le détecteur sous l'influence d'un champ électrique radiofréquence, imposant aux ions une trajectoire oscillante. Une oscillation variant en fonction de la masse sur charge des particules (m/z) (Manz *et al.*, 2004; De Hoffmann et Stroobant, 2007). L'analyseur est défini par quelques caractéristiques, dont sa gamme de rapport m/z pouvant mesurer le signal. Celui-ci était de 50 à 2000 pour l'appareil utilisé.

La dernière étape, le détecteur, où chaque ion (m/z) produira une charge électrique lors de leur contact avec la plaque du détecteur. Le détecteur capte le signal électrique qui est en phase avec l'analyseur, l'amplifie et génère le signal permettant de produire un spectre de masse. De plus, par l'entremise du logiciel de traitement de données, les résultats seront présentés graphiquement sous la forme d'un spectre de masse de type intensité du signal (Manz *et al.*, 2004; De Hoffmann et Stroobant, 2007).

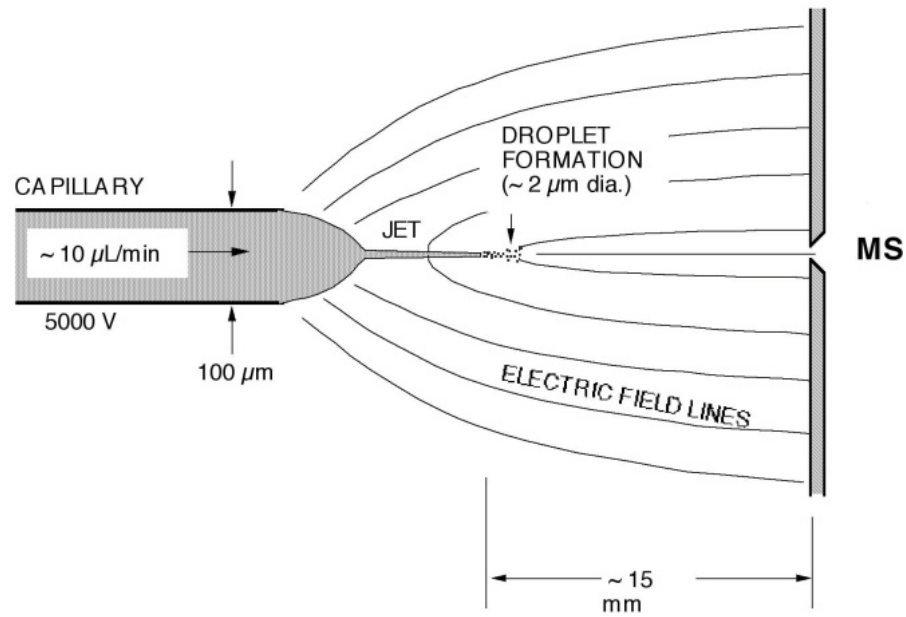


Figure 2.5 : Schéma du champ électrique de la section de l'électrospray (électronébulisation)

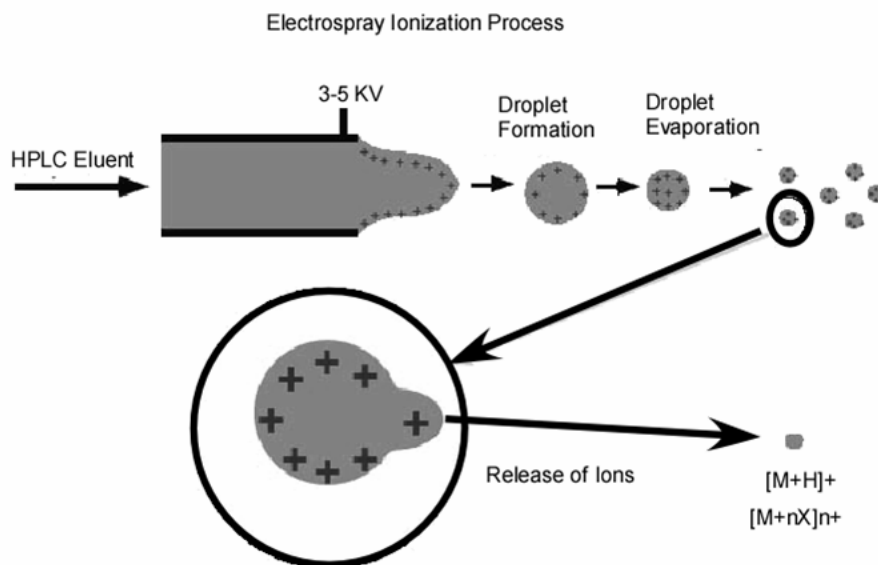


Figure 2.6 : Mécanisme d'ionisation et désorption par électrospray (électronébulisation)

2.2.3 *Déconvolution des résultats HPLC-ESI/MS et corrélation de séquences d'acides aminés*

Les résultats sont présentés sous la forme de spectre de masse, mais il est possible d'obtenir les masses nominales des espèces ioniques multichargées ($[M+nH]^{n+}$) obtenues suivant l'analyse par HPLC-ESI/MS. Ainsi, des algorithmes de déconvolution ont été développés (équation 2.3) afin de transformer les résultats des spectres de masse en masses réelles.

(Équation 2.3)
$$n_2 = \frac{m_1 - 1}{m_1 - m_2}$$

Ensuite, la masse nominale de l'espèce ionique représente la somme des aa présents dans la séquence avec, éventuellement, des modifications. Il y a seulement 20 aa pouvant être présents à chaque position dans la séquence, et parmi eux, seules la leucine et l'isoleucine ont le même poids moléculaire. Donc, la corrélation entre la valeur de la masse nominale et celle de la somme d'aa présents dans la séquence des aa, prédite du polypeptide d'intérêt, permet une identification avec une bonne acuité (De Hoffmann et Stroobant, 2007).

Les masses nominales obtenues seront utilisées afin de simplifier les possibilités de combinaisons de longueurs de chaînes polypeptidiques et des permutations d'aa lors d'interrogation d'outils bioinformatiques, tel que : «*mMass*» (Version 2.4 ICT « Open Source Mass Spectrometry ») (Fang *et al.*, 2008).

2.2.4 *Digestion trypsique*

L'appareil de spectrométrie de masse utilisant une ionisation par électrospray permet un intervalle de détection allant de 50 à 2000 m/z. Une protéine de masse

moléculaire élevée, de plus de 100 kDa, et ayant une charge ionique élevée, suivant son analyse, aura tendance à produire une enveloppe de charge importante. Cette enveloppe pourrait être composée de plus de 25 espèces ioniques multichargées, ce qui rend l'analyse très ardue et diminue par la même occasion la sensibilité des analyses, surtout s'il y a présence de plusieurs fragments de grande taille dans la solution à analyser. Dans le cas d'analyse de protéines de grandes tailles, il est possible d'utiliser la digestion trypsique afin de réduire la taille des protéines (De Hoffmann et Stroobant, 2007).

La digestion trypsique fait partie intégrante des méthodes d'analyse des protéines par spectrométrie de masse et des outils bio-informatiques intégrés assistent l'interprétation des résultats. La trypsine est une endoprotéase connue pour sa spécificité d'hydrolyser les liaisons carboxyliques des aa Lysine (K) et Arginine (R) (Liebler, 2002; Manz *et al.*, 2004; De Hoffmann et Stroobant, 2007). Donc, lorsque la séquence d'aa d'une protéine est connue, les fragments générés par la digestion trypsique peuvent être simulés par des outils bio-informatiques (Liebler, 2002; Manz *et al.*, 2004). La connaissance de la séquence en aa du collagène de type II équin permet de prédéterminer certains résultats d'analyses sans oublier d'intégrer les variabilités des masses dues aux diverses modifications post-traductionnelles possiblement présentes sur la molécule. Certains programmes informatisés déterminent ces différentes possibilités de fragmentations suite à une digestion trypsique des protéines, tel que le programme mMass (Version 2.4 ICT « Open Source Mass Spectrometry »).

2.2.4.1 Stratégie alternative

La stratégie d'analyse indirecte utilise la digestion trypsique et peut être présentée en trois étapes (figure 2.7). La première étape nécessite l'analyse par LC-ESI/MS du collagène de type II équin intact préalablement digéré par la trypsine. La seconde étant l'analyse des produits de digestion par la CK du collagène ayant subi une seconde digestion, cette fois avec la trypsine avant l'analyse. La troisième étape consiste en la comparaison des deux résultats précédents. L'identification des fragments identiques

provenant des deux analyses nous informe que ces fragments sont communs aux deux échantillons comparés et qu'ils ne sont pas des produits de fragmentation spécifique de la CK. Par contre, l'identification de fragments distincts, se caractérisant par la présence d'une des deux extrémités étant non compatible avec la digestion trypsique (K ou R), suggèrent la localisation d'un site de clivage protéolytique de la CK.

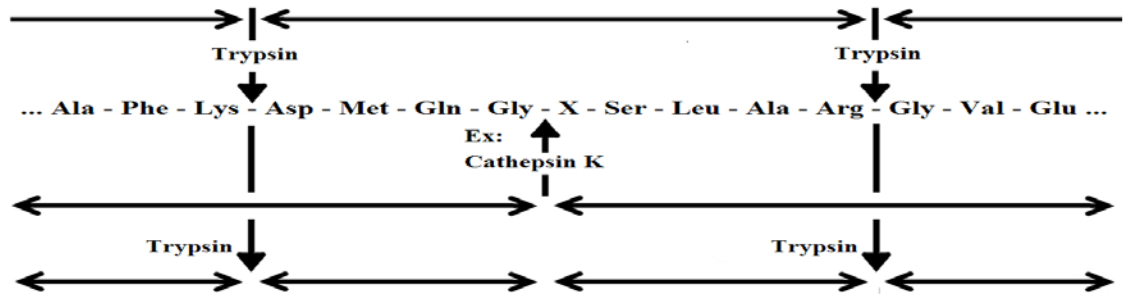


Figure 2.7 : Schéma de la stratégie d'identification des positions de clivages par l'utilisation de la digestion trypsique

2.2.5 Analyse en mode de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

Le mode d'analyse de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), nécessite l'activation des ions, afin de causer la fragmentation des molécules, que l'on nomme collision par gaz « *Collision induced dissociation : CID* ». Sous le mode balayage, la première étape consiste en la sélection d'un ion spécifique. L'appareil isole l'ion désigné dans la chambre où celui-ci entrera en collision avec des molécules des gaz chargés qui brisent la chaîne peptidique en plusieurs endroits spécifiques.

Les spectromètres de masses à trappe ionique tridimensionnelle utilisent un faible niveau d'énergie, ce qui favorise la formation de fragments ioniques de type b et y particulièrement (De Hoffmann et Stroobant, 2007) (Figure 2.8). Le type de fragmentation,

obtenu suivant les collisions, apporte des informations sur la structure des espèces ioniques soumises à l'investigation par l'analyse MS/MS. Principalement, la liaison peptidique est le site de fragmentation le plus fragile. Ainsi, si la charge du proton est située en N-terminal de l'espèce ionique, le type de fragmentation «b» sera favorisé. Alors que si la charge du proton est située en C-terminal de l'espèce ionique, le type de fragmentation «y» sera favorisé.

Ainsi, suivant la fragmentation des ions d'intérêt, il est encore plus facile de procéder à la caractérisation de la séquence d'aa des fragments ioniques et donc, de l'ion d'intérêt.

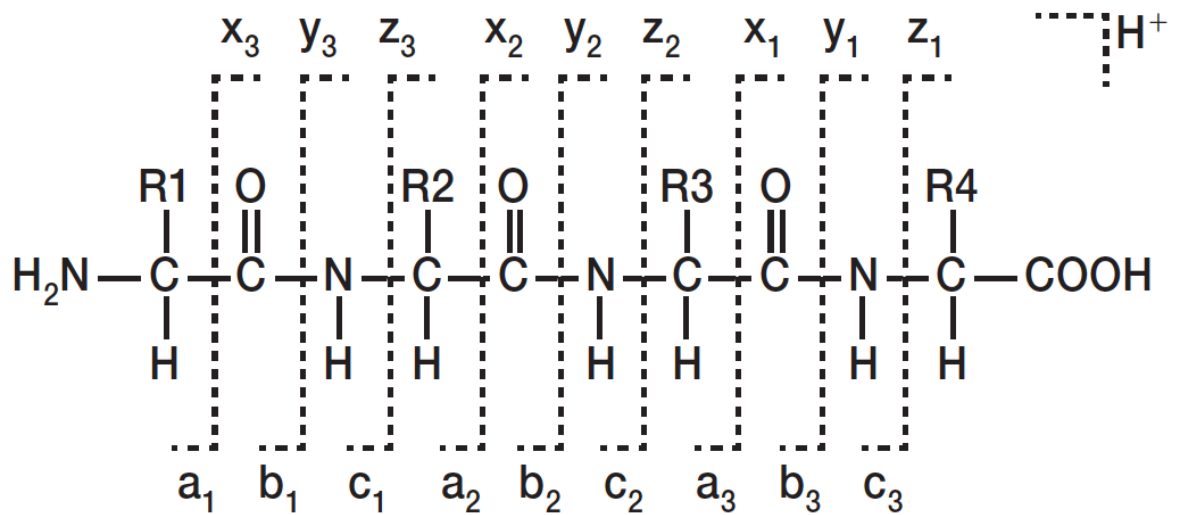


Figure 2.8 : Patron typique de fragmentation CID observé lors d'analyse de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

2.3 Hypothèse et objectifs

2.3.1 *La problématique de l'étude*

L'OA est une pathologie très présente tant chez les humains que chez les animaux, dont le cheval (Caron, 2003). De plus, il y a une grande similarité dans le processus de la dégradation du cartilage articulaire entre les deux espèces. L'enzyme CK est identifiée comme étant un joueur clé dans l'initiation de la dénaturation du collagène de type II intacte et, conséquemment, un facteur important dans le pathophysiologie d'OA (Salminen-Mankonen *et al.*, 2007).

Selon les travaux de Kafienah *et al.* (1998), trois autres sites de clivage du collagène de type II n'ont pas été caractérisés. Ainsi, l'identification complète du profil métabolique du collagène de type II par l'activité enzymatique de la CK, pourrait mettre en évidence d'autres épitopes éventuellement plus spécifiques pour son clivage. Cette découverte pourrait mener à l'élaboration d'un anticorps plus spécifique pour l'activité enzymatique de la CK chez l'humain et l'espèce équine. L'exploitation de tels anticorps dans des kits pour mesurer les épitopes pourrait potentiellement : permettre le diagnostic précoce d'OA, accorder un suivi métabolique d'OA en réponse à l'administration d'un agent thérapeutique ou fournir un pronostic approprié.

2.3.2 *L'hypothèse*

L'activité enzymatique de la CK sur le collagène de type II équin (*in vitro*) produira la formation de fragments (produits de dégradation) spécifiques à son activité. Il serait possible de les identifier par la technique de SDS-PAGE et de les caractériser par spectrométrie de masse. Cette information permettra d'identifier des nouveaux épitopes avec l'objectif de développer des anticorps pour des kits ELISA et d'immunohistochemie afin de suivre l'activité de CK *in vivo* et *in situ*

2.3.3 *Les objectifs*

- 1- Le premier objectif est d'identifier et de visualiser les produits de dégradation générés par l'activité de la CK sur le collagène de type II du cartilage équin (*in vitro*) par l'utilisation de gel de polyacrylamid (SDS-PAGE).
- 2- Le deuxième objectif est de caractériser, par spectrométrie de masse (HPLC-ESI/MS et MS/MS), les principaux fragments de dégradations produits et observés, suivant la réalisation de l'objectif précédant, lors de l'activité enzymatique de la CK sur les molécules natives de collagène de type II du cartilage articulaire équin

Troisième chapitre : Article

Présentation sous forme d'article.

Article en préparation pour soumission à la revue *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*

Proteolysis of Equine Type II Collagen by Cathepsin K: Characterization of a Novel Primary Cleavage Site

Kathleen Thérioux¹, Francis Beaudry^{2*}, A. Robin Poole³, John S. Mort^{3,4}, Sheila Laverty¹

¹ Comparative Orthopaedic Research Laboratory, Département de Sciences Cliniques, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

² Groupe de Recherche en Pharmacologie Animal du Québec (GREPAQ), Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

³ Department of Surgery, McGill University, Montreal, Québec, Canada

⁴ Genetics Unit, Shriners Hospitals for Children, Montreal, Québec, Canada

*Corresponding Author: Francis Beaudry, Ph.D.
Assistant Professor in Analytical Pharmacology
Faculté de Médecine Vétérinaire
Université de Montréal
3200 Sicotte
Saint-Hyacinthe, Québec
Canada, J2S 2M2

ABSTRACT

Proteolytic degradation of type II collagen is believed to be mainly an irreversible event in the process of cartilage matrix degradation in osteoarthritis. Cathepsin K is the most active vertebrate protease outside the matrix metalloproteinase family capable of degrading intact triple helical type II collagen. Cathepsin K cleavage of equine type II collagen was first examined by SDS-PAGE electrophoresis. Molecular characterization of proteolytic fragments, and therefore cleavage sites, was performed using tryptic digestion followed by LC-ESI/MS analysis to establish a comprehensive peptide map which was used as a template to identify specific proteolytic cleavage by cathepsin K. Six major fragments were observed by SDS-PAGE and confirmed by LC-ESI/MS including F₁ [189-190], F₂ [252-253], F₃ [326-327], F₄ [428-429], F₅ [563-564] and F₆ [824-825]. The observed F₁ fragment showed that cleavage was three residues N-terminal to the site reported previously for bovine type II collagen. These new findings will be used to develop new analytical methods to quantify biomarkers associate to equine type II collagen degradation in osteoarthritis patient and/or to support the development of new treatments.

1. Introduction

Osteoarthritis (OA) is a slowly progressive degenerative joint pathology characterized by the degradation of articular cartilage and remodeling of underlying bone, low-grade inflammation and chronic pain (Sharma, 2007). OA has been estimated to affect 20 million Americans from 25-74 years of age or 12% of the population (Lawrence et al., 1998). OA also affects animals. It is the most common cause of lameness in sports horses (Goodrich and Nixon, 2006) and over 8 million dogs (20% of total population) have been diagnosed with OA in the United States (Johnston, 1997). As the disease process is believed by many to originate in the articular cartilage, it is important to understand the fundamental mechanisms of cartilage degradation in order to identify specific biomarkers of the disease process to help diagnose early disease onset, to stage OA, to monitor response to targeted therapy (Poole et al., 2004, Gamero, 2007) and to identify new therapeutic targets (Gamero, 2007, Sumer et al., 2006, Sandell L.J., 2007). The cartilage loss that occurs in OA is an end point of very complex processes that result in a final common pathway of enzymatic destruction of cartilage matrix molecules including type II collagen and aggrecan. Proteolytic degradation of the relatively resistant intact type II collagen molecule, one of the major structural proteins of articular cartilage, is currently believed to be a key irreversible event in the process of cartilage degradation (Sandell L.J., 2007) and leads to a loss of structural and functional integrity of the matrix. Consequently, it is important to investigate this process to better understand early OA pathology and identify potential new therapeutic targets based on specific molecular mechanisms (Sandell L.J., 2007).

A limited number of enzymes have the capacity to cleave the intact triple helical molecule of type II collagen, the primary key event in its degradation (Werb Z, 1993). Following this primary cleavage that unravels the collagen molecule, a number of other matrix enzymes can then degrade the denatured molecule (Sandell L.J., 2007). The roles of several enzymes in these degradative events have been studied. The primary enzyme families are the collagenases, including the matrix metalloproteinases (MMPs) MMP-13, MMP-8, MMP-1 and MMP-14 (MT-MMP) (Werb Z, 1993). The proteolytic activities of MMPs on type II collagen have been previously reported (Werb Z, 1993) and the resulting degradation products were characterized and quantified by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) (Zhen et al., 2008). The collagenase MMP-13 preferentially cleaves the triple helical domain of type II collagen compared to other MMP's such as collagenases MMP-1 and MMP-8: these and other MMPs participate in secondary cleavage (Mitchell et al., 1996). Potential OA biomarkers, identifying specific byproducts of MMP-13 cleavage, have been created and validated (Poole et al., 2004) (Henrotin et al., 2007). Despite the development of these important screening tools for OA, potent MMP inhibitors to prevent type II collagen breakdown in articular cartilage are not yet currently available for use in clinics because of musculoskeletal side effects including joint stiffness, pain in arms, fibroplasia and tendinitis associated with their use (Sumer et al., 2006). Other proteases with a capacity to primarily cleave type II collagen are now being investigated.

Cathepsin K (CK), a cysteine protease, is the major vertebrate protease, outside the MMP family, capable of degrading intact type II collagen molecules (Li et al., 2004, Swingler et al., 2009). Investigations revealed that CK cleaves the telopeptides and the triple helical domain of bovine type II collagen into four principal fragments (F₁-F₄) with molecular weights ranging from 120-90 kDa (Kafienah et al., 1998). Western blotting, employing specific antibodies to different regions of the α_1 (II) chain, also demonstrated that CK initially cleaves native α_1 (II) collagen in the N-terminal helical region, rather than at the distinct MMP-13 cleavage site (Kafienah et al., 1998, Dejica et al., 2008, Dunbar and Wilson, 1994). N-terminal protein sequencing of the F₁ fragment, revealed cleavage at the G₂₆₁–K₂₆₂ bond (Kafienah et al., 1998).

Recent observations support a role for CK in cartilage type II collagen cleavage *in vivo*. CK activity has been identified in both human and equine naturally occurring OA by immunoanalytical and enzyme inhibition methodology (Dejica et al., 2008, Vinardell et al., 2009) pointing to its potential importance in type II collagen degradation in naturally occurring OA. In addition CK gene expression in human femoral head OA cartilage was reported to be significantly ($p \leq 0.00005$) elevated (5 fold) when compared to that of control cartilage procured from femoral neck fractures in a study profiling the expression of protease genes (Swingler et al., 2009). Furthermore, in experimental animal models of OA (transgenic Dell mice) up-regulation of CK expression was observed in OA cartilage and CK was detected in articular chondrocytes near sites of cartilage matrix destruction (Morko

et al., 2004). In a canine model of OA the administration of a CK inhibitor was recently reported to significantly reduce cartilage lesions compared to controls (Connor et al., 2009). Importantly treatment with a CK inhibitor also significantly reduced biomarkers of type II collagen degradation in urine, highlighting that monitoring of collagen degradation biomarkers may provide evidence of protective effects of anti-arthritis therapeutics on cartilage degradation (Connor et al., 2009). Together these new studies provide emerging evidence for a role for CK in cartilage matrix resorption in OA.

Current trends underline the emerging importance of high performance liquid chromatography couple with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for the investigation of protease degradomics based on its ability to achieve molecular characterization and quantitation of proteins and peptides (Guerrera and Kleiner, 2005, Bijlsma et al., 2006, Bischoff and Luider, 2004). By coupling mass spectrometry with separation techniques such as high performance liquid chromatography, analyses of protein and peptide mixtures can now be efficiently performed (Hoffmann, 2008, Wilson et al., 2008).

The objectives of this study were to characterize specific proteolytic fragments of type II collagen by CK using a comprehensive tryptic peptide mapping strategy derived from LC-MS, LC-MS/MS and bioinformatic analysis. The data will provide the basis for the development of new cleavage biomarker assays for specific to type II equine collagen.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Recombinant human procathepsin K was expressed and processed to the mature form as previously described (Billington et al. 2000). Human recombinant MMP-13 was purchased from Biomol International LP (Plymouth Meeting, PA). Equine type II collagen was purified from foetal cartilages following pepsin digestion using methodology described previously (Miller, 1971). Reagents and chemicals including chondroitin-4-sulphate (C4-S), trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), dithiothreitol (DTT), trypsin (proteomic grade), 4-aminophenyl mercury acetate (APMA), the sodium dodecyl sulphate (SDS), were purchased from Sigma (St-Louis, Mo). The molecular weight standards used for SDS-PAGE were purchased from GE Healthcare (Piscataway, NJ). HPLC grade acetonitrile and formic acid were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

2.2 Digestion of native equine type II collagen by CK

Equine type II collagen (2 mg/mL) was dissolved in 200 mM acetic acid overnight and dialyzed with a dialysis cassette (Slide-A-Lyzer, 7 KDa molecular cut-off, Pierce, Fisher, Nepean, ON) for two days at 4°C against a 100 mM sodium acetate buffer, containing 2 mM EDTA and 350 mM NaCl, (pH 5.5). The digestion buffer contained native equine type II collagen (1.0 mg/mL), 1 µL of C4-S (18 mg/mL), 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5), and CK (250 nM) previously activated with 2 mM DTT. The digestion was performed

for 16h at 32°C and stopped by the addition of (1 μ M) E-64, an irreversible cysteine protease inhibitor. The samples were stored at -80°C until subsequent analysis.

2.3 SDS-PAGE Electrophoresis

SDS PAGE electrophoresis was performed using the method described by Laemmli (Laemmli, 1970). Briefly, the samples were mixed with 2x SDS loading buffer (25% 0.5M Tris HCl (pH 6.5) 20% glycerol, 2% SDS, 0.4% DTT and 0.02% bromophenol blue). Reduction and alkylation of protein fragments was performed by the addition of 20 mM DTT and samples were heated at 90°C for 5 minutes. Following the reduction, free thiol groups were alkylated with 50 mM iodoacetamide at ambient temperature for 20 minutes. Aliquots of 5 μ L of molecular weight standards, 10 μ L of native equine type II collagen, 40 μ L of digested samples were loaded onto 6% and 15% (w/v) polyacrylamide gels. The separation was achieved at 150V and 130V respectively in the compartment buffer containing 0.025 M Tris, 0.192 M glycine and 0.075% SDS. The gels were fixed for 20 min. in a 50% methanol, 10% acetic acid and a 10% fixative from the Bio-Rad silver staining plus kit (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA), to enhance fragment visualisation. Gels were scanned and the molecular weight calculations were performed using a standard semi-log method (Merril, 1998). Then a linear regression was performed with the reciprocal migration time (R_f) of the protein standard to identified the log of relative molecular mass (M_r) (Merril, 1998).

2.4 Tryptic Digestion

The tryptic digestion of native equine type II collagen and CKs digestion samples was performed. The first used an approximate substrate/trypsin ratio of 1:20, incubated for 12h. at 37°C. Following the digestion of type II collagen with CK, an aliquot of the sample was subjected to a tryptic digestion using a substrate/enzyme ratio of (1:60) for 18h. of incubation at 37°C.

2.5 Peptide Analysis

The HPLC system consisted of a Thermo Surveyor autosampler and a Thermo Surveyor MS pump (Thermo, San Jose, CA, USA). The MS system used was a quadrupole ion trap (QIT) mass spectrometer Thermo LCQ Advantage (Thermo, San Jose, CA, USA). Data were acquired on a Dell Optiplex desktop computer (Round Rock, TX, USA). Data acquisition and analysis were performed using XCalibur 1.4 (Thermo, San Jose, CA, USA).

2.6 Chromatographic Conditions

The tryptic peptides were separated on a Thermo Biobasic C8 100 x 1 mm column prior to introduction into the electrospray ion source. The mobile phase conditions consisted of acetonitrile and 0.2% formic acid in water. From 0 to 2 min., 0% acetonitrile was used. From 2 to 60 min. a linear gradient was applied up to a ratio of 45:55 which was maintained for 10 min. The mobile phase composition ratio was reverted to the initial

conditions and the column was allowed to re-equilibrate for 20 min for a total run time of 90 min. The flow rate was fixed at 55 $\mu\text{L}/\text{min}$ and 2 μL of samples were injected.

2.7 Mass Spectrometry

The mass spectrometer was interfaced with the HPLC system using a pneumatic assisted electrospray (ESI) ion source equipped with a metal electrode. The sheath gas was set to 5 units and the ESI electrode was operated at 4000 V. The capillary temperature was at 300°C and the transfer capillary voltage was 40 V. The mass spectrometer operated in full scan [m/z 200-2000] with the maximum injection time of 300 ms. Collision induced dissociation (CID) spectra were collected with an isolation setting of 3 Da and a collision energy set at 30%.

2.8 Peptide Mapping and Identification of CK Cleavage Sites

Tryptic digest samples were analysed by LC-ESI/MS and the observed ions (m/z) were surveyed against a native equine type II collagen predicted peptide list generated with mMass (Version 2.4, ICT) (Strohalm et al., 2008). Proline and lysine hydroxylation, and glycolysis of hydroxylysine were taken into consideration and added as variables. Further analyses were performed with the assistance of MASCOT (Matrix Science, London, UK) and PROWL (Laboratory of Mass Spectrometry and Gaseous Ion Chemistry, New York, USA). The identification strategy is illustrated in Figure 2.

3. Results and Discussion

3.1 Digestion of native equine type II collagen by CK

A 24 h digestion of native equine type II collagen by CK was analyzed on a 6 % SDS PAGE gel (Figure 1). Four major fragments, denoted F₁ to F₄ were observed with a similar profile and mobilities to those previously observed when native bovine type II collagen was digested by CK (Kafienah et al., 1998) indicating similar susceptibility of equine collagen to this enzyme. However, only the F₁ fragment appears to be clearly distinct from the MMP-13 fragments observed on gels (data not shown).

3.2 Peptide Mapping of Native Equine type II collagen

Helical equine type II collagen was heat denatured and digested with trypsin. Following the analysis of the peptide mixtures, 315 proteolytic fragments were identified with a total sequence coverage of 84%. The analyses of these fragments permitted the identification of a series of post-translational modifications on 48 proline (P) and 5 lysine (K) residues. Hydroxylation was observed at the following specific amino acid motifs; GPP, GEP, and GEK within the equine type II collagen molecule. Moreover, glycosylation of hydroxylysine identified based on the signature neutral loss of 162 Da (Gadgil et al., 2007) was observed at positions K₁₆₄, K₅₅₁, K₇₀₄, K₇₃₄ and K₈₈₇ (GI:1480744) and were specifically identified based on the signature neutral loss of 162 Da (Gadgil et al., 2007).

3.3 Identification of non tryptic peptides in helical equine type II collagen samples digested by CK

By comparing the amino acid sequences of the two sets of mutually overlapping fragments, the position of CK fragmentation in the subunits can be deduced as illustrated in Figure 2. Using this strategy, our results indicate that CK proteolytic activity on equine type II collagen is characterized by 6 major cleavage sites. The LC-MS analysis results suggest cleavages at residues 189-190 (F₁), 252-253 (F₂), 326-327 (F₃), 428-429 (F₄), 563-564 (F₅) and 824-825 (F₆) producing F₁-F₆ shown in Figure 1 and the newly identified cleavage site that generates fragment F₁ which is different to that reported for human and bovine type II collagen (Figure 3). Interestingly, the molecular masses of these C-terminal fragments F₁; 116.9 KDa, F₂; 111.1 KDa, F₃; 104.4 KDa, F₄; 95.3 KDa, F₅; 82.9 KDa and F₆; 59.4 KDa are highly correlated with the fragments observed on the SDS-PAGE gel shown in Figure 1. Additionally, the calculated molecular weight for the 6 principal fragments observed were compatible with the proposed cleavages sites (Manz, 2004). The cleavage site previously reported (Kafienah et al., 1998) could not be established in the present analyses since the ion abundance of a product associated with this cleavage was too weak.

3.4 Molecular characterization of the principal proteolytic fragment (F₁)

Product ion spectra of the two peptides specific to the proposed cleavage site generating F₁ were collected. Characteristic peptide fragmentation patterns are shown in Figure 4 . Typically, Figure 5 shows the CID spectrum of KPGKSGERGPP(OH)GPQGAR [190-

206] at m/z 847 ($[M+2H]^{2+}$), compatible with the amino acid sequence of the proteolytic fragment F_1 . The spectrum revealed the presence of the characteristic b and y fragments at m/z 1410 (y_{14}), 1195 (y_{12}), 1165 (b_{12}), 1138 (y_{11}), 1008 (y_{10}), 995 (b_{10}), 841 (b_8), 795 (y_8), 699 (y_7), 685 (b_7), 585 (y_6), 555 (b_6), 528 (y_5) and 498 (b_5) with a peak observed at 16 min. CID spectrum of a second proteolytic fragment **GPP(OH)GPP(OH)GKPGDDGEAG** [174-189] at m/z 719 ($[M+2H]^{2+}$) is shown in Figure 6. The spectrum also revealed the presence of characteristic b and y fragments at m/z 1169 (y_{13}), 1112 (y_{12}), 989 (b_{11}), 902 (y_{10}), 874 (b_{10}), 845 (y_9), 717 (y_8), 620 (y_7), 592 (b_7) and 535 (b_6) with a peak observed at retention time of 15 min. The CID spectrum was compatible with the amino acid sequence of the proteolytic fragment [174-189]. These ions at m/z 847 and 719 were abundant and, following confirmation of the molecular structure of these peptides, it suggest that CK cleavage of equine type II collagen occurs at residue 189-190 and not at residue 192-193 from the N-terminus, as formerly derived from previous studies on bovine type II collagen (Kafienah et al., 1998).

4. Conclusion

We have demonstrated that despite a high level of sequence homology a previously described F_1 fragment (Kafienah et al., 1998) generated in bovine type II collagen is not observed following digestion of equine type II collagen with CK. Instead a different cleavage site is identified that generates a similar fragment in size. These results will permit the development of new ELISA based biomarker assays and immunohistochemical

methods allowing to study in body fluids and tissues specific proteolytic cleavage fragments of equine type II collagen. Furthermore, sensitive LC-MS/MS methods using isotopic labeling and reference internal standard strategy could be validated to support drug development program.

Acknowledgement

Kathleen Th  roux is a recipient of a Canadian Arthritis Network/The Arthritis Society trainee award.

References

- BIJLSMA, S., BOBELDIJK, I., VERHEIJ, E. R., RAMAKER, R., KOCHHAR, S., MACDONALD, I. A., VAN OMMEN, B. & SMILDE, A. K. 2006. Large-scale human metabolomics studies: a strategy for data (pre-) processing and validation. *Anal Chem*, 78, 567-74.
- BISCHOFF, R. & LUIDER, T. M. 2004. Methodological advances in the discovery of protein and peptide disease markers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 803, 27-40.
- CONNOR, J. R., LEPAGE, C., SWIFT, B. A., YAMASHITA, D., BENDELE, A. M., MAUL, D. & KUMAR, S. 2009. Protective effects of a cathepsin K inhibitor, SB-553484, in the canine partial medial meniscectomy model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 17, 1236-43.
- DEJICA, V. M., MORT, J. S., LAVERTY, S., PERCIVAL, M. D., ANTONIOU, J., ZUKOR, D. J. & POOLE, A. R. 2008. Cleavage of type II collagen by cathepsin K in human osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol*, 173, 161-9.
- DUNBAR, B. & WILSON, S. B. 1994. A buffer exchange procedure giving enhanced resolution to polyacrylamide gels prerun for protein sequencing. *Anal Biochem*, 216, 227-8.
- GADGIL, H. S., BONDARENKO, P. V., TREUHEIT, M. J. & REN, D. 2007. Screening and sequencing of glycosylated proteins by neutral loss scan LC/MS/MS method. *Anal Chem*, 79, 5991-9.
- GAMERO, P. 2007. Noninvasive biochemical markers in osteoarthritis. In: SAUNDERS (ed.) *Osteoarthritis*. Philadelphia.
- GOODRICH, L. R. & NIXON, A. J. 2006. Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Vet J*, 171, 51-69.

- GUERRERA, I. C. & KLEINER, O. 2005. Application of mass spectrometry in proteomics. *Biosci Rep*, 25, 71-93.
- HENROTIN, Y., ADDISON, S., KRAUS, V. & DEBERG, M. 2007. Type II collagen markers in osteoarthritis: what do they indicate? *Curr Opin Rheumatol*, 19, 444-50.
- HOFFMANN, E. S., V. 2008. Analysis of biomolecules. In: WILEY (ed.) *Mass spectrometry, principles and applications*. 3rd ed.
- JOHNSTON, S. A. 1997. Osteoarthritis. Joint anatomy, physiology, and pathobiology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 27, 699-723.
- KAFIENAH, W., BROMME, D., BUTTLE, D. J., CROUCHER, L. J. & HOLLANDER, A. P. 1998. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem J*, 331 (Pt 3), 727-32.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAWRENCE, R. C., HELMICK, C. G., ARNETT, F. C., DEYO, R. A., FELSON, D. T., GIANNINI, E. H., HEYSE, S. P., HIRSCH, R., HOCHBERG, M. C., HUNDER, G. G., LIANG, M. H., PILLEMER, S. R., STEEN, V. D. & WOLFE, F. 1998. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum*, 41, 778-99.
- LI, Z., YASUDA, Y., LI, W., BOGYO, M., KATZ, N., GORDON, R. E., FIELDS, G. B. & BROMME, D. 2004. Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans. *J Biol Chem*, 279, 5470-9.
- MANZ, A. P., N. LOSSIFIDIS, D. 2004. *Bioanalytical chemistry*, World Scientific Pub Co Inc.
- MERRIL, C. R., WASHART, K.M. 1998. Protein detection methods. *Gel Electrophoresis*. New York: Oxford University Press.
- MILLER, E. J. 1971. Isolation and characterization of a collagen from chick cartilage containing three identical alpha chains. *Biochemistry*, 10, 1652-9.

- MITCHELL, P. G., MAGNA, H. A., REEVES, L. M., LOPRESTI-MORROW, L. L., YOCUM, S. A., ROSNER, P. J., GEOGHEGAN, K. F. & HAMBOR, J. E. 1996. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*, 97, 761-8.
- MORKO, J. P., SODERSTROM, M., SAAMANEN, A. M., SALMINEN, H. J. & VUORIO, E. I. 2004. Up regulation of cathepsin K expression in articular chondrocytes in a transgenic mouse model for osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 63, 649-55.
- POOLE, A. R., IONESCU, M., FITZCHARLES, M. A. & BILLINGHURST, R. C. 2004. The assessment of cartilage degradation in vivo: development of an immunoassay for the measurement in body fluids of type II collagen cleaved by collagenases. *J Immunol Methods*, 294, 145-53.
- SANDELL L.J., H. D., HERING T.M. 2007. Cell biologie, biochemistry, and molecular biology of articular cartilage in osteoarthritis. In: SAUNDERS (ed.) *Osteoarthritis*. 4th ed. Philadelphia.
- STROHALM, M., HASSMAN, M., KOSATA, B. & KODICEK, M. 2008. mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 22, 905-8.
- SUMER, E. U., SCHALLER, S., SONDERGAARD, B. C., TANKO, L. B. & QVIST, P. 2006. Application of biomarkers in the clinical development of new drugs for chondroprotection in destructive joint diseases: a review. *Biomarkers*, 11, 485-506.
- SWINGLER, T. E., WATERS, J. G., DAVIDSON, R. K., PENNINGTON, C. J., PUENTE, X. S., DARRAH, C., COOPER, A., DONELL, S. T., GUILLE, G. R., WANG, W. & CLARK, I. M. 2009. Degradome expression profiling in human articular cartilage. *Arthritis Res Ther*, 11, R96.
- VINARDELL, T., DEJICA, V., POOLE, A. R., MORT, J. S., RICHARD, H. & LAVERTY, S. 2009. Evidence to suggest that cathepsin K degrades articular

cartilage in naturally occurring equine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 17, 375-83.

WERB Z, A. C. 1993. Proteinases and matrix degradation. *Textbook of Rheumatology*. Philadelphia: Saunders.

WILSON, R., BELLUOCIO, D. & BATEMAN, J. F. 2008. Proteomic analysis of cartilage proteins. *Methods*, 45, 22-31.

ZHEN, E. Y., BRITTAIN, I. J., LASKA, D. A., MITCHELL, P. G., SUMER, E. U., KARSDAL, M. A. & DUFFIN, K. L. 2008. Characterization of metalloprotease cleavage products of human articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 58, 2420-31.

Figures legends

- Figure 1 :** Analysis of *in vitro* digestion of native equine type II collagen by CK (350nM) using 6% and 15% gels SDS PAGE. 1) MW ladder, 2) Native Equine type II collagen et 3) Equine type II collagen digested 24h by CK.
- Figure 2 :** Example of proteolytic cleavage of equine type II collagen with CK followed by trypsin
- Figure 3 :** CK primary cleavage site in bovine type II collagen and alignment of corresponding human and equine sequences around this site.
- Figure 4:** Typical CID fragmentation pattern for peptides
- Figure 5 :** CID Spectrum of proteolytic fragment F1 ; KPGKSGERGPPPGPQGAR [190-206] at m/z 847 [M+2H]²⁺
- Figure 6 :** CID Spectrum of proteolytic fragment F1' ; GPP(OH)GPP(OH)GKPGDDGEAG [174-189] at m/z 719 [M+2H]²⁺

Figure 1 : Analysis of *in vitro* digestion of native equine type II collagen by CK (350nM) using a 6% SDS PAGE gel. 1. MW ladder, 2. Native Equine type II collagen and 3. Equine type II collagen digested 24h by CK.

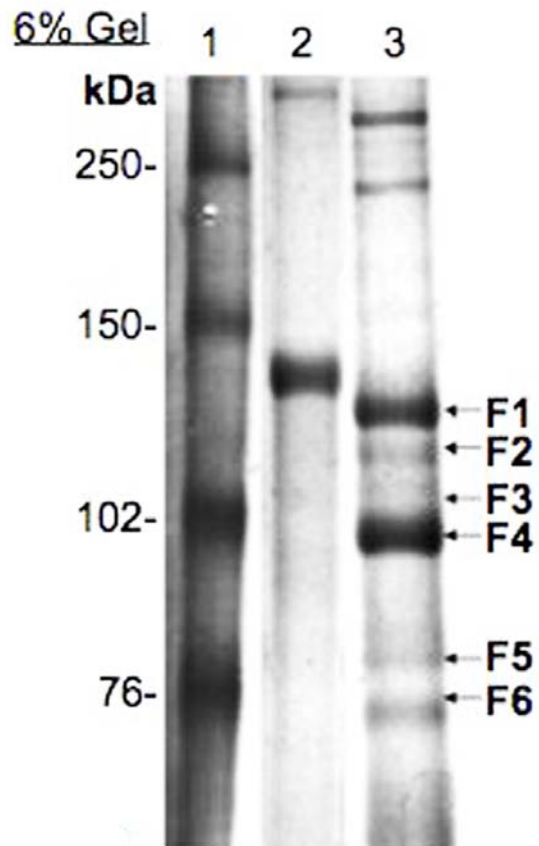


Figure 2 : Identification strategy used to reveal specific proteolysis fragments of equine type II collagen digested by CK.

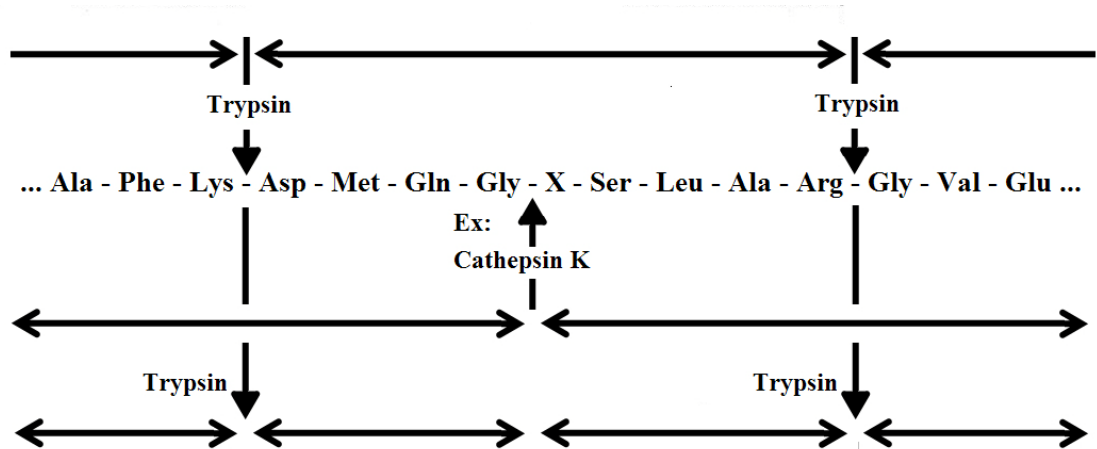


Figure 3 : CK primary cleavage site in bovine type II collagen and sequence alignment of corresponding human and equine sequences (Bornstein and Sage 1980; Richardson et Dodge, 1997)

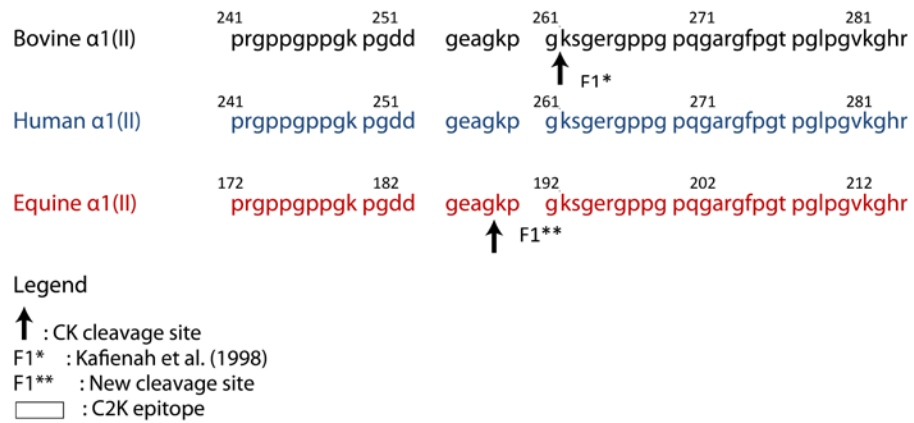


Figure 4 : Typical collision-induced peptide fragmentation pattern observed with tandem mass spectrometry (MS). This figure illustrates the accepted nomenclature for peptide fragment ions.

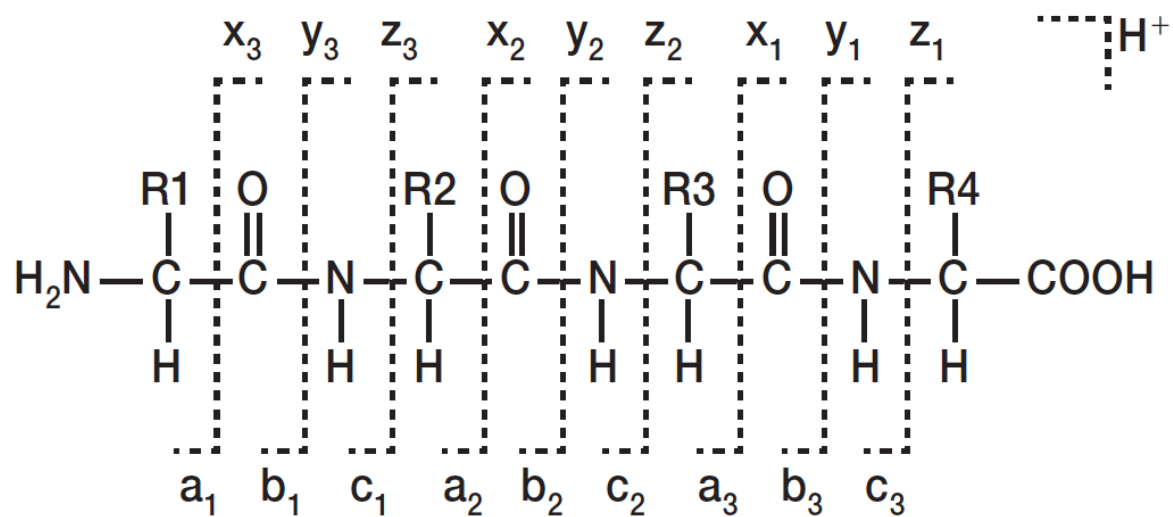


Figure 5 : CID Spectrum of proteolytic fragment KPGKSGERGPPGPQGAR [190-206] at m/z 847 $[M+2H]^{2+}$

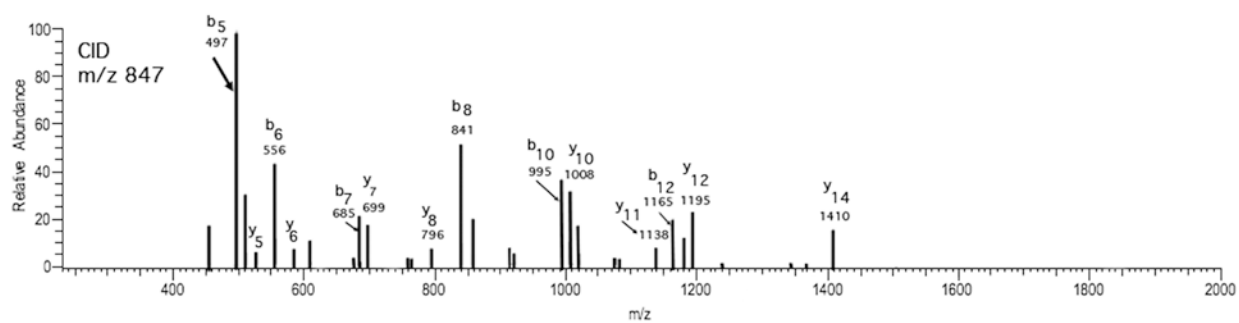
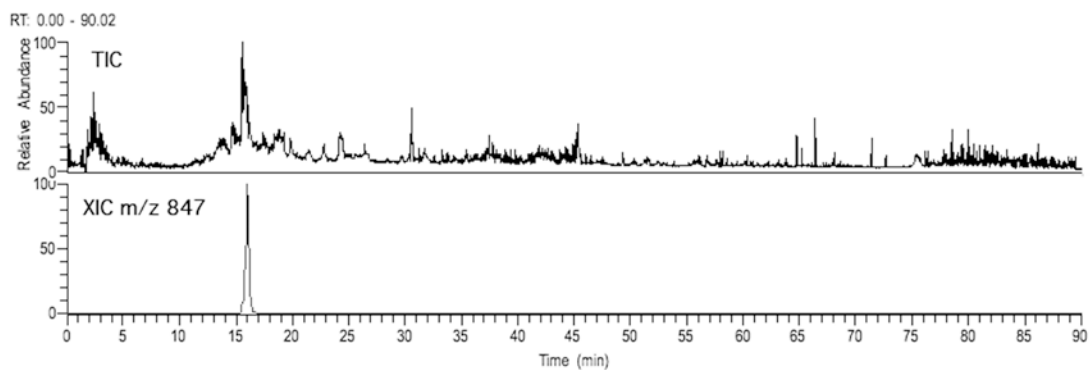
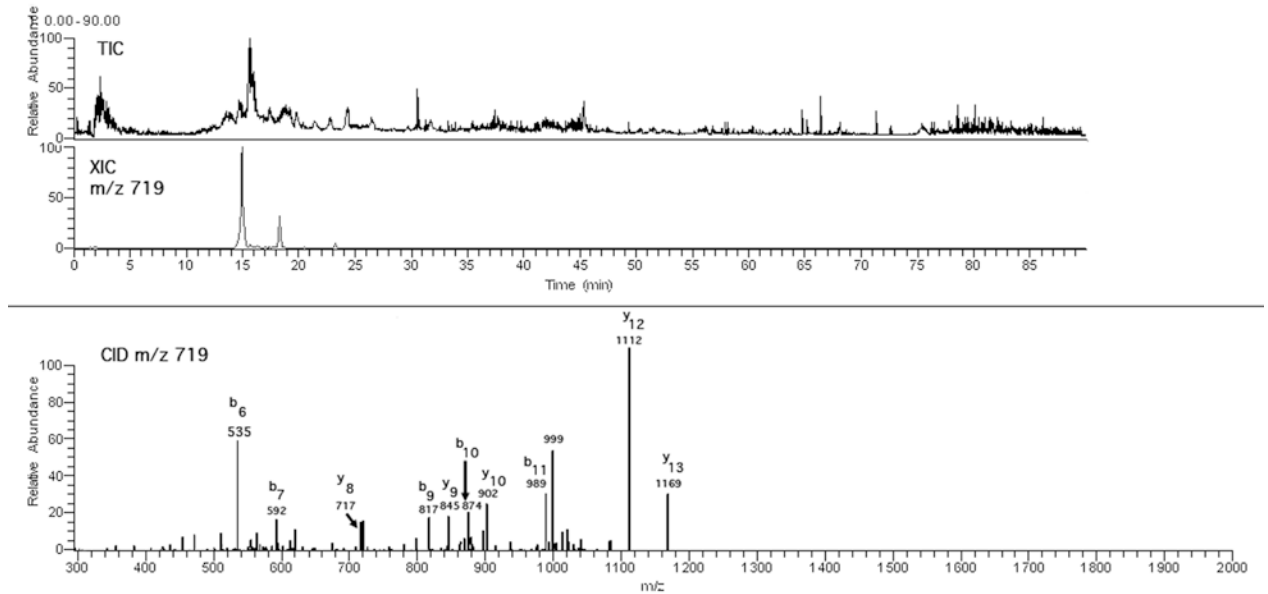


Figure 6: CID Spectrum of proteolytic fragment F1' ;
GPP(OH)GPP(OH)GKPGDDGEAG [174-189] at m/z 719 [M+2H]²⁺



Quatrième chapitre : Discussion

4.1 *Étude préliminaire de la digestion du collagène de type II natif équin par la CK*

En raison de la grande similitude entre la molécule de collagène de type II bovine et celle, équine, l'étude préliminaire consistait à confirmer la similarité entre l'activité enzymatique de la CK sur le collagène de type II bovin (Kafienah *et al.*, 1998) et équin. Ainsi, les travaux de Kafienah *et al.* (1998) ont servi de base afin d'élaborer les expériences initiales sur le collagène de type II équin, afin de déterminer les paramètres optimaux permettant la visualisation adéquate des quatre fragments produits par l'activité de la CK (F₁ à F₄). Le résultat de notre étude préliminaire a révélé, sur le gel de polyacrylamide, la présence de quatre fragments de poids moléculaires très semblables à ceux observés dans les travaux de Kafienah *et al.* (1998). Ce résultat suggère donc une analogie entre l'activité de la CK chez l'espèce bovine et équine. Par ailleurs, une étude plus poussée s'avère nécessaire afin de confirmer cette similitude.

4.2 *Étude de la digestion du collagène de type II natif équin par la CK*

Dans la perspective d'optimiser la visualisation des fragments ainsi que de se rapprocher des conditions *in vivo*, certains paramètres ont été modifiés. La température de digestion a été augmentée à 32°C, température semblable à celle des articulations (Verzijl *et al.*, 2000), tout en restant inférieure à la température de fusion du collagène, de 38°C (Hay, 1982). Le pH du milieu utilisé a été augmenté à 5.5, au lieu de 5.0, ce qui se rapproche du pH moyen d'une articulation atteinte d'OA (Konttinen *et al.*, 2002). Le temps de digestion a été allongé jusqu'à 24h et la concentration d'enzymes a été augmentée de 250 nM à 350 nM, dans le but d'augmenter la production des produits de dégradation, facilitant ainsi la détection et la caractérisation des fragments obtenus par la digestion du collagène de type II équin par la CK. Les changements ont provoqué une diminution de la production des fragments F₂ et F₃, ainsi qu'une augmentation de la production des fragments F₁, F₄ et

des autres plus petits (F'_1 à F'_4 , F_5 et F_6). Selon les changements apportés aux paramètres de digestion, ceux-ci devraient permettre la formation des fragments se rapprochant de ce qui serait observé en situation *in vivo*.

La première coloration utilisée est celle à base de bleu de Coomassie. C'est une méthode rapide qui ne permet que la détection de plus de 0.3 à 0.5 μg de protéine par bande sur gel de SDS-PAGE (Wirth et Romano, 1995; Sasse et Gallagher, 2003). Une investigation plus approfondie du patron de fragmentation a été réalisée à l'aide d'une coloration pratiquement cent fois plus sensible, le nitrate d'argent (Wirth et Romano, 1995; Sasse et Gallagher, 2003). Ainsi, six autres fragments liés à la dégradation du collagène de type II équin par la CK ont été observés sur les gels de polyacrylamide. Sur le gel à 6% de polyacrylamide, les fragments F_5 et F_6 ont été identifiés, en plus des fragments F_1 à F_4 précédemment observés. La masse moléculaire a été déterminée par le calcul de la mobilité relative (rf), comme expliqué précédemment (Méthodes analytiques 2.1.7). Les masses déduites par cette technique étaient de : F_1 ; 118 KDa, F_2 ; 112 KDa, F_3 ; 106 KDa, F_4 ; 98 KDa, F_5 ; 86 KDa and F_6 ; 61 KDa. Sur le gel de 15%, quatre autres fragments ont été observés et nommés de F'_1 à F'_4 . Leur poids moléculaire respectif, déterminé par le calcul du rf, est de : 17 kDa pour F'_1 , 26 kDa pour F'_2 , 35 kDa pour F'_3 et 42 kDa pour F'_4 : 42 kDa. Nous avons attribué les termes suivant F_x et F'_x aux fragments qui semblent complémentaires; F_x pour le fragment du côté C-terminal du site de clivage et F'_x pour celui du côté N-terminal. On observe des relations entre certains fragments et plus particulièrement entre les fragments F_1 (118 kDa) et F'_1 (17 kDa), ce qui donne un poids moléculaire global de 135 kDa, le poids moléculaire correspondant à une molécule de collagène de type II équin sous sa forme native (Richardson et Dodge, 1997).

Suivant l'observation de cette relation on s'attendait à une coloration de même intensité pour les fragments F_1 et F'_1 , suggérant une même concentration. Cependant, sur les gels (Figure 3.4), une différence de coloration entre ces deux fragments, F_1 et F'_1 , suggère une différence de concentration. Cette différence peut être induite par l'utilisation du nitrate d'argent comme agent révélateur des protéines. Comme mentionnée

précédemment, cette technique ne présente que peu de corrélation avec la concentration protéinique des bandes sur le gel, comparativement à la technique de coloration au bleu de Coomassie (Schleicher et Watterson, 1982; Wirth et Romano, 1995). Il est aussi possible que cette différence soit due à une activité protéolytique secondaire de la CK sur le plus petit fragment, réduisant ainsi sa concentration. Il est en effet connu que la CK a une activité enzymatique très active sur les molécules de collagène une fois dénaturées (Kafienah *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2004).

4.3 Étude de la spécificité des sites de digestion de la CK comparativement à ceux de la MMP-13

Il est connu que le collagène de type II intact est également clivé par les collagénases et tout particulièrement par la collagénase-3 (MMP-13) (Nagase *et al.*, 2006). Afin de s'assurer de la spécificité des fragments produits par la CK comparativement à la MMP-13, une migration sur SDS-PAGE des produits de digestion du collagène de type II par chacune de ces enzymes, a été exécutée. Les résultats ont démontré des différences dans la migration des fragments, produits par l'activité des deux enzymes qui ont été observées (figure 3.3). La comparaison de la migration des deux types de digestion, sur le gel de 6%, permet d'identifier que les fragments F₁, F₄ et F₆ sont spécifiques à l'activité protéolytique de la CK, comparativement aux fragments générés par l'activité de la MMP-13. Par contre, lors de la comparaison de certaines bandes sur le gel, la diffusion des fragments F₂, F₃ et F₅, ne permet pas d'assurer leurs spécificités de formation.

La technique de SDS-PAGE utilisée offre généralement une bonne approximation de la masse moléculaire des éléments présents dans l'échantillon analysé, mais peut parfois manquer de précision et de résolution (Liebler, 2002). Ceci peut être expliqué par la présence de sites de glycolisation sur la molécule de collagène de type II. En effet, la présence de glycolisation interfère avec les liaisons que le SDS établit avec les aa lors du processus de linéarisation de la molécule (Liebler, 2002). De plus, les conditions de migration, la sensibilité des instruments ainsi que la qualité des produits utilisés peuvent

influencer la diffusion (Liebler, 2002). La concentration du gel peut également influencer la migration des protéines, même dénaturées. Ainsi, l'évaluation des masses moléculaires des protéines ne s'avère qu'une approximation, d'où l'intérêt d'associer cette technique à la spectrométrie de masse, afin de réaliser une caractérisation plus sensible et exacte des fragments obtenus.

4.4 Cartographie des peptides provenant du collagène de type II natif équin

Afin de cartographier les peptides de collagène de type II natif équin, un appareil de HPLC couplé à un spectromètre de masse utilisant une source d'ionisation par électrospray (HPLC-ESI/MS) a été utilisé.

La stratégie d'identification de la carte peptidique a été basée sur la transposition des valeurs $[M+nH]^{n+}$ obtenues par l'analyse HPLC-ESI/MS en valeur de masse de séquences d'aa. Les résultats de l'analyse de ces fragments tryptiques de collagène de type II par HPLC-ESI/MS, ont été comparés à des simulations de fragmentation produite à l'aide du logiciel mMass (mMass version 2.4). Ainsi, il y a 305 fragments recouvrant près de 84% du collagène de type II équin qui ont été identifiés, ce qui est considéré comme un recouvrement important (De Hoffmann et Stroobant, 2007). Lors de l'identification de ces fragments, il a été noté que quelques-uns des fragments identifiés recouvrent la séquence du signal peptidique de la protéine. Ce qui indique que certains des composants de la solution de collagène de type II équin utilisés sont, entre autres, des molécules de collagène intracellulaire (Van Der Rest, 1991).

Des modifications post-traductionnelles variables ont été simulées, telles que celles observées précédemment dans le collagène de type II humain : l'hydroxylation de prolines (P) ainsi que l'hydroxylation accompagnée d'une glycosylation pour les lysines (K) (Bornstein and Sage 1980). Suivant la même stratégie d'identification de la carte peptidique, la comparaison des valeurs $[M+nH]^{n+}$ obtenues par l'analyse et des valeurs de

masse des simulations de séquences d'aa modifiées, a été exécutée. Ainsi, il a été possible d'identifier l'emplacement de plusieurs modifications post-traductionnelles présentes sur la molécule de collagène de type II équin (Figure 3.5). C'est-à-dire, 48 sites d'hydroxylation de prolines ainsi que cinq lysines qui sont à la fois hydroxylées et glycosylées. Les prolines hydroxylées sont situées selon les arrangements spécifiques d'aa suivant, GPP, GEP et GEK, présents sur la molécule de collagène de type II équin. Nos résultats seraient donc compatibles avec ce qui a été précédemment observé pour le collagène de type I et II humain (Bornstein, et Sage, 1980; Su *et al.*, 1989). Parmi ces modifications post-traductionnelles sur les prolines, trois d'entre elles semblent hydroxylées de façon permanente (P²⁸⁷, P⁵²¹ et P⁵⁷⁵), alors que les autres (45) ont paru être présentes sous les deux formes, hydroxylées ou non (Figure 3.5). Concernant les lysines modifiées, elles sont observées en positions K¹⁶⁴, K⁵⁵¹, K⁷⁰⁴, K⁷³⁴ et K⁸⁸⁷, leur identification étant basée sur la signature d'une perte neutre de 162 Da, due à la présence de la fonction glycolysée sur la protéine. Une perte neutre spécifique à une perte d'hexoses de l'espèce ionique (Gadgil *et al.* 2007) (figure 3.5). L'analyse n'a été faite que sur un seul spécimen de collagène de type II équin. Alors, il est certain que l'analyse de plusieurs sources de collagène de cartilage équin donnerait une image plus représentative des modifications post-traductionnelles présentes sur la séquence d'aa du collagène de type II équin. Ceci pourrait même être le sujet d'une petite étude à venir, afin d'approfondir et confirmer les informations recueillies sur les modifications post-traductionnelles présentes sur la séquence d'aa du collagène de type II équin.

4.5 Identification des fragments produits par l'activité protéolytique de la CK sur le collagène de type II équin

L'identification des fragments non trypsiques, composés d'une extrémité engendrée par l'activité protéolytique de la trypsine et l'autre par celle de la CK, informe sur la présence d'un site de clivage par la CK. Ainsi, six sites de clivage protéolytique de la CK sur le collagène hélicoïdal intact de type II équin ont été localisés par l'entremise de

l'identification des fragments non tryptiques présents en abondance : [189-190], [252-253], [326-327], [428-429], [563-564] et [824-825] (Figure 3.6). Les masses associées aux fragments les plus longs (C-Terminaux [X-1418] : F_x) résultant de ces sites de clivage, sont les masses moléculaires suivantes : F_1 : 116.9 kDa, F_2 : 111.1 kDa, F_3 : 104.4 kDa, F_4 : 95.3 kDa, F_5 : 82.9 kDa et F_6 : 59.4 kDa. Une forte corrélation est constatée entre les masses assignées aux longs fragments F_1 à F_4 observés sur les gels de SDS-PAGE 1D (Figure 3.4) et les masses associées aux sites de clivage déterminés par l'analyse HPLC-ESI/MS. L'utilisation d'un appareil de plus haute résolution aurait pu être davantage adéquat comme stratégie d'analyse, mais ce type d'appareillage est plus rare et beaucoup plus onéreux à utiliser. Cependant, la stratégie utilisée dans le cadre de cette analyse offre un degré d'exactitude des résultats suffisamment élevé afin d'identifier proprement les fragments correspondant aux valeurs $[M+nH]^{n+}$ obtenues.

4.6 Caractérisation moléculaire du principal fragment protéolytique ($^E F_1$)

Nous avons appelé ce nouveau fragment ($^E F_1$) pour des raisons de proximité du site de clivage F_1 précédemment identifié par Kafienah (1998) et ajouté un (E) pour son identification chez l'espèce équine. La caractérisation moléculaire du site de clivage protéolytique principal $^E F_1$ a été réalisée par l'investigation de deux spectres MS/MS des ions représentant les côtés opposés du site de digestion $^E F_1$ nouvellement identifié ; les ions 847 m/z et 719 m/z.

Ainsi, le spectre MS/MS de l'ion d'une valeur de masses sur charge de 847 m/z est présent à l'intérieur du pic identifié au temps d'éluion de 16 min., a permis de déterminer qu'il représentait la séquence KPGKSGERGPP(OH)GPQGAR. Le spectre révèle la présence de fragments caractéristiques b et y à des m/z de : 1410 (y_4), 1195 (y_6), 1165 (b_{12}), 1138 (y_7), 1008 (y_8), 995 (b_{10}), 841 (b_8), 795 (y_{10}), 699 (y_{11}), 685 (b_7), 585 (y_{12}), 555 (b_6), 528 (y_{13}) et 498 (b_5). Ces fragments sont tous compatibles avec la structure du peptide identifié, qui représente la séquence d'aa [190-206] située en aval du site de clivage, sur le

nouveau fragment ${}^E F_1$ (Figure 3.8). Le spectre qui a été obtenu suite à l'analyse MS/MS de l'ion m/z 719 ($[M+2H]^{2+}$) au temps d'éluion de 15 min., est constitué par les fragments b et y à des m/z de 1169 (y_4), 1112 (y_5), 999 (y_6), 989 (b_{11}), 902 (y_7), 874 (b_{10}), 845 (y_8), 717 (y_9), 620 (y_{10}), 592 (b_7) et 535 (b_6). Le tout est associé à la séquence des aa suivants [174-189], donc **GPP(OH)GPP(OH)GKPGDDGEAG**, situé en amont du site de clivage (Figure 3.9). La présence abondante de ces deux ions de m/z 847 et 719, confirme qu'ils sont sans doute des fragments de dégradation très importants. Cependant, ces résultats suggèrent que le site de clivage du collagène de type II équin par la CK est situé entre les résidus 189-190 et non entre les résidus 192-193 à partir de l'extrémité N-terminal, comme identifié par l'étude menée sur l'activité de la CK sur le collagène de type II bovin (Kafienah *et al.*, 1998).

Les résultats suggèrent que la présence du fragment F_1 , proposé par Kafienah *et al.* (1998), ne peut pas être clairement démontrée puisque l'abondance d'ions correspondant à ce clivage était trop faible pour produire un spectre MS/MS adéquat. La première hypothèse expliquant cette observation était que ce nouveau site de clivage serait la résultante d'une activité secondaire de l'enzyme suivant le clivage F_1 précédemment identifié par Kafienah *et al.* (1998). Par contre, le fragment identifié par les spectres MS/MS (**KPGKSGERGPP(OH)GPQGAR**), recouvre le site de clivage F_1 précédemment identifié par Kafienah *et al.* (1998). Dans le cas d'une activité protéolytique secondaire, ce fragment n'aurait pas été observé, ce qui infirme cette première hypothèse. Selon la seconde hypothèse, le site de clivage précédemment identifié par Kafienah *et al.* (1998) serait dû à une activité protéolytique secondaire au site de clivage ${}^E F_1$. Par contre, le site de digestion identifié par Kafienah *et al.* (1998) est la résultante d'une digestion du collagène de type II par la CK pendant 16h, alors que nos analyses ont été réalisées suite à une digestion de 24h, sous des conditions très semblables. De plus, les résultats de Kafienah *et al.* (1998) ne font aucune mention de la présence possible d'un site de clivage antérieur à celui qu'ils ont observé. À la lumière de ces informations, il serait peu probable que cette hypothèse soit valide. Finalement, nos résultats suggèrent que le fragment F_1 dérivé des

investigations de Kafienah *et al.* (1998) ne soit possiblement pas un produit de digestion important suite à la digestion du collagène de type II équin, par la CK, en raison d'une distinction d'espèce. Une différence au niveau des modifications post-traductionnelles pourrait expliquer que ces résultats antérieurs ne semblent pas être totalement transposables au collagène de type II équin, et ce, en dépit de l'homologie élevée entre ces espèces (figure 3.1).

4.7 *Investigation sur l'homologie et la spécificité d'un biomarqueur potentiel*

Une investigation sur la séquence d'aa située à proximité du site de clivage ^EF₁ de la CK sur le collagène de type II bovin, humain et équin, a été réalisée afin de déterminer la spécificité des néoépitopes formés par ce clivage. Cette étude a permis d'identifier quelques légères différences dans la séquence d'aa des espèces (figure 3.1).

Ensuite, nous avons effectué une analyse Blast afin de déterminer si les séquences d'aa des néoépitopes identifiés sont bien spécifiques et non retrouvées ailleurs que dans le collagène de type II équin. Nous avons analysé spécifiquement les molécules de collagène de type I, III, IX et XI, ainsi que les molécules composant le cartilage. En raison de l'indisponibilité des séquences de collagène de type I, III, IX et XI équin, nous avons été obligés d'employer les séquences humaines (Seyer et Kang 1977; Bornstein et Sage 1980; Bernard, Yoshioka et al., 1988; Su, Lee et al. 1989; Muragaki, Kimura et al. 1990). Cependant, il y a un taux élevé d'homologie entre les séquences d'aa humaines et équine au niveau du collagène de type II (Richardson et Dodge, 1997). Nos résultats suggèrent que les six premiers aa des néoépitopes situés sur le fragment F₁ (KPGKSG_{équin} et KPGKAG_{humain}) sont spécifiques au collagène de type II respectif parmi toutes les protéines, équines ou humaines, séquencées ou prédites. Ces segments pourraient ainsi être utilisés dans la perspective de produire des anticorps qui seraient spécifiques pour le clivage de CK pour les deux espèces.

4.8 Études futures

L'identification de ce nouveau site de clivage sur le collagène de type II équin, diffère de celui précédemment identifié (Kafienah *et al.*, 1998), ce qui ouvre la voie à diverses opportunités de recherches, suivant la caractérisation et l'identification de la séquence spécifique au collagène de type II équin. Ainsi, il serait intéressant d'effectuer une investigation sur la possibilité de la production d'un anticorps reconnaissant cette séquence spécifique au fragment $^E F_1 ; K^{190} P G K S G E R^{197}$.

L'élaboration d'un anticorps détectant ce produit de clivage chez l'espèce équine pourrait être un outil clé dans l'établissement d'un diagnostic précoce des tissus atteints d'OA. L'application de techniques d'immunohistochimie et d'ÉLISA avec ce nouvel anticorps, pourrait permettre un suivi métabolique en réponse à un agent thérapeutique contre l'activité de la CK ou de fournir un pronostic approprié concernant l'évolution de la pathologie. La détection de ces produits dans les liquides ou les tissus *in vitro* et *in vivo* devra être validée et optimisée.

Il sera important de valider et d'optimiser la méthodologie employant des liquides, tissus normaux et certains, atteints d'OA, afin de permettre la détection des fragments de dégradation du collagène de type II équin, produits par l'activité protéolytique de la CK. Ces étapes pourraient démontrer l'efficacité de la reconnaissance et la spécificité de l'anticorps dans des conditions *in vivo*. De plus, en raison du taux élevé d'homologie entre la séquence d'aa équine et humaine pour le collagène de type II, il serait intéressant de déterminer par une investigation si le néoépitope, adapté à la séquence d'aa humaine ($K P_{OH} G K A G E R$) est produit par l'activité de la CK chez les humains. Ce qui pourrait constituer un outil prometteur tant pour l'espèce équine que pour l'espèce humaine.

Cinquième chapitre : Conclusion

En conclusion, nos résultats apportent des informations nouvelles aux connaissances déjà établies sur le collagène de type II équin, ainsi que sur l'activité enzymatique de la CK sur ce dernier. D'abord, nous avons identifié différentes modifications post-traductionnelles du collagène de type II équin, c'est-à-dire 48 sites d'hydroxylation de prolines, en plus de 5 lysines étant à la fois hydroxylées et glycosylées. Subséquemment, nous avons identifié de nouveaux sites de clivage, dont l'un nommé $^E F_1$ en raison de sa grande proximité avec celui identifié précédemment lors de l'étude de Kafienah *et al.* (1998) sur le collagène de type II bovin. La création d'anticorps spécifiques à ces sites de clivage aura le potentiel de permettre l'élaboration de méthodes de dépistage d'OA, plus sensibles et plus sélectives de l'activité protéolytique de la CK sur le cartilage articulaire de l'espèce équine et, éventuellement, pour les tissus humains. Ces méthodes permettraient de suivre l'activité de la CK et deviendraient des outils intéressants dans l'évaluation de réponses à des thérapies pour l'OA et dans le développement de nouvelles drogues thérapeutiques contre l'activité de la CK pour les articulations atteintes d'OA.

Bibliographie

- Altman RD. Laboratory findings. In : Moskowitz RW, Altman RD, Hochberg MC, Buckwalter JA et Goldberg VM. (Eds.), Osteoarthritis, 4th edition. Saunders, Philadelphia. 2007 : P201-214.
- Aubrey J et Hough J. Pathology of osteoarthritis. In : Moskowitz RW, Altman RD, Hochberg MC, Buckwalter JA et Goldberg VM. (Eds.), Osteoarthritis, 4th edition. Saunders, Philadelphia. 2007 : P51-72.
- Bernard M, Yoshioka H, Rodriguez E, Van der Rest M, Kimura T, Ninomiya Y, Olsen BR et Ramirez F. Cloning and sequencing of pro-alpha 1 (XI) collagen cDNA demonstrates that type XI belongs to the fibrillar class of collagens and reveals that the expression of the gene is not restricted to cartilagenous tissue. *J Biol Chem* 1988 : 263(32): 17159-17166.
- Billinghurst RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, Chen J, Van Wart H et Poole AR. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 1997;99 (7): 1534-1545.
- Bischoff R et Luider TM. Methodological advances in the discovery of protein and peptide disease markers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004 : 803(1): 27-40.
- Bornstein P et Sage H. Structurally distinct collagen types. *Annu Rev Biochem* 1980 : 49: 957-1003.
- Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, Kurdyla JT, McNulty DE, Drake FH, Gowen M et Levy MA. Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem*. 1996 May 24;271(21):12517-24.
- Bouchgua M, Alexander K, d'Anjou MA, Girard CA, Carmel EN, Beauchamp G, Richard H, Laverty S. Use of routine clinical multimodality imaging in a rabbit model of osteoarthritis--part I. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 Feb;17(2):188-96.
- Brix K, Dunkhorst A, Mayer K, et Jordans S. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie* 2008 ; 90 (2): 194-207.

- Bromme D, Okamoto K, Wang BB et Biroc S. Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. *J Biol Chem*. 1996 Jan 26;271(4):2126-32.
- Canas B, Lopez-Ferrer D, Ramos-Fernandez A, Camafeita E et Calvo E. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2006 Feb;4(4):295-320.
- Cantley CE, Firth EC, Delahunt JW, Pfeiffer DU et Thompson KG. Naturally occurring osteoarthritis in the metacarpophalangeal joints of wild horses. *Equine Vet J* 1999 ; 31 (1): 73-81.
- Caron JP. Osteoarthritis. In : Ross M. W. and Dyson SJ. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. Saunders. 2003 : 572-594.
- Céleste C, Farley J, Richard H et Laverty S. Modèles d'animaux pour l'étude de l'OA. Dans la revue : *Le médecin vétérinaire du Québec*, 2005 : 35, N 1 : 30-36.
- Cruz AM et Hurtig MB. Multiple pathways to osteoarthritis and articular fractures: is subchondral bone the culprit? *Vet Clin North Am Equine Pract* 2008 ; 24 (1): 101-116.
- Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis JJ et Wolman M. Are the polarization colors of picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry* 1989 ; 93: 27-29.
- Dejica VM, Mort JS, Laverty S, Percival MD, Antoniou J, Zukor DJ et Poole AR. Cleavage of type II collagen by cathepsin K in human osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol* 2008;173 (1): 161-169.
- Dewire P et Einhorn TA. The joint as an organ?. In Moskowitz RW, Howell DS, Altman RD, Buckwalter JA et Goldberg VM (Eds.), *Osteoarthritis*, 3rd edition. Saunders, Philadelphia.2001 : 49-68.
- Dodge GR et Poole AR. Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid, and osteoarthritic articular cartilages and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin 1. *J Clin Invest* 1989 ; 83 (2): 647-661.
- Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, Lee-Rykaczewski E, Coleman L, Rieman D, Barthlow R, Hastings G et Gowen M. Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem*. 1996 May 24;271(21):12511-6.

- Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res.* 2002;4(1):30-5.
- Eyre DR, Weis MA, Wu JJ. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *Eur Cell Mater.* 2006 Nov 2;12:57-63.
- Eyre DR, Weis MA, Wu JJ. Advances in collagen cross-link analysis. *Methods.* 2008 May;45(1):65-74.
- Eyre DR, McDevitt CA, Billingham ME et Muir H. Biosynthesis of collagen and other matrix proteins by articular cartilage in experimental osteoarthritis. *Biochem J.* 1980 : Jun 15;188(3):823-37.
- Fang AS, Miao X, Tidswell PW, Towle MH, Goetzinger WK, et Kyranos JN. Mass spectrometry analysis of new chemical entities for pharmaceutical discovery. *Mass Spectrom Rev.* 2008 Jan-Feb;27(1):20-34.
- Frisbie DD, Kawcak CE, Werpy NM, Park RD et McIlwraith CW. Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. *Am J Vet Res* 2007; 68 (3): 290-296.
- Frisbie DD, Cross MW et McIlwraith CW. A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2006; 19 (3): 142-146.
- Frisbie DD. Synovial joint biology and pathology. In Auer JA et Stick JA. : *Equine surgery*, 3th Ed. Saunders : Philadelphia. 2006: 1036-1055.
- Gadgil HS, Bondarenko PV, Treuheit MJ, Ren D. Screening and sequencing of glycosylated proteins by neutral loss scan LC/MS/MS method. *Anal Chem.* 2007 Aug 1;79(15):5991-9. Epub 2007 Jun 16.
- Garnero P. Noninvasive biochemical markers in osteoarthritis. In Moskowitz RW, Altman RD, Hochberg MC, Buckwalter JA et Goldberg VM. (Eds.), *Osteoarthritis*, 4th edition. Saunders, Philadelphia. 2007 : 215-232.
- Gelb BD, Shi GP, Chapman HA et Desnick RJ. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science (New York, NY)* 1996 ; 273 (5279): 1236-1238.

- Gold G, Chandnani V et Resnick D. Radiologic diagnosis. In Moskowitz RW, Altman RD, Hochberg MC, Buckwalter JA et Goldberg VM. (Eds.), Osteoarthritis, 4th edition. Saunders, Philadelphia. 2007: 147-166.
- Goldring MB. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006 ; 20 (5): 1003-1025.
- Goldring MB et Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 2007 ; 213 (3): 626-634.
- Goodrich LR et Nixon AJ. Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Vet J* 2006;171 (1): 51-69.
- Gowen M, Lazner F, Dodds R, Kapadia R, Feild J, Tavarria M, Bertocello I, Drake F, Zavarselk S, Tellis I, Hertzog P, Debouck C et Kola I. Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *J Bone Miner Res* 1999;14 (10): 1654-1663.
- Guerrera IC et Kleiner O. Application of mass spectrometry in proteomics. *Biosci Rep*. 2005; 25(1-2): 71-93.
- Han S, Makareeva E, Kuznetsova NV, DeRidder AM, Sutter MB, Losert W, Phillips CL, Visse R, Nagase H et Leikin S. Molecular mechanism of type I collagen homotrimer resistance to mammalian collagenases. *J Biol Chem*. 2010 Jul 16;285(29):22276-81.
- Hay ED. Cell biology of extracellular matrix. Edited by Elizabeth D. Hay. Plenum Press, New York, État-Unis. 1982; 1 – 37.
- Henrotin Y, Addison S, Kraus V et Deberg M. Type II collagen markers in osteoarthritis: what do they indicate? *Curr Opin Rheumatol* 2007 ; 19 (5): 444-450.
- De Hoffmann E et Stroobant V. Analysis of biomolecules. Mass spectrometry, principles and applications. Wiley. 2007.
- Homandberg GA. Cartilage damage by matrix degradation products: fibronectin fragments. *Clin Orthop Relat Res* 2001 (391 Suppl): S100-107.
- Hou WS, Li W, Keyszer G, Weber E, Levy R, Klein MJ, Gravallesse EM, Goldring SR, Brömme D. Comparison of cathepsins K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium. *Arthritis Rheum*. 2002 Mar;46(3):663-74.

- Hou WS, Li Z, Buttner FH, Bartnik E et Bromme D. Cleavage site specificity of cathepsin K toward cartilage proteoglycans and protease complex formation. *Biological chemistry* 2003 ; 384 (6): 891-897.
- Hough AJ. Pathology of osteoarthritis. In Moskowitz RW, Altman RD, Hochberg MC., Buckwalter JA, Goldberg VM (Eds.), *Osteoarthritis*, 4th edition. Saunders, Philadelphia.2007 : 51-72.
- Hulejova H, Baresova V, Klezl Z, Polanska M, Adam M et Senolt L. Increased level of cytokines and matrix metalloproteinases in osteoarthritic subchondral bone. *Cytokine* 2007 ; 38 (3): 151-156.
- Inaoka T, Bilbe G, Ishibashi O, Tezuka K, Kumegawa M et Kokubo T. Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 ; Jan 5;206(1):89-96.
- Iozzo RV. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1997;32(2):141-74.
- Jones GC, Riley GP et Buttle DJ. The role of proteases in pathologies of the synovial joint. *Int J Biochem Cell Biol* 2008 ; 40 (6-7): 1199-1218.
- Kafienah W, Bromme D, Buttle DJ, Croucher LJ et Hollander AP. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem J.* 1998 May 1;331 (Pt 3):727-32.
- Kiviranta R, Morko J, Uusitalo H, Aro HT, Vuorio E et Rantakokko J. Accelerated turnover of metaphyseal trabecular bone in mice overexpressing cathepsin K. *J Bone Miner Res* 2001 ; 16 (8): 1444-1452.
- Kontinen YT, Mandelin J, Li TF, Salo J, Lassus J, Liljeström M, Hukkanen M, Takagi M, Virtanen I et Santavirta S. Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*2002 ; Apr;46(4):953-60.
- Knudson CB et Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol.* 2001 Apr;12(2):69-78.
- Lecaille F, Bromme D et Lalmanach G. Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie* 2008 ; 90 (2): 208-226.
- Leeson CR et Leeson TS. *Histologie*, deuxième édition. Édition MASSON, Paris, France. 1980; 121-146

- Li Z, Hou WS, Escalante-Torres CR, Gelb BD et Bromme D. Collagenase activity of cathepsin K depends on complex formation with chondroitin sulfate. *J Biol Chem* 2002 ; 277 (32): 28669-28676.
- Li Z, Yasuda Y, Li W, Bogyo M, Katz N, Gordon RE, Fields GB, Brömme D. Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans. *J Biol Chem*. 2004 Feb 13;279(7):5470-9.
- Li WW, Nemirovskiy O, Fountain S, Rodney Mathews W et Szekely-Klepser G. Clinical validation of an immunoaffinity LC-MS/MS assay for the quantification of a collagen type II neopeptide peptide: A biomarker of matrix metalloproteinase activity and osteoarthritis in human urine. *Anal Biochem*. 2007 Oct 1;369(1):41-53. Epub 2007 May 6.
- Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L et Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities. in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *The journal of bone and joint surgery* 1971 ; 53: 523-537.
- Marieb EN et Hoehn K. *Human Anatomy and physiology*. Édition Benjamin-Cummings Publishing Company. 2007;chapitre 8.
- Manz A, Pamne N et Lossifidis D. *Bioanalytical chemistry*. World Scientific Pub Co Inc. 2004
- McQueney MS, Amegadzie BY, D'Alessio K, Hanning CR, McLaughlin MM, McNulty D, Carr SA, Ijames C, Kurdyla J, Jones CS. Autocatalytic activation of human cathepsin K. *J Biol Chem* 1997;272 (21): 13955-13960.
- McIlwraith C.W. General pathobiology of the joint and response to injury. McIlwraith CW, Trotter GW (eds); *Joint Disease in the Horse* WB Saunders Company, 1997, pp 40-70.
- Meril et Washart. Protein detection methods. In *Gel electrophoresis of proteins*, ed. Hames B. D., Oxford University Press. 1998 : 53-91
- Meyer U. et Wiesmann HP. *Bone and Cartilage Engineering*. Ed. Springer. 2006 ; p7-46
- Morko JP, Soderstrom M, Saamanen AM, Salminen HJ, and Vuorio EI. Up regulation of cathepsin K expression in articular chondrocytes in a transgenic mouse model for osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2004 ; 63 (6): 649-655.

- Morko J, Kiviranta R, Joronen K, Saamanen AM, Vuorio E et Salminen-Mankonen H. Spontaneous development of synovitis and cartilage degeneration in transgenic mice overexpressing cathepsin K. *Arthritis and rheumatism* 2005 ; 52 (12): 3713-3717.
- Moskowitz RW, Altman RD, Hochberg MC, Buckwalter JA et Goldberg VM. Osteoarthritis, diagnosis and medical surgical management, Fourth Edition. Ed. Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. 2007.
- Muragaki Y, Kimura T, Ninomiya Y, Olsen BR. The complete primary structure of two distinct forms of human alpha 1 (IX) collagen chains. *Eur J Biochem.* 1990 Sep 24;192(3):703-8.
- Nagase H et Kashiwagi M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* 2003 ; 5 (2): 94-103.
- Nagase H et Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999 ; 274 (31): 21491-21494.
- Pelmont J. Enzymes, catalyseurs du monde vivant. Presses Universitaires de Grenoble, Paris, France. 1995
- Platt D. Articular cartilage homeostasis and the role of growth factors and cytokines in regulatin matrix composition. In McIlwraith CW et Trotter GW (Eds.), *Joint Disease in the horse*. Saunders. 1996 ; 1-28.
- Poole A, Guilak F et Abramson B. Etiopathogenesis of Osteoarthritis. In Moskowitz RW, Altman RD, Hochberg MC, Buckwalter JA et Goldberg VM. (Eds.), *Osteoarthritis*, 4th edition. Saunders, Philadelphia. 2007 : 27-50
- Poole, AR. Cartilage in health and disease. In: Koopman W., editor. *Arthritis and Allied Conditions A Textbook of Rheumatology*. ed 15. Philadelphia: Lippincott, Williams, and Wilkins,; 2005. 223–269.
- Poole AR. Cartilage in health and disease. In: Koopman W. editor. *Arthritis and Allied Conditions A Textbook of Rheumatology*. 14. New York: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. 2260–2284.
- Poole AR. Proteoglycans in health and disease: structures and functions. *Biochem J.* 1986 May 15;236(1):1-14.

- Poole AR, Ionescu M, Fitzcharles MA, Billingham RC. The assessment of cartilage degradation in vivo: development of an immunoassay for the measurement in body fluids of type II collagen cleaved by collagenases. *J Immunol Methods*. 2004 Nov;294(1-2):145-53.
- Poole R, Blake S, Buschmann M, Goldring S, Lavery S, Lockwood S, Matyas J, McDougall J, Pritzker K, Rudolphi K, van den Berg W et Yaksh T. Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Oct;18 Suppl 3:S10-6.
- Plummer DT. Introduction aux techniques de biochimie. Édition McGraw-Hill, Paris, France. 1989; 55-87
- Rabilloud T. Silver staining of 2-D electrophoresis gels. *Methods Mol Biol* 1999;112: 297-305.
- Rengel Y, Ospelt C et Gay S. Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction. *Arthritis Res Ther* 2007;9 (5): 221.
- Richardson DW et Dodge GR. Cloning of equine type II procollagen and the modulation of its expression in cultured equine articular chondrocytes. *Matrix Biol* 1997;16 (2): 59-64.
- Riggs CM. Osteochondral injury and joint disease in the athletic horse. *Equine Veterinary Education*. 2006 ; 18, 128-144.
- Ropes MW, Rossmeisl EC et Bauer W. The Origin and Nature of Normal Human Synovial Fluid. *J Clin Invest* 1940;19 (6): 795-799.
- Ruettger A, Schueler S, Mollenhauer JA, Wiederanders B. Cathepsins B, K, and L are regulated by a defined collagen type II peptide via activation of classical protein kinase C and p38 MAP kinase in articular chondrocytes. *J Biol Chem*. 2008 Jan 11;283(2):1043-51. Epub 2007 Nov 8.
- Salminen-Mankonen HJ, Morko J et Vuorio E. Role of cathepsin K in normal joints and in the development of arthritis. *Curr Drug Targets* 2007;8 (2): 315-323.
- Sandell LJ, Heinegard D et Hering TM. Cell biologie, biochemistry, and molecular biology of articular cartilage in osteoarthritis. In Moskowitz RW, Altman RD, Hochberg MC., Buckwalter JA, Goldberg VM (Eds.), *Osteoarthritis*, 4th edition. Saunders, Philadelphia. 2007 ; 73-106.

- Seyer JM et Kang AH. Covalent structure of collagen: amino acid sequence of cyanogen bromide peptides from the amino-terminal segment of type III collagen of human liver. *Biochemistry*. 1977 ; 16(6): 1158-1164.
- Sharma L et Kapoor D. Epidemiology of osteoarthritis. In Moskowitz RW, Altman RD, Hochberg MC., Buckwalter JA, Goldberg VM (Eds.), *Osteoarthritis*, 4th edition. Saunders, Philadelphia. 2007 ; 3-26.
- Su MW, Lee B, Ramirez F, Machado M et Horton W. Nucleotide sequence of the full length cDNA encoding for human type II procollagen. *Nucleic Acids Res*. 1989 ; Nov 25;17(22):9473.
- Sumer EU, Schaller S, Sondergaard BC, Tanko LB et Qvist P. Application of biomarkers in the clinical development of new drugs for chondroprotection in destructive joint diseases: a review. *Biomarkers* 2006 ; 11 (6): 485-506.
- Sutton S, Clutterbuck A, Harris P, Gent T, Freeman S, Foster N, Barrett-Jolley R, Mobasher A. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J*. 2009 Jan;179(1):10-24.
- Tao M., J Selent et al.. Inhibition and activation of the collagenase activity of cathepsin K. 14th Canadian Connective Tissue Conference (CCTC). McGill University, Montreal, Canada, McGill. 2008 ; 93.
- Tardif G, Reboul P, Pelletier JP et Martel-Pelletier J. Ten years in the life of an enzyme: the story of the human MMP-13 (collagenase-3). *Mod Rheumatol*. 2004 ; 14(3):197-204.
- Tepel C, Bromme D, Herzog V et Brix K. Cathepsin K in thyroid epithelial cells: sequence, localization and possible function in extracellular proteolysis of thyroglobulin. *J Cell Sci* 2000 ; 113 Pt 24: 4487-4498.
- Todhunter RJ. Anatomy and physiology of Synovial joint. In : McIlwraith CW et Trotter GW (Eds.), *Joint Disease in the horse*. Saunders. 1996 ; 1-28.
- Todhunter PG, Kincaid SA, Todhunter RJ, Kammermann JR, Johnstone B, Baird AN, Hanson RR, Wright JM, Lin HC et Purohit RC. Immunohistochemical analysis of an equine model of synovitis-induced arthritis. *Am J Vet Res*. 1996 Jul;57(7):1080-93.
- Van Der Rest, M. et Garrone, R. The collagen family of proteins. *FASEB J*. 1991 ; 5, 2814-2823

- Van Der Rest M. The collagens of bone. In Hall BK (ed) : Bone, Vol3, Bone Matrix and Specific Products. Boca Raton. CRC Press, 1991, p 187.
- Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, Bank RA, Shaw JN, Lyons TJ, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG, Baynes JW et TeKoppele JM. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem*. 2000 Dec 15;275(50):39027-31.
- Vinardell T, Dejica V, Poole AR, Mort JS, Richard H et Laverty S. Evidence to suggest that cathepsin K degrades articular cartilage in naturally occurring equine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 Mar;17(3):375-83. Epub 2008 Sep 21
- Visse R et Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003 ; 92 (8): 827-839
- Voet D et Voet JG. Biochimie, seconde édition. Édition De Boeck Université, Paris, France. 1995 ; 156 -268
- Werb Z et Alexander CM. Proteinases and matrix degradation. In: Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB, eds. Textbook of rheumatology, 4th edn. Philadelphia: W B Saunders Company. 1993 : 248-69.
- Wu J, Liu W, Bemis A, Wang, E., Qiu, Y., Morris, E. A., Flannery, C. R. et Yang, Z. Comparative proteomic characterization of articular cartilage tissue from normal donors and patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2007 ; 56 (11): 3675-3684.
- Yasuda Y, Kaleta J et Brömme D. The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: rationale for the design of new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005 May 25;57(7):973-93.
- Yasuda T, Tchetina E, Ohsawa K, Roughley PJ, Wu W, Mousa A, Ionescu M, Pidoux I et Poole AR. Peptides of type II collagen can induce the cleavage of type II collagen and aggrecan in articular cartilage. *Matrix Biol* 2006 ; 25 (7): 419-429.
- Yamashita DS et Dodds RA. Cathepsin K and the design of inhibitors of cathepsin K. *Curr Pharm Des*. 2000 Jan;6(1):1-24.
- Zhu W, Iatridis JC, Hlibczuk V, Ratcliffe A, and Mow VC. Determination of collagen-proteoglycan interactions in vitro. *J Biomech* 1996 ; 29 (6): 773-783.

Annexes

Annexe 1

Séquence d'acides aminés de la protéine de collagène de type II humain

Chaîne précurseur de collagène alpha-1 (II), isoforme 1

Locus NP_001835 1487aa

(Bornstein and Sage 1980)

```

1  MIRLGAPQTL VLLTLLVAAV LRCQGQDVQE AGSCVQDGQR YNDKDVWKPE PCRICVCDTG
61  TVLCDDIICE DVKDCLSPEI PFGECCPICP TDLATASGQP GPKGQKGEPPG DIKDIVGPKG
121 PPGPQGPAGE QGPRGDRGDK GEKGAPGPRG RDGEPGTPGN PGPPGPPGPP GPPGLGGNFA
181 AQMAGGFDEK AGGAQLGVMQ GPMGPMGPRG PPGPAGAPGP QGFQGNPGEP GEPGVSGPMG
241 PRGPPGPPGK PGDDGEAGKP GKAGERGPPG PQGARGFPGT PGLPGVKGHR GYPGLDGAKG
301 EAGAPGVKGE SGSPGENGSP GPMGPRGLPG ERGRTGPAGA AGARGNDGQP GPAGPPGPVVG
361 PAGGPGFPGA PGAKGEAGPT GARGPEGAQG PRGEPGTPGS PGAGASGNP GTDGI PGAKG
421 SAGAPGIAGA PGFPGPRGPP GPQGATGPLG PKGQTGEPGI AGFKGEQGPK GEPGPAGPQG
481 APGPAGEEGK RGARGEPPGV GPIGPPGERG APGNRGFPQG DGLAGPKGAP GERGPSGLAG
541 PKGANGDPGR PGEPGLPGAR GLTGRPGDAG PQGKVGPSGA PGEDGRPGPP GPQGARGQPG
601 VMGFPGPKGA NGEPPGKAGEK GLPGAPGLRG LPGKDGETGA AGPPGPAGPA GERGEQAGAP
661 PSGFQGLPGP PGPPGEGGKP GDQGVPEAG APGLVGPRGE RGFPPGERGSP GAQGLQGPGR
721 LPGTPGTDGP KGASGPAGPP GAQGPPGLQG MPGERGAAGI AGPKGDRGDV GEKGPEGAPG
781 KDGGRGLTGP IGPPGPAGAN GEKGEVGPVG PAGESAGARGA PGERGETGPP GPAGFAGPPP
841 ADGQPGAKGE QGEAGQKQKDA GAPGPQGPSG APGPQGPTGV TGPKGARGAQ GPPGATGFPPG
901 AAGRVGPPGS NGNPGPPGPP GPSGKDGPKG ARGDSGPPGR AGEPLQGP A GPPGEKGEPPG
961 DDGPSGAEGP PGPQGLAGQR GIVGLPGQRG ERGFPGPLPGP SGEPGKQGAP GASGDRGPPP
1021 PVGPPGLTGP AGEPPGREGSP GADGPPGRDG AAGVKGDRGE TGAVGAPGAP GPPGSPGPAG
1081 PTGKQGDRGE AGAQGPMGPS GPAGARGIQG PQGPRGDKGE AGEPPGERGLK GHRGFTGLQG
1141 LPGPPGPSGD QGASGPAGPS GPRGPPGPVVG PSGKDGANGI PGPIGPPGPR GRSGETGPAG
1201 PPGNPGPPGP PGPPGPGIDM SAFAGLGP RE KGPDPLQYMR ADQAAGGLRQ HDAEVDATLK
1261 SLNNQIESIR SPEGSRKNPA RTCRDLKLCH PEWKSGDYWI DPNQGCTLDA MKVFCNMETG
1321 ETCVYPNPAN VPKNWSSK SKEKKHIWFG ETINGGFHFS YGDDNLAPNT ANVQMTFLRL
1381 LSTEGSQNIT YHCKNSIAYL DEAAAGNLKKA LLIQGSNDVE IRAEGNSRFT YTALKDGCTK
1441 HTGKWKTVI EYRSQKTSRL PIIDIAPMDI GGPEQEFQVD IGPVCF

```

Annexe 2

Séquence d'acides aminés de la protéine de collagène de type II équin

Chaîne précurseur de collagène alpha-1 (II), isoforme 1

Locus NP_001075233

1418aa

(Richardson et Dodge, 1997)

```

1  MIRLGAPQTL VLLTLLVAAV LRCHGQDVRQ PGPKGQKGEP GDIKDIVGPK GPPGPQGPAG
61  EQGPRGDRGD KGEKGAPGPR GRDGEPTGPG NPGPPGPPGP PGPPGLGGNF AAQMAGGFDE
121 KAGGAQMGVM QGPMGPMGPR GPPGPAGAPG PQGFQGNPGE PGEPGVSGPM GPRGPPGPPG
181 KPGDDGEAGK PGKSGERGPP GPQGARGFPG TPGLPGVKGH RGYPLDGAKE GEAGAPGVKG
241 ESGSPGENGS PGPMGPRGLP GERGRTGPAG AAGARGNDGQ PGFAGPPGPV GPAGGPGFPG
301 APGAKGEAGP TGARGPEGAQ GPRGEPGTPG SPGPAGAAGN PGTDGIPGAK GSAGAPGIAG
361 APGFPGPRGP PGFQATGPL GPKGQTGEPG IAGFKGEQGP KGEFPGAGPQ GAPGPAGEEG
421 KRGARGEPPG AGFVGPGER GAPGNRGPFG QDGLAGPKGA PGERGPSGLA GPKGANGDPG
481 RPGEPLPGA RGLTGRPGDA GPQKVGPSG APGEDGRPGP PGFQARGQP GVMGFPGPKG
541 ANGEFGKAGE KGLPGAPGLR GLPGKDGETG AAGPPGPAGP AGERGEQFAP GPSGFQGLPG
601 PPGPPGEGGK PGDQGVPEGA GAPGLVGPFG ERGFPGERGS PGAQGLQGAR GLPGTPGTDG
661 PKGASGPAGP PGAQFPPGLQ GMPGERGAAG IAGPKGDRGD VGEKGPEGAP GKDGGRGLTG
721 FIGPPGPAGA NGEKGEVGPV GPAGTAGARG APGERGETGP PGFAGFAGPP GADGQFQAKG
781 EQGEAGQKGD AGAPGPQGPS GAPGPQGPFG VTGPKGARGA QGPPGATGFP GAAGRVGPPG
841 SNGNPGPPGP PGPSGKDGPK GARGDSGPPG RAGDPGLQGP AGPPGKGEF GDDGSPGPDG
901 PPGPQGLAGQ RGIVGLPGQR GERGFPLPG PSGEFQKQGA PGASGDRGPP GPVGPPLTG
961 PAGEFGREGT PGADGPPGRD GAAGVKGDRG EAGALGAPGA PGPPGSPGPA GPTGKQFDRG
1021 EAGAQQPMGP AGFAGARGLP GPQFPRGDKG EAGEAGERGL KGHGFQGLQ GLPGPPGPPG
1081 DQGASGPAGP SGPRGPPGPV GPSGKDGANG IPGPIGPPGP RGRSGETGPA GPPGNPGPPG
1141 PPGPPPGID MSFAGLGPV EKGPDPLQYM RADEAAGGLR PHDEEVEATL KSLNNQIESI
1201 RSPEGSRKNP ARTCRDLKLC HPEWKSGDYW IDPNQGTLD AMKVFCNMET GETCVYPNPA
1261 NVPKKNWSS KSKDKKHIWF GETINGGFHF SYGDDNLAPN TANVQMTFLR LLSTEGSQNI
1321 TYHCKNSIAY LDEAAGNLKK ALLIQGSNDV EIRAEGNSRF TYTVLKDGT KHTGKWKTT
1381 IEYRSQKTSR LPIIDIAPMD IGGPEQEFV DIGPVCFL

```