

Université de Montréal

**L'Altération de la production du collagène de type I dans les ostéoblastes
arthrosiques humains : implication dans le processus de minéralisation**

par
Isabelle Aubry

Département de Biochimie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade

Maître (ès) Sciences (M.Sc.)
en biochimie

mars 2004

© Isabelle Aubry, 2004



W
4
U58
2004
v. 127

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**L'Altération de la production du collagène de type I dans les ostéoblastes
arthrosiques humains : implication dans le processus de minéralisation**

présenté par :

Isabelle Aubry

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Dr Guy Boileau

Directeur de recherche : Dr Daniel Lajeunesse

Membre du jury : Dr Pascal Reboul

Sommaire

L'arthrose (OA) est une maladie qui affecte les articulations et se caractérise par une perte progressive du cartilage articulaire et une sclérose osseuse de l'os sous-chondral. Toutefois, l'étiologie de cette pathologie demeure inconnue. Les données récentes de la littérature indiquent une participation active de l'os dans l'apparition et/ou la progression de cette maladie. Plus spécifiquement, les ostéoblastes provenant de l'os sous-chondral du plateau tibial présentent un phénotype modifié et la matrice extracellulaire osseuse, principalement composée de collagène de type I, est plus abondante chez les sujets OA. Néanmoins, les mécanismes responsables de cette sclérose osseuse demeurent inconnus. L'objectif de ce projet d'étude était de déterminer les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la quantité de collagène de type I dans la matrice osseuse OA.

Nous avons utilisé un modèle de culture primaire d'ostéoblastes (Ob) issus de la plaque sous-chondrale du plateau tibial de patients OA et d'individus normaux. Les cellules OA présentaient un phénotype ostéoblastique *in vitro* déterminé en fonction de leur production de phosphatase alcaline et d'ostéocalcine plus élevées que dans les Ob normaux. Les Ob OA exprimaient un niveau basal d'ARNm, mesuré par RT-PCR semi-quantitatif, des chaînes $\alpha 1$ et 2 du collagène de type I légèrement plus élevé que les Ob normaux. Par contre, la réponse des Ob OA à la stimulation par la prostaglandine E₂ (PGE₂) et l'hormone parathyroïdienne (PTH) était grandement altérée par rapport à celle des Ob normaux. Les Ob normaux démontraient une diminution en ARNm de la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type I de 27% et 40%, ainsi qu'une diminution de la chaîne $\alpha 2$ de 33% et 43% après stimulation par PGE₂ et

PTH respectivement. Par contre, la réponse des Ob OA indiquait une diminution de 14% et 8% pour la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type I et de 14% et 17% pour la chaîne $\alpha 2$. L'expression des ARNm, mesurée par PCR en temps réels, était cependant augmentée de manière significative pour la chaînes $\alpha 1$ dans les Ob OA, mais non pour la chaîne $\alpha 2$. Ceci indique donc une variation du ratio des chaînes $\alpha 1/\alpha 2$ de $3.1 \pm 0.6/1$ chez les individus normaux à $7.2 \pm 0.2/1$ dans les Ob OA. Dans les Ob OA, la synthèse *de novo* du collagène de type I, mesurée par la relâche du pro-peptide, était augmentée de 42% et la protéine mature montrait une augmentation de 35% et 26% pour les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ respectivement. Nous avons aussi démontré que l'activité des métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 était augmentée de 28% et 52.9% chez les patients OA, mais que ceci n'était pas dû vraisemblablement à l'activation via les MMP de type membranaire, MT1-MMP ou MT2-MMP. Finalement, malgré une abondante matrice extracellulaire *in vitro* comme *in vivo*, les Ob OA ont une capacité de minéralisation réduite *in vitro* tel qu' *in vivo* sous des conditions basales et après stimulations avec la bone morphogenetic protein (BMP-2).

Nos recherches ont démontré que les activités anaboliques et cataboliques augmentées des ostéoblastes arthrosiques témoignent d'un métabolisme augmenté. La production augmentée du collagène de type I chez les OA est en accord avec la sclérose osseuse observée *in vivo*. Les réponses altérées des Ob OA à la PGE_2 et à la PTH seraient potentiellement impliquées dans cette formation de matrice osseuse augmentée *in vivo* ainsi que dans le faible potentiel de minéralisation de ces cellules.

Mots clés : arthrose, os sous-chondral, ostéoblastes, sclérose osseuse, collagène de type I, minéralisation, métalloprotéases.

Abstract

Osteoarthritis (OA) is a disease characterized by a progressive loss of articular cartilage accompanied by subchondral bone sclerosis. Today, the aetiology of this disease still remains unknown. However, recent data have suggested an active participation of bone in the initiation and/or progression of the disease. Specifically, osteoblasts (Ob) from the subchondral bone plate of tibial plateaus present an altered phenotype and the bone matrix, mainly composed of collagen type I, is much more abundant in OA. Nevertheless, mechanisms responsible for this sclerosis remain unknown. Our objective was to determine mechanisms involved in this increased level of collagen type I in OA bone matrix.

We have developed a primary cell culture model of Ob isolated from the human subchondral bone plate of tibial plateaus. OA cells presented an osteoblastic phenotype *in vitro* determined by their higher alkaline phosphatase activity and osteocalcin release than normal Ob. OA Ob expressed a slightly higher mRNA level of collagen type I $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chain, measured by semi-quantitative RT-PCR compared to normal Ob. However mRNA expression measured by real-time PCR was increased in a significant manner for $\alpha 1$ chain in OA Ob but not for $\alpha 2$ chain. This led to a variation of the ratio of $\alpha 1$ to $\alpha 2$ chains of $2.5 \pm 0.6 : 1$ in normal Ob to $7.2 \pm 0.2 : 1$ in OA Ob. Moreover, OA Ob are more resistant than normal Ob to prostaglandin E₂ (PGE₂) and parathyroid hormone (PTH) stimulations. Normal Ob showed a decreased mRNA level for collagen type I $\alpha 1$ chain of 27% and 40%, and a decrease for $\alpha 2$ chain of 33% and 43% after stimulation with PGE₂ and PTH respectively. However, OA Ob presented a decrease of only 14% and 8% for

collagen type I $\alpha 1$ chain and 14% and 17% $\alpha 2$ chain. *De novo* synthesis of collagen type I, measured by carboxyterminal propeptide release, was increased by 42% and the mature protein was also increase by 35% and 26% for $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chain respectively. We also demonstrated that metalloproteinase activity of MMP-2 and MMP-9 was increased by 28% and 52.9% in OA Ob, and that this was unlikely due to activation via membrane type MMP MT1-MMP and MT2-MMP. Finally, despite an abundant bone matrix *in vitro*, OA Ob have a decreased mineralization capacity under basal condition. Indeed, the minelarizarion potential was decreased when measured by Von Kossa staining , as well as following bone morphogenetic (BMP-2) stimulation.

Our results showed increased anabolic and catabolic activities in OA Ob and this reveals an increased metabolism. The increased production of collagen type I in OA Ob agree with the sclerosis observed in *vivo*. Altered responses of OA Ob to PGE₂ and PTH would be potentially involved in this increased bone matrix formation in vivo so in their weak mineralization potential.

Key words : osteoarthritis, subchondral bone, osteoblasts, bone sclerosis, collagen type I, mineralization, metalloproteinases.

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE	I
IDENTIFICATION DU JURY.....	II
SOMMAIRE.....	III
ABSTRACT.....	V
TABLE DES MATIÈRES.....	VII
Liste des figures.....	X
Liste des abréviations	XII
REMERCIEMENTS	XIV
INTRODUCTION.....	1
1) L'arthrose	2
1.1 Les maladies rhumatismales.....	2
1.2 Épidémiologie.....	2
1.3 La pathologie de l'arthrose.....	3
1.4 Étiologie et facteurs de risques.....	4
1.4.1 Génétique.....	4
1.4.2 La diète.....	7
1.4.3 L'obésité.....	8
1.4.4 L'activité physique.....	9
2) Le cartilage	10
2.1 Le cartilage articulaire.....	10
2.2 Composition du cartilage normal.....	10

2.3 Le cartilage arthrosique.....	14
2.3.1 La matrice extracellulaire altérée.....	17
2.3.2 Les chondrocytes arthrosiques.....	17
3) L'os normal.....	19
3.1 Le tissu osseux.....	19
3.1.1 Structure de l'os.....	19
3.2 Les ostéoblastes.....	20
3.2.1 Composition de la matrice osseuse.....	22
3.2.2 Le collagène	25
3.3 Les ostéoclastes et la résorption osseuse.....	26
3.4 Le remodelage osseux.....	27
3.4.1 Le cycle de remodelage osseux	27
3.4.2 Régulation du remodelage osseux.....	28
3.4.2.1 Facteurs locaux : RANKL et l'ostéoprotégerine... 28	
3.4.2.2 L'hormone parathyroïdienne.....	29
3.4.2.3 La vitamine D3.....	30
4) L'os arthrosique.....	35
4.1 L'os sous-chondral arthrosique.....	35
4.1.1 Caractéristiques de l'os sous-chondral arthrosique.....	35
4.1.2 Les modèles expérimentaux d'arthrose.....	36
4.2 La biochimie de l'os sous-chondral arthrosique.....	37
4.2.1 Les ostéoblastes arthrosiques.....	37
4.2.2 Le collagène arthrosique et l'hypominéralisation.....	39

4.2.3 Interaction os-cartilage dans l'arthrose.....	40
5) Les métalloprotéases.....	41
5.1 Les métalloprotéases de la matrice extracellulaire.....	41
5.2 Le rôle des métalloprotéases dans l'arthrose.....	41
5.2.1 Les métalloprotéases dans le cartilage arthrosique.....	42
5.2.2 Les métalloprotéases dans l'os arthrosique.....	42
6) Hypothèse de travail.....	44
MÉTHODOLOGIE.....	45
RÉSULTATS.....	54
DISCUSSION.....	71
CONCLUSION.....	83
RÉFÉRENCES.....	84

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1	Distinction entre l'arthrite et l'arthrose.....	5
Figure 2	Le genou arthrosique.....	6
Figure 3	Structure du cartilage articulaire.....	12
Figure 4	Composition du cartilage.....	13
Figure 5	Changements primaires dans le cartilage arthrosique.....	15
Figure 6	Modifications tardives dans l'articulation arthrosique.....	16
Figure 7	Système de Havers.....	23
Figure 8	Les ostéoblastes.....	24
Figure 9	Le collagène de type I : structure et synthèse.....	31
Figure 10	La bipolarité morphologique et fonctionnelle de l'ostéoclaste.....	33
Figure 11	Le cycle de remodelage osseux.....	34
Figure 12	Phénotype d'ostéoblastes OA et normaux provenant de l'os sous-chondral.....	38

Résultats

Figure 1	Niveau basal d'ARNm des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type I dans les ostéoblastes OA et normaux de l'os sous-chondral humain..	62
Figure 2	PCR en temps réel : Ratio des chaînes α du collagène de type I sur leur GAPDH.....	63

Figure 3 Régulation de l'expression d'ARNm de la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type I dans les ostéoblastes OA et normaux 64

Figure 4 Régulation de l'expression d'ARNm de la chaîne $\alpha 2$ du collagène de type I dans les ostéoblaste OA et normaux..... 65

Figure 5 Relâche du pro-peptide CICP par les ostéoblastes normaux et OA... 66

Figure 6 Analyse par western blot de la production de collagène de type I mature par les ostéoblastes OA et normaux..... 67

Figure 7 Analyse par western blot des niveaux de MT1-MMP et MT2-MMP exprimés à la surface cellulaire d'Ob OA et normaux..... 68

Figure 8 Zymographie de MMP-2 et MMP-9 dans les surnageants d'ostéoblastes..... 69

Figure 9 Minéralisation *in vitro* des ostéoblaste humains OA et normaux mesurée par Von Kossa..... 70

Discussion

Figure 13 Les BMPs dans la différenciation ostéoblastique..... 76

Figure 14 Facteurs de transcription dans la différenciation ostéoblastique..... 77

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ALPase	Phosphatase alcaline
BMP-2	Bone morphogenetic protein-2
BMSC	Cellules stromales de la moelle osseuse
Cbfa1/Runx2	Core binding factor A1
Coll1a1	Chaîne alpha 1 du collagène de type I
Coll1a2	Chaîne alpha 2 du collagène de type I
GAG	Glycosaminoglycanes
GLA	Acide γ -carboxylé
GLY	Glycine
HA	Acide hyaluronique
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL-1	Interleukine-1
IL-6	Interleukine-6
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor
MMP	Métalloprotéase de la matrice
MT-MMP	Métalloprotéase matricielle de type membranaire
OA	Arthrose (ou ostéoarthrose)
Ob	Ostéoblaste
OPG	Ostéoprotégerine
PG	Protéoglycane
PGE ₂	Prostaglandine E ₂

PTH	Hormone parathyroïdienne
RANK	Receptor activator for NF-kappaB
RANKL	Ligand du récepteur RANK
TGF- β	Transforming growth factor β
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF- α	Tumor necrosis factor α
uPA	Plasminogène urokinase

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier infiniment le Dr Daniel Lajeunesse qui m'a guidé tout au long de ce projet d'étude. Merci à Aline Delalandre pour son aide technique et sa bonne humeur et merci à mes parents et à ma sœur qui m'ont encouragé tout au long de mes études.

INTRODUCTION

1) L'arthrose

1.1 Les maladies rhumatismales

Les maladies rhumatismales touchent principalement les articulations et le tissu conjonctif environnant. On en compte plus d'une centaine parmi lesquelles on retrouve les tendinites, la goutte, la chondrocalcinose articulaire, la sclérodermie, l'arthrose et l'arthrite rhumatoïde. Le terme arthrite (du grec « arth » qui signifie articulation et « itis » qui signifie inflammation) est couramment utilisé pour désigner ces maladies rhumatismales. En général, l'arthrite désigne une inflammation articulaire, mais certaines maladies rhumatismales, comme l'arthrose, ne montrent pas toujours de signes d'inflammation. Le point commun est, dans tous les cas, la douleur articulaire et musculosquelettique (La Société d'arthrite, Arthroscopie 2003).

Au début du siècle, les pathologistes et radiologistes ont fait la distinction entre deux principales formes chroniques d'arthrite : atrophique et hypertrophique (Goldthwaith et al. 1904). L'arthrite atrophique, comprenant aujourd'hui l'arthrite rhumatoïde, se caractérise par une inflammation synoviale et une érosion ou atrophie du cartilage et de l'os. L'arthrite hypertrophique, ou arthrose, se caractérise par une perte localisée du cartilage, peu d'inflammation et un épaissement (hypertrophie) de l'os adjacent et la formation d'ostéophytes aux extrémités externes de l'articulation (Doherty M. 1994) (figure 1).

1.2 Épidémiologie

Selon la Société d'arthrite, l'arthrite se classe parmi les trois maladies chroniques les plus répandues au Canada avec les maladies respiratoires et

circulatoires. L'arthrite est la principale cause d'invalidité de longue durée au Canada. D'ailleurs, les deux formes responsables de la majorité d'invalidités graves sont l'arthrose et l'arthrite rhumatoïde (La Société d'arthrite, Arthroscopie 2003).

La prévalence de l'arthrite, et plus spécialement l'arthrose, augmente avec l'âge autant chez l'homme que chez la femme (Center for Disease Control and Prevention, 2001 ; Reginster, 2002). On estime que 70% des cas d'arthrose surviennent après l'âge de 50 ans (Allanore et Hilliquin, 1999). En 1997, la prévalence de l'arthrite aux Etats-Unis était de 16%. On s'attend à voir augmenter cette prévalence dans les années à venir à cause du vieillissement de la population (Reginster, 2002). D'ailleurs, l'impact de cette maladie sur l'économie commence à se faire sentir. On estime le coût annuel relié aux désordres musculosquelettiques, dont l'arthrose est le plus commun, à 1-2.5% du produit national brut des pays étudiés, le Canada, les États-Unis, l'Australie, le Royaume Uni et la France (March et Bachmeier, 1997). Ce fardeau économique comprend autant les coûts directs, consultations, traitements, hospitalisation, médicaments, que les coûts indirects, arrêt de travail, invalidité, retraite anticipée et mortalité.

1.3 La pathologie de l'arthrose

L'arthrose (OA) est une pathologie articulaire dite dégénérative et touche principalement les personnes âgées de 65 ans et plus. Les articulations le plus souvent affectées sont celles du genou (gonarthrose), des hanches (coxarthrose), des doigts et du rachis cervical et lombaire (Pinals, 1996). D'un point de vue morphologique, l'arthrose est caractérisée par une perte progressive du cartilage articulaire, d'une sclérose de l'os sous-jacent, appelé os sous-chondral, et par la

formation d'excroissances osseuses aux extrémités de l'articulation : les ostéophytes (figure 2). La douleur, la raideur et le fonctionnement limité de l'articulation atteinte ainsi que la qualité de vie diminuée sont des caractéristiques typiques de l'arthrose. On distingue deux catégories d'arthrose : primaire et secondaire. L'arthrose primaire, ou idiopathique, est d'origine pratiquement inconnue, tandis que l'arthrose dite secondaire apparaît suite à un traumatisme articulaire ou encore à une perturbation métabolique anatomique ou endocrinienne. Le présent ouvrage portera principalement sur l'arthrose du genou.

1.4 Étiologie et facteurs de risques

L'étiologie de l'arthrose n'est malheureusement pas connue avec certitude, mais plusieurs études montrent en fait qu'il s'agit d'une pathologie multifactorielle. Des facteurs de risques autant systémiques que biomécaniques sont mis en cause. Les facteurs systémiques comprennent l'âge, la gent féminine, la prédisposition génétique, la race, la densité osseuse et la diète, alors que les facteurs biomécaniques incluent l'obésité, le niveau d'activité physique, la faiblesse musculaire et les blessures articulaires antérieures (Sangha, 2003 ; Sowers, 2001; NIH Conference, 2000). Voici quelques exemples pertinents de ces facteurs de risques dont la preuve n'est plus à refaire.

1.4.1 Génétique

De plus en plus d'évidences montrent que la prédisposition génétique est un facteur important dans le développement de l'arthrose primaire. Une étude de jumeaux mono- et hétérozygotes a montré qu'il existe un effet génétique évident

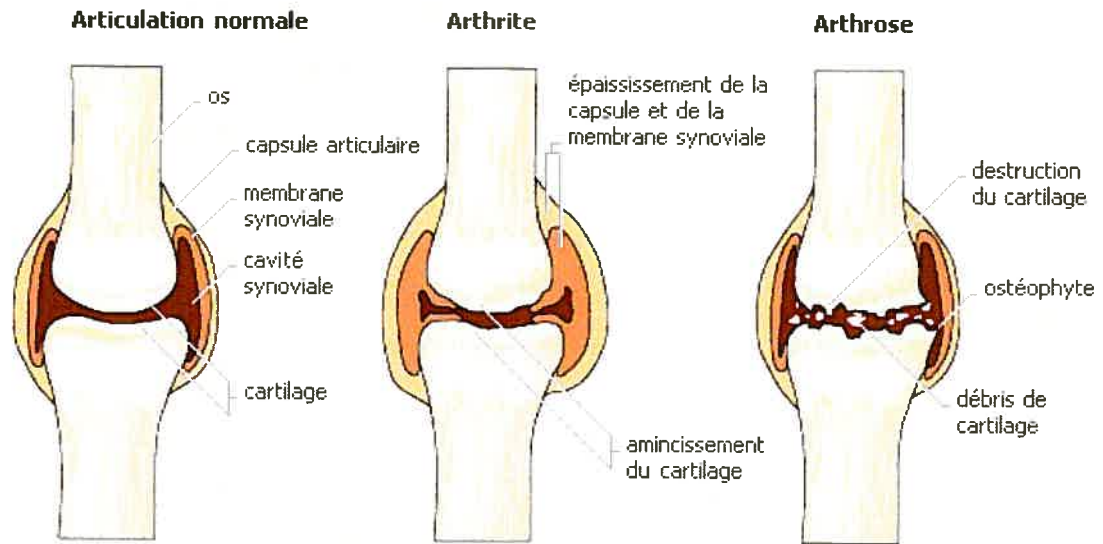


Figure 1. Distinction entre l'arthrite et l'arthrose. L'arthrite est une maladie inflammatoire, alors que l'arthrose est une pathologie dégénérative.

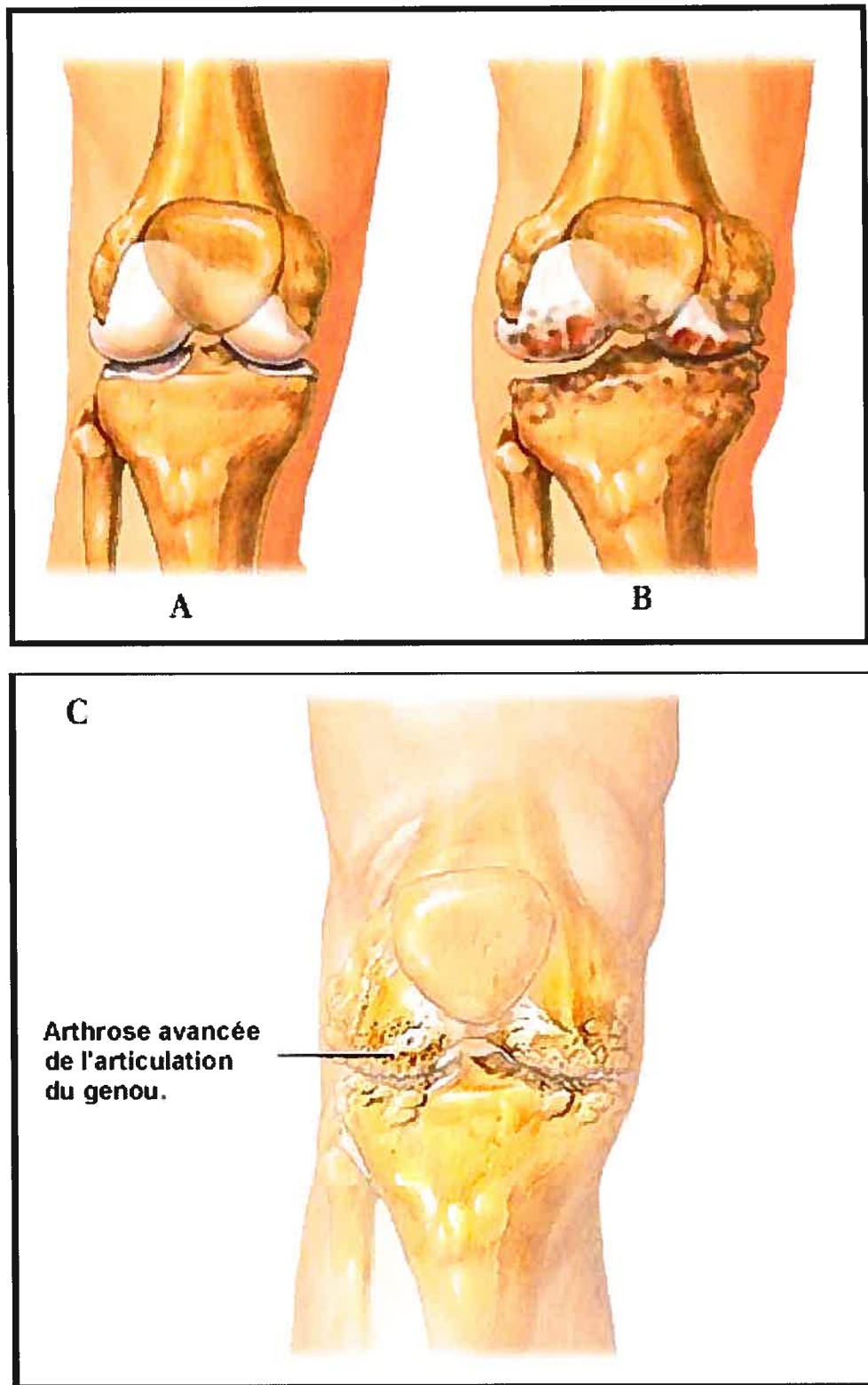


Figure 2: Le genou arthrosique A) Genou normal. B) Hypertrophie et excroissance de l'os et érosion du cartilage. C) Arthrose du genou à un stade très avancée de la maladie.

pour l'arthrose de la main et du genou chez les femmes, indépendamment des facteurs environnementaux connus (Spector et al., 1996). De plus, des études de liaison chromosomique ont permis de déterminer certains gènes, ou locus, candidats susceptibles d'être associés au développement de l'OA. Parmi celles-ci, notons les travaux de Palotie et al. (1989) dont l'étude de polymorphismes sur le gène du collagène de type II, principal composant du cartilage articulaire, a révélé une liaison génétique entre ce gène et l'arthrose primaire. Il est toutefois important de retenir que l'arthrose idiopathique n'est pas associée à un seul gène, mais plutôt à plusieurs loci chromosomiques susceptibles d'être liés à l'arthrose. En effet, parce que le développement de l'arthrose implique plusieurs tissus et types cellulaires, il y a un potentiel pour plusieurs gènes de contribuer à la prédisposition pour l'arthrose (Sowers, 2001).

1.4.2 La diète

Le risque et la sévérité de l'OA peuvent être modifiés par la diète. Il a été démontré que les radicaux libres d'oxygènes (oxydants) sont de puissants agents destructeurs de cartilage et de tissus conjonctifs. McAlidon et al. (1996) ont démontré les effets bénéfiques de la consommation d'antioxydants, les vitamines C et E et la β -carotène, sur la prévention de la douleur et de la progression de l'arthrose.

La vitamine D joue un rôle important dans le métabolisme osseux normal. L'étude Framingham a rapporté que les personnes ayant une diète faible en vitamine D et un bas niveau de vitamine D dans le sang ont un risque de progression de l'arthrose 3 fois plus élevé que ceux ayant une diète riche en vitamine D (McAlindon

et al., 1996²). Une autre équipe a déterminé qu'un bas niveau de vitamine D dans le sang est associé à l'incidence de l'arthrose de la hanche (Lane et al., 1999).

1.4.3 L'Obésité

De nombreuses études ont montré que l'obésité est un facteur de risque important dans l'arthrose. Pour la gonarthrose, le lien entre le surpoids ou l'obésité et l'OA a été fortement démontré dans des études de cohorte, des études cas-contrôle et des études transversales. Manninen et al.(1996) ont démontré que le surpoids est un important facteur de risque pour l'invalidité due à l'arthrose du genou. Dans une importante étude de cohorte, l'étude Framingham, Felson et al.(1988) ont démontré que l'obésité est associée au risque de développer de l'OA du genou asymptomatique et symptomatique. De plus, une perte de poids de 5.1 kg est associée à une réduction de 50% du risque de développer l'arthrose du genou symptomatique chez la femme (Felson et al., 1992). Il y a de plus en plus d'évidences qui supportent le rôle de l'obésité dans l'arthrose de la hanche. Une étude épidémiologique effectuée par Karlson et al.(2003) a permis de mesurer le statut d'exposition (l'obésité) avant que la maladie ne se développe (coxarthrose). Ils ont déterminé qu'il y a un risque élevé de remplacement chirurgical de la hanche dû à l'OA chez les femmes âgées et d'indice de masse corporel élevé. De plus, la relation entre l'indice de masse corporel à l'âge de 18 ans et la coxarthrose était fortement apparente, suggérant que ce risque est partiellement établi à un moment précoce de la vie (Karlson et al., 2003).

1.4.4 L'activité physique

Ce facteur de risque peut être subdivisé en deux parties : l'occupation professionnelle et le sport. L'occupation professionnelle occasionne souvent des gestes répétitifs demandant une participation continuelle de certaines articulations, une situation qui peut conduire à long terme au développement de l'arthrose dans ces articulations. L'étude Framingham suggère qu'une occupation professionnelle physiquement exigeante et nécessitant la flexion des genoux est une importante cause de l'OA radiographique du genou (Felson et al., 1991). De plus, le risque de développer la gonarthrose est plus élevé chez les hommes dont la profession nécessite la flexion des genoux sur des périodes de temps prolongées et des levées régulières de charges de 25 kg et plus (Coggon et al., 2000). Les fermiers ont des hauts taux d'arthrose de la hanche (Cogon et al. 1998; Maetzel et al., 1997), alors que les travailleurs du textile développent après quelques années de l'arthrose dans les doigts (Hadler et al., 1978).

Pratiquer une activité physique modérée ne conduit pas nécessairement au développement de l'arthrose. C'est la participation excessive à des sports de haute intensité, particulièrement sur une longue période de temps et au niveau élite, qui augmente le risque de développer de l'arthrose aux articulations sollicitées. De plus, ce risque est augmenté si le participant possède au départ une anatomie ou un alignement anormal de l'articulation, une faiblesse musculaire ou encore une blessure antérieure au niveau de l'articulation (Saxon et al. 1999; Sharma, 2001).

2) Le cartilage

2.1 Le cartilage articulaire

Le cartilage articulaire, ou hyalin, est le tissu conjonctif qui recouvre les os au niveau des articulations. Le cartilage sert de coussin protecteur entre les os lors du mouvement et sa structure permet de s'adapter à de fortes contraintes mécaniques en amortissant et répartissant les charges sur l'articulation. C'est un tissu avasculaire et non innervé composé d'un seul type cellulaire, le chondrocyte, entouré d'une matrice extracellulaire de macromolécules formant une structure hautement organisée. Des études morphologiques de la matrice cartilagineuse ont permis de distinguer quatre zones depuis la surface articulaire jusqu'à l'os sous-chondral : superficielle, de transition, profonde et calcifiée (Schenk et al., 1986) (figure 3). Ces quatre zones sont de composition et de propriétés différentes et la taille des différentes zones varie d'une articulation à l'autre et d'une espèce à l'autre. L'organisation en zone confère au cartilage un grand pouvoir de résistance aux forces de tension et de compression auxquelles les articulations sont soumises (Huber et al., 2000).

2.2 Composition du cartilage normal

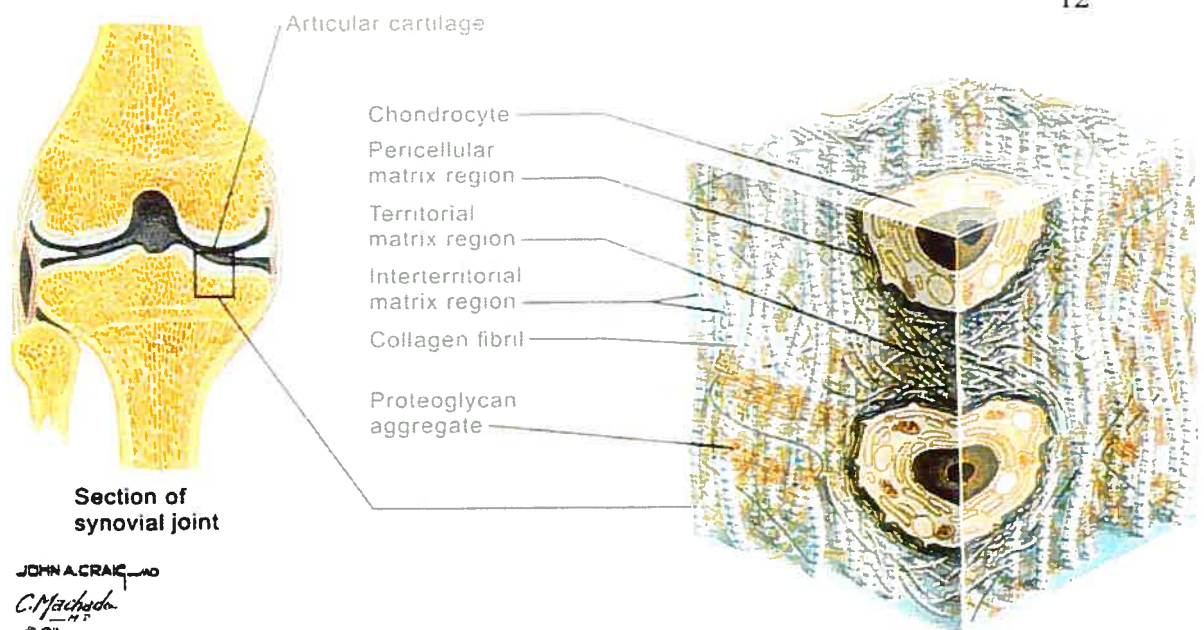
Le chondrocyte est l'unique type cellulaire retrouvé dans le cartilage. Les chondrocytes possèdent un réseau étendu de réticulum endoplasmique, un large appareil de Golgi et d'importantes vacuoles de sécrétion, reflétant leur synthèse active de la matrice extracellulaire (Kosher, 1983). Les composantes de la matrice extracellulaire sécrétées par les chondrocytes sont principalement du collagène et des protéoglycanes.

Cinq types de collagène ont été identifiés dans le cartilage articulaire : II, VI, IX, X et XI. Le collagène de type II est le plus abondant, 80-85% du contenu en

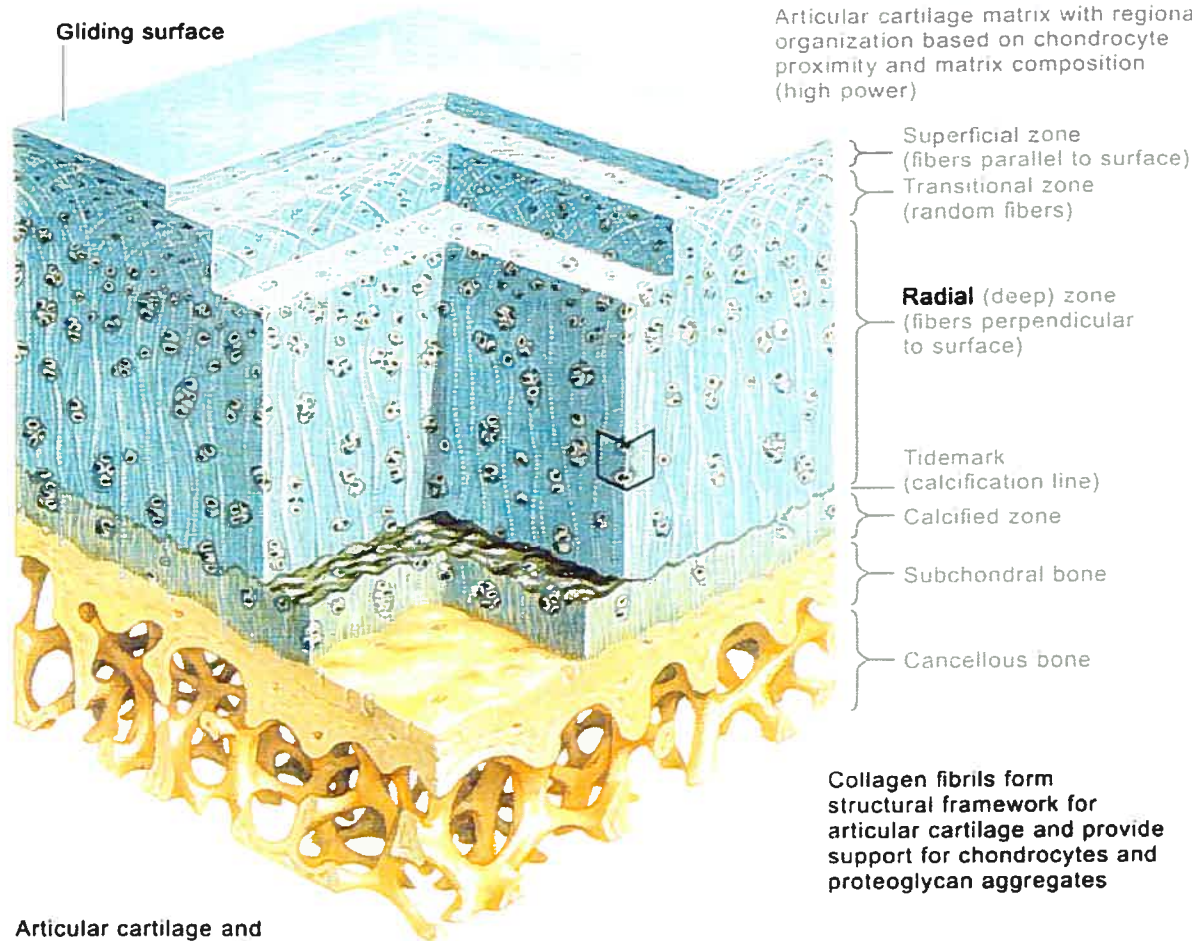
collagène, alors que les types IX et XI qui sont spécifiques au cartilage sont retrouvés en plus faibles quantités, 3-10% du collagène total (Cremer et al., 1998). Ces collagènes sont arrangés en réseau de fibrilles tridimensionnel, où le type II constitue le squelette du réseau, le type XI régule la taille du réseau de fibrilles en les liant de façon covalente et le type IX facilite l'interaction des fibrilles avec les protéoglycanes (Cremer et al., 1998; Eyre et Wu, 1995).

Les protéoglycanes (PGs) sont formés de chaînes glycosaminoglycanes (GAG) liées de façon covalente à un noyau protéique (sauf pour l'acide hyaluronique). Les GAG présents dans le cartilage sont la chondroïtine sulfate, la kératine sulfate et l'acide hyaluronique (HA) (Lash et Vasan, 1983). L'agrécane, énorme agrégat de protéoglycanes (chondroïtine et kératine sulfate) liés à une molécule d'HA, est le principal protéoglycane du cartilage. Le groupement sulfate des GAG, mis à part l'HA qui ne possède pas ce groupement, augmente la charge négative des protéoglycanes. Ces charges négatives concentrées au même endroit forcent les protéoglycanes à prendre de l'expansion et permettent d'attirer l'eau, augmentant ainsi le volume de la matrice. Cette expansion est limitée par le réseau de collagène (figure 4).

En résumé, les chondrocytes sont les seules cellules présentes dans le cartilage articulaire et sont responsables de la production de la matrice extracellulaire. Cette matrice extracellulaire constitue un réseau de fibrilles de collagène enfermant des protéoglycanes et une grande quantité d'eau. Cette structure complexe et ordonnée permet au cartilage d'avoir des propriétés biomécaniques exceptionnelles.

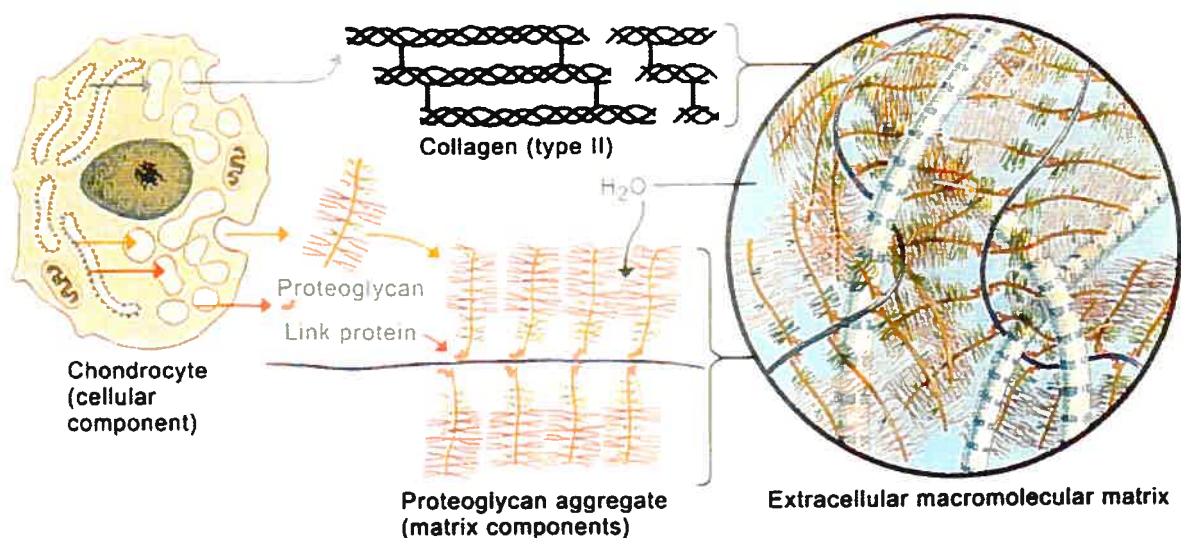


Articular cartilage matrix with regional organization based on chondrocyte proximity and matrix composition (high power)

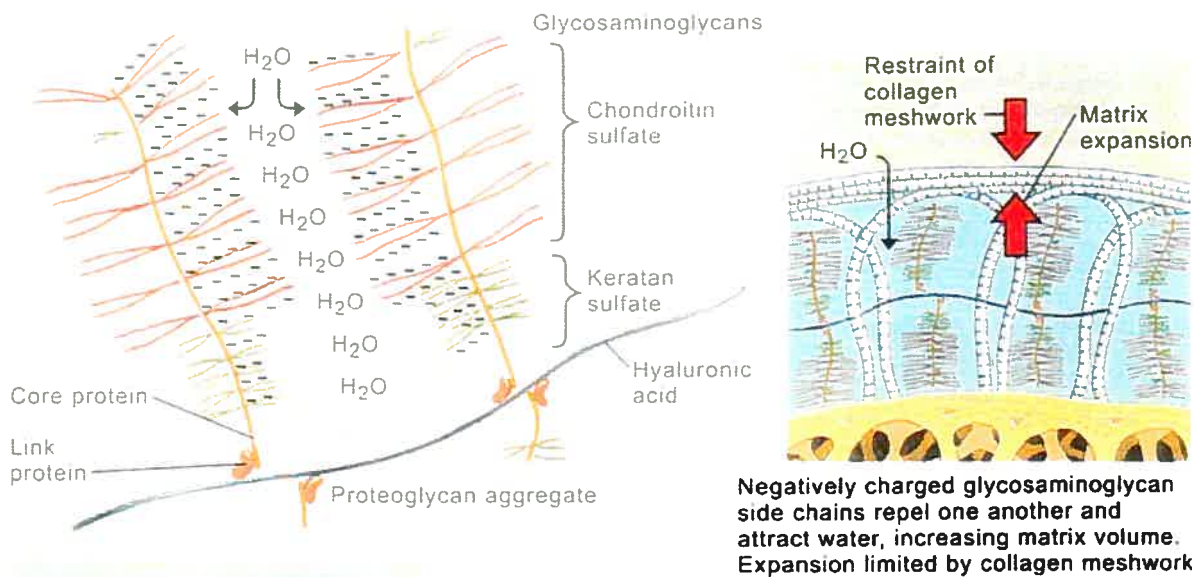


Collagen fibrils form structural framework for articular cartilage and provide support for chondrocytes and proteoglycan aggregates

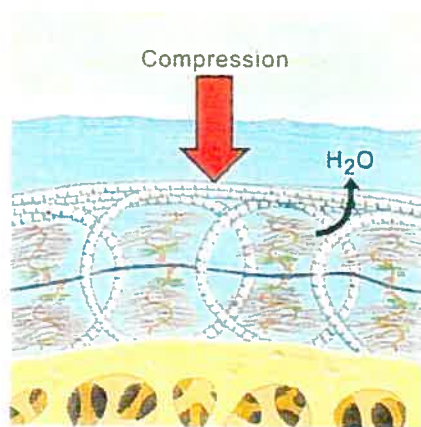
Figure 3. Structure du cartilage articulaire. Le cartilage articulaire comprend les chondrocytes et la matrice extracellulaire composée de protéoglycanes et de fibrilles de collagènes de type II. Depuis la surface articulaire jusqu'à l'os sous-chondral, 4 zones de composition et de propriétés différentes sont observées: superficielle, de transition, profonde et calcifiée.



Chondrocytes synthesize collagen (structural framework) and hydrophilic proteoglycans, which interact with collagen fibrils to form hydrated macromolecular matrix of articular cartilage



Negatively charged glycosaminoglycan side chains repel one another and attract water, increasing matrix volume. Expansion limited by collagen meshwork



Compression of matrix pushes glycosaminoglycan side chains together, releasing water and decreasing matrix volume. Decompression allows reexpansion of molecule and matrix volume

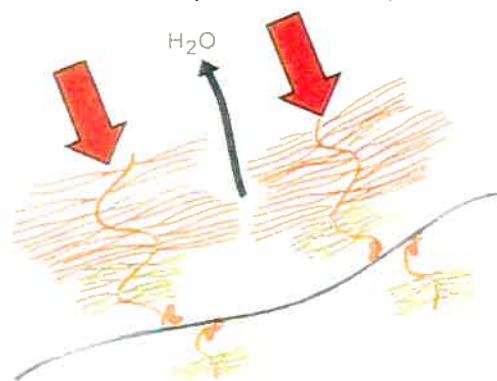


Figure 4. Composition du cartilage

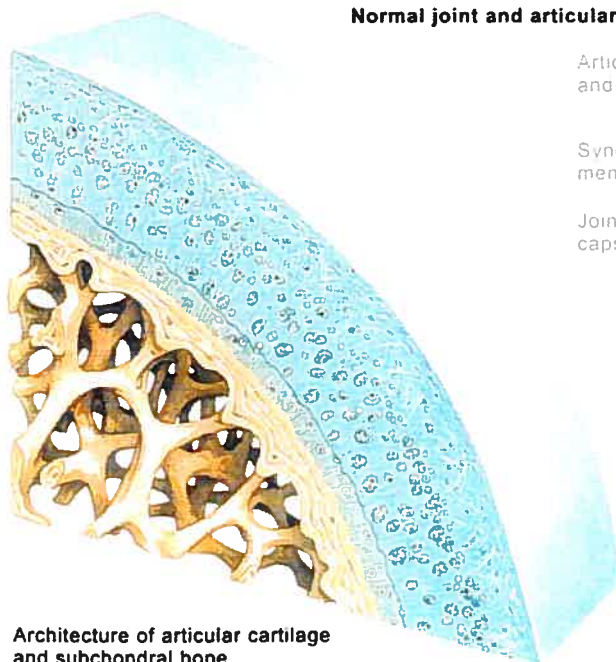
2.3 Le cartilage arthrosique

L'arthrose se caractérise par une perte progressive du cartilage articulaire accompagnée par une tentative de réparation du cartilage, une sclérose de l'os sous-chondral et la formation d'ostéophytes. Le premier signe d'arthrose visible à la surface articulaire est la fibrillation des couches superficielles du cartilage (figure 5). Au fur et à mesure que la maladie progresse, les irrégularités en surface se transforment en fissures et la fibrillation s'étend dans les zones plus profondes jusqu'à ce que les fissures atteignent l'os sous-chondral (Buckwalter et Mankin, 1997). Lors des étapes plus tardives de l'arthrose, il y a relâche de cartilage fibrillé dans l'articulation, dégradation enzymatique et amincissement du cartilage jusqu'à la perte totale du cartilage articulaire laissant l'os exposé directement à la synovie (figure 6).

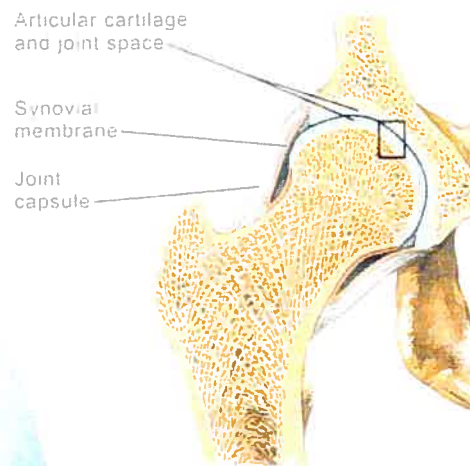
D'un point de vue moléculaire, la dégradation du cartilage peut être divisée en 3 étapes : des dommages ou altérations de la matrice cartilagineuse, la réponse du chondrocyte aux dommages tissulaires et l'échec de la réponse chondrocytaire (Buckwalter et Mankin, 1997). La première étape correspond surtout aux dommages fait en surface à la matrice extracellulaire alors que les deux dernières étapes impliquent une participation active du chondrocyte dans la tentative de réparation de cette matrice. Notons que la deuxième étape, soit la réponse active des chondrocytes aux dommages tissulaires, peut durer plusieurs années (Buckwalter et Mankin, 1997).

Joint and Articular Changes

Normal joint and articular surface

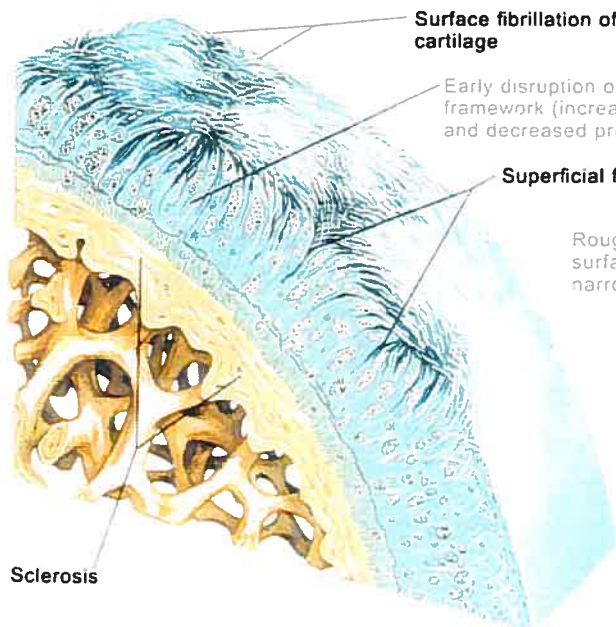


Architecture of articular cartilage and subchondral bone

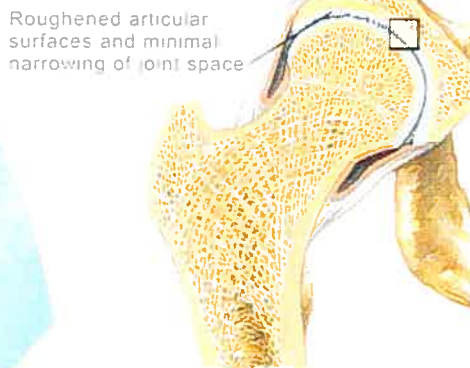


Joint with normal space and cartilage-covered articular surfaces

Early degenerative changes



Sclerosis (thickening) of subchondral bone early sign of degeneration



Narrowing of upper portion of joint space with early degeneration of articular cartilage

CLINICAL SYMPOSIA

Figure 5 : Changements primaires dans la cartilage arthrosique. En haut : le cartilage normal repose sur l'os sous-chondral et sert de coussin protecteur entre les os lors du mouvement. En bas : L'arthrose débute par la fibrillation du cartilage artulaire en surface et par la sclérose de l'os sous-chondral.

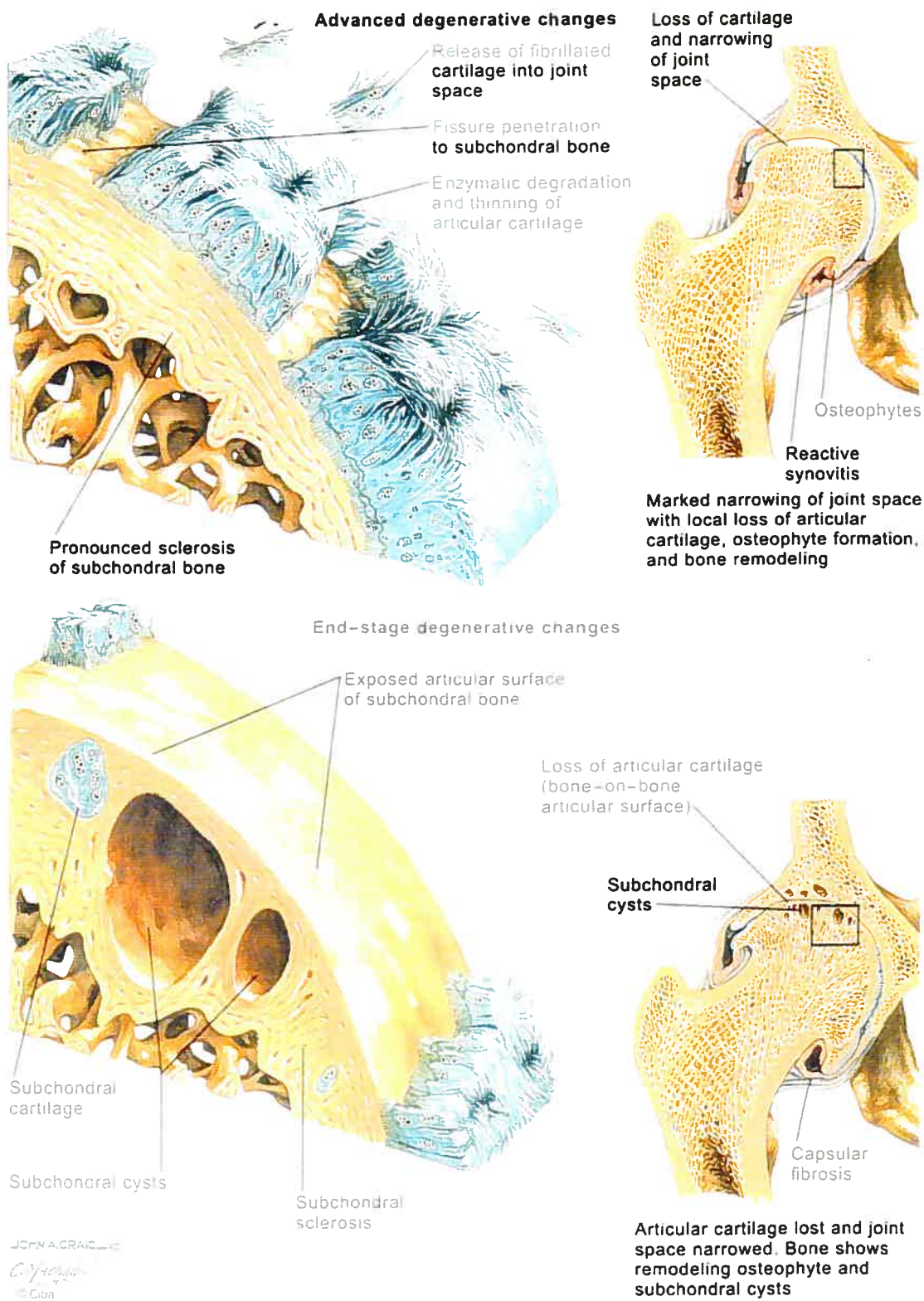


Figure 6. Modifications tardives dans l'articulation arthrosique.

2.3.1 La matrice extracellulaire altérée

Lors de la fibrillation, la concentration de collagène de type II demeure constante, mais il y a une perte nette des protéoglycanes. La perte de protéoglycanes conduit à une augmentation du contenu en eau dans le cartilage ce qui diminue sa rigidité et sa capacité à répondre aux stress biomécaniques (Mankin et Thrasher, 1975). En plus d'une perte de protéoglycanes, les interactions entre les fibrilles des différents types de collagène se desserrent. Bien qu'on ne sache pas ce qui vient en premier dans le processus de dégradation, ces deux événements semblent inter-reliés. Maroudas (1976) a démontré qu'un desserrage du réseau de collagène conduit à une perte de protéoglycanes, et qu'une perte de protéoglycanes conduit à une surcharge mécanique et donc au dommage et au desserrage du réseau de collagène. L'intégrité du cartilage est alors perturbée (changements d'osmolarité tissulaire et de pH et/ou forces biomécaniques altérées (Kerin et al., 2002)) et c'est ainsi que le chondrocyte détecte les dommages tissulaires.

2.3.2 Les chondrocytes arthrosiques

La réponse chondrocytaire aux altérations de la matrice cartilagineuse implique des activités anaboliques et cataboliques (Buckwalter et Mow, 1992). Lorsque les dommages au tissu s'initient, les chondrocytes répondent en proliférant (Poole, 1997) et en augmentant la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire. Il y a une augmentation de la synthèse du collagène de type II (Nelson, 1998) et de protéoglycanes (Rizkalla et al., 1992), mais aussi de la synthèse des métalloprotéases de la matrice et des cytokines (Goldring, 2000).

Les métalloprotéases de la matrice (MMPs) jouent un rôle important dans la dégradation du collagène et des protéoglycanes. Plusieurs MMPs sont augmentées dans le cartilage et/ou le liquide synovial OA (Chubinskaya et al., 1999 ; Yoshihara Y et al., 2000). Dans le chondrocyte normal, la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire est en équilibre. Par contre, dans l'arthrose, il semble y avoir un déséquilibre en faveur de la dégradation.

Durant la dégradation de la matrice, une grande variété de fragments moléculaires est générée par l'activité protéolytique des MMPs. Certains de ces fragments (fragments de collagène de type II ou de fibronectine) peuvent activer des cytokines comme l'interleukine-1 (IL-1) et le « tumor necrosis factor α » (TNF- α) (Poole et al., 2002). IL-1 joue un rôle important dans le catabolisme du cartilage en activant les MMPs et en inhibant la synthèse des PGs et la prolifération des chondrocytes (Pujol et Loyau, 1987).

Il est évident que le chondrocyte OA a un métabolisme augmenté lors de sa tentative de réparer la matrice extracellulaire. Néanmoins, cette activité est limitée et les activités cataboliques du chondrocyte prennent le dessus jusqu'à dégradation complète du cartilage. On ne connaît pas la cause de cet échec chondrocytaire, mais ceci pourrait être dû en partie aux changements phénotypiques observés chez le chondrocyte arthrosique. Aigner et McKenna (2002) ont démontré avec plusieurs marqueurs de différenciation des chondrocytes que les chondrocytes peuvent être différenciés (expriment Col I et III), hypertrophiques (expriment Col X), activés (expriment Col II et agrécane) et redevenir des cellules chondroprogénitrices (expriment Col IIA). Les chondrocytes avec un phénotype modifié ne produisent alors plus les protéines matricielles, donc la matrice n'est plus réparée.

3) L'os normal

3.1 Le tissu osseux

L'os est un tissu conjonctif spécialisé qui forme le squelette avec le cartilage. Les os remplissent plusieurs fonctions importantes. Ils servent de soutien mécanique pour l'ancrage des muscles et de tout autre organe mou et protègent les organes vitaux et la moelle osseuse. De plus, les os ont un rôle métabolique important en tant que réserve d'ions, principalement le calcium et le phosphate, pour la maintenance de l'homéostasie du sérum (Baron, 2003). Finalement, les os sont le siège de l'hématopoïèse qui se produit dans les cavités médullaires de certains os (Marieb, 1993).

Les os sont constitués d'une matrice extracellulaire dont la composition et la taille sont régulées par deux types cellulaires principaux : les ostéoblastes et les ostéoclastes. La matrice extracellulaire est composée d'une structure de fibrilles de collagène, dont le type I compte pour 90% des protéines totales, et de protéines non-collagèneuses. Cette structure, appelée matrice ostéoïde, est alors calcifiée par des cristaux hydroxyapatites $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ qui viennent se fixer sur et entre les fibrilles de collagène (Baron, 2003). Cette structure confère à l'os la rigidité et la solidité qu'on lui connaît.

3.1.1 Structure de l'os

On distingue deux types d'os selon leur forme dans le squelette, les os longs comme le tibia et les os plats comme ceux du crâne. La structure d'un os long comprend un corps cylindrique, appelé diaphyse, et deux extrémités, les épiphyses. Les surfaces externes de l'os sont protégées par une membrane double, le périoste, et

les surfaces internes par une membrane appelée endoste. Ces deux surfaces sont doublées d'une couche de cellules ostéogéniques (ostéoblastes et ostéoclastes). Tous les os sont composés de deux types de tissus osseux : l'os compact et l'os spongieux (ou trabéculaire).

L'os compact constitue la portion externe de l'os et est composé d'une dense couche de tissu calcifié dans laquelle on retrouve une multitude de canaux et de passages contenant les nerfs, les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques. L'unité structurale de l'os compact est appelé ostéon (ou système de Havers) où chaque ostéon constitue un cylindre allongé orienté selon l'axe longitudinal de l'os (Marieb, 1993). Au centre de chaque ostéon se trouve un canal (canal de Havers) dans lequel des petits vaisseaux sanguins viennent desservir les cellules de l'ostéon. D'autres types de canaux perpendiculaires à l'axe de l'ostéon (canaux perforant ou de Volkmann) relient les nerfs et les vaisseaux du périoste jusqu'au canal médullaire (qui contient la moelle) en passant par le canal de Havers (figure 7). Les ostéocytes, cellules osseuses matures, sont reliés au canal central de l'ostéon par des canicules (canaux très fins) permettant ainsi aux cellules d'un même ostéon de communiquer entre elles.

L'os trabéculaire est composé de travées osseuses situées sous l'os compact dans les épiphyses des os longs. Il tient un rôle important dans la résistance mécanique de l'os.

3.2 Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont les cellules responsables de la production de la matrice osseuse. Leur fonction principale est de synthétiser et de minéraliser la matrice

osseuse lors de la croissance du squelette, du renouvellement de la matrice osseuse chez l'adulte et de la réparation osseuse tout au long de la vie (Vernejoul et Marie, 1996).

Les ostéoblastes des os longs proviennent de la différenciation de cellules souches du stroma médullaire, capables de se différencier en cellules cartilagineuses, osseuses, musculaires ou adipocytaires sous l'induction de facteurs locaux et systémiques (Vernejoul et Marie, 1996). Pour la différenciation ostéoblastique, l'expression des facteurs de transcription *Cbfa1/Runx2* (Core binding factor A1) et ostérix (*Osx*) est requise. L'ostéogenèse débute par la prolifération de cellules ostéoprogénitrices qui se différencient en pré-ostéoblastes, puis en ostéoblastes matures (figure 8). Les gènes caractéristiques de la différenciation ostéoblastique et associés à la production de la matrice sont la phosphatase alcaline, le collagène de type I et l'ostéopontine. De plus, les ostéoblastes différenciés expriment des marqueurs tardifs de la différenciation, soit l'ostéocalcine et la sialoprotéine osseuse (Marie, 2001). L'ostéocyte est le stade final de la différenciation ostéoblastique. Les ostéocytes sont inclus dans des lacunes de la matrice osseuse qu'ils viennent de produire et communiquent entre eux par un réseau d'extensions cytoplasmiques de type filipode enchâssées dans des canalicules. L'ostéocyte a la capacité de synthétiser certaines protéines de la matrice et aide à conserver l'intégrité de la matrice osseuse (Lian et al., 2003)

D'un point de vue morphologique, les ostéoblastes matures sont retrouvés en groupe de 100 à 400 cellules cuboïdes par site de formation osseuse. Ils sont caractérisés par un noyau rond à la base de la cellule, un cytoplasme basophile et un appareil de Golgi très développé entre le noyau et l'apex de la cellule. La membrane

plasmique des ostéoblastes est riche en phosphatase alcaline (dont la concentration sérique sert d'indice de formation osseuse) et exprime des récepteurs pour l'hormone parathyroïdienne (PTH) et les prostaglandines. De plus, les ostéoblastes expriment des récepteurs nucléaires d'hormones stéroïdiennes et de la vitamine D₃ ainsi que plusieurs molécules d'adhésion (intégrines) et des récepteurs aux cytokines (Baron, 2003)

3.2.1 Composition de la matrice extracellulaire

La matrice osseuse comprend des composantes organiques, comme le collagène et les protéines non-collagèneuse, et inorganiques tels que les minéraux qui constituent 50-70% de la matrice. Le collagène de type I représente 90% de la matrice organique de l'os et sert d'échafaudage à la matrice ostéoïde qui sera minéralisée. Des traces de collagène de type III, V et X sont aussi observées durant certaines étapes de la formation osseuse et pourraient réguler le diamètre des fibres de collagène de type I. Les protéines non-collagèneuse constituent 10-15% du contenu total de protéines. On peut les diviser en quatre groupes, soit les protéoglycanes, les protéines glycosylées, les protéines pouvant moduler l'attachement cellulaire et les protéines contenant les résidus d'acide γ -carboxylés (GLA) (impliquées dans la minéralisation). Le rôle de chacune des protéines individuelles dans l'os n'est pas bien connu, mais elles pourraient participer à l'intégrité structurale de la matrice, à la minéralisation de l'os et au contrôle du métabolisme des ostéoblastes et des ostéoclastes (Robey et Boskey, 2003).

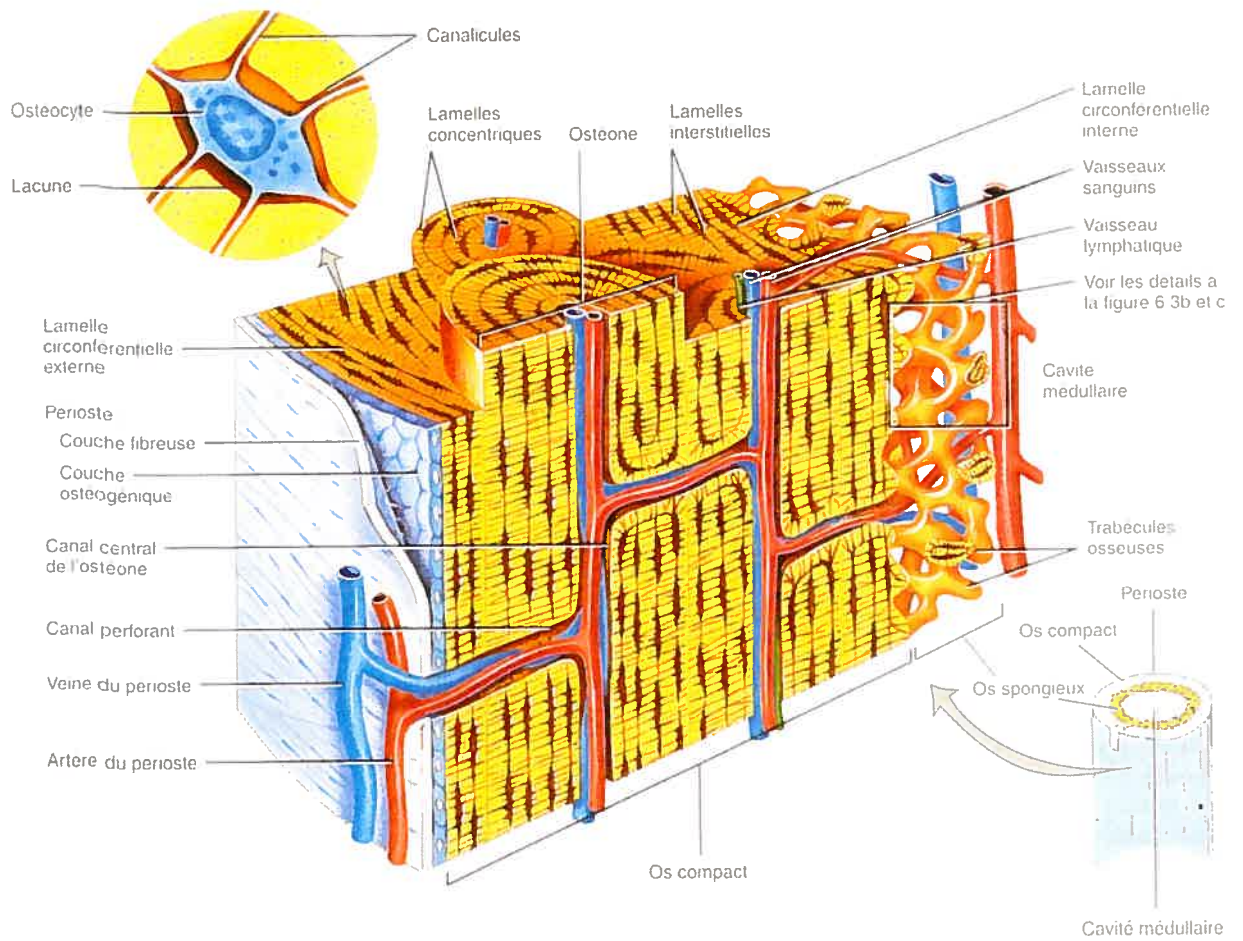


Figure 7 : Système de havers dans un os compact. Coupes de la diaphyse d'un os long montrant le périoste à gauche, l'os compact au centre, l'os spongieux et la cavité médullaire à droite. En médaillon (en haut à gauche), un ostéocyte dans une lacune.

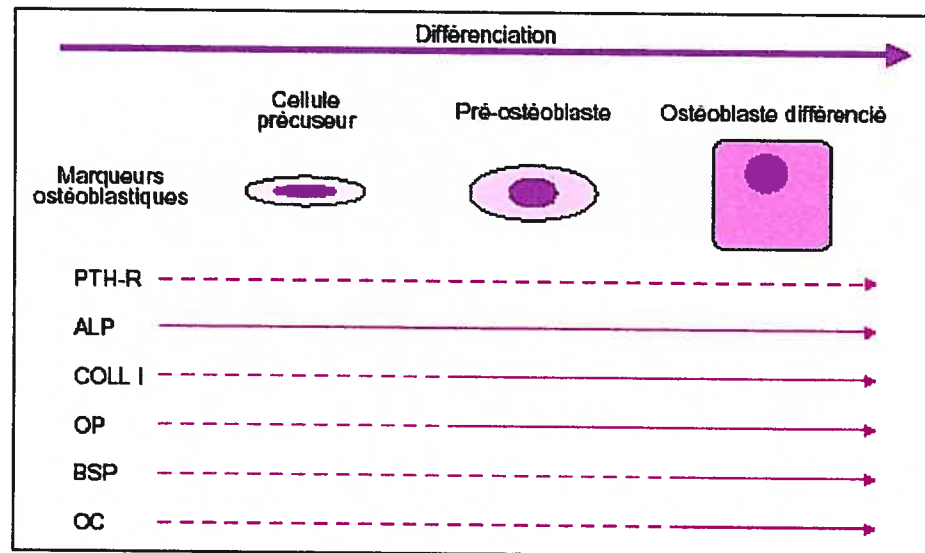
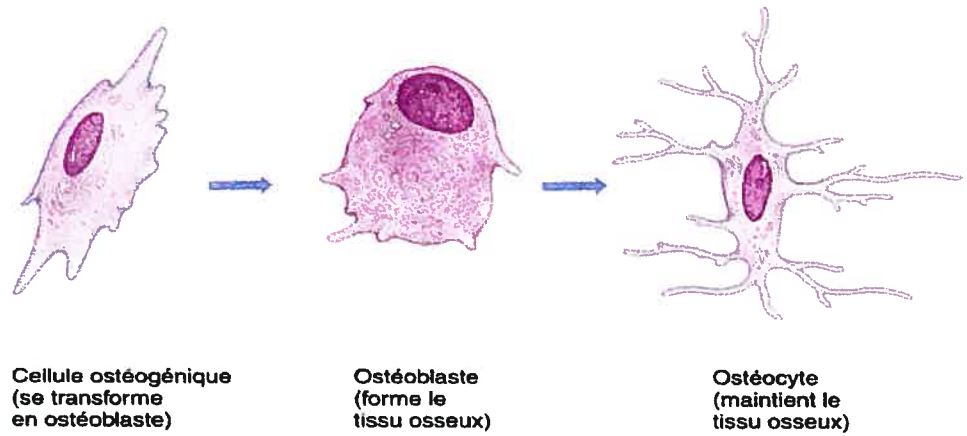
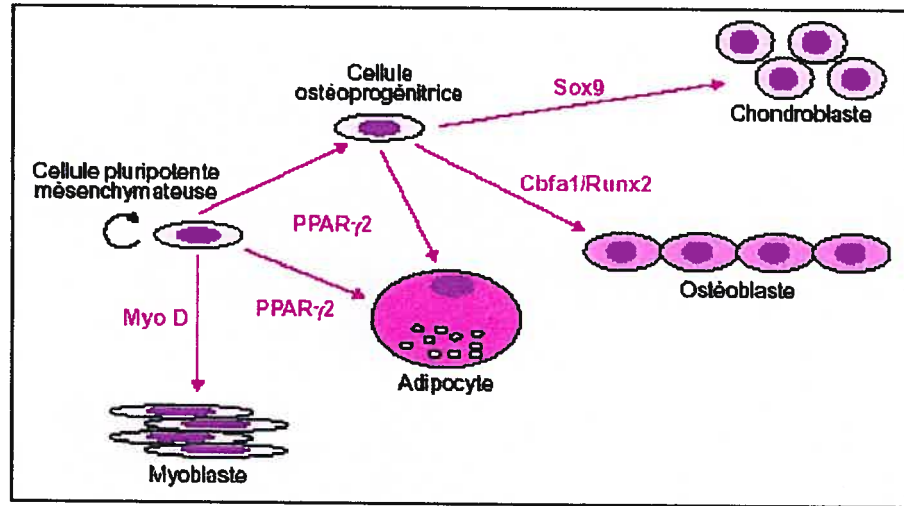


Figure 8. Les ostéoblastes

3.2.2 Le collagène

Comme nous venons de le voir, le collagène de type I est le constituant majeur de la matrice osseuse. Les collagènes constituent une famille de protéines fibreuses dont l'aspect caractéristique est leur structure hélicoïdale rigide à trois brins. La molécule de collagène comprend trois chaînes polypeptidiques, les chaînes α , enroulées entre elles pour former une super hélice. Les chaînes α sont composées d'une succession de triplets Gly-X-Y, où X est généralement une proline et Y généralement une hydroxyproline (figure 9a). Les résidus hydroxyproline et hydroxylysine sont fréquents dans la molécule de collagène et les groupements hydroxyles de ces acides aminés forment des liaisons hydrogène entre les chaînes ce qui stabilise la triple hélice. On a identifié environ 25 chaînes α de collagène codées par autant de gènes, mais malgré toutes les combinaisons possibles, seulement 15 types de collagènes ont été trouvés (Alberts et al., 1995). Le collagène de type I est composé de deux chaînes $\alpha 1$ identiques et d'une chaîne $\alpha 2$ semblable, mais génétiquement différente.

Les molécules de collagène retrouvées dans l'os sont synthétisées par les ostéoblastes. Dans l'appareil de Golgi, trois chaînes α s'assemblent en une triple hélice de pro-collagène. La molécule de pro-collagène est sécrétée avec une extension non hélicoïdale des chaînes α (pro-peptide) à chaque extrémité. Lorsque la molécule de pro-collagène est sécrétée, les pro-peptides sont clivés par des enzymes protéolytiques dans le milieu extracellulaire. Par la suite, les molécules de collagène s'assemblent en fibrilles de collagène de taille beaucoup plus grande (figure 9b). Les pro-peptides ont deux fonctions : guider la formation intracellulaire

de la triple hélice et empêcher la formation intracellulaire de fibrilles de collagène de grande taille qui pourrait être fatale pour la cellule (Alberts et al., 1995).

3.3 Les ostéoclastes et la résorption osseuse

Les ostéoclastes sont d'origine hématopoïétique et la différenciation de pré-monocytes en précurseurs ostéoclastiques se déroule dans la moelle osseuse sous le contrôle de trois facteurs clés, M-CSF (macrophage-colony stimulating factor), RANKL, le ligand du récepteur RANK (receptor activator for NF-kappaB) et son antagoniste, l'ostéoprotégérine (Baron, 2001). L'ostéoclaste est une cellule multinucléée contenant des complexes de Golgi bien développés et disposés autour de chaque noyau, ainsi que de nombreuses vésicules de sécrétion remplies d'enzymes lysosomiales. On retrouve généralement l'ostéoclaste en contact avec une surface osseuse calcifiée dans des lacunes, les lacunes de Howship, qui sont le résultat de leur propre activité de résorption (Baron, 2003).

La caractéristique la plus frappante chez l'ostéoclaste est sa bipolarité morphologique et fonctionnelle. Le pôle apical, en regard de la matrice osseuse, est caractérisé par une bordure en brosse au centre entourée par un anneau d'actine qui sert de zone d'attachement de la cellule à la surface osseuse. La bordure en brosse est le siège de sécrétion de protons, d'enzymes lysosomiales et de métalloprotéases (Baron, 2003), tous impliqués dans la dégradation de la matrice osseuse. La zone d'attachement de l'ostéoclaste à la matrice osseuse comprend, à la surface des ostéoclastes, des récepteurs trans-membranaires de la famille des intégrines permettant une interaction solide entre la cellule et la matrice. D'ailleurs, une fois l'ostéoclaste attaché à l'os, la cellule génère un micro-environnement extracellulaire

isolé entre elle et la surface osseuse (Teitelbaum, 2000). Les pompes à protons de type ATPase au niveau de la bordure en brosse entraînent l'acidification du micro-environnement isolé ce qui déclenche la déminéralisation de la matrice. Par la suite, la matrice osseuse est dégradée par les enzymes lysosomiales et les métalloprotéases.

Le pôle opposé, ou pôle basolatéral, est en contact avec l'environnement extérieur, la moelle osseuse et/ou le périoste. Il exprime les récepteurs des facteurs de croissance et comprend un excréteur acide (l'échangeur Na^+/H^+) et un excréteur de base (l'échangeur $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$) qui acidifie le cytoplasme (figure 10). La fonction essentielle du pôle basolatéral est de maintenir l'équilibre électrochimique de l'ostéoclaste via la coordination des pompes à ions et des canaux et échangeurs ioniques (Baron, 2001).

3.4 Le remodelage osseux

L'os adulte est une structure dynamique qui subit constamment un renouvellement. Le remodelage osseux est l'équilibre entre la formation et la dégradation de la matrice osseuse effectuées par les ostéoblastes et les ostéoclastes respectivement. Ce processus est régulé par différentes hormones, facteurs de croissance et cytokines.

3.4.1 Le cycle de remodelage osseux

La séquence du remodelage osseux débute par une activation des précurseurs ostéoclastiques qui se différencient en ostéoclastes. Vient alors la phase de résorption osseuse par les ostéoclastes, étape qui dure une dizaine de jours environ. Par la suite, les ostéoclastes se détachent et meurent par apoptose, puis les

précurseurs ostéoblastiques se différencient en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes qui synthétisent une nouvelle matrice au site de résorption. À la fin de cette phase de formation, d'une durée d'environ 3 mois, les ostéoblastes deviennent soit des cellules bordantes, meurent par apoptose ou se laissent inclure dans la matrice en devenant des ostéocytes (figure 11) (Mundy, 2003; Marie, 2001).

3.4.2 Régulation du remodelage osseux

Le cycle de remodelage osseux décrit précédemment est régulé par des facteurs systémiques et locaux comprenant des hormones, des facteurs de croissance des prostaglandines et des cytokines. Ces facteurs agissent de façon directe sur l'ostéoblaste et indirecte sur l'ostéoclaste en affectant leur prolifération et leur survie, la transcription des protéines et la synthèse de la matrice (Blair et al., 2002).

3.4.2.1 Facteurs locaux : RANKL et l'ostéoprotégerine

Lors de la résorption osseuse, les précurseurs ostéoclastiques se différencient sous l'influence du signal RANKL, une protéine membranaire exprimée à la surface des ostéoblastes et des cellules stromales de la moelle osseuse (BMSC). L'interaction de RANKL avec son récepteur RANK (exprimé sur les précurseurs ostéoclastiques) déclenche la différenciation des ostéoclastes, et donc la résorption osseuse. Par contre, l'ostéoprotégerine bloque l'interaction entre RANKL et son récepteur. L'ostéoprotégerine (OPG) est un récepteur sans domaine transmembranaire sécrété par les ostéoblastes et les BMSC qui a été récemment identifié (Simonet et al., 1997). OPG inhibe la résorption osseuse par les ostéoclastes en liant RANKL, empêchant ce dernier de se lier à RANK sur les précurseurs

ostéoclastiques. Donc, OPG agit en tant que régulateur physiologique du remodelage osseux. Il est intéressant de noter que presque tous les facteurs qui stimulent l'expression de RANKL inhibent la production d'OPG (Hofbauer et Heufelder, 2001; Boyle et al., 2003).

3.4.2.2 L'hormone parathyroïdienne

L'hormone parathyroïdienne est un régulateur majeur de l'homéostasie du calcium dans le sang. Lors du remodelage osseux, la PTH stimule la résorption osseuse par les ostéoclastes. La PTH n'agit pas directement sur les ostéoclastes, ceux-ci ne possédant pas de récepteurs à la PTH, mais via la stimulation de l'expression de RANKL à la surface des ostéoblastes (Yasuda et al., 1998). La PTH a des effets contraires sur le métabolisme osseux dépendamment qu'elle soit administrée de façon intermittente ou continue. L'administration intermittente de PTH conduit à la formation de la matrice osseuse (Dempster et al., 1993) alors qu'une administration soutenue inhibe la synthèse du collagène de type I et de l'ostéocalcine par les ostéoblastes (Beresford et al., 1984 ; Dietrich et al., 1976) et stimule la résorption osseuse.

En effet, des traitements intermittents avec la PTH stimulent la synthèse du collagène et la formation osseuse. Ces effets anaboliques pourraient s'expliquer via la stimulation par la PTH de facteurs locaux comme l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1) et le TGF- β (transforming growth factor β) (Canalis et al. 1989 ; Canalis et Raisz, 1994), tous deux des facteurs de croissance favorisant la formation osseuse. D'autre part, les traitements chroniques avec la PTH résultent en une inhibition de la formation osseuse. La PTH inhibe l'OPG et stimule RANKL simultanément ce qui

favorise la formation et l'activation des ostéoclastes et ainsi la résorption osseuse au détriment de la formation osseuse (Aubin et Bonnelye, 2000).

3.4.2.3 La vitamine D₃

Tout comme la PTH, la vitamine D₃ joue un rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie calcique. La 1,25(OH)₂ vitamine D, synthétisée par le rein, est la forme active de la vitamine D₃. La vitamine D₃ stimule la résorption osseuse par les ostéoclastes via l'activation de RANKL (Yasuda et al., 1998) et augmente l'absorption intestinale de calcium afin de maintenir des niveaux de calcium normaux dans le sang. De plus, la vitamine D₃ joue un rôle dans la formation de la matrice osseuse par les ostéoblastes en augmentant la synthèse de protéines matricielles telle que l'ostéopontine, l'ostéocalcine (Farach-Carson et Ridall, 1998) et en diminuant celle du collagène de type I (Harrison et Clark, 1986).

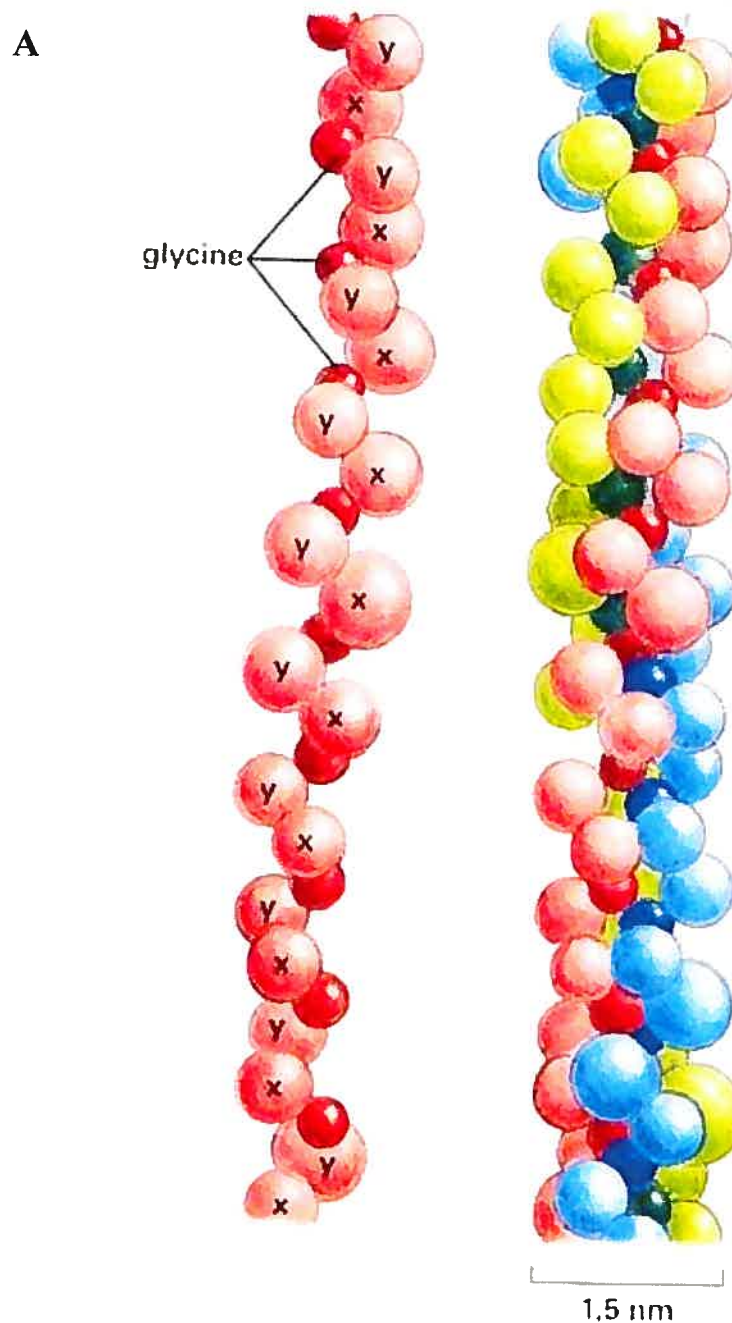
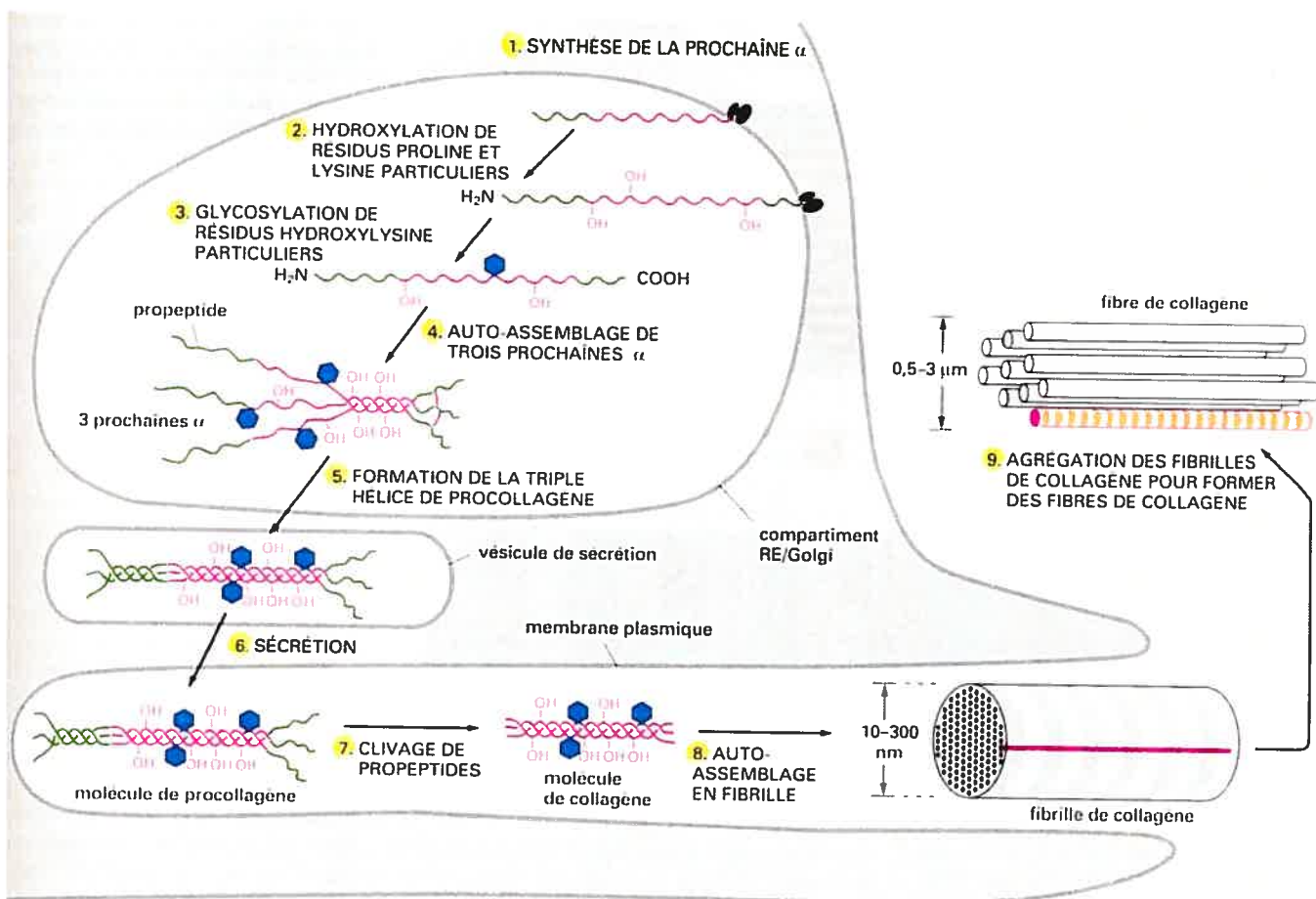


Figure 9. Le structure et la synthèse du collagène. **A)** Une fibrille de collagène constituée de trois chaînes α formant une triple hélice. Chaque chaîne α comprend un motif Gly-X-Y où X est généralement une proline et Y une hydroxyproline. **B)** Les chaînes α sont synthétisées et assemblées dans la cellule pour former une molécule de pro-collagène. Les molécules de pro-collagène sont clivées dans le milieu extracellulaire pour donner des molécules de collagène qui s'assembleront en fibrilles, puis en fibres de collagène.

B



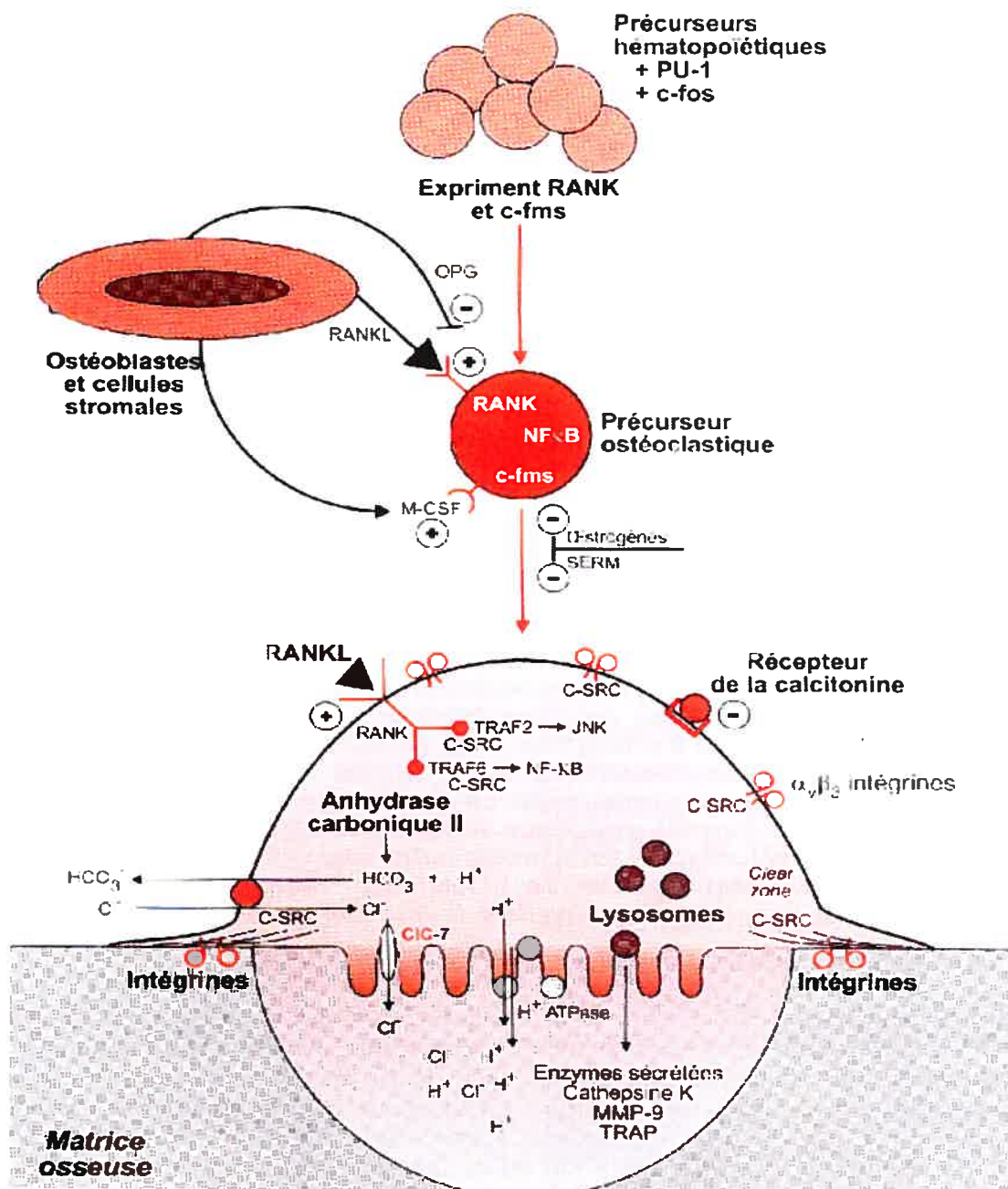


Figure 10. Bipolarité morphologique et fonctionnelle de l'ostéoclaste. Le pôle apical est en regard de la matrice osseuse; il comprend la zone scellée, et délivre dans la lacune de résorption enzymes et métalloprotéases dégradant la matrice. Cette bordure en brosse est aussi le siège d'une sécrétion spécifique de protons qui acidifient le compartiment de résorption osseuse. Le pôle opposé, ou pôle basolatéral, est en contact avec l'environnement de la moelle osseuse et du périoste. Il comprend un échangeur Na^+/H^+ pour excréter des protons et un échangeur $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ pour excréter des ions HCO_3^- ce qui acidifie le cytoplasme.

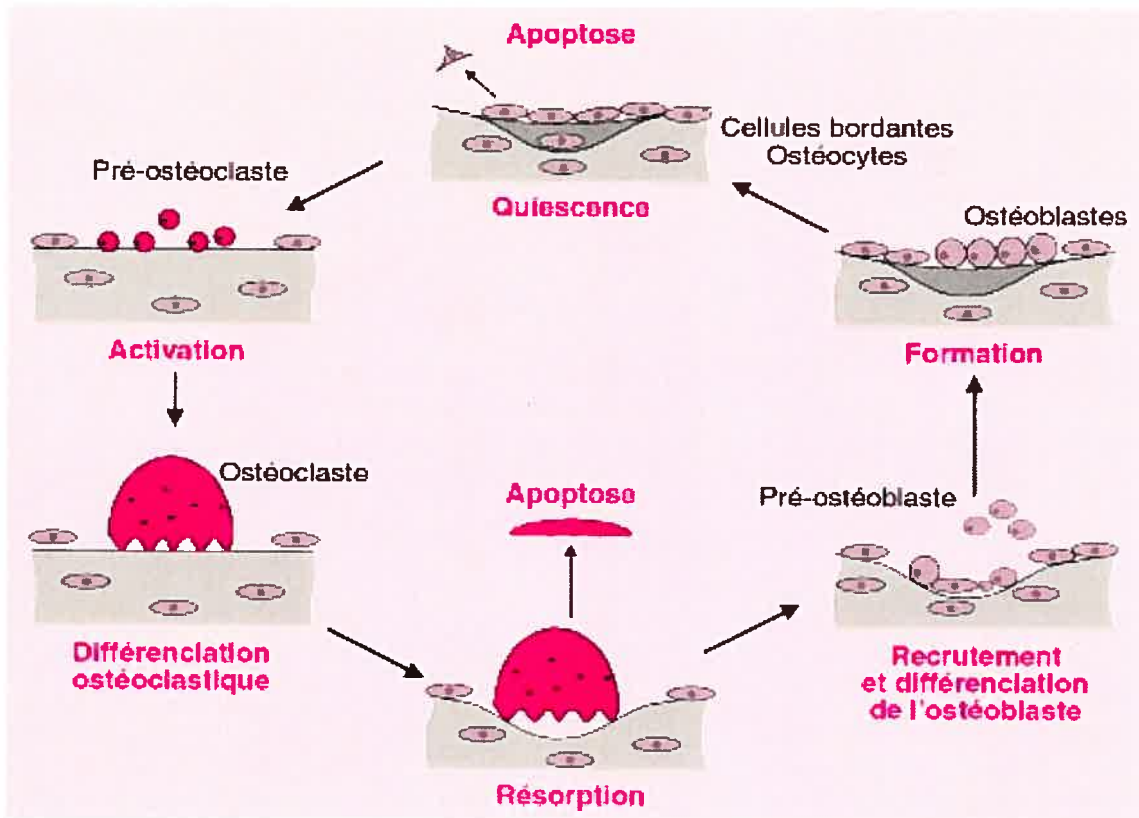


Figure 11. Le cycle de remodelage osseux

4) L'os arthrosique

4.1 L'os sous-chondral arthrosique

Comme nous l'avons vu dans les sections précédentes, les changements morphologiques conduisant à la destruction du cartilage dans l'arthrose sont bien documentés. Néanmoins, des changements tout aussi importants surviennent dans la structure osseuse au cours de l'arthrose, notamment la formation d'ostéophytes et la sclérose de l'os sous-chondral. Ce n'est que récemment que le rôle du métabolisme anormal de l'os sous-chondral arthrosique a été pris en considération dans le processus de la maladie.

4.1.1 Caractéristiques de l'os sous-chondral arthrosique

L'os sous-chondral OA est caractérisé par une sclérose osseuse et une augmentation de la formation de l'os. Les travaux initiaux sur l'implication de l'os dans l'arthrose effectués par Radin et al. (1970) ont montré que l'application de charges excessives sur l'articulation causait un épaissement de l'os sous-chondral dû à la réparation de micro-fractures. L'os devient plus épais et plus rigide, donc absorbe moins bien les chocs. Le cartilage absorbera alors la pression transférée par l'os entraînant ainsi sa dégradation (Radin et al. 1970; Radin et Paul, 1970). Nous reparlerons plus en détails des interactions os-cartilage dans la section 4.2.3. Il a été démontré que la sclérose de l'os sous-chondral arthrosique correspond à un épaissement de l'os associé à un taux de minéralisation anormalement bas (Li et Aspden, 1997; Grynpas et al, 1991). En outre, Mansell et Bailey (1998) ont observé à partir d'explants de têtes fémorales arthrosiques une augmentation de la synthèse

du collagène, mais une diminution du rapport calcium/collagène témoignant d'une formation osseuse accrue, mais d'une réduction de la minéralisation.

Donc, on a rapporté une augmentation du métabolisme du collagène dans l'os sous-chondral arthrosique (Mansell et al., 1997) ainsi qu'une diminution de la densité minérale osseuse par unité de surface (Li et Aspden, 1997). De ce fait, malgré qu'il y ait un épaissement de la matrice ostéoïde, celle-ci est moins minéralisée (Grynpas et al, 1991). De plus, il y a formation d'ostéophytes, des excroissances osseuses, qui joueraient un rôle compensatoire dans la redistribution des forces dans l'articulation afin de protéger le cartilage articulaire (Moskowitz, 1999).

4.1.2 Les modèles expérimentaux d'arthrose

Des études avec des modèles expérimentaux tels que le chien (Brandt et al., 1991), le lapin (Radin et al., 1984), le mouton (Brown et al, 1984), le cochon d'inde (Layton et al. 1988) et les macaques (Carlson et al., 1994) ont permis d'observer plusieurs modifications au niveau du tissu osseux arthrosique. Les changements observés au niveau de l'os impliquent une formation osseuse et une densité osseuse augmentées, une porosité de l'os diminuée et un épaissement de la portion sous-chondral et trabéculaire de l'os. La majorité de ces études montraient que les changements dans le remodelage osseux apparaissaient bien avant les changements histologiques du cartilage (Brandt et al, 1991 ; Radin et al., 1984 ; Brown et al., 1984). En outre, chez un modèle spontané d'arthrose, le macaque cynomolgus, les lésions ostéoarthrosiques étaient morphologiquement similaires à celles des humains. Chez ce modèle, on observait des changements osseux plus communs et sévères que

ceux du cartilage et qui morphologiquement semblaient précéder les changements dans le cartilage (Carlson et al., 1994). Aujourd'hui, il est généralement accepté que l'os est impliqué dans la progression de l'arthrose, toutefois d'autres études restent à faire pour savoir si l'os est responsable ou non de l'initiation de la maladie. Toutes ces études avec les modèles expérimentaux ont permis de faire ressortir plusieurs points importants concernant l'implication de l'os dans la maladie. Tout d'abord, seulement les changements osseux à proximité du cartilage affectent celui-ci. De plus, l'os et le cartilage calcifié se remodelent de façon couplée et devraient être considérés comme une seule unité sous-chondrale. Finalement, la sclérose de l'os sous-chondral semble être nécessaire pour la progression de la maladie (Burr et Schaffler, 1997).

4.2 La biochimie de l'os sous-chondral arthrosique

4.2.1 Les ostéoblastes arthrosiques

Comme la composition de l'os arthrosique est modifiée et que l'ostéoblaste est responsable de la formation osseuse, certaines équipes ont étudié le phénotype des ostéoblastes arthrosiques. Notre laboratoire est l'un des premiers à avoir mis sur pied un système de culture primaire d'ostéoblastes humains arthrosiques et normaux afin d'étudier les différences phénotypiques de ces deux groupes chez la cellule osseuse *in vitro*. Ainsi, nous avons déterminé que les ostéoblastes arthrosiques ont un phénotype altéré par rapport aux normaux. Les ostéoblastes OA relâchent plus d'IGF-1 et expriment un niveau et une activité augmentés de l'activateur du plasminogène urokinase (uPA). L'uPA est un élément clef dans le remodelage osseux local car il lie la résorption osseuse à la formation osseuse en stimulant

localement des protéases et en relâchant des facteurs de croissance emprisonnés dans la matrice osseuse. Les ostéoblastes OA ont une activité phosphatase alcaline et une relâche d'ostéocalcine augmentées par rapport aux normaux, ainsi qu'une synthèse altérée d'AMPc après stimulation avec la PTH et la prostaglandine E₂ (PGE₂) (Hilal et al., 1998; Hilal et al., 1999) (figure 12).

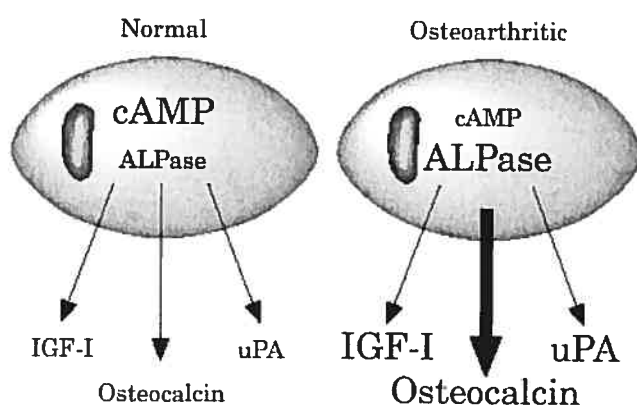


Figure 12. Phénotype d'ostéoblastes OA et normaux provenant de l'os sous-chondral. Les cellules arthrosiques montrent une diminution d'AMPc en réponse à la PTH et au PGE₂ et une augmentation de l'activité phosphatase alcaline (ALPase) et d'ostéocalcine au niveau basal et en réponse à la 1,25(OH)₂D₃. Les niveaux de base de l'uPA et d'IGF-1 sont aussi augmentés (adapté de Lajeunesse et al., 1999).

Récemment, il a été démontré que la production de TGF- β , un facteur de croissance qui stimule la formation de la matrice osseuse, est augmentée dans les ostéoblastes arthrosiques. De plus, on a fait la distinction entre deux groupes de patients OA, les producteurs faibles ou forts, selon leur production de PGE₂ et d'IL-6 par des ostéoblastes isolés de spécimens d'os sous-chondral (Massicote et al., 2002).

Tous les changements phénotypiques mentionnés ci-haut témoignent d'un métabolisme anormal des ostéoblastes dans l'arthrose. L'augmentation des facteurs de croissances relâchés par les ostéoblastes OA comme l'IGF-1 et le TGF- β , et la résistance aux métabolites impliqués dans le remodelage osseux tels que la PTH et le PGE₂ pourraient être en partie responsables de la sclérose osseuse observée *in vivo*.

4.2.2 Le collagène arthrosique et l'hypominéralisation

La minéralisation osseuse implique la participation de plusieurs protéines qui interagissent entre elles et le collagène de type I. Un déséquilibre entre la synthèse du collagène et des protéines non-collagèneuses par les ostéoblastes OA pourrait conduire à une augmentation du volume osseux sans minéralisation subséquente (Lajeunesse et Reboul, 2003). De plus, un contenu anormal en collagène pourrait conduire à une minéralisation altérée puisque seulement les fibrilles de collagènes de type I natives peuvent être minéralisées correctement. Il a été observé que le contenu en collagène de type I est élevé dans l'os trabéculaire de têtes fémorales de patients OA par rapport aux sujets normaux, mais que cette matrice ostéoïde augmentée est hypominéralisée (Mansell et al., 1997; Mansell et Bailey, 1998). Il semblerait que la composition du collagène de type I arthrosique soit anormale. Le collagène de type I est composé d'un hétérotrimère de chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ dans un ratio 2.4 : 1 dans l'os normal alors que chez l'os OA ce ratio varierait de 4 :1 à 17 :1 formant ainsi un homotrimère de chaînes $\alpha 1$ avec des propriétés mécaniques différentes (Bailey et al., 2002). D'ailleurs, une réduction de chaînes $\alpha 2$ conduit à une diminution de 50% de la résistance de l'os au stress et à la force de compression tel qu'observé chez des souris knock-out du gène de la chaîne $\alpha 2$ (Misof et al., 1997). Donc, la structure altérée du collagène de type I dans l'arthrose diminuerait la stabilité de la triple hélice changeant ainsi le patron de minéralisation normal de la matrice ostéoïde.

4.2.3 Interaction os-cartilage dans l'arthrose

Un débat fait rage présentement dans le domaine de l'arthrose en ce qui concerne les premiers signes physiologiques impliqués dans la maladie. On ne sait pas encore si les premiers changements dans l'articulation OA se produisent dans le cartilage ou dans l'os ou bien si ces deux phénomènes sont concomitants. Néanmoins, les modifications d'un tissu pourraient influencer l'autre et vice-versa. La majorité des études avec les modèles animaux montrent que les changements dans le tissu osseux précèdent la dégradation du cartilage (Carlson et al., 1994 et 1996; Dedrick et al., 1993; Brandt et al., 1991). Par ailleurs, chez l'humain, il y a une corrélation certaine entre le niveau de dégradation du cartilage et le volume et la formation de l'os sous-chondral (Matsui et al., 1997). Des études histologiques ont aussi rapporté que les changements observés dans l'os sous-chondral arthrosique corrélaient directement avec la sévérité des lésions dans le cartilage (Reimann et al., 1977).

Selon Dedrick et al. (1993), les changements dans l'os sous-chondral arthrosique résulteraient en une transmission anormale du stress au cartilage sous-jacent et contribueraient à la progression de la dégradation du cartilage. Toutefois, il n'y aurait pas que des interactions de types mécaniques entre ces deux tissus, mais aussi des modifications biochimiques. Les travaux de Westacott et al. (1997) ont démontré pour la première fois que 50% des ostéoblastes OA étudiés sont capables d'induire la dégradation des glycosaminoglycanes provenant de biopsies de cartilage normal. Il y aurait donc un ou des facteurs produits par les ostéoblastes OA qui auraient un impact sur l'intégrité du cartilage.

5) Les métalloprotéases

5.1 Les métalloprotéases de la matrice extracellulaire

Comme leur nom l'indique, les métalloprotéases de la matrice (MMPs) sont des enzymes responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire. Elles sont capables de dégrader une grande variété de protéines de la matrice incluant le collagène, les protéoglycanes, la fibronectine et les laminines. Les MMPs jouent un rôle central dans le développement de l'embryon, la morphogenèse et le remodelage tissulaire ainsi que dans plusieurs maladies telles que les différentes formes d'arthrite, l'ulcération des tissus, l'athérosclérose et le cancer (Nagase, 1997).

Les MMPs sont une famille d'endopeptidases à zinc caractérisées par un pro-peptide en N-terminal, un domaine catalytique zinc-dépendant et un domaine hémopexine en C-terminal. Les MMPs sont synthétisées et sécrétées (sauf les MMPs de types membranaire (MT-MMP)) sous forme de pro-enzymes et activées par clivage catalytique. Elles sont inhibées par une famille de quatre inhibiteurs : les « tissue inhibitors of metalloproteinases » ou TIMP (Bigg et Rowan, 2001). Jusqu'à aujourd'hui, 25 MMPs ont été identifiées et on les a subdivisées en 5 groupes selon leurs propriétés fonctionnelles et structurales : les collagénases, les gélatinases, les stromelysines, les MT-MMP et les autres (Nagase et Woessner, 1999).

5.2 Le rôle des métalloprotéases dans l'arthrose

Les métalloprotéases matricielles jouent un rôle important dans la dégradation du cartilage dans l'arthrose. On a observé l'augmentation de l'expression et de l'activité d'un grand nombre de MMPs au niveau de l'articulation

arthrosique, autant dans le liquide synovial que dans le cartilage ou l'os (Martel-Pelletier et al., 2001 ; Konttinen et al., 1999).

5.2.1 Les métalloprotéases dans le cartilage arthrosique

Plusieurs collagénases et stromelysines sont augmentées dans le cartilage OA et sont responsables de la dégradation du collagène de type II, des protéoglycanes et des agrécanes. Dans presque tous les chondrocytes OA ainsi que dans le cartilage OA les MMP-3 (stromelysine), MMP-8 (collagénase-2) et MMP-13 (collagénase-3) sont élevées (Billingham et al.1997 ; Sandell et Aigner, 2001). La MMP-13 semble être la plus cruciale dans l'arthrose à cause de sa dégradation préférentielle du collagène de type II (Stahle-Backdahl et al, 1997) et sa prévalence dans les tissus OA comparée aux normaux (Fernandes et al., 1998 ; Moldovan et al., 1997).

5.2.2 Les métalloprotéases dans l'os arthrosique

Plusieurs MMPs sont produites par les ostéoblastes, telles que les MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 et la MT1-MMP (MMP-14) (Stahle-Backdahl et al., 1997; Filanti et al., 2000 ; Apte et al., 1997). La MMP-2 peut dégrader le collagène dénaturé, la gélatine, la fibronectine et l'élastine, alors que les MMP-1 et -3 jouent un rôle essentiel dans la dégradation des matrices osseuse et cartilagineuse respectivement (Delaisse et al., 1993 ;Okada et al., 1992). Ces MMPs sont toutes inter-reliées et peuvent s'activer entre elles. Les MMP-2 et -3 sont de puissants stimulateurs de MMP-13 qui peut activer la MMP-9. La MT1-MMP est impliquée dans l'activation de la pro-MMP-2 en MMP-2 active (Strongin et al. 1995 ; Kinoh et al., 1996) et possiblement d'autres MMPs sécrétées (Cowell et al., 1998).

Dans l'os arthrosique, il a été démontré que les tissus osseux trabéculaires expriment beaucoup plus la MMP-2 que chez des sujets normaux du même âge (Mansell et al., 1997). D'ailleurs, l'activité MMP-2 est augmentée dans des kystes trouvés à la surface sous-chondral de tissus osseux de patients OA et il y a une corrélation positive entre la production de MMP-9 et la destruction rapide de la hanche chez le patient OA (Masuhara et al., 2000). Les MMPs provenant du tissu osseux OA pourraient influencer l'intégrité du cartilage puisqu'elles sont sécrétées par les ostéoblastes et peuvent circuler dans l'espace synovial. Plusieurs études restent à faire afin de déterminer l'interaction relative de ces deux tissus et l'implication des MMPs dans ce processus.

6) Hypothèse de travail

L'arthrose est une maladie dégénérative des articulations caractérisée par une perte de cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral et la formation d'ostéophytes. L'arthrose a longtemps été considérée comme une maladie du cartilage, mais les données récentes de la littérature suggèrent une participation active de l'os dans l'initiation et /ou la progression de cette pathologie. La sclérose osseuse observée chez les patients OA est due à une abondante matrice ostéoïde qui est toutefois hypominéralisée. Le collagène de type I est augmenté *in vivo* dans les tissus osseux OA, et il y a un ratio anormal des chaînes $\alpha 1/\alpha 2$ du collagène de type I dans ce tissu. Les mécanismes responsables de cette matrice ostéoïde anormale ne sont pas connus.

Notre hypothèse de travail est que les ostéoblastes arthrosiques ont une fonction anormale qui perturbe le métabolisme osseux et qu'ils sont responsables de la sclérose osseuse observée *in vivo* chez les patients arthrosiques, mais aussi de la sous-minéralisation de ce tissu. Nos objectifs spécifiques sont de :

- 1) Déterminer les mécanismes responsables de la production anormale de collagène de type I.
- 2) Étudier le rôle des métalloprotéases dans cette formation accrue de collagène.
- 3) Mesurer le potentiel de minéralisation des ostéoblastes arthrosiques *in vitro*.

Méthodologie

Patients et paramètres cliniques

Les plateaux tibiaux provenaient de patients OA ayant subi une chirurgie de remplacement total du genou. Nous avons isolé l'os sous-chondral en retirant le cartilage articulaire et la portion d'os trabéculaire ne faisant pas partie de la plaque de croissance sous-chondrale. Un total de 41 patients (âgés de 70 ± 1.2 ans : 10 mâles, 31 femelles) classifiés OA selon les critères cliniques reconnus par l'American College of Rheumatology (Altman et al., 1986) ont été inclus dans cette étude. Aucun de ces patients n'a reçu de médication qui pourrait interférer avec le métabolisme osseux, incluant des corticostéroïdes, 6 mois avant l'opération. Un total de 16 spécimens osseux de plateau tibial d'individus normaux (âgés de 60 ± 5 ans : 11 mâles, 5 femelles) ont été collectés à l'autopsie moins de 16 heures après la mort. Les individus montrant de la détérioration du cartilage et/ou une sclérose du plateau sous-chondral n'ont pas été inclus dans le groupe normal. Le groupe normal ne comprenait pas de patients avec des pathologies pouvant affecter l'os (ostéoporose, maladie de Paget) ou ayant subi de la chimiothérapie pour des cancers. Tout le matériel humain a été acquis après un accord signé des patients ayant subi la chirurgie ou de la parenté pour les spécimens recueillis à l'autopsie suivant les règlements du comité d'éthique du CHUM.

Préparation des cultures primaires d'ostéoblastes

La partie médiale d'os sous-chondral de plateaux tibiaux a été isolée pour préparer des cultures primaires de cellules osseuses. Le cartilage a d'abord été enlevé du plateau tibial et l'os trabéculaire disséqué de la plaque sous-chondrale. D'un point de vue macroscopique, les spécimens d'os sous-chondral d'individus

normaux étaient plus minces que ceux des patients OA qui présentaient une sclérose évidente. Les échantillons osseux ont été coupés en petits morceaux de 2 mm² avant de subir une digestion séquentielle en présence de 1 mg/ml de collagénase de type I (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) dans du milieu Ham F12/DMEM (Sigma-Aldrich) sans sérum à 37°C pour 30, 30 et 240 minutes. Cette étape permet d'enlever les cellules adhérentes et les cellules résiduelles de la moelle osseuse des morceaux d'os. Après plusieurs lavages avec du milieu Ham F12/DMEM, les morceaux d'os digérés ont été mis en culture dans du milieu Biggers, Gwatkin and Judah (BGJ_b) (Sigma-Aldrich) contenant 20% de sérum fœtal bovin (FBS; Biowhittaker, Walkerville, MD, USA). Ce milieu a été remplacé aux deux jours jusqu'à l'apparition de cellules dans les flasques. À partir de ce moment, le milieu de culture a été remplacé par du BGJ_b contenant 10% FBS jusqu'à confluence des cellules. Le milieu BGJ_b est spécifiquement conçu pour favoriser la croissance cellulaire des ostéoblastes et leur différenciation.

À confluence, les cellules en culture primaire ont subi un seul passage à 25 000 cellules/cm² dans des plaques de 6 puits et ont été cultivées pendant 5 jours dans du milieu Ham F12/DMEM contenant 10% FBS avant d'être testées. Les cellules ont alors été incubées avec ou sans traitements, soit la 1,25(OH)₂D₃ (50nM), la PGE₂ (500nM) ou la PTH (100nM) dans du milieu Ham F12/DMEM contenant 0,5%FBS pour 48 heures. Les surnageants ont été récupérés à la fin de l'incubation et conservés à -80°C jusqu'à l'essai. Les cellules ont été préparées soit pour une séparation sur SDS-PAGE ou des expériences de RT-PCR. Les cellules préparées pour séparation par SDS-PAGE ont été lysées dans du tampon RIPA (Tris HCl 50mM pH 7.4, NaCl 150mM, 1% NP-40, 0,5% Na-deoxicholate et 0,1% SDS avec

les inhibiteurs suivants : 10 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinine, 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptine, 10 $\mu\text{g/ml}$ pepstatine, 10 $\mu\text{g/ml}$ O-phenatroline, 1mM Na-orthovanadate, 1mM DTT) et conservées à -80°C jusqu'à l'essai. Pour les dosages de protéines, la méthode à l'acide bisinchoninic (BCA) a été utilisée (Smith et al., 1985). Les cellules préparées pour l'analyse par RT-PCR ont été lysées dans du TRIzol (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) et la quantification d'ARN a été effectuée selon la procédure RiboGreen en suivant les recommandations du manufacturier (Cederlane, Hornby, Canada).

Caractérisation phénotypique des cultures d'ostéoblastes sous-chondraux humains

Les caractéristiques phénotypiques des cultures d'ostéoblastes obtenues ont été déterminées en évaluant l'activité phosphatase alcaline et la relâche d'ostéocalcine dépendantes de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (50nM). L'activité phosphatase alcaline a été déterminée sur les lysats cellulaires en mesurant l'hydrolyse de son substrat, la p-nitrophénylphosphate (PNPP) incolore en p-nitrophénol coloré jaune et détecté à 405nm. La relâche d'ostéocalcine a été mesurée dans les surnageants par EIA tel que décrit précédemment (Lajeunesse et al., 1991; Lajeunesse et al., 1996).

Transcription reverse et réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) semi-quantitative

Pour la détermination de l'expression du collagène de type I, les ostéoblastes ont été traités avec du Ham F12/DMEM contenant 0,5% FBS pour 48 heures en absence ou en présence de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (50nM), PGE_2 (500nM) ou PTH (100nM).

À la fin de l'incubation, les cellules ont été lavées 2 fois avec une solution saline tamponnée avec phosphate (PBS), pH 7.4, et lysées dans du TRIzol. L'ARN a été extrait par la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987) et 1µg d'ARNm a été utilisé pour l'amplification par RT-PCR telle que décrite précédemment (Hilal et al., 2001). Les produits d'amplification par PCR Coll1a1 et Coll1a2 de 409 paires de base (pb) et 461 pb respectivement ont été générés avec 20 pmoles de chaque amorce. Les amorces pour Coll1a1 sont 5'-AGA GGT TTC AGT GGT TTG GA -3' (sense) et 5'-CCA GGA GCA CCA TTG GCA CC -3' (anti-sense) et celles pour Coll1a2 sont 5'-GGA CAC AAT GGA TTG CAA GG-3' (sense) et 5'-AAC TGG CAA GCA AGG AGA CA-3' (anti-sense). Pour s'assurer de l'équivalence des échantillons, la GAPDH a été amplifiée avec 20 pmole de chaque amorce, 5'- GAG AAC ATC ATC CCT GCC TCT -3' (sense) et 5'- GCT TGA CAA AGT GGT CGT TGA G-3'(anti-sense), générant un produit de 360 pb. Nos résultats préliminaires indiquent qu'avec 25 et 35 cycles, nous nous situons dans la portion linéaire de l'amplification de la GAPDH et de Coll1a1 ou Coll1a2 respectivement, donc c'est avec ce nombre de cycles que l'amplification par PCR a été effectuée. Après amplification, l'ADN a été analysé sur gel d'agarose 1,2% et visualisé par détection U.V. L'analyse densitométrique a été effectuée avec un ChemiImager 4000 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA). Les résultats sont présentés en tant qu'expression relative de Coll1a1 ou Coll1a2 normalisé avec le gène ubiquitaire GAPDH.

PCR-quantitatif

La quantification en temps réel de l'ARNm de Coll1a1, Coll1a2 et GAPDH a été effectuée dans le GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied

Biosystems, Foster City, CA) avec le 2X Quantitect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. En bref, 200ng de cDNA obtenu de la RT ont été amplifiés dans un volume total de 50ul comprenant le Master Mix 1X, l'uracil-N-glycosylase (UNG, 0.5 unité) (Epicentre Technologies, Madison, WI) et les amorces spécifiques aux gènes décrits ci-haut à une concentration finale de 200 nM. Les tubes ont d'abord été incubés pour 2 minutes à 50°C (réaction de UNG), ensuite à 95°C pour 15 minutes (inactivation d'UNG et activation de la polymérase) suivi de 40 cycles consistant chacun aux étapes de dénaturation (94°C, 15 secondes), d'hybridation (60°C, 30 secondes), d'extension des brins (72°C, 30 secondes) et d'enregistrement des données (77°C, 15 secondes). Les données ont été collectées et traitées avec le GeneAmp 5700 SDS software et rapportées en « threshold cycle » (Ct), correspondant au cycle de PCR auquel on peut détecter pour la première fois une augmentation dans la fluorescence supérieure à la ligne de base du signal. Les ADN de plasmides contenant les séquences des gènes cibles ont été utilisés pour générer les courbes standards. Lorsque l'on compare les niveaux d'expressions de base pour les normaux et les OA, les Ct ont été convertis en nombre de molécules et la valeur pour chaque échantillon a été calculée en ratio du nombre de molécules du gène cible/ nombre de molécule de GAPDH.

Immunotransfert Western du collagène et des collagénases

Les extraits cellulaires ont été chargés (20µg/puits) sur gel de polyacrylamide 7.5% et séparés par électrophorèse de protéines en gel de polyacrylamide contenant du SDS (SDS-PAGE) en conditions dénaturantes à 200 volts pendant 60 minutes suivant la méthode de Sambrook *et al* (1989). Le chargement des protéines a été

ajusté selon la concentration cellulaire en protéine de chaque spécimen. Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de polyvinylidène difluoride (PDVF) (Boehringer Mannheim, Penzberg, Germany) à 150 volts pendant 75 minutes. Après avoir été bloquées dans du lait écrémé 5% dans TTBS (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0,1% Tween® 20, pH 7.6) et lavées, les membranes ont été séquentiellement incubées 16 heures à 4°C avec un anticorps primaires, lavées, puis incubées avec un anticorps secondaire lié une peroxidase (horseradish-peroxidase). La détection de bandes a été visualisée avec le kit ECL-plus (Pierce) selon les directives du manufacturier. Une variété d'anticorps primaires a été utilisée : rabbit anti-human collagen type I (dilution 1 :7 500, Biodesign), mouse anti human MT1-MMP (dilution 1 :1000, Oncogene), mouse anti-human MT2-MMP (dilution 1 :1000, Oncogene) et rabbit anti-actin (dilution 1 :15 000, Sigma); et d'anticorps secondaires : Goat anti-mouse IgG dilution 1 : 100 000 de Pierce (Rockfort, IL); Rabbit anti-sheep IgG (dilution 1 :50 000) et Goat anti-rabbit IgG (dilution 1 :20 000) de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Les analyses de densitométrie ont été effectuées avec un ChemiImager 4000.

Détermination de la synthèse du collagène

La synthèse de collagène a été déterminée par la relâche *de novo* du fragment peptidique carboxy-terminal (CICP) de la molécule de collagène de type I qui n'est pas métabolisé (Parfitt et al., 1987) ce qui reflète la synthèse réelle du collagène. Le CICP a été mesuré dans les surnageants de culture de cellules N et OA à confluence à l'aide d'un ELISA (Quidel corporation, Cederlane, Hornby, Ontario) très sélectif. La relâche de CICP a alors été ramenée en ng de CICP par mg protéines cellulaires.

Détermination de l'activité métalloprotéase par zymographie

Les expériences de zymographie ont été effectuées en suivant la procédure générale décrite par Roche *et al* (1983). L'activité des MMPs a été directement mesurée sur gel d'électrophorèse contenant de la gélatine. Les MMP digèrent la gélatine contenue dans le gel, donc après la coloration du gel au Bleu de Coomassie, des bandes claires sur fond bleu peuvent être détectées sur le gel et indiquer l'activité MMP.

Brièvement, les surnageants de culture d'Ob (0.4µg de protéines/puit pour la MMP-2 et 10µg de protéines/puit pour la MMP-9) ont subi une électrophorèse dans des conditions non-dénaturantes dans un gel 7,5% polyacrylamide (SDS) contenant 2mg/ml de gélatine (Sigma). Après avoir coulé un gel de concentration 5%, les échantillons ont été chargés et le gel a migré 150 minutes à un voltage constant de 100 volts. Les gels ont été lavés trois fois dans du Triton X-100 2.5% pour 20 minutes et incubés 20 heures à 37°C dans un tampon d'incubation (50mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 0,05% Brij35 à pH 7.4). Les gels ont alors été colorés par Bleu de Coomassie 0,25% pour 45 minutes et décolorés pendant 4 heures dans une solution 30% méthanol/10% acide acétique. Des bandes claires (blanches) sur fond bleu indiquent l'activité MMP et l'intensité des bandes a été mesurée par densitométrie. Des MMPs recombinantes ont migré en parallèle afin d'évaluer les poids moléculaires des formes natives et actives des MMP étudiées (MMP-2 et MMP-9 proviennent de Pfizer, Groton, CT, USA).

Essai de minéralisation de cultures primaires d'ostéoblastes par coloration au Von Kossa

Pour mesurer la minéralisation des cas OA et N de façon relative, les cellules ayant subi un seul passage ont été amenées à pousser pendant 30 jours dans du BJB₆ contenant 10% FBS, de l'acide ascorbique (0,05g/L) et du β -glycérophosphate (1mM) en présence ou en absence de BMP-2 (50 μ g/ml). Au jour établi, les cellules ont d'abord été fixées avec de la formaline 10% dans du PBS pour 30 minutes. Les cellules ont alors été colorées au nitrate d'argent 3% dans le noir pendant 10 minutes, puis la coloration a été développée dans une solution 5% sodium carbonate et 25% formaline pour 1 heure. Finalement, les cellules ont été fixées dans 5% sodium thiosulfate puis photographiées dans leur pétri.

Analyses statistiques

Toutes les données quantitatives sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les données ont été analysées par le test t de Student et les valeurs $p < 0.05$ ont été considérées statistiquement significatives.

Résultats

Expression du collagène de type I

Nous avons tout d'abord évalué si nos amorces étaient spécifiques pour le collagène de type I et les deux chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Nous avons observé une seule bande à la détection démontrant la spécificité des amorces. Nous avons aussi démontré que nous pouvions obtenir des résultats en utilisant 35 cycles pour les Ob normaux et 32 cycles pour les Ob OA (non illustré). Nous avons ensuite évalué le niveau d'expression d'ARNm de Coll1a1 et Coll1a2 dans les ostéoblastes normaux et OA. Tel qu'illustré à la figure 1, nous avons observé une légère augmentation de l'expression des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type I dans les ostéoblastes OA par rapport aux normaux au niveau basal : l'ARNm est augmenté de $19.8 \pm 8.6\%$ pour Coll1a1 et de $16.3 \pm 7\%$ pour Coll1a2. Par PCR en temps réel (figure 2), nous avons obtenu un niveau d'expression de Coll1a1/GAPDH de 31.4 ± 12.8 pour les Ob normaux et 107.3 ± 11.6 pour les OA. Par ailleurs, les niveaux Coll1a2/GAPDH étaient de 11.3 ± 2.3 pour les Ob normaux et 14.9 ± 1.6 pour les OA. Donc, les analyses par RT-PCR quantitatif révèlent un ratio des chaînes $\alpha 1 : \alpha 2$ de $2.5 \pm 0.6 : 1$ pour les normaux et de $7.2 \pm 0.2 : 1$ pour les OA ce qui est en accord avec les observations de Bailey et al. (2002).

De plus, la régulation de Coll1 $\alpha 1$ et Coll1 $\alpha 2$ était perturbée dans les Ob OA par rapport aux normaux. Tandis que les Ob normaux répondaient fortement à la stimulation par le PGE₂ et la PTH, les Ob OA réagissaient beaucoup moins. En effet, l'expression de Coll1a1 était réduite de $27 \pm 20\%$ et de $39.5 \pm 7.5\%$ en réponse au PGE₂ et à la PTH respectivement dans les Ob normaux alors que cette inhibition était de seulement $13.7 \pm 3.0\%$ et de $7.5 \pm 6.0\%$ pour les Ob OA (figure 3). De

même, l'expression de Coll1a2 était inhibée de $32.7 \pm 4.3\%$ et $42.7 \pm 12.9\%$ dans les Ob normaux, mais seulement de $13.4 \pm 3.5\%$ et $17 \pm 2.9\%$ dans les Ob OA en réponse à PGE₂ et PTH (figure 4). Cependant, l'expression des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ dans les Ob OA n'était pas perturbée par la vitamine D₃ chez ces patients. La production de collagène est restreinte aux types I et III dans nos cellules OA et normales puisque nous avons aussi observé des niveaux très faibles de collagène de type III. Par ailleurs, des études précédentes ont déjà démontré que les Ob OA et normaux préparés dans ces mêmes conditions de culture n'exprimaient pas de collagène de type II (Massicotte et al., 2002).

Production du collagène de type I

Comme les niveaux d'expression d'ARNm de Coll1a1 et Coll1a2 étaient augmentés dans les Ob OA en condition basale, nous avons ensuite évalué si la synthèse *de novo* du collagène de type I était altérée dans les ostéoblastes OA. Pour ce faire, nous avons mesuré la relâche du pro-peptide carboxy-terminal du collagène de type I (CICP) par les ostéoblastes OA et normaux. Nous avons observé (figure 5) que les Ob OA synthétisaient beaucoup plus de collagène de type I que les normaux : $42 \pm 7\%$ ($p < 0.01$). Nous avons ensuite évalué si la forme mature du collagène de type I était aussi augmentée dans les Ob OA en mesurant la production de collagène par immunobuvardage (western blot). De ce fait, sous des conditions dénaturantes, le collagène de type I, visualisé en tant que doublet de 180 et 150kDa (chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ respectivement), était augmenté de $34.7 \pm 4.7\%$ et $25.9 \pm 4.0\%$ respectivement dans les Ob OA comparativement aux normaux (figure 6).

Production et activité des métalloprotéases matricielles

Comme l'activité anabolique des Ob OA était augmentée par rapport aux normaux, nous avons alors évalué si le catabolisme était altéré dans ces cellules. Nous avons évalué le potentiel catabolique de ces cellules en mesurant MT1-MMP et MT2-MMP par Western blot et l'activité MMP-2 et MMP-9 par zymographie. Les Ob OA et normaux produisaient un niveau similaire de MT1-MMP et MT2-MMP (figure 7). Néanmoins, l'activité des MMP-2 et -9 était augmentée de $28 \pm 9.4\%$ et $52.9 \pm 11.8\%$ respectivement par rapport à celles des Ob normaux (figure 8).

Potentiel de minéralisation *in vitro*

In vivo, la minéralisation osseuse est réduite chez les patients OA (Li et Aspden, 1997; Grynepas et al, 1991), mais nous ne savons pas s'il s'agit d'une défectuosité cellulaire, d'un problème de régulation systémique ou des deux. Nous avons donc tâché de déterminer si l'hypothèse d'un défaut cellulaire était possible en mesurant la minéralisation *in vitro* par la coloration Von Kossa des Ob OA et normaux après 30 jours de culture (phase de minéralisation). Tel qu'indiqué à la figure 9A, les Ob normaux montraient une coloration intense qui fait contraste à la situation observée dans les Ob OA, indiquant ainsi que le potentiel de minéralisation des Ob OA est diminué *in vitro*. De plus, en présence de la « bone morphogenetic protein-2 » (BMP-2), protéine favorisant la minéralisation, la minéralisation des Ob normaux était fortement stimulée. Par contre, les Ob OA n'ont que peu répondu *in vitro* à la BMP-2 dans les mêmes conditions (figure 9B).

LÉGENDES DES FIGURES

Figure 1 : Niveau basal d'ARNm des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type I dans les ostéoblastes OA et normaux de l'os sous-chondral humain. **A)** Évaluation de l'expression d'ARNm des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type I dans les ostéoblastes normaux et OA. Un RT-PCR semi-quantitatif avec des amorces spécifiques à chacune des chaînes du collagène de type I et à la GAPDH a été effectué avec 1 μ g par puits d'ARN d'ostéoblastes OA et normaux. **B)** Représentation graphique des résultats obtenus en (A). Les résultats sont la moyenne \pm SEM de 5 individus normaux et 10 patients OA.

Figure 2 : Ratio de l'ARNm des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type I sur la GAPDH dans les ostéoblastes OA et normaux en situation basale. L'expression d'ARNm des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type I a été évaluée par RT-PCR quantitatif avec des amorces spécifiques à chacune des chaînes du collagène de type I et à la GAPDH. 200ng d'ARN par puits ont été utilisés. Le ratio des chaînes $\alpha 1$: $\alpha 2$ est de 2.5 ± 0.6 :1 pour les normaux et de 7.2 ± 0.2 :1 pour les OA. Les résultats sont la moyenne \pm SEM de 3 individus normaux et de 5 patients OA.

Figure 3 : Régulation de l'expression d'ARNm de Coll1a1 dans les ostéoblaste OA et normaux. Des ostéoblastes humains à confluence ont été incubés avec ou sans traitement, soit à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (50nM), le PGE_2 (500nM) ou la PTH (100nM) dans du milieu Ham F12/DMEM contenant 0,5%FBS pour 48 heures. **A)** Évaluation de

l'expression d'ARNm de la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type I dans les ostéoblastes normaux et OA par RT-PCR semi-quantitatif avec des amorces spécifiques à Coll1a1 et à la GAPDH. **B)** Représentation graphique des résultats en (A). Les résultats sont exprimés en % du contrôle et sont la moyenne \pm SEM de 2 individus normaux et 10 patients OA.

Figure 4 : Régulation de l'expression d'ARNm de Coll1a2 dans les ostéoblastes OA et normaux. Des ostéoblastes humains à confluence ont été incubés avec ou sans traitement, soit à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (50nM), le PGE_2 (500nM) ou la PTH (100nM) dans du milieu Ham F12/DMEM contenant 0,5%FBS pour 48 heures. **A)** Évaluation de l'expression d'ARNm de la chaîne $\alpha 2$ du collagène de type I dans les ostéoblastes normaux et OA par RT-PCR semi-quantitatif avec des amorces spécifiques à Coll1a2 et à la GAPDH. **B)** Représentation graphique des résultats en (A). Les résultats sont exprimés en % du contrôle et sont la moyenne \pm SEM de 3 individus normaux et 10 patients OA.

Figure 5 : Synthèse *de novo* du collagène de type I. Des ostéoblastes humains OA et normaux mis en culture jusqu'à confluence dans du milieu Ham F12/DMEM contenant 10% FBS ont ensuite été incubés dans du milieu Ham F12/DMEM contenant 0,5%FBS pour 48 heures. Les surnageants ont été récupérés et la relâche du pro-peptide carboxy-terminal du collagène de type I (CICP) a été mesurée avec un ELISA sélectif. Les résultats sont la moyenne \pm SEM de 6 individus normaux et 21 patients OA.

Figure 6 : Analyse par western blot de la production de collagène de type I mature par les ostéoblastes OA et normaux. Les cellules à confluence ont été lysées et séparées par électrophorèse SDS-PAGE. L'usage d'un anticorps primaire polyclonal et d'un anticorps secondaire lié à la peroxydase a permis de visualiser deux bandes représentant les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type I à 180kDa et 150kDa respectivement. L'actine a été révélée après « stripping » (lavages) de cette même membrane. Ces données sont représentatives de 3 expériences individuelles et les résultats sont la moyenne \pm SEM de chaque bande individuelle rapportée sur son actine (normaux, n = 5 et OA, n = 15).

Figure 7 : Analyse par western blot du niveau de MT1-MMP et MT2-MMP exprimé à la surface cellulaire d'Ob OA et normaux. Les cellules à confluence ont été lysées et séparées par électrophorèse SDS-PAGE. **A)** Représentation du western blot pour la MT1-MMP. **B)** Représentation du western blot pour la MT2-MMP. Ces données sont représentatives de 3 expériences individuelles et les résultats sont la moyenne \pm SEM de chaque bande individuelle rapportée sur son actine (normaux, n = 6 et OA, n = 14).

Figure 8 : Zymographie de la MMP-2 et la MMP-9. Des ostéoblastes humains OA et normaux mis en culture jusqu'à confluence dans du milieu Ham F12/DMEM contenant 10% FBS ont ensuite été incubés dans du milieu Ham F12/DMEM contenant 0,5%FBS pour 48 heures. Les surnageants ont été récupérés et des

volumes correspondant à 0.4 μ g de protéines/puits pour la MMP-2 et à 10 μ g de protéines/puits pour la MMP-9 ont été séparés par électrophorèse dans des conditions non-dénaturantes. En parallèle, un western blot a été effectué avec les lysats cellulaires correspondant à chacun de ces surnageants pour révéler l'actine. Ces données sont représentatives de 3 expériences individuelles et les résultats sont la moyenne \pm SEM de chaque bande individuelle de la zymographie rapportée sur son actine correspondante (normaux, n= 6 et OA, n= 16).

Figure 9 : Minéralisation *in vitro* des ostéoblastes humains OA et normaux mesurée par coloration Von Kossa. Les ostéoblastes humains OA et normaux ont étéensemencés dans des pétris de 35mm à 25 000 cellules/cm². Les cellules ont ensuite été incubées dans du milieu BGJ_b contenant 10% FBS, de l'acide ascorbique (0,05g/L) et du β -glycérophosphate (1mM) pour 30 jours. L'essai de minéralisation par coloration Von Kossa a été effectué au jour 30 avec une solution de nitrate d'argent 3%. **A)** Représentation de 3 cas OA et 3 individus normaux. L'analyse macroscopique nous permet de voir une diminution du potentiel de minéralisation des ostéoblastes OA par rapport aux normaux. **B)** Effet d'une stimulation à la BMP-2. Les ostéoblastes normaux répondent à la BMP-2 par une très forte stimulation de la minéralisation. Par contre, les cellules OA répondent beaucoup moins à la BMP-2.

Figure 1. Niveau basal d'ARNm des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type I dans les ostéoblastes normaux et OA.

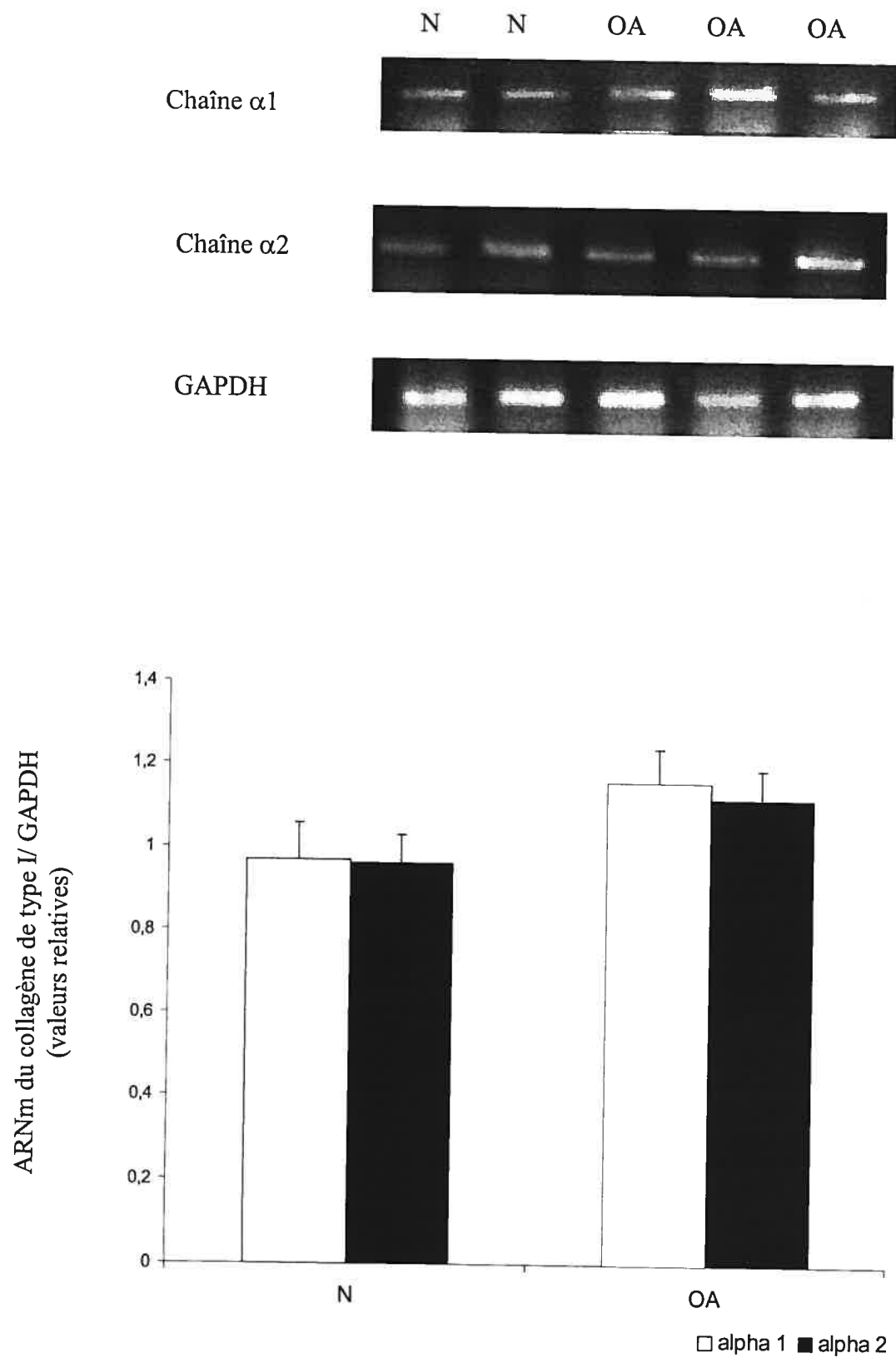


Figure 2. PCR en temps réel : Ratio des chaînes α du collagène de type I sur leur GAPDH

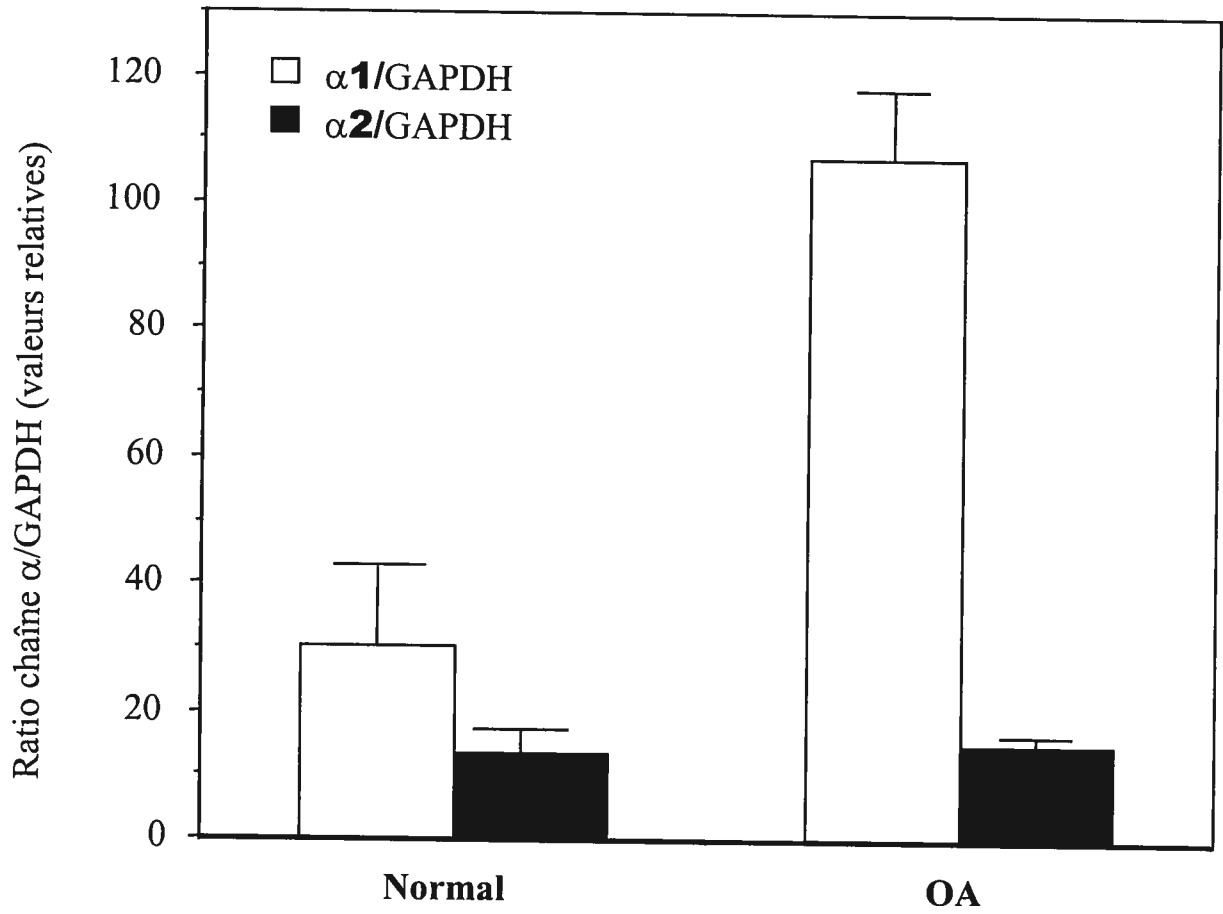


Figure 3. Régulation de l'expression d'ARNm de la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type I dans les ostéoblastes normaux et OA.

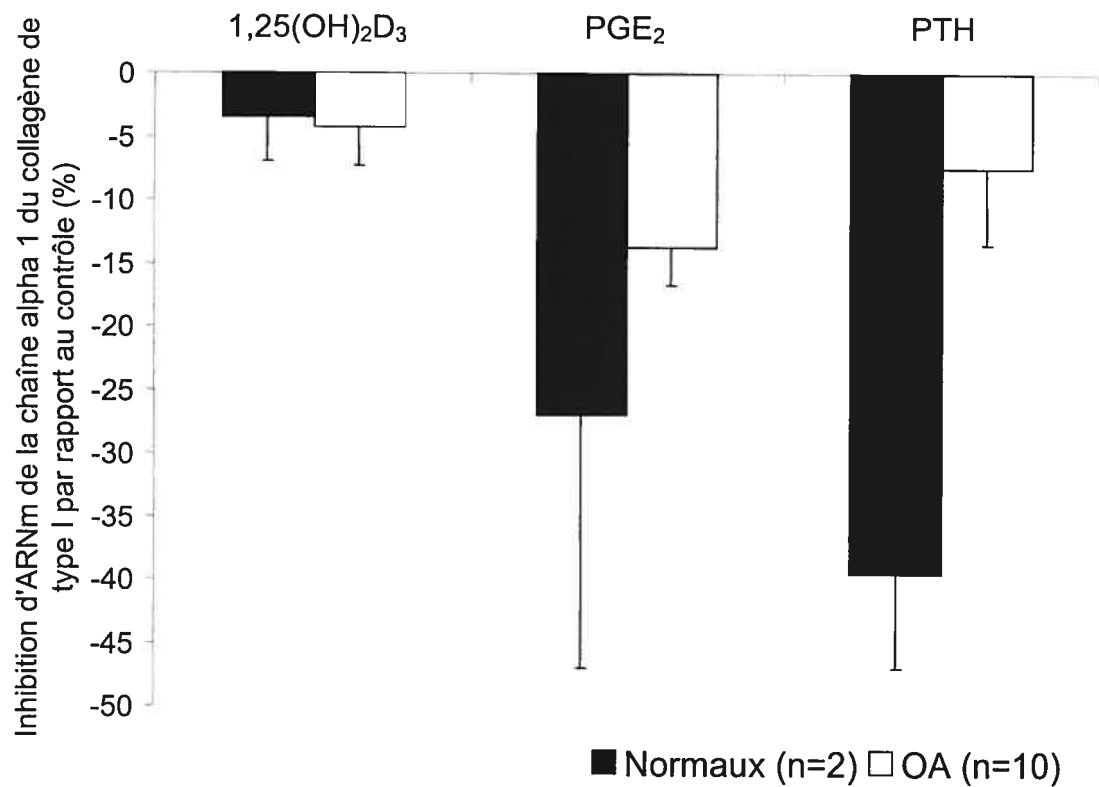
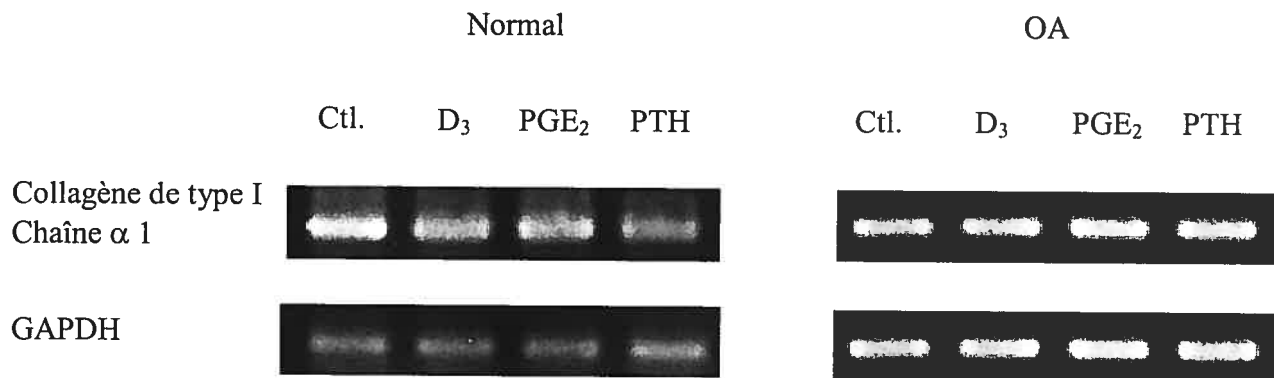


Figure 4. Régulation de l'expression d'ARNm de la chaîne $\alpha 2$ du collagène de type I dans les ostéoblastes normaux et OA.

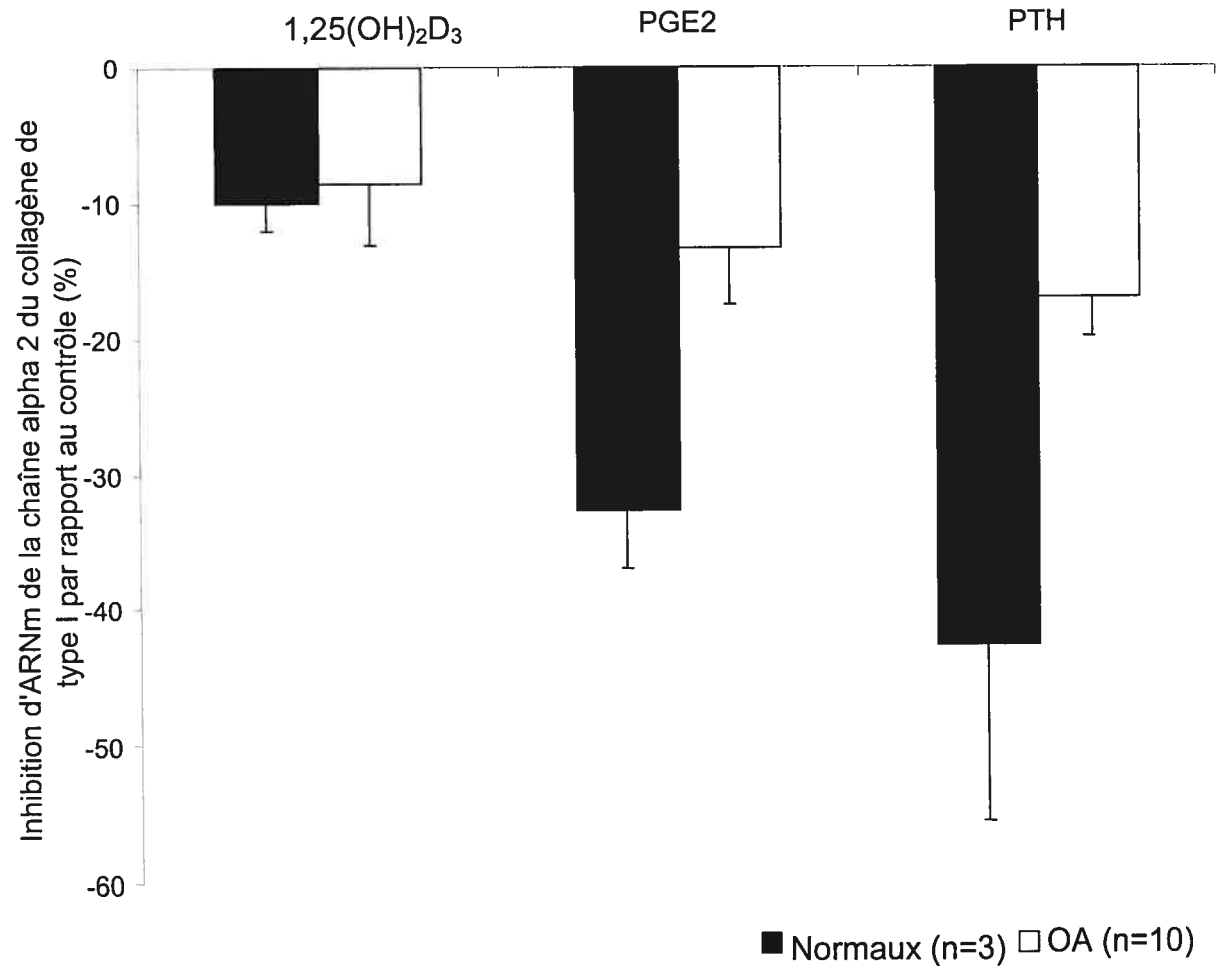
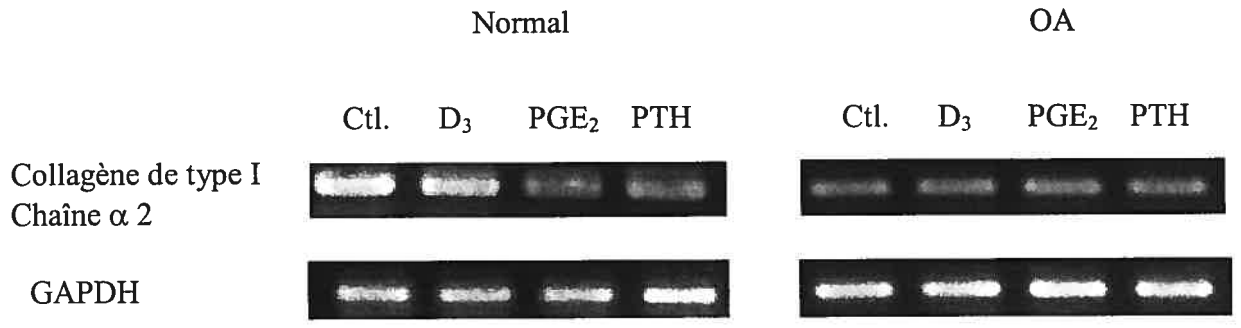


Figure 5. Relâche du pro-peptide CICP par les ostéoblastes normaux et OA

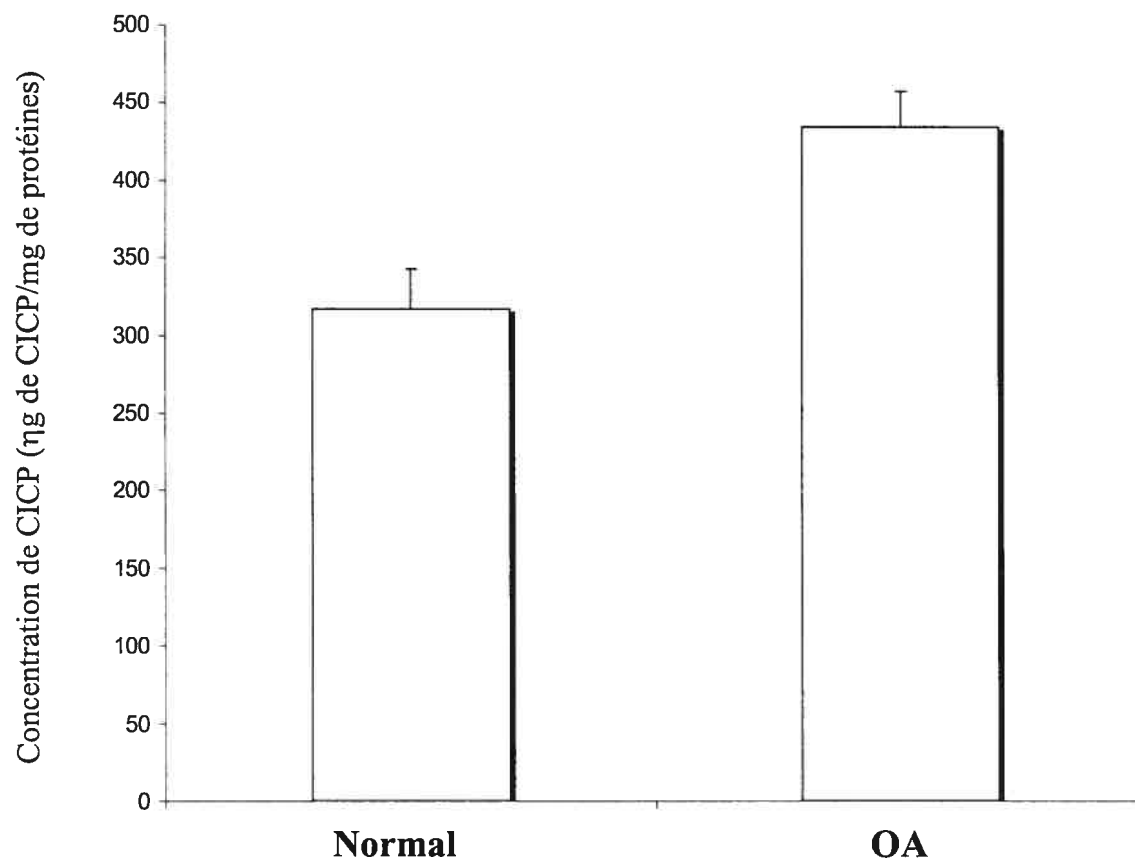


Figure 6. Western blot du collagène de type I produit par les ostéoblastes normaux et OA

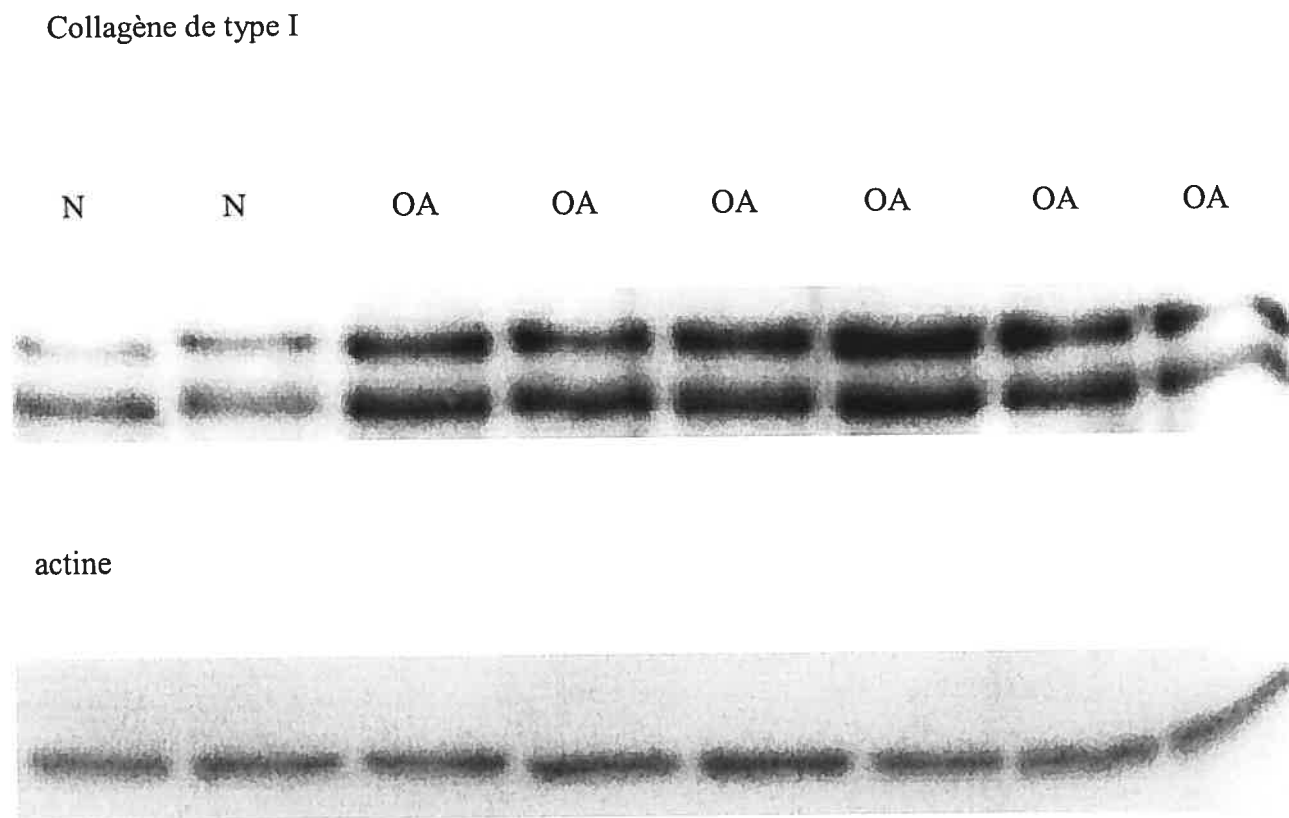
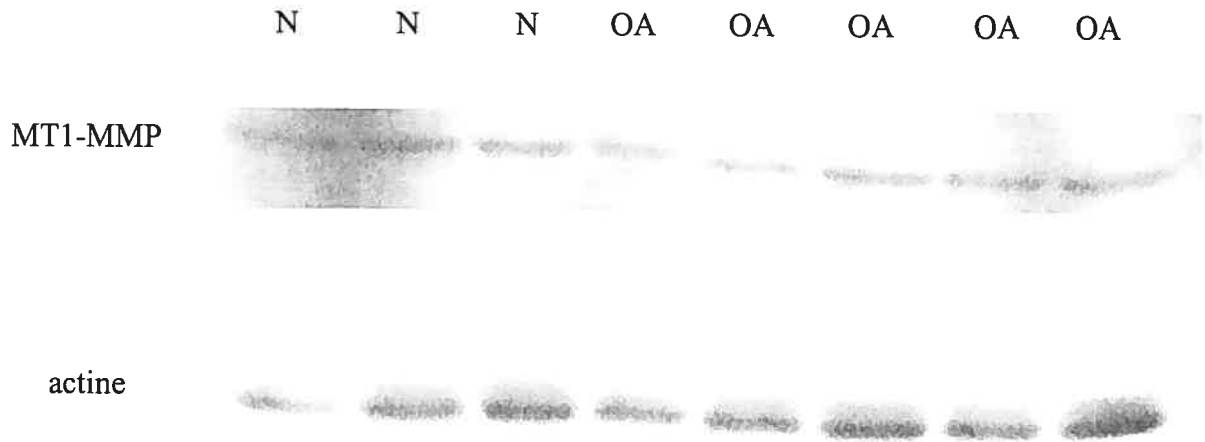


Figure 7. Western blot du niveau de MT-MMP exprimées à la surfaces des ostéoblastes

a)



b)

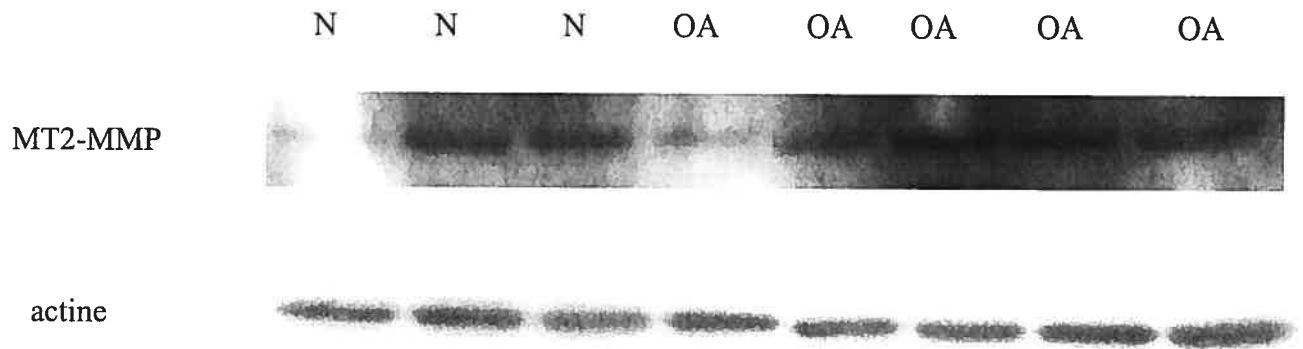
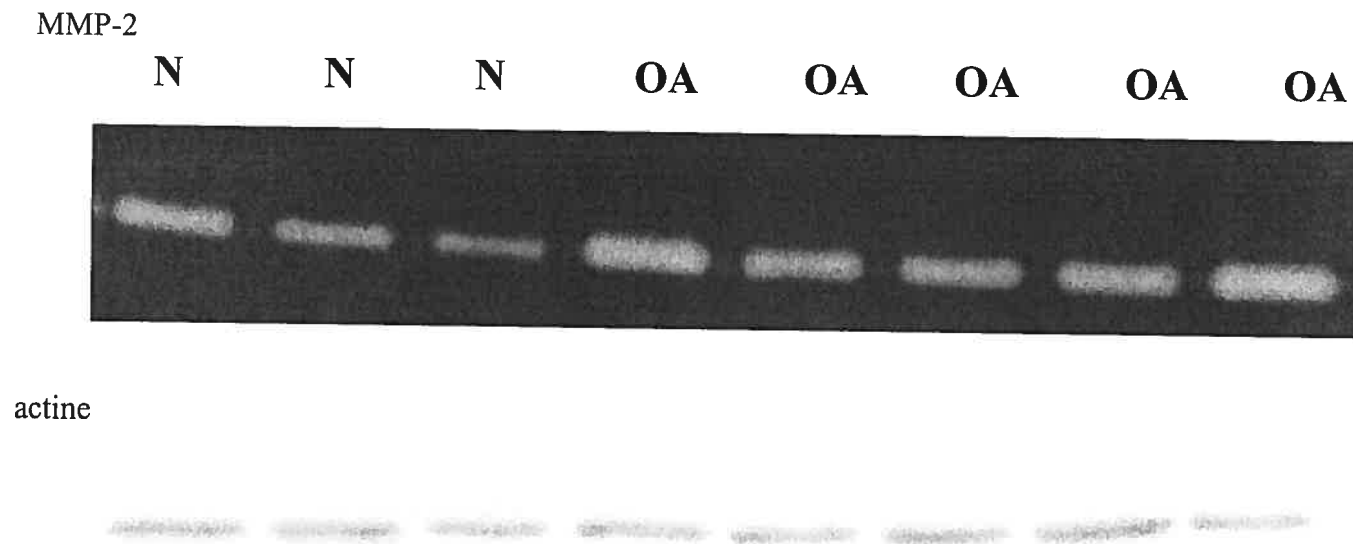


Figure 8. Zymographie des MMP-2 et -9 dans les surnageants d'ostéoblastes.

a) Zymographie MMP-2



b) Zymographie MMP-9

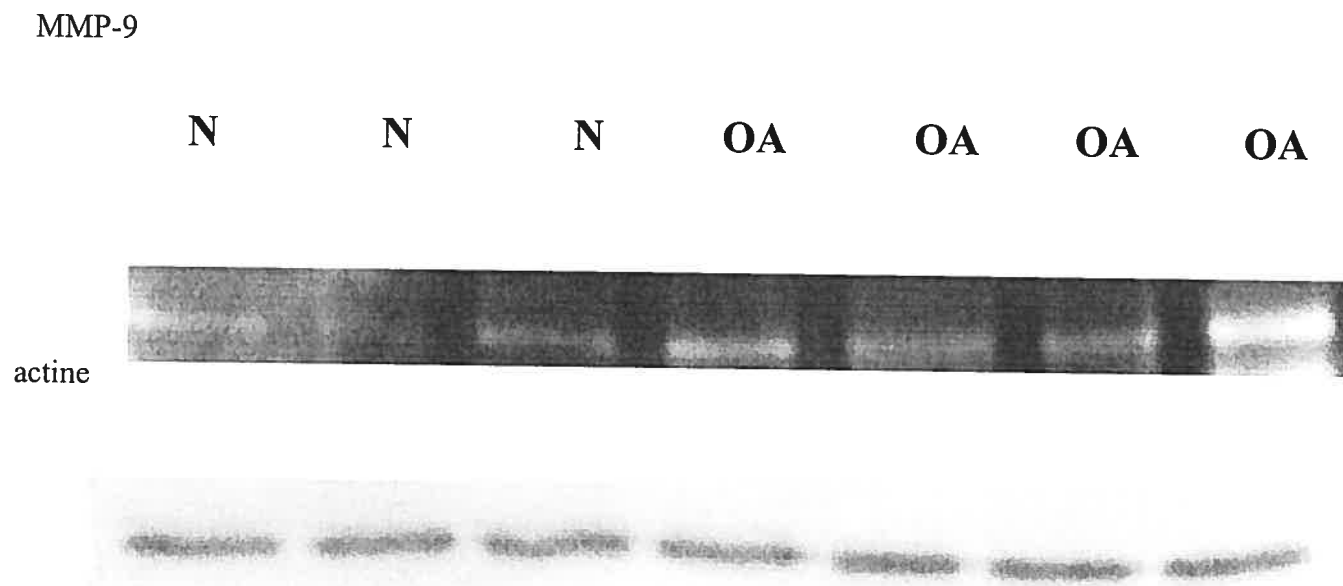
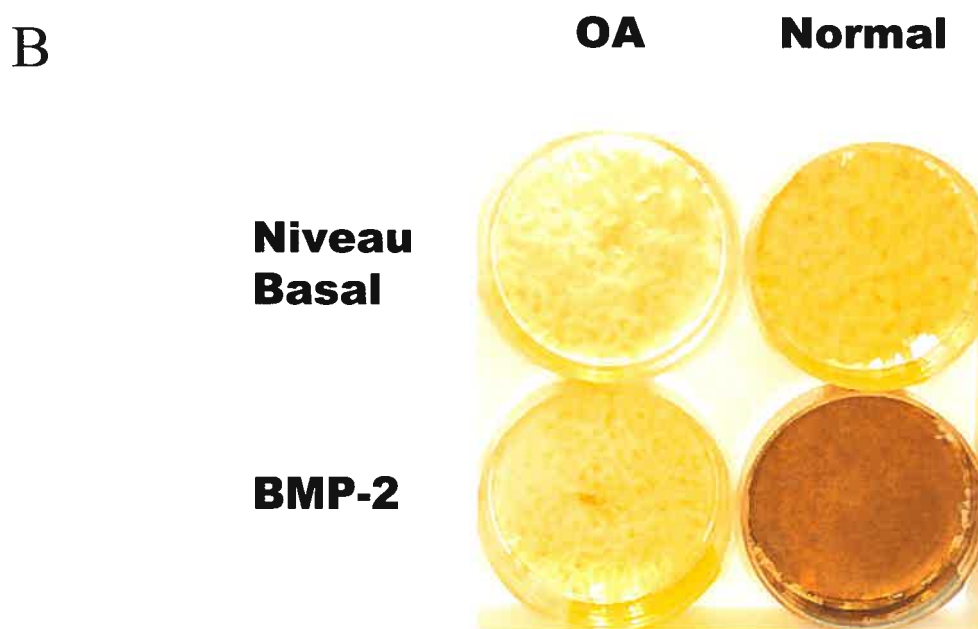


Figure 9. Minéralisation *in vitro* d'ostéoblastes normaux et OA : effet de BMP-2



Discussion/Conclusion

L'arthrose est une pathologie dégénérative conduisant à des dommages permanents aux articulations et à la perte de la flexibilité et de la mobilité. C'est la cause la plus commune d'invalidité grave au Canada et aux États-Unis. Plus de la moitié des personnes âgées de 50 ans et plus en sont affectées et on en ressent les répercussions autant au niveau de la qualité de vie qu'au niveau de l'économie (Sangha, 2003).

On a longtemps pensé que l'arthrose était une maladie du cartilage puisque celui-ci se dégrade complètement au fur et à mesure que la maladie progresse. Toutefois, des changements tout aussi importants surviennent dans le tissu osseux, notamment la formation d'ostéophytes et la sclérose de l'os sous-chondral. L'implication du tissu osseux dans l'initiation et/ou la progression de la maladie est maintenant acceptée, mais les mécanismes impliqués dans la relation os-cartilage demeurent méconnus. Il a été démontré, autant par des études sur des modèles animaux que chez les humains, que le tissu osseux est altéré dans l'articulation arthrosique même à des sites ne subissant pas de fortes contraintes mécaniques ce qui limiterait l'impact de cet aspect sur la progression de la maladie. En outre, la croyance que les patients OA présentant une densité minérale osseuse (BMD) élevée comparée à des individus du même âge protégerait ceux-ci contre l'ostéoporose et/ou des fractures doit être révisée. En effet, les travaux récents montrent que quoique le tissu osseux OA soit sclérosé, ceci est dû principalement à une abondante matrice ostéoïde dont la minéralisation est anormale et insuffisante (Li et Aspden, 1997). Notre hypothèse de travail était que les ostéoblastes

arthrosiques ont une fonction anormale qui perturbe le métabolisme osseux et qu'ils sont responsables de la sclérose osseuse et de la sous-minéralisation observées *in vivo* chez les patients arthrosiques.

Une production accrue de collagène de type I

Nos résultats de RT-PCR semi-quantitatif montrent que l'ARNm des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type I est augmenté de près de 20% dans les ostéoblastes OA provenant de l'os sous-chondral en situation basale. Les mesures prises par PCR semi-quantitatif représentent une tendance générale, mais sont moins précises que celles prises par PCR-quantitatif. Nos résultats de RT-PCR quantitatif indiquent que l'expression de la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type I est augmentée de 3.4 fois dans les ostéoblastes OA alors que celle de la chaîne $\alpha 2$ est augmentée de 1.3 fois. Ceci explique le déséquilibre noté par Bailey et al. (2002) dans le ratio des chaînes $\alpha 1/\alpha 2$ chez les patients OA. D'ailleurs, en réponse à des stimuli physiologiques par PGE_2 et PTH qui *in vivo* inhibent leur expression, *Coll1a1* et *Coll1a2* étaient moins affectés dans les ostéoblastes OA comparativement aux normaux, une situation qui contribue à maintenir des niveaux de collagène de type I encore plus élevés que dans les ostéoblastes normaux. Néanmoins, pour *Coll1a1*, une expérience reste à faire avec des cas normaux pour s'assurer que les données soient statistiquement significatives (figure 3). L'expression du collagène de type I dans les ostéoblastes OA était donc augmentée au niveau basal et répond moins bien à l'inhibition par des stimuli exogènes. En outre, la synthèse du collagène de type I, mesurée par la relâche du pro-peptide, est

augmentée de plus de 40% dans les ostéoblastes OA. Ceci fut vérifié par la mesure des niveaux de la protéine mature, mesurée par western blot, qui indique un niveau plus élevé de collagène de type I dans les ostéoblastes OA. Il est donc évident que les ostéoblastes de l'os sous-chondral OA produisent beaucoup plus de collagène de type I que les normaux, situation qui est en accord avec le dépôt accru de collagène de type I observé *in vivo*.

Minéralisation anormale de la matrice osseuse arthrosique

Malgré qu'elle soit plus abondante, cette matrice de collagène ne semble pas être minéralisée adéquatement *in vivo* (Grynpas et al., 1991), une situation que nous avons aussi observée *in vitro*. Cette diminution de la minéralisation observée *in vitro* sans aucune stimulation indique qu'un défaut cellulaire serait responsable de ce dépôt minéral anormal. Notons qu'un défaut cellulaire a déjà été découvert dans ces ostéoblastes OA par notre laboratoire. Ainsi, les ostéoblastes OA montrent une diminution de la production d'AMPc en réponse à la PTH et au PGE₂ et une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline (ALPase) et de la relâche d'ostéocalcine au niveau basal et en réponse à la 1,25(OH)₂D₃. Les niveaux de base de l'uPA et d'IGF-1 sont aussi augmentés (Hilal et al., 1998 et 2001).

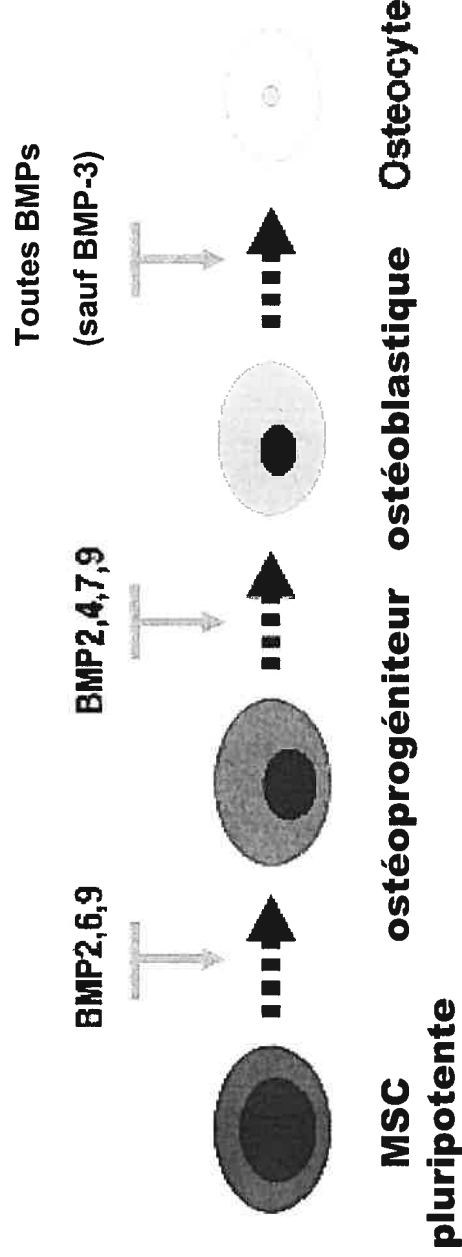
Néanmoins, nous pourrions aussi expliquer le patron de minéralisation anormalement bas observé ici (figure 9A) par la structure de la matrice du collagène de type I. En effet, une structure anormale en collagène pourrait conduire à une minéralisation altérée puisque seulement les fibrilles de collagènes de type I natives peuvent être minéralisées correctement. Le collagène de type I est composé d'un

hétérotrimère de chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ dans un ratio $\alpha 1 : \alpha 2$ de 2.4 : 1 dans l'os normal. Le groupe de Bailey a démontré en utilisant des explants d'os OA que ce ratio variait de 4 :1 à 17 :1 formant ainsi un homotrimère de chaînes $\alpha 1$ avec des propriétés mécaniques différentes (Bailey et al., 2002). Des analyses par RT-PCR quantitatif nous ont permis d'arriver à la même conclusion puisque nous observons un ratio moyen de 7.2 :1 de l'ARNm des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type I dans les ostéoblastes OA. Ceci implique alors que les ostéoblastes OA ont une expression altérée du collagène de type I qui favorise l'expression de la chaîne $\alpha 1$, une situation inadéquate pour une minéralisation optimale. Ces observations indiquent donc que : 1) le modèle cellulaire *in vitro* utilisé ici reproduit fidèlement la situation *in vivo*, 2) ce sont les ostéoblastes OA qui ont un défaut majeur et 3) le défaut de minéralisation n'est pas du à une aberration du contrôle systémique du métabolisme osseux.

Réponse altérée des ostéoblastes OA à la BMP-2

Les « bone morphogenetic proteins » (BMP), membres de la superfamille des TGF- β , jouent un rôle important dans le développement du squelette et la formation osseuse. Les BMPs initient la transduction de leur signal en liant leur récepteur à activité sérine-thréonine kinase trans-membranaire. Il s'agit d'un complexe hétérodimérique formé des BMPR (récepteur BMP) de type I et type II. Les kinases des récepteurs ainsi activées phosphorylent spécifiquement les Smad 1, 5 et 8 qui forment alors un complexe avec Smad 4 dans le noyau et stimulent l'expression de gènes cibles. BMP-2 est considéré comme un pilier de

Hiérarchie ostéogénique des BMP



Adapté de Cheng et al., 2003

Figure 13. Les BMP-2, 6 et 9 jouent un rôle primordial dans la différenciation ostéoblastique des cellules souches mésenchymales (MSC) ainsi que dans la minéralisation osseuse.

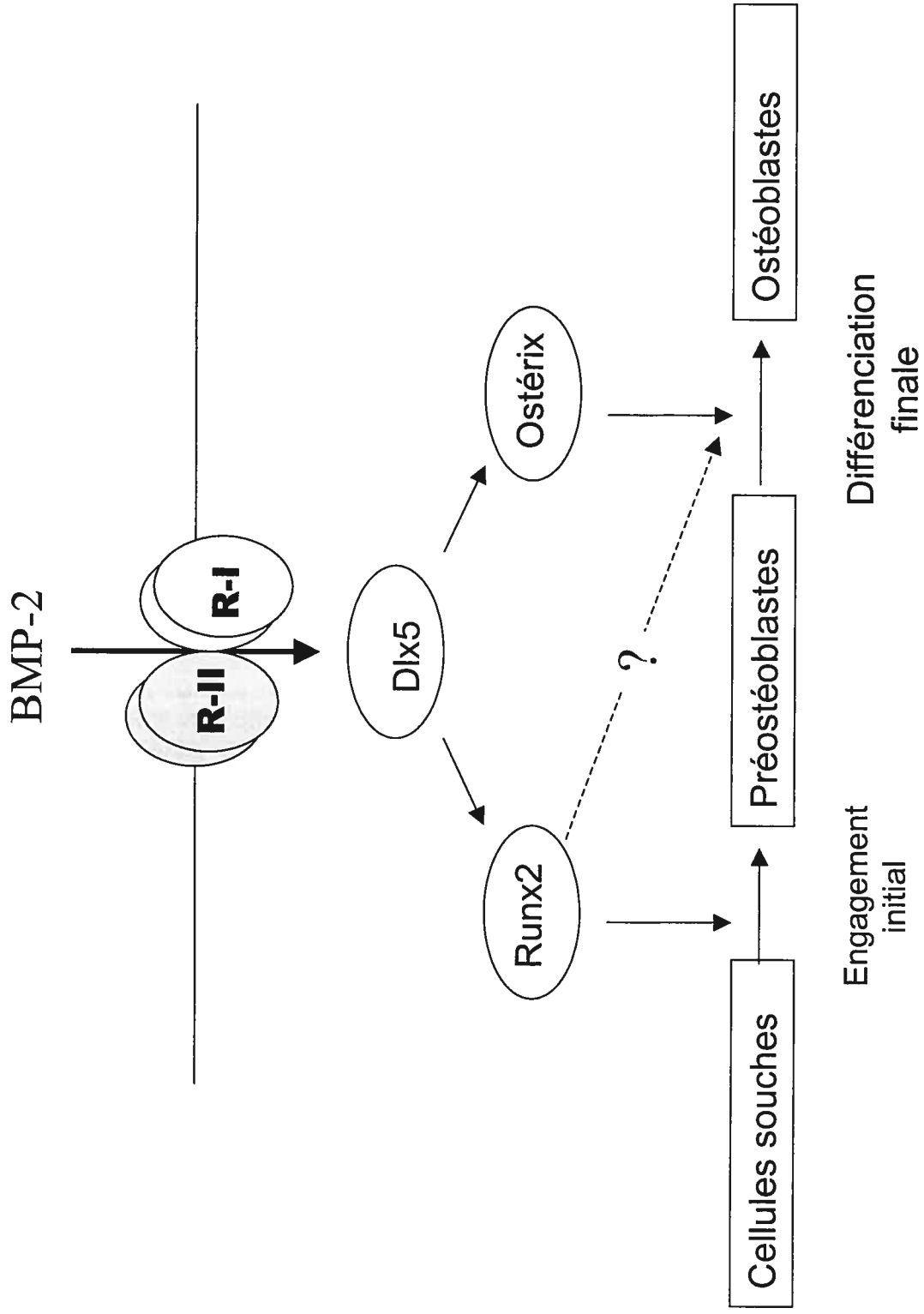


Figure 14. Facteurs de transcription clés dans la différenciation ostéoblastique

l'ostéogénèse puisqu'il stimule l'expression de gènes marqueurs autant précoces que tardifs dans la différenciation ostéoblastique, notamment la phosphatase alcaline, le collagène de type I, l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse et l'ostéocalcine, et qu'il stimule la minéralisation osseuse (Lecanda et al., 1997; Cheng et al., 2003). D'ailleurs, la BMP-2 agit via la stimulation de trois facteurs de transcription clefs dans la différenciation ostéoblastique : Runx2, Dlx5 et Osterix (Osx) (Lee et al., 2003). Voir figures 13 et 14. Nos résultats montrent une forte stimulation de la minéralisation par BMP-2 dans les ostéoblastes provenant d'individus normaux, mais une très faible stimulation de la minéralisation dans les ostéoblastes OA. Nous pourrions expliquer en partie ce phénomène par l'inhibition de l'activité de la BMP-2 par le TGF- β 1. En effet, il a été démontré que TGF- β 1 inhibe la différenciation ostéogénique induite par BMP-2 via la suppression de Dlx5 (Lee et al., 2003). Or, des travaux antérieurs de notre laboratoire ont démontré que le niveau endogène de TGF- β 1 était augmenté dans les ostéoblastes OA (Massicote et al., 2002) ce qui est en accord avec les travaux qui montraient que les niveaux de TGF- β 1 libre et total étaient plus élevés dans les explants d'os sous-chondral OA par rapport aux normaux (Martel-Pelletier et al., 1997). De plus, Dequeker et al. (1993) ont rapporté un niveau augmenté de TGF- β 1 dans des explants d'os provenant de sites non-porteurs de poids chez des patients OA, indiquant qu'une augmentation généralisée des niveaux de TGF- β dans l'os fait partie de la physiopathologie de l'arthrose.

Activités cataboliques des ostéoblastes OA

Nous avons vu que l'activité anabolique des ostéoblastes OA était augmentée par rapport aux normaux, considérant la production élevée de collagène de type I. Nous avons aussi mesuré le catabolisme de ces cellules en mesurant l'activité des métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 par zymographie. Les MMP-2 et -9 ont pour fonction de dégrader les molécules de collagène dénaturées et les fragments de collagènes produits par les collagénases interstitielles. De plus, ces deux gélatinases semblent jouer un rôle important dans la résorption osseuse (Hill et al., 1994) et on a découvert à la MMP-2 une activité collagénase lui permettant de dégrader le collagène de type I (Aimes et Quigley, 1995). Nous avons déterminé que les activités MMP-2 et MMP-9 étaient augmentées dans les ostéoblastes OA par rapport aux normaux ce qui est en accord avec les travaux de Mansell et al. (1997) qui ont démontré que le tissu osseux trabéculaire de patients OA exprimait beaucoup plus de MMP-2 que chez des sujets normaux du même âge. D'ailleurs, l'activité MMP-2 est aussi augmentée dans des kystes trouvés à la surface sous-chondrale de tissus osseux de patients OA. De plus, il y a une corrélation positive entre la production de MMP-9 et la destruction rapide de la hanche chez le patient OA (Masuhara et al., 2000) et les souris transgéniques MMP-9-null montrent un cartilage hypertrophique et une diminution de la formation de l'os trabéculaire (Vu et al., 1998 ; Ortega et al., 2003) témoignant ainsi de l'importance de cette MMP dans la dégradation du cartilage et le remodelage osseux. Les MMPs provenant du tissu osseux OA pourraient donc influencer l'intégrité du cartilage puisqu'elles sont sécrétées par les ostéoblastes et peuvent circuler localement vers l'espace synovial.

Plusieurs études restent à faire afin de déterminer l'interaction relative de ces trois tissus (os, cartilage, membrane synoviale) et l'implication des MMPs dans ce processus.

Nous avons alors exploré la possibilité que ces activités métalloprotéases augmentées pourraient être dues à une activation via les MT-MMP. Nous avons mesuré la production de MT1-MMP et MT2-MMP par immunobuvardage. La MT1-MMP a été récemment identifiée dans les tissus articulaires et est impliquée dans l'activation de la pro-MMP-2 en MMP-2 active (Strongin et al. 1995 ; Kinoh et al., 1996) et possiblement d'autres MMPs sécrétées (Cowell et al., 1998). Nos résultats montrent une quantité similaire de MT1-MMP et de MT2-MMP dans les ostéoblastes OA et normaux. Si l'activité des ces MMP correspond à leur niveau protéique, puisque nous ne distinguons pas de forme active vs totale par immunobuvardage, alors celle-ci est similaire entre normal et OA. Ce n'est donc probablement pas la production de ces MT-MMP qui influencent l'activité augmentée des MMP-2 et -9. Une façon de déterminer de manière certaine cette relation serait alors d'inhiber de manière sélective l'activité de la MT1-MMP et la MT2-MMP. Ainsi, l'activité augmentée de MMP-2 et MMP-9 dans les Ob OA serait due à un défaut cellulaire qui suite à la dégénération du cartilage et/ou des changements mécaniques dans l'articulation, pourrait faciliter le remodelage du collagène dans une tentative de réparer le compartiment osseux. Cette réparation conduirait alors à un remodelage anormal et à une boucle de réparation tissulaire altérée.

Notre étude nous a permis de déterminer que les ostéoblastes arthrosiques provenant de l'os sous-chondral ont des activités anaboliques et cataboliques augmentées par rapport aux ostéoblastes normaux reflétant ainsi un métabolisme accéléré et un dérèglement de ces cellules. La production élevée de collagène de type I par ces ostéoblastes explique en partie la sclérose osseuse observée *in vivo* tout comme leur potentiel de minéralisation diminué *in vitro* égale la situation *in vivo*. L'activité augmentée des métalloprotéases dans les ostéoblastes OA pourrait possiblement participer à la dégradation du cartilage, conséquence caractéristique et inévitable de cette maladie. Ces travaux amènent donc des évidences supplémentaires de l'importance de l'os dans l'homéostasie de l'articulation arthrosique. L'étude du métabolisme osseux dans l'arthrose est important puisqu'elle pourrait permettre de modifier l'approche thérapeutique qui est aujourd'hui uniquement orientée vers le cartilage.

Perspectives

Pour mieux comprendre le rôle du métabolisme altéré du tissu osseux dans la maladie arthrosique voici quelques idées pour orienter nos recherches futures :

1) Afin de se rapprocher le plus possible de la situation *in vivo*, il faudrait mettre au point un système de co-culture d'ostéoblastes humains normaux et arthrosiques avec des explants de cartilages normaux et arthrosiques pour mieux comprendre le rôle de l'os sous-chondral dans la dégradation du cartilage. Des travaux semblables ont déjà été proposés par le groupe de Westacott et al. (1997). En suggérant que les

métalloprotéases provenant de l'os sous-chondral dégraderaient le cartilage, nous devrions mesurer l'activité et le niveau des métalloprotéases dans le cartilage ainsi que le taux de dégradation du cartilage à l'aide de ce système de co-culture. Pour déterminer si une MMP spécifique est impliquée dans la dégradation du cartilage, cette MMP devrait être inhibée sélectivement dans les ostéoblastes OA et on étudiera les effets des ostéoblastes sur le cartilage en présence ou en absence de cet inhibiteur.

2) Il serait intéressant d'explorer la voie de signalisation de BMP-2 dans l'arthrose puisque ce facteur influence grandement la structure osseuse. D'ailleurs nous avons vu qu'il y avait une réponse altérée des ostéoblastes OA à ce stimulus. Nous pourrions étudier les facteurs de transcription des ostéoblastes OA et normaux afin de déterminer le niveau de différenciation de nos ostéoblastes *in vitro*. De plus, les niveaux des récepteurs BMPR-I et BMPR-II pourraient être comparés dans les Ob OA et normaux. Nous pourrions aussi étudier la régulation de cette voie en mesurant les inhibiteurs de minéralisation S100A4 et msx2 dans les Ob OA et normaux. En effet, S100A4 est une protéine intracellulaire et extracellulaire exprimée par les ostéoblastes qui a pour rôle de réguler négativement la minéralisation de la matrice (Duarte et al., 2003). Msx2 a pour rôle de promouvoir la prolifération d'ostéoprogéniteurs (Satokata et al., 2000), mais empêche la différenciation terminale des ostéoblastes et la minéralisation (Liu et al., 1999 ; Dodig et al., 1999). L'étude des composantes de cette voie de signalisation dans l'arthrose pourrait apporter des explications à la sous-minéralisation osseuse.

Conclusion

Notre étude nous a permis de constater que les ostéoblastes de l'os sous-chondral arthrosique ont un métabolisme augmenté. Donc, la sclérose osseuse observée chez les patients arthrosiques serait en partie due à une altération cellulaire au sein de la structure osseuse. Cette étude amène une preuve supplémentaire de l'importance de l'os dans l'homéostasie de l'articulation arthrosique. Néanmoins, il ne faut pas oublier que l'arthrose affecte l'ensemble de l'articulation et que chacune de ses composantes, l'os, le cartilage la membrane synoviale et la synovie, doit être considérée en regard des autres et que leurs interactions réciproques influencent la progression de la maladie.

Références

Aigner T, McKenna L.(2002) Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci.* **59**(1): 5-18.

Aimes RT, Quigley JP. (1995) Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem.* **270**(11): 5872-6

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.D.(1995) Biologie moléculaire de la cellule, 3^{ième} édition, Flammarion, Paris. pp.978-982

Allanore Y. et Hilliquin P. (1999) La maladie arthrosique. Coll. Médecine générale, Ed. ESTEM, Paris. pp.9-10

Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, et al. (1986) Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum.* **29**(8):1039-49

Apte SS, Fukai N, Beier DR, Olsen BR. (1997) The matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) gene is structurally distinct from other MMP genes and is co-expressed with the TIMP-2 gene during mouse embryogenesis. *J Biol Chem.* **272**(41):25511-7

Aubin JE, Bonnelye E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int.* **11**(11): 905-13

Aydelotte MB, Kuettner KE. (1988) Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. *Connect Tissue Res.* **18**(3): 205-22

Aydelotte MB, Greenhill RR, Kuettner KE. (1988) Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism. *Connect Tissue Res.* **18**(3): 223-34

Bailey AJ, Sims TJ, Knott L. (2002) Phenotypic expression of osteoblast collagen in osteoarthritic bone: production of type I homotrimer. *Int J Biochem Cell Biol.* **34**:176-82

Baron R. (2001) L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse. *Médecine/science* **17** : 1260-1269

Baron R. (2003) General Principles of Bone Biology. Edt: Murray, J.F. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, fifth edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp.1-8

Beresford JN, Gallagher JA, Poser JW, Russell RG (1984) Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of 1,25(OH)₂D₃, 24,25(OH)₂D₃, parathyroid hormone, and glucocorticoids. *Metab Bone Dis Relat Res.* **5** (5):229-34.

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, Poole AR.(1997) Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest.* **99**(7):1534-45

Bigg HF and Rowan AD. (2001) The inhibition of metalloproteinases as a therapeutic target un rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Curr opin in phrarmacol.* **1**:314-320

Blair H.C., Zaidi M., Schlesinger P.H. (2002) Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. *Biochem. J.* **364**: 329-341

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423** :337-342.

Brandt KD, Myers SL, Burr D and Albrecht M. (1991) Osteoarthritic changes in canine articular cartilage, subchondral bone, and synovium fifty-four months after transection of the anterior cruciate ligament. *Arthritis Rheum.* **34**(12):1560-70

Brown TD, Radin EL, Martin RB and Burr DB. (1984) Finite element studies of some juxtarticular stress changes due to localized subchondral stiffening. *J Biomech.* **17**(1): 11-24

Buckwalter J.A. and Mankin H.J. (1997) Articular cartilage. Part II: Degeneration and osteoarthrosis repair, regeneration, and transplantation. *J bone Joint Surg Am.* **79**(4) :612-632

Buckwalter J.A. and Mow V.C. (1992) Cartilage repair in osteoarthritis. Osteoarthritis : diagnosis and medical/surgical management. Edt: Moskowitz R.W., Howell D.S., Goldberg V.M. and Mankin H.J. 2nd Edition, Philadelphia, W.B. Saunders, pp.71-107

Burr DB et Schaffler MB. (1997) The involvement of subchondral mineralized tissues in osteoarthrosis: quantitative microscopic evidence. *Microscopy research and Technique* **37**: 343-357

Canalis E, Centrella M, Burch W, McCarthy TL. (1989) Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J Clin Invest.* **83**(1): 60-5

- Canalis E, Raisz LG. (1994) Parathyroid hormone: Anabolic and catabolic on bone and interactions with growth factors. The parathyroids. Bilezikian JP, Levine MA. New York: 65-82
- Carlson CS, Loeser RF, Jayo MJ, Weaver DS, Adams MR, Jerome CP. (1994) Osteoarthritis in cynomolgus macaques: a primate model of naturally occurring disease. *J Orthop Res.* **12**(3): 331-339
- Carlson CS, Loeser RF, Purser CB, Gardin JF and Jerome CP. (1996) Osteoarthritis in cynomolgus macaques. III: Effects of age, gender, and subchondral bone thickness on the severity of disease. *J Bone Miner Res.* **11**(9):1209-1217
- Centers for Disease Control and Prevention. Prevalence of Arthritis-United States 1997. (2001) *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **50**,334-6
- Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC. (2003) Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am.* **85-A**(8):1544-52
- Chomczynski P and Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**: 156-159
- Chubinskaya S, Kuettner KE and Cole AA. (1999) Expression of matrix metalloproteinases in normal and damaged articular cartilage from human knee and ankle joints. *Lab Invest.* **79**(12): 1669-77.
- Coggon D, Kellingray S, Inskip H, Croft P, Campbell L, Cooper C. (1998) Osteoarthritis of the hip and occupational lifting. *Am J Epidemiol.* **147**(6):523-8
- Coggon D, Croft P, Kellingray S, Barrett D, McLaren M, Cooper C. (2000) Occupational physical activities and osteoarthritis of the knee. *Arthritis & Rheumatism* **43**(7): 1443-1449
- Cowell S, Knauper V, Stewart ML, D'Ortho MP, Stanton H, Hembry RM, Lopez-Otin C, Reynolds JJ, Murphy G. (1998) Induction of matrix metalloproteinase activation cascades based on membrane-type 1 matrix metalloproteinase: associated activation of gelatinase A, gelatinase B and collagenase 3. *Biochem J.* **331** : 453-8
- Cremer M.A., Rosloniec E.F., Kang A.H. (1998) The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J. Mol. Med.* **76**:275-288

Dedrick DK, Goldstein SA, Brandt KD, O'Connor BL, Goulet RW and Albrecht M. (1993) A longitudinal study of subchondral plate and trabecular bone in cruciate-deficient dogs with osteoarthritis followed up for 54 months. *Arthritis Rheum.* **36**(10):1460-7

Delaisse JM, Eeckhout Y, Neff L, Francois-Gillet C, Henriot P, Su Y, Vaes G, Baron R. (1993) (Pro)collagenase (matrix metalloproteinase-1) is present in rodent osteoclasts and in the underlying bone-resorbing compartment. *J Cell Sci.* **106** : 1071-82

Dempster DW, Cosman F, Parisien M, Shen V and Lindsay R. (1993) Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocr Rev.* **14**(6):690-709

Dequeker J, Mohan S, Finkelman RD, Aerssens J, Baylink DJ. (1993) Generalized osteoarthritis associated with increased insulin-like growth factor types I and II and transforming growth factor beta in cortical bone from the iliac crest. Possible mechanism of increased bone density and protection against osteoporosis. *Arthritis Rheum.* **36**(12):1702-8

Dietrich JW, Canalis EM, Maina DM, Raisz LG. (1976) Hormonal control of bone collagen synthesis in vitro: effects of parathyroid hormone and calcitonin. *Endocrinology.* **98**(4):943-9.

Dodig M, Tadic T, Kronenberg MS, Dacic S, Liu YH, Maxson R, Rowe DW, Lichtler AC. (1999) Ectopic Msx2 overexpression inhibits and Msx2 antisense stimulates calvarial osteoblast differentiation. *Dev Biol.* **209**(2):298-307

Doherty M. (1994) Color Atlas and Text of Osteoarthritis. Wolfe publishing, Barcelona. pp.7-8

Eyre D.R., Wu JJ. (1995) Collagen structure and cartilage matrix integrity. *J. Rheumatol.* Suppl. **43**: 82-85

Farach-Carson MC et Ridall AL. (1998) Dual 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Signal Response Pathways in Osteoblasts: Cross-Talk Between Genomic and Membrane-Initiated Pathways. *American Journal of Kidney Diseases* **31**(4) : 729-742

Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Walker AM, Meenan RF. (1988) Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Ann Intern Med.* **109**(1):18-24

Felson DT, Hannan MT, Naimark A, Berkeley J, Gordon G, Wilson PW, Anderson J. (1991) Occupational physical demands, knee bending and knee osteoarthritis: results from the Framingham study. *J. Rheumatol.* **18**(10): 1587-92

Felson DT, Zhang Y, Anthony JM, Naimark A, Anderson JJ. (1992) Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study. *Ann Intern Med.* **116**(7): 535-539

Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Lascau-Coman V, Moldovan F, Jovanovic D, Raynauld JP, Pelletier JP. (1998) Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in normal and early experimental osteoarthritic canine cartilage: an immunohistochemical study. *J Rheumatol.* **25**(8):1585-94

Filanti C, Dickson GR, Di Martino D, Ulivi V, Sanguineti C, Romano P, Palermo C and Manduca P. (2000) The expression of metalloproteinase-2, -9, and -14 and of tissue inhibitors-1 and -2 is developmentally modulated during osteogenesis in vitro, the mature osteoblastic phenotype expressing metalloproteinase-14. *J Bone Miner Res.* **15**:2154-68

Goldring M.B. (2000) The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* **43**(9): 1916-1926

Goldthwait J.E. (1904) The differential diagnosis and treatment of the so called rheumatoid disease. *Bost. Med. Surg. J.* **151**, 529-534.

Grynpas MD, Alpert B, Katz I, Lieberman I and Pritzker KP. (1991) Subchondral bone in osteoarthritis. *Calcif Tissue Int.* **49**(1):20-6

Hadler NM, Gillings DB, Imbus HR, Levitin PM, Makuc D, Ustinger PD, Yount WJ, Slusser D, Moskovitz N. (1978) Hand structure and function in an industrial setting. *Arthritis Rheum.* **21**(2): 210-220

Harrison JR and Clark NB. (1986) Avian medullary bone in organ culture: effects of vitamin D metabolites on collagen synthesis. *Calcif Tissue Int.* **39**(1):35-43

Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P and Lajeunesse D. (1998) Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis Rheum.* **41**(5):891-899

Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Duval N and Lajeunesse D (1999) Abnormal regulation of urokinase plasminogen activator by insulin-like growth factor 1 in human osteoarthritic subchondral osteoblasts. *Arthritis Rheum.* **42**(10):2112-22

Hilal G, Massicotte F, Martel-Pelletier J, Fernandes JC, Pelletier JP, Lajeunesse D. (2001) Endogenous prostaglandin E2 and insulin-like growth factor 1 can modulate the levels of parathyroid hormone receptor in human osteoarthritic osteoblasts. *J Bone Miner Res.* **16**(4):713-21

Hill PA, Murphy G, Docherty AJ, Hembry RM, Millican TA, Reynolds JJ, Meikle MC. (1994) The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts. *J Cell Sci.* **107** : 3055-64

Hofbauer LC, Heufelder AE. (2001) Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med.* **79**:243-253

Huber M, Trattnig S, Lintner F. (2000) Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest Radiol.* **35**(10): 573-80

Karlson EW., Mandl LA, Aweh GN, Sangha O, Liang MH, Grodstein F. (2003) Total Hip Replacement due to osteoarthritis: The importance of age, obesity, and other modifiable risk factors. *Am J Med.* **114**: 93-98

Kerin A., Patwari P., Kuettner K., Cole A. and Grodzinsky A. (2002) Molecular basis of osteoarthritis: biomechanical aspects. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**:27-35

Kinoh H, Sato H, Tsunozuka Y, Takino T, Kawashima A, Okada Y and Seiki M. (1996) MT-MMP, the cell surface activator of proMMP-2 (pro-gelatinase A), is expressed with its substrate in mouse tissue during embryogenesis. *J Cell Sci.* **109**: 953-9

Kontinen YT, Ainola M, Valleala H, Ma J, Ida H, Mandelin J, Kinne RW, Santavirta S, Sorsa T, Lopez-Otin C, Takagi M.(1999) Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* **58**(11): 691-7

Kosher R.A. (1983) The chondroblast and the chondrocyte. Cartilage Vol. 1, Structure, Function and Biochemistry. Edt: Hall B.K., New York, Academic Press, p.60

Lajeunesse D, Hilal G, Pelletier J-P and Martel-Pelletier J. (1999) Subchondral bone morphological and biochemical alterations in osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage* **7**: 321-322

Lajeunesse D et Reboul P. (2003) Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. *Curr Opin Rheumatol.* **15**: 628-33

Lajeunesse D, Busque L, Menard P, Brunette MG and Bonny Y. (1996) Demonstration of an osteoblast defect in two cases of human malignant osteopetrosis. Correction of the phenotype after bone marrow transplant. *J Clin Invest.* **98**(8):1835-42

Lajeunesse D, Kiebzak GM, Frondoza C and Sacktor B. (1991) Regulation of osteocalcin secretion by human primary bone cells and by the human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone Miner.* **14**(3):237-50

Lane NE, Gore LR, Cummings SR, Hochberg MC, Scott JC, Williams EN, Nevitt MC. (1999) Serum vitamin D levels and incident changes of radiographic hip osteoarthritis: a longitudinal study. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arthritis Rheum.* **42**(5):854-860

Lash J.W. and Vasani N.S. (1983) Glycosaminoglycans of cartilage. Cartilage Vol. 1, Structure, Function and Biochemistry. Edt: Hall B.K., New York, Academic Press, pp.215-229

La société d'arthrite : Arthroscopie : dernière mise à jour 14/03/2003. Disponible à l'adresse internet suivante :
<http://www.arthrite.ca/resources%20for%20advocates/arthroscope/index/default.aspx?s=1>

Layton MW, Goldstein SA, Goulet RW, Feldkamp LA, Kubinski DJ and Bole GG. (1988) Examination of subchondral bone architecture in experimental osteoarthritis by microscopic computed axial tomography. *Arthritis Rheum.* **31**(11):1400-5

Lecanda F, Avioli LV, Cheng SL. (1997) Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Biochem.* **67**: 386-96

Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM, Ryoo HM. (2003) BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun.* **309**(3):689-94

Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, Park HD, Kang AR, Kyung HM, Sung JH, Wozney JM, Kim HJ, Ryoo HM. (2003) BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J Biol Chem.* **278**(36):34387-94

Li B and Aspden RM (1997) Composition and mechanical properties of cancellous bone from the femoral head of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *Journal of Bone & Mineral Research.* **12**(4):641-51

Lian J.B., Stein G.S. and Aubin J.E. (2003) Bone formation: maturation and functional activities of osteoblast lineage cells Edt: Murray, J.F. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, fifth edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp.13-28

- Liu YH, Tang Z, Kundu RK, Wu L, Luo W, Zhu D, Sangiorgi F, Snead ML, Maxson RE. (1999) Msx2 gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: a possible mechanism for MSX2-mediated craniosynostosis in humans. *Dev Biol.* **205**(2):260-74
- Maetzel A, Makela M, Hawker G, Bombardier C. (1997) Osteoarthritis of the hip and knee and mechanical occupational exposure – a systematic overview of the evidence. *J Rheumatol.* **24**(8): 1599-1607
- Mankin H.J. et Thrasher A.Z. (1975) Water content and binding in normal and osteoarthritic human cartilage. *J bone Joint Surg Am.* **57**(1): 76-80
- Manninen P, Riihimaki H, Heliövaara M, Makela P. (1996) Overweight, gender and knee osteoarthritis. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **20**(6): 595-597
- Mansell JP, Tarlton JF and Bailey AJ. (1997) Biochemical evidence for altered subchondral bone collagen metabolism in osteoarthritis of the hip. *British Journal of Rheumatology* **36**(1):16-9
- Mansell JP and Bailey AJ. (1998) Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J Clin Invest.* **101**(8):1596-603
- March LM, Bachmeier CJ. (1997) Economics of osteoarthritis : a global perspective. *Baillieres Clin. Rheumatol.* **11**(4); 817-834
- Marie P. (2001) Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *Médecine/Science* **17** (12) :1252-1259
- Marieb E. (1993) Anatomie et physiologie humaines. Éditions du Renouveau Pédagogique inc.(ERPI), 2^{ième} édition, Québec, pp.157-173
- Maroudas A.I. (1976) Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage. *Nature* **260**: 808-809
- Massicotte F, Lajeunesse D, Benderdour M, Pelletier JP, Hilal G, Duval N, Martel-Pelletier J. (2002) Can altered production of interleukin-1beta, interleukin-6, transforming growth factor-beta and prostaglandin E(2) by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis Cartilage.* **10**(6):491-500
- Martel-Pelletier J, Hilal G, Pelletier JP, Ranger P, Lajeunesse D. (1997) Evidence for increased metabolic activity in human osteoarthritic subchondral bone explants. *Arthritis Rheum.* **40** S182 (Abstract)
- Martel-Pelletier J, Welsch DJ, Pelletier JP. (2001) Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* **15**(5): 805-29

Masuhara K, Bak Lee S, Nakai T, Sugano N, Ochi T, Sasaguri Y. (2000) Matrix metalloproteinases in patients with osteoarthritis of the hip. *Int Orthop.* **24**(2):92-6

Matsui H, Shimizu M and Tsuji H. (1997) Cartilage and subchondral bone interaction in osteoarthritis of human knee joint: a histological and histomorphometric study. *Microsc. Res. Tech.* **37**(4):333-42

McAlindon TE, Jacques P, Zhang Y, Hannan MT, Aliabadi P, Weissman B, Rush D, Levy D, Felson DT. (1996) Do antioxidant micronutrients protect against the development and progression of knee osteoarthritis? *Arthritis Rheum.* **39**(4): 648-656

McAlindon TE, Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Aliabadi P, Weissman B, Rush D, Wilson PW, Jacques P. (1996) Relation of dietary intake and serum levels of vitamin D to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the Framingham Study. *Ann Intern Med.* **125**(5): 353-359

Misof K, Landis WJ, Klaushofer K, Fratzl P. (1997) Collagen from the osteogenesis imperfecta mouse model (oim) shows reduced resistance against tensile stress. *J Clin Invest.* **100**(1):40-45

Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. (1997) Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum.* **40**(9):1653-1661.

Moskowitz RW (1999) Bone remodeling in osteoarthritis: subchondral and osteophytic responses. *Osteoarthritis Cartilage* **7**(3):323-4

Mundy G.R., Chen D. and Oyajobi B.O. (2003) Bone remodeling. Edt: Murray, J.F. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, fifth edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp.46-58

Nagase H. (1997) Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.* **378**: 151-60

Nagase H, Woessner JF Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* **274**(31): 21491-21494

Nelson F, Dahlberg L, Laverty S, Reiner A, Pidoux I, Ionescu M., Fraser G.L., Brooks E, Tanzer M, Rosenberg LC, Dieppe P, Robin Poole A. (1998) Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J Clin Invest.* **102**(12):2115-25

- NIH Conference. Felson DT, conference chair. (2000) Osteoarthritis: New Insights. Part 1: The disease and its risk factors. *Ann Intern Med.* **133**: 635-646
- Okada Y, Shinmei M, Tanaka O, Naka K, Kimura A, Nakanishi I, Bayliss MT, Iwata K, Nagase H. (1992) Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. *Lab Invest.* **66**(6):680-90
- Ortega N, Behonick D, Stickens D, Werb Z. (2003) How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* **995**:109-16
- Palotie A, Vaisanen P, Ott J, Ryhanen L, Elima K, Vikkula M, Cheah K, Vuorio E, Peltonen L. (1989) Predisposition to familial osteoarthritis linked to type II collagen gene. *Lancet* **1**: 924-927
- Parfitt AM, Simon LS, Villanueva AR, Krane SM. (1987) Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with Iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. *J Bone Miner Res.* **2**(5):427-36
- Pinals RS. (1996) Mechanisms of joint destruction, pain and disability in osteoarthritis. *Drugs* **52**(suppl.3):14-20
- Poole C.A. (1997) Articular cartilage chondrons: from, function and failure. *J.Anat.* **191**:1-13
- Poole AP, Kobayashi M, Yasuda T, Lavery S, Mwale F, Kojima T, Sakai T, Wahl C, El-Maadawy S, Webb G, Tchetina E. and Wu W. (2002) Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* **61** (suppl II): ii78-ii81
- Pujol JP and Loyau G. (1987) Interleukin-1 and osteoarthritis. *Life Sci.* **41**(10): 1187-98
- Radin EL, Paul IL, Lowy M. (1970) A comparison of the dynamic force transmitting properties of subchondral bone and articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* **52**(3): 444-56
- Radin EL, Paul IL, Tolkoff MJ.(1970) Subchondral bone changes in patients with early degenerative joint disease. *Arthritis Rheum.* **13**(4): 400-5
- Radin EL, Paul IL.(1970) Does cartilage compliance reduce skeletal impact loads? The relative force-attenuating properties of articular cartilage, synovial fluid, periarticular soft tissues and bone. *Arthritis Rheum.* **13**(2): 139-44

- Radin EL, Martin RB, Burr DB, Caterson B, Boyd RD and Goodwin C. (1984) Effects of mechanical loading on the tissues of the rabbit knee. *J Orthop Res.* **2**(3):221-34
- Reginster J-Y. (2002) The prevalence and burden of arthritis. *Rheumatology* **41**(suppl.1) 3-6
- Reimann I, Mankin HJ, Trahan C. (1977) Quantitative histologic analyses of articular cartilage and subchondral bone from osteoarthritic and normal human hips. *Acta Orthop Scand.* **48**(1):63-73
- Rizkalla G, Reiner A, Bogoch E, Poole AR. (1992) Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis. Evidence for molecular heterogeneity and extensive molecular changes in disease. *J Clin Invest.* **90**(6):2268-77
- Robey P.G. and Boskey A.L. (2003) Extracellular Matrix and Biomineralization of Bone. Edt: Murray, J.F. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, fifth edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp.38-46
- Roche PC, Campeau JD and Shaw ST Jr.(1983) Comparative electrophoretic analysis of human and porcine plasminogen activators in SDS-polyacrylamide gels containing plasminogen and casein. *Bio-chem Biophys Acta* **745**:82-9.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual. 2^{ième} édition Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory pp.18.50-18.55
- Sandell LJ, Aigner T. (2001) Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res.* **3**(2):107-13
- Sangha O. (2003) Epidemiology of rheumatic diseases. *Rheumatology* **39**(suppl.2):3-12
- Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R. (2000) Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet.* **24**(4):391-5
- Saxon L, Finch C, Bass S. (1999) Sports participation, sports injuries and osteoarthritis: implications for prevention. *Sport Med.* **28**(2) : 123-135
- Schenk R.K., Eggli P.S. and Hunziker E.B. (1986) Articular cartilage morphology. Articular Cartilage Biochemistry. Edt: Kuettner K.E., Schleyerbach R. and Hascall V., New York, Raven Press. pp.3-22

- Sharma L. (2001) Local factors in osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology* **13**: 441-446
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P and Boyle WJ.(1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**(2):309-319
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* **150**: 76-85
- Sowers M. Epidemiology of risk factors for osteoarthritis: systemic factors. (2001) *Current Opinion in Rheumatology* **13**: 447-451
- Spector TD, Cicuttini F., Baker J, Loughlin J, Hart D. (1996) Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ* **312**: 940-943
- Stahle-Backdahl M, Sandstedt B, Bruce K, Lindahl A, Jimenez MG, Vega JA, Lopez-Otin C. (1997) Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab Invest.* **76**(5):717-28
- Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. (1995) Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem.* **270**(10):5331-8
- Teitelbaum S.L. (2000) Bone resorption by osteoclasts. *Science* **289**:1504-1508
- Vernejoul MC. et Marie PJ. (1996) Cellules osseuses et remodelage osseux. Edt :Kuntz D. Maladies métaboliques osseuses de l'adulte. Paris, Flammarion, pp.3-16
- Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z. (1998) MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* **93**(3):411-22
- Westacott CI, Webb GR, Warnock MG, Sims JV and Elson CJ. (1997) Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone. *Arthritis Rheum.* **40**(7):1282-1291

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**(7):3597-3602.

Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K. and Okada Y. (2000) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* **59**(6): 455-461