

Université de Montréal

Étude de la signalisation des facteurs de croissance de la famille REG :
Implication dans les mécanismes inflammatoires et l'arthrose

Par

Virginie Landreville

Laboratoire de Génétique Moléculaire de l'Os et des Malformations
Musculo-Squelettiques

Hôpital Sainte-Justine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Biochimie

Août 2005

© Virginie Landreville, 2005



W

4

U58

2006

V.023

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 :
**Étude de la signalisation des facteurs de croissance de
la famille REG : Implication dans les mécanismes
inflammatoires et l'arthrose**

présenté par
Virginie Landreville

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Muriel Aubry
Présidente-rapporteur

Dr Alain Moreau
Directeur de recherche

Dr. René St-Arnaud
Membre du jury

Résumé

L'arthrose est une maladie dont l'éthiopathogénèse est inconnue, qui est caractérisée par la destruction localisée du cartilage articulaire et la croissance anormale de l'os sous-chondral adjacent. Bien que la cause de la maladie demeure incertaine, de nombreux facteurs de prédisposition sont connus : l'âge, le sexe, l'obésité, l'hérédité, les blessures ou encore une sur-utilisation des joints articulaires. Récemment, des travaux dans notre laboratoire ont mis en évidence chez des souris *Pitx1*^{+/-} génétiquement modifiées une dégradation du cartilage articulaire ressemblant en plusieurs points à la maladie humaine de l'arthrose. Au niveau moléculaire, plusieurs évidences expérimentales ont permis de déterminer que ces changements sont possiblement causés par la sur-expression des gènes *Reg I*, *Reg II* et du récepteur *Reg (EXTL3)* qui pourraient être des facteurs déclenchant de l'arthrose. Nos travaux ont aussi permis de mettre en évidence une association entre la perte d'expression du gène *Pitx1* et la sur-expression des gènes *Reg I* et du récepteur *Reg* dans les chondrocytes articulaires chez tous les patients atteints d'arthrose testés à ce jour. Les résultats obtenus des expériences de transfections transitoires avec des mutants de délétions générés à partir des formes originales de *Reg I* et d'*EXTL3* nous permettent de commencer à comprendre la signalisation des facteurs de croissance de la famille *Reg*, de proposer que cette protéine soit impliquée dans les phénomènes de régénération au niveau des tissus musculo-squelettiques. Enfin, l'identification d'un motif de liaison à *TRAF-2* dans la séquence codante du récepteur *Reg*, *EXTL3*, suggère que ce récepteur est en mesure d'interagir avec *TRAF-2* et de moduler la signalisation de certaines cytokines comme le *TNF α* jouant un rôle direct dans la signalisation de l'inflammation. Nous proposons donc que la signalisation engendrée par la protéine *Reg I* implique deux récepteurs et qu'*EXTL3* peut se comporter comme un co-récepteur potentiel du récepteur *TNFR1*. Les travaux présentés dans ce mémoire génèrent un très grand nombre de nouvelles données qui permettront d'améliorer la compréhension des voies de signalisation existantes. Ces nouveaux résultats s'avèrent essentiels dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'inflammation et l'arthrose puisqu'à ce jour, ces phénomènes ne sont pas encore élucidés.

Mots clés : Arthrose, inflammation, protéines *Reg I*, récepteur *EXTL3*, *TRAF-2*.

Abstract

The key features of osteoarthritis (OA) are the focal destruction of the articular cartilage and the abnormal growth of the subchondral bone producing outgrowths. The increased formation of subchondral bone in OA patients throughout the joint could be symptomatic of a more generalized disease of the bone. Although its etiology still remains obscure, many factors are known to precede its apparition; factors such as the age, sex, weight, the overused of the bone joints, all together, leads OA disease to be considered as a collective result of heterogeneous factors affecting cartilage. Consequently, the study of early events of the degenerative process requires simpler models, as murin. Recently, experiments conducted in our laboratory have demonstrated that Pitx1 +/- mice have many severe symptoms that are specific to human OA, as the high mineralization of the subchondral bone as well as the fibrillation and calcification of the articular cartilage. At the molecular level, much evidence suggested that these degenerative changes could be generated by the over expression of Reg I and II genes and its receptor EXTL3. Indeed, the lack of Pitx1 in OA articular chondrocytes of patients leads to a marked up-regulation of Reg I and its receptors, which have been confirmed by immunohistochemistry assays. Transitory transfections of mutants with a deleted form of Reg I and EXTL3 allowed us the understanding of the molecular signaling of Reg family. We are now able to propose that the protein encoded by Reg I gene could be significantly involved in the regeneration of musculoskeletal tissues. Finally, we also discovered that EXTL3 encoding sequence contain a binding site for TRAF-2, which bring us to think that this receptor is able to interact with the TNF receptor. Thereby, EXTL3 throughout this interaction could be directly involved in inflammatory events that occur in OA patients. Here we suggest that the signalization through Reg I protein involve two receptors and that EXTL3 could potentially act as a co-receptor for TNFR1. We hereby present unique data, all contributing to a better understanding of the existent signalization pathways. Of even, these results are highly essential for shedding lights on the molecular mechanisms that occur in osteoarthritis and the inflammation that arises from it.

Keywords : Osteoarthritis, inflammation, Reg proteins, EXTL3 receptor, TRAF-2.

Table des matières

<i>CHAPITRE 1. Revue de la littérature</i>	1
1. L'arthrose	1
1.1 Définition.....	1
1.2 Facteurs étiologiques.....	2
1.2.1 Facteurs génétiques	4
1.3 Anatomie et physiologie des tissus minéralisés	4
1.3.1 Homéostasie du cartilage.....	8
1.4 Progression de la maladie.....	10
1.4.1 Les agents de dégradation du cartilage articulaire	11
1.4.2 Hypothèses proposées pour expliquer l'épaississement de l'os arthrosique .	13
1.5 Gènes de la famille Reg (Regenerating gene).....	15
1.5.1 Identification de l'origine et de l'organisation des gènes de la famille Reg .	15
1.5.2 L'inhibition des cristaux de calcium par la protéine Reg I	16
1.5.3 La protéine Reg dans les maladies humaines.....	19
1.5.3.1 Reg et le système gastrique	19
1.5.3.2 Reg dans le cancer du colon	20
1.5.3.3 Reg dans le diabète.....	20
1.5.4 La régulation transcriptionnelle de Reg via PARP	23
1.5.5 Mécanismes régulant l'expression et la fonction des facteurs Reg.....	24
1.6 EXTL3 : le récepteur Reg	26
1.6.1 Les gènes EXT et les glycosyltransférases.....	26
1.6.2 Rôles des membres de la famille EXT dans certaines pathologies humaines	26
1.6.3 Implication des gènes EXT dans le développement.....	28
1.7 Les voies de signalisation impliquées dans les phénomènes d'inflammation.....	30
1.7.1 NF- κ B.....	30
1.7.1.1 Généralités :.....	30
1.7.2 Les effets biologiques du TNF α	31
1.7.2.1 TRAF-2 : Co-récepteur du TNFR	34
1.7.3 Autres cytokines pro-inflammatoires	34

1.8 Les modèles animaux de l'arthrose	35
1.8.1 Les souris Pitx1	35
1.8.2 Le facteur de transcription Pitx1 et sa régulation transcriptionnelle.....	37
1.9 Hypothèses et objectifs :.....	38
<i>CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES</i>	39
2.1 Plan de cette étude.....	39
2.2 Matériel	39
2.2.1. Les souris Pitx1 +/-.....	39
2.2.2. Les lignées cellulaires	39
2.2.3 Caractéristiques cliniques des patients arthrosiques (OA) et sains (N).....	40
2.3 Méthodes	40
2.3.1 Culture primaire de chondrocytes provenant de cartilage articulaire humain..	40
2.3.2 Culture des lignées cellulaires.....	41
2.3.3 Histologie sur sections de souris Pitx1.....	41
2.3.4 Immunohistochimie.....	41
2.3.4.1 Immunohistochimie de cartilage articulaire humain.....	41
2.3.4.2 Immunohistochimie de cartilage articulaire de lapins.....	42
2.3.5 Extraction d'ARN.....	42
2.3.5.1 À partir de chondrocytes articulaires de patients	42
2.3.5.2 À partir des souris Pitx1	42
2.3.6 Analyse d'expression génique.....	43
2.3.6.1 À partir d'ARN de chondrocytes articulaires.....	43
2.3.6.2 Les souris Pitx1	44
2.3.6.3 MC3T3-E1.....	45
2.3.7 Transfections transitoires de lignée cellulaires	46
2.3.8 La protéine Reg I.....	46
2.3.8.1 Clonage du gène Reg murin dans le vecteur d'expression pFlagMac	46
2.3.8.2 Production de la protéine Reg I.....	46
2.3.9. Génération et clonage des mutants de délétion de Reg I.....	47
2.3.10 Génération des mutants EXTL3	49

2.4 Méthodes statistiques	50
<i>CHAPITRE 3 RÉSULTATS</i>	<i>51</i>
3.1 La souris Pitx1 hétérozygote	51
3.1.1 Analyse phénotypique des souris Pitx1 +/-	51
3.1.2 Analyse histologique des souris Pitx1 +/-	54
3.1.3 Analyse d'expression génique des souris Pitx1 +/+ et Pitx1 -/-.....	56
3.2 Analyse d'expression à partir des cellules MC3T3-E1	59
3.2.1 Impact des expériences de gain de fonction de Pitx1 dans la lignée cellulaire MC3T3-E1	59
3.2.2 La perte de Pitx1 entraînerait-elle la sur-expression de PARP-1, un régulateur transcriptionnel connu de Reg I?	60
3.3 Analyse du cartilage articulaire de patients arthrosiques	64
3.3.1 Analyse des profils d'expression des chondrocytes articulaires	64
3.3.2 Analyse de sections histologiques de cartilage humain par immunohistochimie	66
3.4 Le lapin, un modèle animal de l'arthrose causée par un traumatisme.....	66
3.5 Activation de la voie de NF- κ B via la protéine Reg I et EXTL3 dans l'arthrose.	69
3.6 Génération des mutants de délétion de Reg I et EXTL3.	73
3.6.1 Mutants de délétion de Reg I et du récepteur EXTL3: résultats préliminaires .	73
3.7 Présence du domaine de liaison à TRAF-2 dans le récepteur EXTL3	75
3.8 Effet de la glucosamine sur la fonction du récepteur Reg et sa signalisation.	79
<i>Chapitre 4 : Discussion</i>	<i>83</i>
4.1 Est-ce que la perte de Pitx1 est directement liée à l'arthrose?	83
4.2 Mécanismes liés à l'activation de l'expression du récepteur Reg I et de ses ligands	84
4.2.1 La sur-expression de la protéine Reg I est-elle liée à une prédisposition génétique ou plutôt à un mécanisme naturel de protection du cartilage?.....	84

4.2.2 La protéine Reg I est-elle impliquée dans la régénération des tissus musculosquelettiques?	85
4.3 La protéine Reg I est-elle impliquée dans les étapes précoces du développement de l'arthrose?	86
4.4 Convergence des cytokines pro-inflammatoires vers le système Reg I/EXTL3	88
4.5 EXTL3, est-il simplement qu'un autre co-récepteur capable d'interagir avec TNFR1?	90
4.6 Est-ce que tous les membres de la famille Reg sont en mesure d'homodimérisation ou d'hétérodimérisation?	94
4.7 La glucosamine interfère dans la liaison de la protéine Reg I à son récepteur EXTL3	95
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	98
<i>ANNEXES</i>	105

Liste des tableaux

Tableau I. Principaux gènes proposés dans le développement de l'arthrose humaine.....	6
Tableau II. Changements observés dans la pathogenèse de l'arthrose.....	12
Tableau III. Membres des 4 sous-classes de la grande famille des Reg.	17
Tableau IV. Implication de Reg dans les maladies humaines.....	21
Tableau V. Lignées cellulaires utilisées et origine de chacune.....	40
Tableau VI. Amorces utilisées pour l'amplification de gènes humains à partir de chondrocytes articulaires de patients.....	43
Tableau VII. Amorces utilisées pour l'amplification de gènes de souris à partir de l'ARN provenant des souris Pitx1 hétérozygotes et knock-out.	44
Tableau VIII. Amorces utilisées pour l'amplification de gènes de souris à partir de cellules MC3T3-E1.	45
Tableau IX : Description des amorces utilisées par PCR et taille des fragments générés.	48
Tableau X. Description des amorces utilisées par PCR et taille des fragments générés pour les mutants d'EXTL3.....	49
Tableau XI. Présence du domaine de liaison à TRAF-2 dans le gène codant pour EXTL3.....	78

Liste des figures

Figure 1. Facteurs de susceptibilité à l'arthrose.	3
Figure 2. Schématisation de la composition et de la structure du cartilage articulaire.	7
Figure 3. Cytokines influençant l'homéostasie du cartilage articulaire.	9
Figure 4. Représentation schématique d'un ostéoblaste normal et arthrosique de l'os sous-chondral sur le remodelage osseux.....	14
Figure 5 : Homologie des membres de la famille Reg chez la souris	18
Figure 6. Le système Reg-EXTL3 dans la régénération des cellules β pancréatiques.	22
Figure 7. Rôles multiples de PARP-1 dans la réparation de l'ADN.	25
Figure 8. Membres de la famille EXT.....	29
Figure 9. Schématisation de la signalisation reliant le TNF α et la voie de NF-kB.	33
Figure 10. Apparition de signes cliniques de l'arthrose chez les souris Pitx1 hétérozygotes.	52
Figure 11. Examen radiologique des souris Pitx1 hétérozygotes.....	53
Figure 12. Coloration de Goldner sur des sections de fémurs de souris Pitx1 et de type sauvage.	55
Figure 13. Comparaison de coupes histologiques de têtes fémorales de souris Pitx1 +/- et de type sauvage.	57
Figure 14. Expression des gènes de la famille EXT et Reg chez les souris normales et Pitx1 -/-.	58
Figure 15. Sur-expression du gène Pitx1 dans des cellules MC3T3-E1 par transfection. .	61
Figure 16. Expression du gène PARP-1, co-activateur de Reg, en fonction de la perte d'expression de Pitx1.	62
Figure 17. Perte d'expression du gène PARP-1 lors de la sur-expression de Pitx1.....	63
Figure 18. Comparaison des profils d'expression de Pitx1, PARP-1, Reg I, EXTL3 chez des sujets normaux et arthrosiques.	65

Figure 19. Analyse in vivo de la protéine Reg I sur du cartilage articulaire de patients normaux et arthrosiques.	67
Figure 20. Analyse in vivo des protéines Reg I dans un modèle de lapin arthrosique.	68
Figure 21. Détection de la protéine REG via Western Blot avec anticorps Anti-Flag (1 :4000).	70
Figure 22. Effet du récepteur Reg (EXTL3) sur l'activation de la voie NF- κ B induite par TNF α	71
Figure 23. Activation de la transcription du gène NF- κ B par les protéines Reg I.	72
Figure 24. Génération des mutants de délétion du gène Reg I.	76
Figure 25. Génération des mutants de délétion du gène EXTL3.	77
Figure 26. Représentation chimique des molécules de la streptozocine et de la D-glucosamine HCl.	80
Figure 27. Comparaison des effets inhibiteurs de la glucosamine sur l'activation de NF- κ B.	81
Figure 28. Inhibition de la liaison de la protéine Reg I en présence de glucosamine.	82
Figure 29. Implication des facteurs génétiques et traumatiques dans le développement de l'arthrose.	87
Figure 30. Schématisation de l'interaction entre Pitx1, PARP-1, Reg I et EXTL3.	89
Figure 31. Schématisation de l'interaction possible entre le récepteur EXTL3 et TNFR1.	93
ANNEXE 1. Résultats préliminaires des divers mutants Reg I, Reg Δ 4, Reg Δ 7 et Reg Δ 8 sur l'activation de NF- κ B.	107
ANNEXE 2. Résultats préliminaires de l'impact de la cytokine pro-inflammatoire TNF α sur l'activation de la voie de NF- κ B sur les mutants de délétion Reg I.	108
ANNEXE 3. Résultats préliminaires de l'impact des délétions sur EXTL3 sur l'activation de la voie de NF- κ B en présence ou en absence de la protéine Reg I.	109
ANNEXE 4. Résultats préliminaires de l'effet du TNF α sur les mutants de délétion d'EXTL3.	110

Liste des sigles et abréviations

- ALPase : Phosphatase alcaline
ARNm: Acide ribonucléique messenger
BFGF : Fibroblast growth factor basic
cAMP : Adénosine monophosphate cyclique
cDNA : Acide désoxyribonucléique complémentaire
COL: Collagène
ECL : Gastric fundic enterochromaffin like cells
ER α : Estrogen receptor alpha
EXT: Exostoses multiples héréditaires
IGF: Insulin growth factor
IL: Interleukine
INF γ : Interferon γ
INGAP : Pancreatic beta cell growth factor
IPTG : Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
MMP: Metalloproteinases
NF-kB : Nuclear factor kappa B
NO: Oxide nitrique
OA: Osteoarthritis (Arthrose)
PA : Plasminogen activator
PAP: Pancreatic associated protein
PARP: Poly(ADP-ribose) polymerase
PDGF: Platelet derived growth factor
PGE2 : Prostaglandines
PITX1 : Pituitary homeobox factor-1
PSP: Pancreatic associated protein
PTH : Hormone parathyroïde
PTP : Pancreatic thread protein
REG: Regenerating gene
RS: Reg-related sequence

TGF β : Tumor growth factor beta

TIMP: Tissue inhibition of metalloproteases

TNF: Tumor necrosis factor

TNFR: Tumor necrosis factor receptor

TRAF-2: TNFR-associated factor

UPA : Urokinase plasminogène

Dédicace

À mes parents, Michèle et Paul-André, pour m'avoir toujours fourni tous les moyens pour réussir. Vos encouragements, votre confiance, votre amour et votre support dans les moments les plus difficiles m'ont été très précieux.

Merci pour tout,

Virginie

Je cherche quand je veux, je trouve quand je peux.

Albert Einstein

Remerciements

Merci au Dr. Alain Moreau pour m'avoir fait confiance et avoir cru en mes capacités. Sa disponibilité, la compréhension et ton encadrement m'auront permis de me dépasser.

Merci au Dr. Da Shen Wang pour les nombreux conseils, les encouragements et le support technique.

Merci à Bouziane Azeddine pour avoir toujours été là lorsqu'un problème survenait.

Merci à tous les membres du laboratoire pour l'entraide et le soutien.

Merci particulièrement à Séverine et Isabelle pour leur amitié.

Merci à toute l'équipe du laboratoire du Docteur Florina Moldovan.

Merci à tous les stagiaires avec lesquels j'ai travaillé.

Merci au personnel de l'animalerie du Centre de recherche de l'Hôpital Ste-Justine.

Merci à tout le personnel du Centre de Recherche de l'Hôpital Ste-Justine.

Merci aux Instituts de Recherche en Santé du Canada pour leur support financier.

CHAPITRE 1. REVUE DE LA LITTÉRATURE

L'arthrose est une maladie dégénérative du cartilage qui atteint plus d'un Canadien sur dix. Malheureusement, les traitements proposés ne permettent que d'alléger les symptômes sans jamais toutefois guérir la maladie. La présente revue de littérature permettra de définir la maladie aussi bien au niveau clinique que fondamental mais aussi d'entrevoir les différentes causes étiologiques proposées qui soutendent cette maladie. De plus, les gènes des familles Reg et EXT seront présentés ainsi que l'implication de la protéine Reg I dans diverses maladies humaines compte tenu de nos récentes découvertes à leur sujet dans l'arthrose dans le cadre de ce mémoire. Par la suite, diverses voies de signalisation impliquées dans les phénomènes d'inflammation tel que NF-kB, TNF α et d'autres cytokines pro-inflammatoires seront également abordées. Enfin, puisque l'étude des mécanismes déclenchant l'arthrose ne peut se faire directement sur l'homme, nous détaillerons la pertinence des modèles animaux utilisés dans le cadre de cette étude portant sur la signalisation des facteurs de croissance Reg et leur implication dans les mécanismes inflammatoires et l'arthrose.

1. L'arthrose

1.1 Définition

L'arthrose se définit comme une destruction lente du cartilage articulaire (chondrolyse) associée à une condensation de l'os sous-chondral, à la présence d'ostéophytes et à une dégénération de la membrane synoviale variable dans le temps (Chevalier 1998). Il existe des formes particulières d'arthrose érosive des doigts qui correspondent à des aspects cliniques différents de l'arthrose des membres inférieurs. L'arthrose des articulations des membres inférieurs est une maladie fréquente liée à l'âge mais différente de la sénescence du cartilage (Chevalier 1998). L'arthrose est une pathologie extrêmement fréquente, qui affecte un tiers de la population de 65 ans et plus, dont l'incidence augmente avec le vieillissement de la population, représentant un coût socio-économique croissant puisqu'aucun traitement pharmacologique n'est vraiment efficace (Conrozier 2003) (Bird 2003). L'arthrose constitue la principale cause d'incapacité chronique parmi les sujets âgés de plus de 65 ans et a traditionnellement été considérée comme une conséquence du vieillissement mais y on reconnaît maintenant une large contribution génétique (Brandt 2003).

1.2 Facteurs étiologiques

Les facteurs de risque de l'apparition de cette maladie sont très variables d'un sujet à l'autre mais aussi d'un site articulaire à l'autre. Il existe 2 types de facteurs pouvant favoriser la survenue de l'arthrose : des facteurs locaux et des facteurs généraux. Les facteurs locaux regroupent les causes strictement localisées à une articulation tel la maladie de Paget sous-chondrale, la dysplasie focale (Chevalier 1998), les causes mécaniques, les traumatismes articulaires, les activités professionnelles et sportives (Ravaud 1996).

Parmi les facteurs généraux qui augmentent la susceptibilité à l'arthrose, on retrouve l'âge ainsi que l'obésité qui est un facteur de risque prépondérant de l'arthrose (Urban 1994) (Felson 1988). De plus, cette maladie a un profil évolutif différent selon le sexe **Figure 1**.

En effet, non seulement les femmes ont quatre fois plus chance de développer la maladie que les hommes mais elles ont aussi une arthrose qui évolue plus rapidement que la maladie développée par les hommes (D'Ambrosia 2005). Le site atteint d'arthrose varie aussi selon le sexe avec une atteinte plus forte chez les femmes au niveau des mains alors que les hommes développent plus d'arthrose des hanches que les femmes (Rossignol 2003). Il est aussi important de noter que de nombreuses maladies sont aussi associées à une augmentation de la fréquence de l'arthrose soit : l'hémochromatose, la maladie de Wilson, les chondroplasies et l'acromégalie.

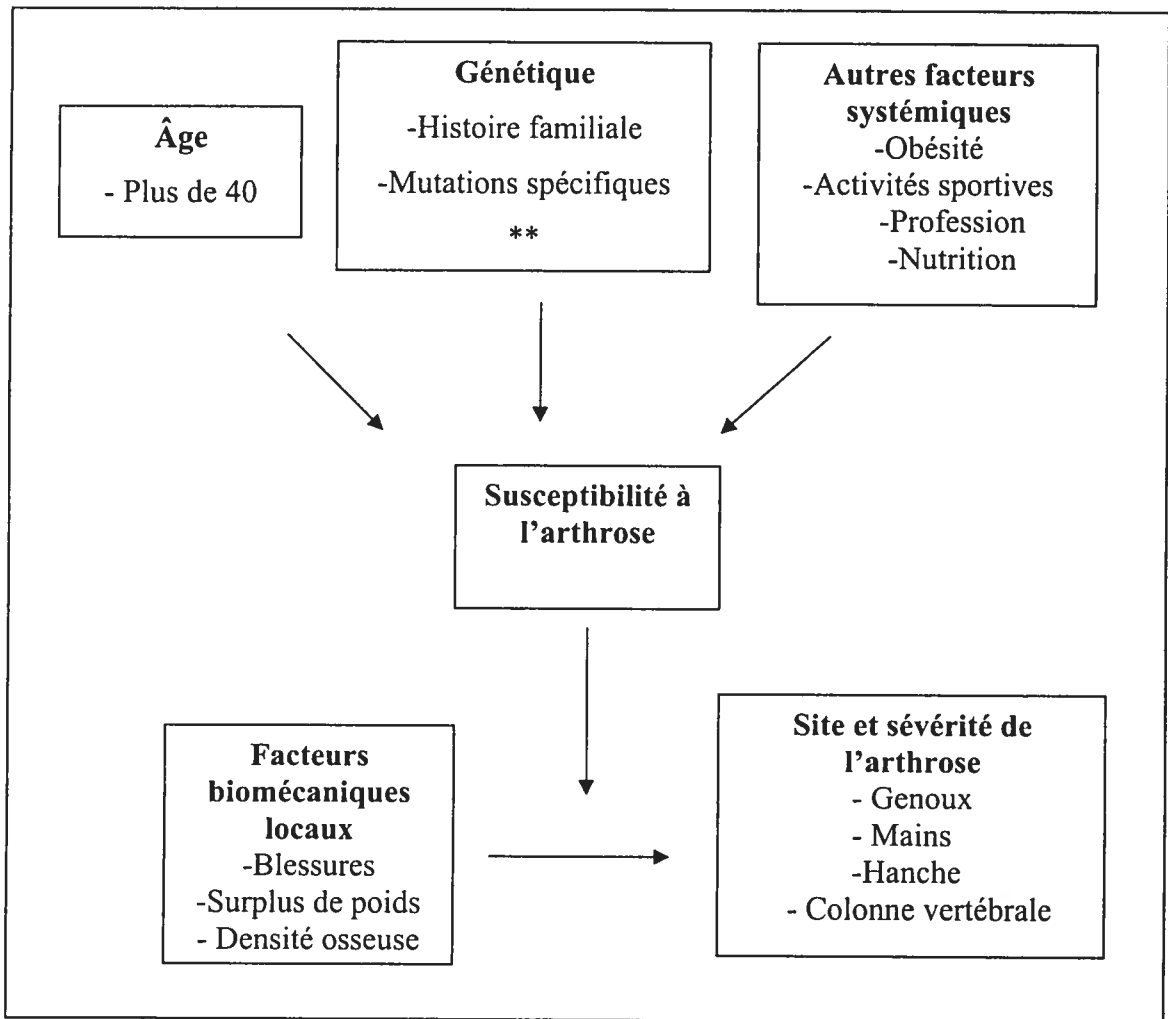


Figure 1. Facteurs de susceptibilité à l'arthrose.

La sévérité de l'arthrose développée chez l'humain est associée à différents facteurs soit l'âge, la génétique, des facteurs systémiques ainsi que des facteurs biomécaniques locaux.

** Voir les mutations connues causant l'arthrose au **Tableau I**.

Adapté d'après Ravaut 1996 et Dieppe 2005 .

1.2.1 Facteurs génétiques

Le rôle des facteurs génétiques a été évoqué dans l'arthrose il y a plus de 60 ans (Stecher 1941). Encouragé par l'importance de trouver les bases biologiques de l'arthrose, différents groupes ont cherché à identifier des gènes impliqués dans cette maladie (Carr 2003). Les gènes de susceptibilité à l'arthrose reconnus par la communauté scientifique sont présentés dans le **Tableau I**. L'existence de certaines mutations ponctuelles dans le gène du procollagène de type II a été démontrée. Suite à cette mutation, les fibrilles formées sont beaucoup plus fines et fragiles (Knowlton 1990). Cette étude portant sur des souris transgéniques, a permis de confirmer la responsabilité de certaines mutations dans le développement de l'arthrose généralisée. Malheureusement, les études portant sur cette mutation, n'ont pas généré chez l'homme les résultats espérés dans le cadre d'une étude effectuée chez des paires de jumeaux (Knowlton 1990).

D'autres études ont permis d'identifier des gènes qui seraient associés avec un risque accru de développer l'arthrose. En effet, les gènes identifiés sont impliqués dans la matrice extracellulaire du cartilage soit : les collagènes de type II, IX et XI (Dieppe 2005). Somme toute, l'ensemble des études portant sur des causes génétiques suggère que l'arthrose est plutôt une maladie multifactorielle et que la présence d'une mutation dans un seul de ces gènes ne permet pas nécessairement le développement de la maladie.

1.3 Anatomie et physiologie des tissus minéralisés

Les articulations humaines sont composées de nombreux tissus différents; le cartilage, le cartilage calcifié, l'os, le synovium et les ligaments. Chacun de ces tissus interagit avec les autres dans le but de faire fonctionner l'articulation normalement, et ce, pendant plusieurs années. La santé de chacun de ces tissus est très importante car lorsque l'un d'entre eux commence à se dégrader, l'ensemble du fonctionnement de l'articulation est altéré. Au niveau médical, c'est l'interaction entre l'os et le cartilage qui a été le plus étudiée dans les dégénérescences articulaires (Burr 2004). Les molécules de glycochrome et les protéoglycans se retrouvent dans le cartilage articulaire pour résister aux stress de surface et aux compressions dans les autres couches du cartilage (O'Connor 1988).

Les molécules de collagène sont orientées de façon parallèle en surface mais elles s'orientent de façon perpendiculaire lorsque l'on analyse les couches plus profondes. La quantité de molécules de protéoglycans tend aussi à y augmenter. Par la suite, on retrouve une couche de cartilage calcifié qui n'est pas vascularisée ce qui entraîne un processus de remodelage inefficace. Dans la couche la plus interne, on retrouve la plaque de l'os sous-chondral qui n'est ni vraiment poreuse ni vraiment vascularisée.

Les différentes régions des tissus minéralisés présentées à la **Figure 2** ont des réponses mécaniques différentes mais aussi aux niveaux physiologiques et pharmacologiques.

Tableau I. Principaux gènes proposés dans le développement de l'arthrose humaine.

Gène impliqué	Localisation chromosomique	Phénotype
COL2A1	12	Arthrose généralisée
COL1A1	17	Arthrose idiopathique féminine
ER α	11	Arthrose généralisée
TGF β 1	19	Arthrose de la colonne vertébrale
IGF-1	12	Arthrose généralisée
Aggrecan	15	Arthrose masculine des mains
Récepteur de la vitamine D	12	Arthrose des genoux

Adapté de Aigner 2003 et Brandi 2001

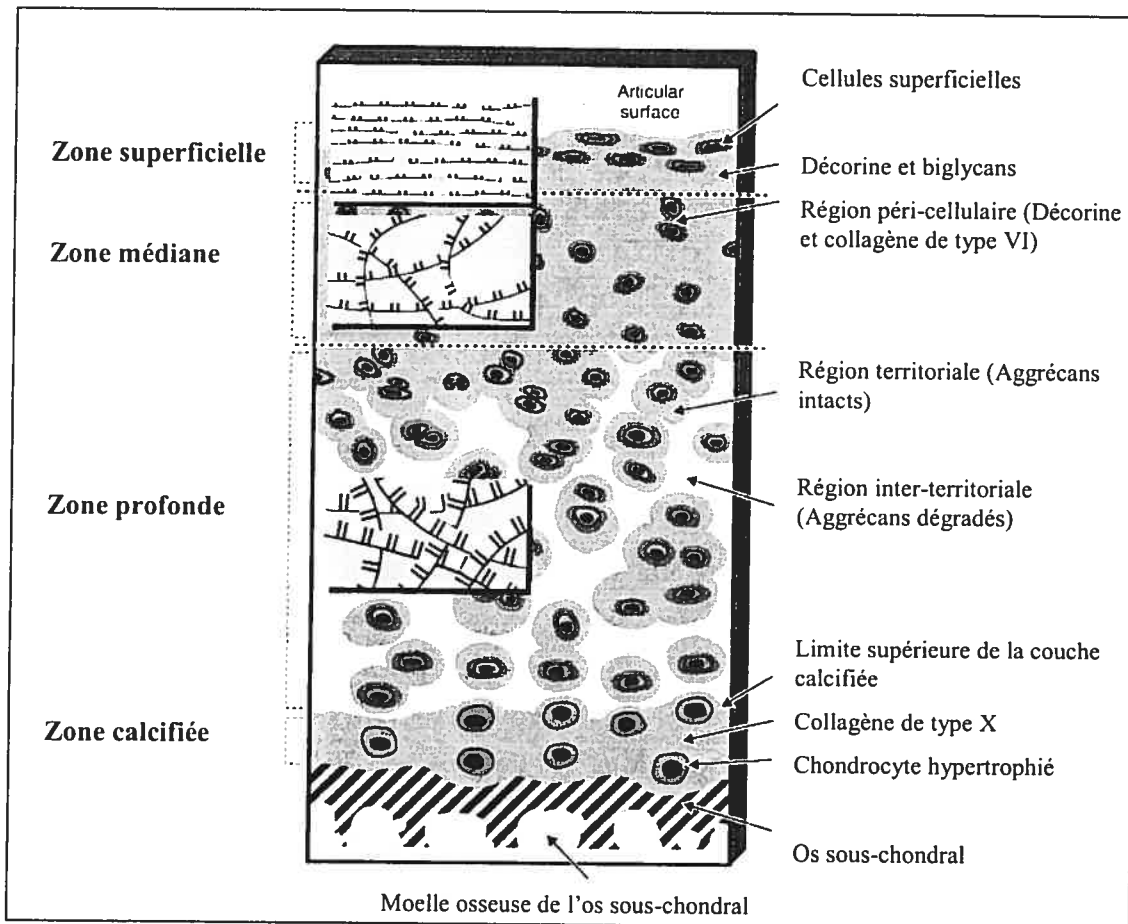


Figure 2. Schématisation de la composition et de la structure du cartilage articulaire.

Le cartilage articulaire est divisé en plusieurs couches (superficielle, moyenne, profonde et calcifiée) et chacune d'entre elles contiennent des molécules différentes. *Adapté de Poole AR. Composition and structure of articular cartilage. A template for tissue repair. Clin Orthopaed Rel Res 391S:S26-S33. Reproduction permise par Lippincott Williams and Wilkins.*

1.3.1 Homéostasie du cartilage

Le cartilage est constitué de cellules, connues sous le nom de chondrocytes, qui sont dispersées dans une matrice extracellulaire. Dans des conditions normales, les chondrocytes articulaires se divisent très peu et le réseau de collagène n'est que très peu renouvelé. Par contre, les protéoglycans sont constamment renouvelés pour assurer le maintien de l'articulation. Bien qu'ils ne se divisent plus, les chondrocytes permettent d'assurer l'homéostasie du cartilage. Cette intégrité du cartilage est maintenue grâce à l'équilibre entre les facteurs de croissance (IGF et TGF- β) (*insulin growth factor* et *tumor growth factor beta*) et les facteurs qui participent à sa dégradation, IL-1 β et TNF α (*interleukine-1* et *tumor necrosis factor alpha*) (Poiraudau 1996).

Les chondrocytes sont par contre soumis à différents stimuli contradictoires car ils possèdent la capacité de produire des inhibiteurs des métalloprotéases tels les TIMP (*tissue inhibition of metalloproteases*) de même que des cytokines inhibitrices de la dégradation : IL6 et IL10 (*Interleukines 6 et 10*). Le chondrocyte peut donc contrôler à la fois les phénomènes de synthèse et de dégradation de la matrice extracellulaire et c'est la variation dans ce ratio qui poussera le système vers la synthèse ou la dégradation du cartilage.

En plus des cytokines pro-inflammatoires, différents facteurs de croissance peuvent aussi moduler la dégradation du cartilage. Le *fibroblast growth factor basic* (bFGF) et le *platelet derived growth factor* (PDGF) ont des effets mitogéniques sur le cartilage alors que l'*insulin like growth factor 1 et 2* (IGF1 et IGF2) peuvent posséder une activité mitogénique s'ils sont sécrétés en présence du bFGF (Tyler 1989). Les molécules influençant l'homéostasie du cartilage sont présentées à la **Figure 3**.

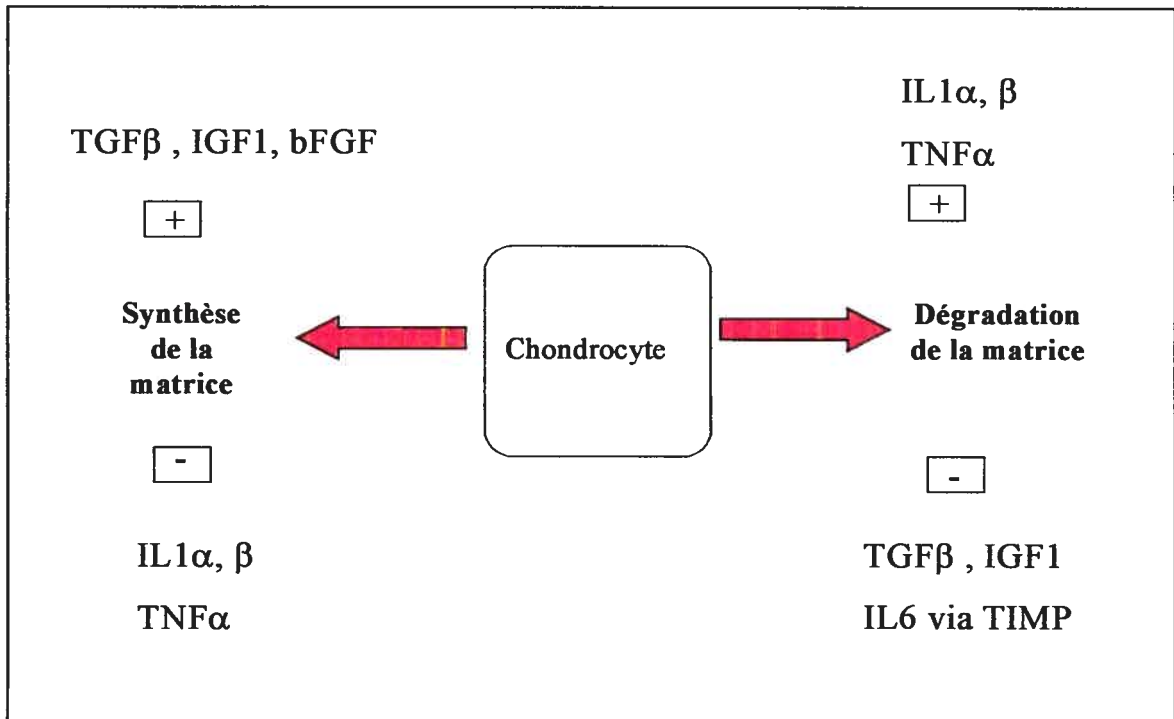


Figure 3. Cytokines influençant l'homéostasie du cartilage articulaire.

Présentation des différentes cytokines ayant un effet positif (+) ou négatif (-) sur la synthèse ou sur la dégradation de la matrice osseuse. Adapté de Poiraudau 1996.

1.4 Progression de la maladie

L'évolution de l'arthrose, demeure encore à ce jour mal connue compte tenu de l'hétérogénéité de cette condition et de sa lente évolution. D'ailleurs, l'évolution semble variable d'un sujet à l'autre mais diffère aussi d'une articulation à l'autre. Les profils de douleurs peuvent également être différents car on considère généralement que la douleur ressentie chez les patients provient de l'inflammation synoviale mais elle peut également provenir de l'os sous-chondral, de la capsule articulaire, des ligaments, des tendons ou d'une contracture musculaire périarticulaire (Brandt 2003).

Au début de la maladie, les phénomènes d'anabolisme et de catabolisme sont en équilibres, mais rapidement, les facteurs anaboliques n'arrivent pas à compenser les effets des facteurs cataboliques. On assiste à un déséquilibre du ratio « synthèse/dégradation » au profit d'une dégradation trop grande (Chevalier 1998). Au stade précoce de l'arthrose, on observe en premier lieu une augmentation de la teneur en eau du cartilage, en lien avec la rupture du réseau des fibres de collagène dont la structure est altérée sans modification quantitative significative. On peut aussi noter une diminution de la teneur en protéoglycans qui est facilement observable à l'aide de colorants se fixant aux protéoglycans tel le bleu d'alcian ou la safranine O (Hamerman 1989).

On sait maintenant qu'à ce stade précoce de l'arthrose, il y a augmentation des cytokines comme l'IL-1 β et TNF α dans le cartilage et que celles-ci contrôlent la dégradation des protéines matricielles en activant les protéases. Survient ensuite un épisode rapide et transitoire de réparation par les facteurs qui stimulent la synthèse. Mais la réparation est inefficace car les protéoglycans néosynthétisés ont un pouvoir d'agrégation très faible. Lorsque la destruction du cartilage est avancée, des fragments de tissus cartilagineux sont relargués dans l'articulation et peuvent être la source d'un processus inflammatoire articulaire avec synovite secondaire (Poiraudou 1996).

1.4.1 Les agents de dégradation du cartilage articulaire

La dégradation du cartilage articulaire dans la pathologie de l'arthrose résulte de deux mécanismes distincts soit l'augmentation de l'activité catabolique et aussi d'une inhibition de l'activité de synthèse (Shinmei 1990). Les changements biochimiques observés sont dus aux activités des différentes protéinases, des métalloprotéinases, des cytokines et des facteurs de croissance. Tous les changements morphologiques, biochimiques et métaboliques observés dans la pathogenèse de l'arthrose sont énumérés dans le **Tableau II**.

Parmi les enzymes impliquées au niveau de la dégradation du cartilage, les métalloprotéinases en sont les principales responsables. Cette très grande famille de MMP compte plus de 18 membres et puisqu'elles sont actives à pH neutre, les MMP peuvent agir sur la matrice extracellulaire à distance. Les cytokines sont aussi des molécules très étudiées dans la pathogenèse de l'arthrose parce qu'elles sont produites par plusieurs des cellules que l'on retrouve dans le joint articulaire. Bien que l'arthrose ne soit pas classée comme une maladie inflammatoire, plusieurs des cytokines inflammatoires se retrouvent aussi impliquées dans l'arthrose. Tout comme les MMP, les cytokines sont synthétisées par les chondrocytes et les synoviocytes et sont responsables des changements notés dans le cartilage endommagé, dans la membrane synoviale, dans l'os sous-chondral et dans la formation des ostéophytes. La cytokine prédominante dans l'arthrose est l'interleukine-1 (IL-1) car elle altère directement la qualité de la matrice du cartilage en diminuant la synthèse du collagène de type II et IX mais en augmentant la synthèse du collagène de type I et III.

Tableau II. Changements observés dans la pathogenèse de l'arthrose.

Changements morphologiques	Irrégularité de la surface du cartilage Apparition de fissures superficielles Distribution altérée des protéoglycans Exposition de l'os Formation d'ostéophytes
Changements biochimique	↑ Contenu en eau dans le cartilage ↓ Diamètre des fibres de collagène de type II ↑ Collagène de type I dans la matrice extracellulaire ↓ Kératanes sulfate Formation de cristaux de calcium ↑ Phosphatase alcaline ↑ NO ↑ Activateur de plasminogène (PA)
Changements métaboliques	↑ MMP (MMP-1,2,3,8,9,13) ↑ Cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF α , INF γ) ↑ Facteurs de croissance (TGF β , PDGF, FGF, IGF)

NO : *Oxide nitrique*, PA: Plasminogen activator, MMP : Métalloprotéinases, IL : Interleukine, TNF α : *Tumor necrosis factor α* , INF γ : *Interféron γ* , TGF β : *tumor growth factor beta* , PDGF : *platelet derived growth factor*, FGF : *fibroblast growth factor*, IGF : *insulin growth factor*)

Adapté d'après *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Edward D. Harris Jr. 7th edition. Pages 380-390 et 1496-1499.

1.4.2 Hypothèses proposées pour expliquer l'épaississement de l'os arthrosique

La sclérose de l'os sous-chondral arthrosique est un phénomène bien connu (Lajeunesse 1999). Au niveau biochimique, les mécanismes pour expliquer l'épaississement de cet os sous-chondral ne sont pas élucidés car les recherches ne réussissent pas à démontrer si le phénomène de sclérose survient avant ou après les premiers dommages au cartilage. C'est donc à certains marqueurs biochimiques que les chercheurs se sont intéressés pour tenter d'élucider le phénomène de sclérose de l'os sous-chondral. Les résultats ont démontrés des changements dans les taux d'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) dans les ostéoblastes de l'os sous-chondral de patients arthrosiques en réponse à l'hormone parathyroïde (PTH) et aux prostaglandine (PGE2) (Lajeunesse 1999). De plus, ils ont aussi dénoté une modification au niveau de la phosphatase alcaline (ALPase) et de l'ostéocalcine lorsque les cellules étaient traitées avec la vitamine D(1,25(OH)₂D3) **Figure 4**.

Plusieurs facteurs différents sont soupçonnés d'altérer la densité osseuse, que ce soit au niveau local, systémique ou mécanique. Dans cet optique, deux systèmes majeurs ont été mis à l'étude dans le but de déterminer s'ils avaient un impact sur l'augmentation de l'activité des ostéoblastes; soit *l'insuline-like growth factor* (IGF1) et l'activateur de plasminogène (PA). Ces travaux ont montré que les ostéoblastes issus de l'os sous-chondral arthrosique produisent des taux plus élevés de IGF-1 et de l'activateur de l'urokinase plasminogène (uPA) mais pas dans le cas spécifique de l'inhibiteur (PAI)-1. Selon le mécanisme postulé, ces augmentations favorisent la formation de l'os ce qui entraînent une plus grande rigidité de celui-ci. Ces données supportent donc le concept qu'un défaut au niveau osseux pourrait débiter ou engendrer la progression de la dégradation du cartilage (Lajeunesse 1999).

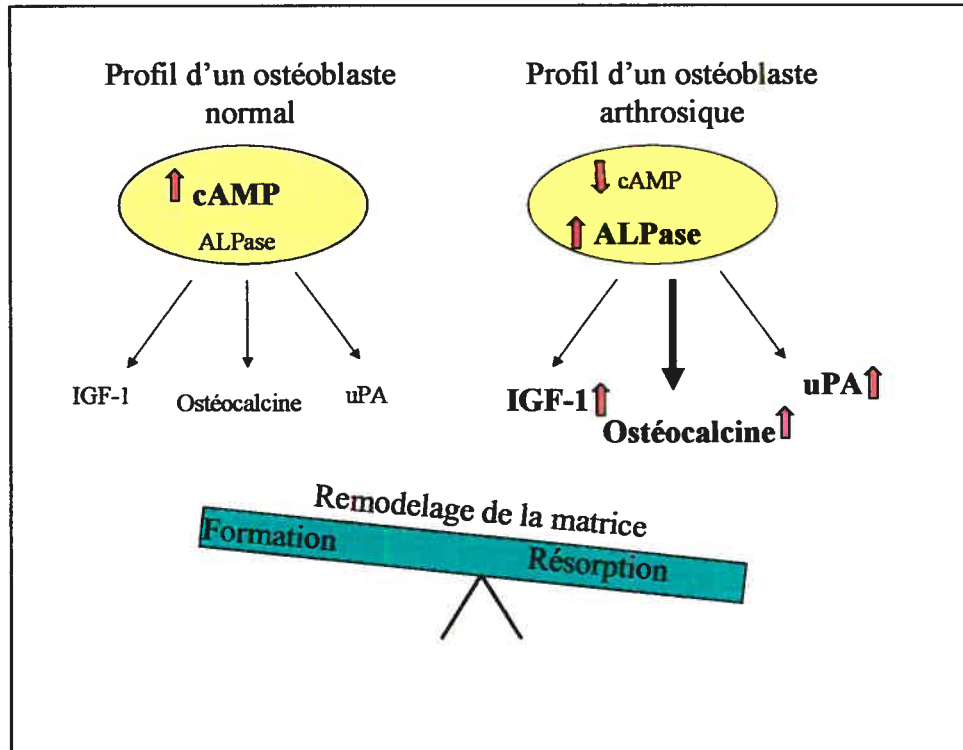


Figure 4. Représentation schématique d'un ostéoblaste normal et arthrosique de l'os sous-chondral sur le remodelage osseux.

L'ostéoblaste arthrosique présente des taux plus élevés de la phosphatase alcaline mais un taux inférieur de cAMP lorsque l'on le compare à un ostéoblaste normal. Cette perturbation entraîne une augmentation de l'IGF-1, de l'ostéocalcine et de l'uPA ce qui favorise plutôt la résorption osseuse (Modifié de Lajeunesse 1999).

1.5 Gènes de la famille Reg (Regenerating gene)

1.5.1 Identification de l'origine et de l'organisation des gènes de la famille Reg

En 1984, Yamamoto et son équipe ont découvert que l'administration de la nicotinamide accélère la régénération des îlots de Langerhan du pancréas chez les rats partiellement pancréactomisés (Yonemura 1984). Par l'entremise d'une librairie de cDNA d'îlots pancréatiques de rats, Terazono découvre un nouveau gène de 165 acides aminés contenant une séquence signal de 21 acides aminés qui est soupçonnée d'être impliquée dans la régénération des îlots pancréatiques. Le gène est à ce moment nommé *Regenerating gene* ou *Reg* (Terazono 1988). Ces résultats ont montré que la protéine Reg stimulait la régénération et/ou la croissance des cellules β pancréatiques, et par le fait même, améliorait le diabète des animaux. Ce n'est qu'en 1997 que la terminologie fut modifiée et à ce moment, la nouvelle appellation devint Reg I. La nomenclature de la molécule Reg est très confuse; on la retrouve aussi sous plusieurs synonymes soit : PTP (*pancreatic thread protein*), PSP (*pancreatic stone protein*), PAP (*pancreatic associated protein*) et sous le nom de lithostathine. (Zhang 2003) Afin de faciliter la lecture de ce mémoire, seule la nomenclature Reg sera utilisée.

Chez l'humain, le gène Reg I est présent en une seule copie de 3,0 Kb composé de 6 exons et de 5 introns et est situé sur le bras court du chromosome 2p12. Ce gène code pour une pré-protéine de 166 acides aminés avec une séquence signale de 22 acides aminés et cette protéine humaine possède 68% d'homologie au niveau de la séquence d'acides aminés primaires avec la protéine de rat, initialement découverte (Akiyama 2001). L'ARNm du gène humain a été détecté de façon prédominante dans le pancréas et à une plus faible concentration, dans la muqueuse gastrique et dans les reins. Tel que mentionné ci-haut, la protéine Reg est d'abord générée sous la forme d'une pré-protéine puis peut être ensuite clivée pour former une glycoprotéine soluble de 144 acides aminés qui contient 3 ponts disulfures et qui est présente sous 11 isoformes différents (Patard 2003). De plus, une autre forme de la protéine Reg est retrouvée dans le jus pancréatique lorsque la forme initiale est clivée par la trypsine entre les acides aminés 11(Arg) et 12 (Ile), ce qui en fait une protéine totalement insoluble en condition physiologique (Patard 2003) (Lee 2003).

Après la découverte de Reg I chez le rat et l'homme, l'homologue de Reg I a été isolé chez la souris et un second gène a été isolé chez ces trois mêmes espèces, soit Reg II (Unno 1993). Après l'identification de quelques membres de la famille Reg chez différentes espèces, Okamoto regroupe les différents gènes Reg et Reg-related des espèces humaine, rat et souris en 4 sous-classes différentes soit type I, type II, type III et type IV (**Voir Tableau III et Figure 5**) (Zhang 2003). La classification est basée sur la similitude et les différences des molécules de la très grande famille Reg.

Il y a, à ce jour, 18 membres de la famille Reg à travers différentes espèces animales qui partagent au moins 39 acides aminés identiques, ce qui suggère que les différents membres ont certaines fonctions similaires mais des distributions tissulaires différentes qui sont principalement dans le système gastro-intestinal et les organes associés dont le pancréas (Kinoshita 2004).

1.5.2 L'inhibition des cristaux de calcium par la protéine Reg I

La composition de la protéine Reg I étant identique à la forme connue sous le nom lithostathine, il a été proposé que la protéine Reg I pouvait jouer le rôle d'inhibiteur de croissance des cristaux de calcium ce qui pourrait expliquer en partie l'abondance relative de la protéine Reg I dans le canal pancréatique, un environnement très riche en sels (Patard 2003). La présence de la protéine Reg I dans cet environnement gastro-intestinal pourrait empêcher la formation de cristaux de calcium mieux connu sous le nom de roches pancréatiques. L'inhibition de la formation des cristaux par la protéine Reg I serait associée à un clivage protéolytique spécifique par une sérine protéase ce qui générerait un petit peptide (EEAQTELPQAR) qui devient insoluble à pH physiologique (tel que mentionné à la page 15). La capacité de la protéine Reg I à inhiber la formation de cristaux calciques implique plusieurs rôles possibles pour cette protéine dans le système gastro-intestinal (Gerbaud 2000).

En plus des rôles associés à cette inhibition du calcium, les membres de la famille Reg seraient impliqués dans diverses maladies humaines que nous discuterons maintenant.

Tableau III. Membres des 4 sous-classes de la grande famille des Reg.

Classification des types	Protéines
Type I	Reg I α humain (Nata 2004) Reg I β humain (Nata 2004) Reg I souris (Abe 2000) Reg I rat (Namikawa 2005)
Type II	Reg II souris (Hartupee 2000)
Type III	PAPIB/Reg III humain (Nata 2004) HIP/PAP humain (Nata 2004) Reg III α souris (Abe 2000) Reg III β souris (Abe 2000) Reg III δ souris (Abe 2000) Reg III γ souris (Abe 2000) PAP/Peptide 23 rat (Namikawa 2005) Reg III/PAP II rat (Namikawa 2005) PAP III rat (Namikawa 2005) INGAP hamster (Taylor-Fishwick 2003) PTP bovin (Laurine 2005)
Type IV	Reg IV humain (Nata 2004) Reg IV souris (Abe 2000) Reg IV rat (Namikawa 2005)

(Abe 2000) (Laurine 2005) (Namikawa 2005) (Nata 2004) (Taylor-Fishwick 2003) , PTP: Pancreatic thread protein, PSP: pancreatic stone protein, INGAP: pancreatic beta cell growth factor.

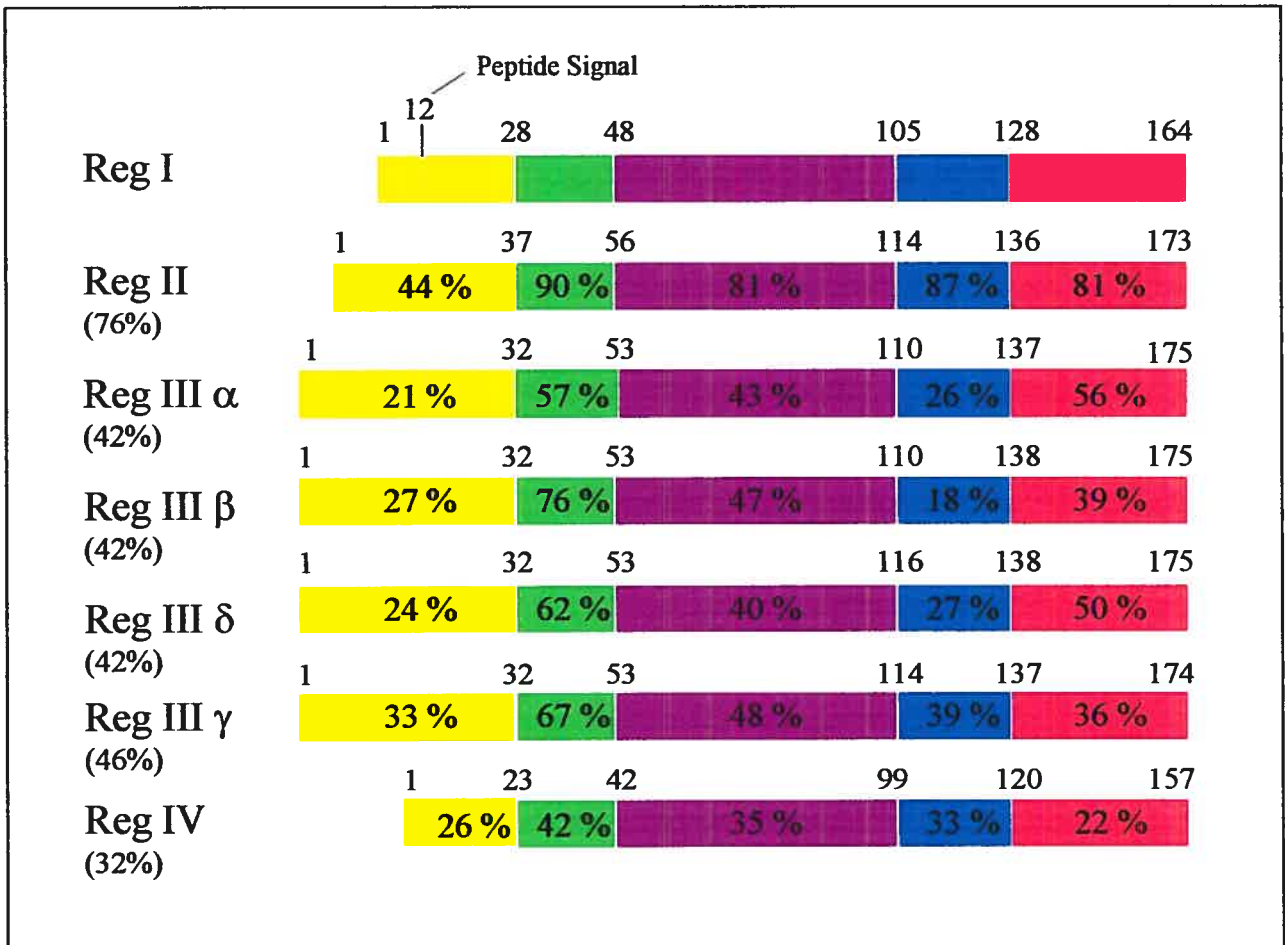


Figure 5 : Homologie des membres de la famille Reg chez la souris

Les gènes Reg chez la souris ont une grande variabilité entre eux. Ils sont exprimés dans des tissus différents et les divers gènes Reg ne sont pas impliqués dans les mêmes pathologies.

1.5.3 La protéine Reg dans les maladies humaines

Les membres de la famille Reg ont été découverts dans le cadre d'un modèle de pancréatite. Des inductions expérimentales sur des tissus endommagés ont montré une forte augmentation de la protéine Reg I et Reg III. Étant donné que ces protéines apparaissaient aussi lors d'une induction à un moyen stress, les protéines Reg ont aussi été définies comme des protéines sécrétées en réponse à un stress (*secretory stress protein*) et peuvent aussi être utilisées comme outil de diagnostic dans les cas de pancréatites car elles permettent de se prononcer sur le niveau de sévérité de la maladie. Des blessures qualifiées de légères à modérées induisent la synthèse des protéines Reg alors qu'une affection sévère du pancréas tend plutôt à diminuer la quantité de protéines produites (Bimmler 2004). Avant d'élaborer sur le lien qui relie la protéine Reg dans le contexte de l'arthrose humaine, nous détaillerons quelques unes des maladies où la protéine Reg a été étudiée (**Tableau IV**).

1.5.3.1 Reg et le système gastrique

Outre le pancréas, le rôle de la protéine Reg a aussi été investigué au niveau de l'estomac et du colon. Les premiers travaux ont permis de détecter l'expression de Reg I au niveau gastrique. À ce niveau, la protéine Reg I est exprimée principalement dans les cellules endocrines spécialisées de la muqueuse de l'estomac (ECL) (Kinoshita 2004). Il est aussi connu que la protéine Reg est produite dans de nombreux cas de cancers gastriques, principalement dans les cas de cancers qui impliquent des cellules pauvrement différenciées ou encore, dans les cas de cancers très avancés. Le niveau d'expression de la protéine Reg I pourrait servir d'indice de prédiction de la chance de survie du patient car la quantification de la protéine Reg devrait potentiellement permettre de détecter les tumeurs les plus agressives et ainsi mieux orienter les traitements du patient. En effet, les cancers associés à de hauts taux de protéines Reg sont aussi associés à de très mauvais pronostics (Dhar 2004). La protéine Reg, considérée comme un facteur de croissance, peut donc moduler la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales gastriques saines et néoplasiques.

1.5.3.2 Reg dans le cancer du colon

Des études sur la protéine Reg a permis de démontrer son rôle dans les cancers colorectaux (Zhang 2003). Le but de cette étude était de déterminer les changements dans le niveau d'expression de la protéine Reg durant la croissance cellulaire et pendant la différenciation. Des études précédentes avaient montré que la protéine Reg n'était pas exprimée dans les cellules saines de l'intestin humain (Watanabe 1990). Ces expériences ont permis de montrer la présence de la protéine Reg dans les lignées cellulaires de cancers colorectaux et de démontrer que la protéine Reg est exprimée dans les phases de croissance mais que son expression est abolie lorsque les cellules entrent en phase de différenciation (Bernard-Perrone 1999). Ces informations nous permettent de croire que la protéine Reg serait impliquée dans le maintien des jonctions cellulaires grâce à son activité lectine dépendante du calcium impliquée dans la reconnaissance des surfaces cellulaires qui sont des événements associés à la croissance cellulaire et à la différenciation (Bernard-Perrone 1999).

1.5.3.3 Reg dans le diabète

Le pancréas est le seul organe capable de régénération même à l'âge adulte et permet aux îlots des patients diabétiques de se régénérer. Par contre, le vieillissement peut aussi être associé à la disfonction des îlots qui pourrait impliquer l'expression du gène Reg. Il est donc probable de penser que le gène Reg I pourrait jouer un rôle important dans les phénomènes de croissance et de régénération des cellules β et c'est pourquoi le gène Reg I est donc devenu une cible thérapeutique intéressante pour traiter le diabète. Dans les années 1980, Takasawa a proposé un modèle de cellules β endommagées (Modèle Okamoto) où ils ont démontré que la protéine Reg I était en mesure d'induire la prolifération des cellules β et l'amélioration de l'état diabétique. Par la suite, l'addition combinée de IL-6 et de dexaméthasone pouvait induire l'expression du gène Reg I dans des cellules β . Enfin, en 2002, la même équipe, a démontré que la molécule PARP (poly(ADP-ribose) polymérase) et ses inhibiteurs pouvaient à la fois induire la régénération des cellules β du pancréas, le maintien de la sécrétion d'insuline et par le fait même, prévenir la mort cellulaire de ces mêmes cellules β (Zhang 2003) (Nguewa 2005).

Tableau IV. Implication de Reg dans les maladies humaines

Maladies	Effet sur Reg
Pancréatite aiguë	↑Protéines Reg I et Reg III Élongation de l'ARNm de Reg III (Zhang 2003), (Iovanna 1991)
Maladie inflammatoire du colon	↑Protéines Reg I (Zhang 2003)
Diabète chez patients non-obèses	↑ Gènes Reg I et Reg II (Zhang 2003)
Cancer gastrique	↑Protéines RegI (Zhang 2003), (Sekikawa 2005)
Maladies cardiaques	↑ Protéines RegI et de son récepteur Extl3 (Kiji 2005)
Cancer de la prostate	Expression du gène Reg IV (Gu 2005)

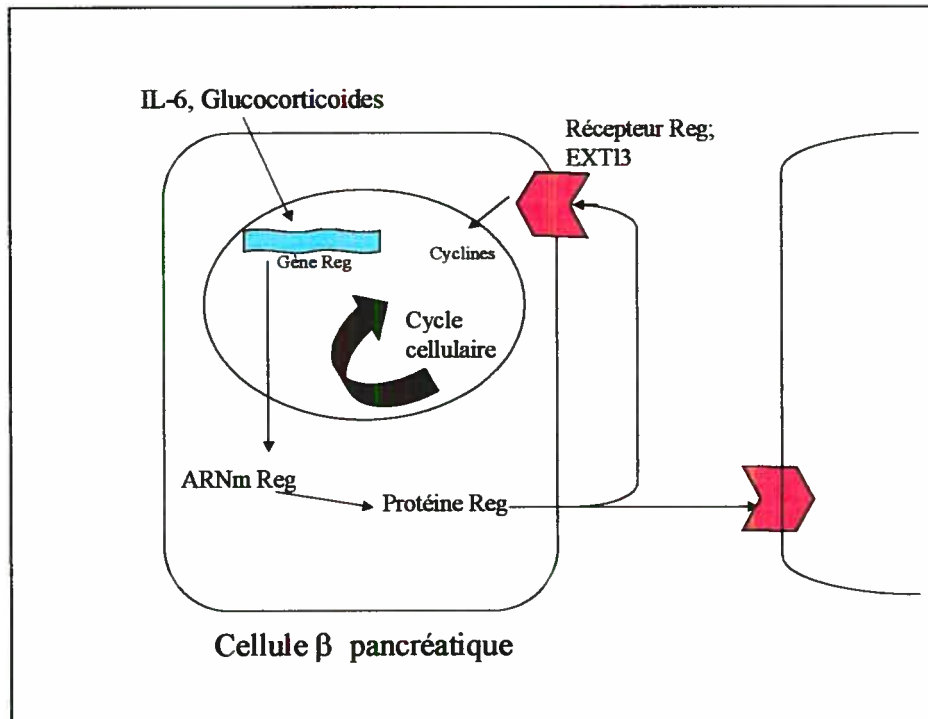


Figure 6. Le système Reg-EXTL3 dans la régénération des cellules β pancréatiques.

La protéine Reg est produite suite aux signaux pro-inflammatoires (IL-6 et les glucocorticoides) et peut agir tel un facteur de croissance autocrine ou paracrine sur les cellules β via leur récepteur EXTL3 (Adapté de Okamoto 2002).

1.5.4 La régulation transcriptionnelle de Reg via PARP

L'existence de la molécule PARP a été rapportée il y a maintenant près de 40 ans et depuis ce temps, plusieurs rôles biologiques lui ont été attribuées. Les poly(ADP-ribose) polymérasés sont une grande famille d'enzymes qui regroupent 17 membres qui se distinguent par leur structure, leur localisation cellulaire et leurs fonctions (Nguewa 2005). Le membre le plus étudié de cette grande famille est la molécule PARP-1 car elle est directement impliquée dans les processus de réparation de l'ADN ainsi que dans les processus de mort cellulaire. PARP-1 est une enzyme nucléaire, abondante et exprimée de façon constitutive qui effectue la conversion du NAD^+ vers les polymères d'ADP-ribose (Ame 2004). Des études d'immunobuvardages ont montré que la molécule PARP (*poly ADP ribose synthétase polymérase*) était en mesure de lier l'élément de régulation cis du promoteur de Reg -81 \cong -70 (TGCCCCTCCCAT). Les essais de retardement sur gel ont aussi montré que PARP était activement impliqué dans le complexe transcriptionnel ADN/protéines et que le complexe formé était aussi régulé par une autopoly(ADN-ribosyl)ation de cette même molécule PARP. Le complexe de protéines formé atteint son maximum de stabilisation lorsque PARP est en présence d'inhibiteurs, car à ce moment, l'autopoly(ADP-ribosyl)ation est impossible (Okamoto 2002).

La région de régulation est très conservée entre les formes humaines et murines des gènes Reg. La découverte de cette région a aussi permis de montrer qu'elle est activée par la présence combinée d'IL-6 et de dexaméthasone (**Figure 7. Partie 1**). C'est la sensibilité de Reg à ces deux substances qui permet d'expliquer le lien qui unit Reg et PARP. En effet, IL-6 et les glucocorticoïdes sont produits dans les phénomènes d'inflammation. La sécrétion de ceux-ci induit la formation d'un complexe de transcription actif de Reg, où la transcription de Reg demeure active car la molécule PARP est à ce moment, incapable d'autopoly(ADP-ribosyl)ation (Okamoto 2002). La protéine Reg produite peut alors agir en tant que facteur autocrine ou paracrine et ainsi lier son récepteur EXTL3 (Kobayashi 2000). La réplication de l'ADN est alors possible et la régénération survient dans les cellules β du pancréas. Par contre, lorsqu'il y a des dommages causés à l'ADN, l'arrêt de l'expression du gène Reg est modulée selon le niveau des dommages (**Figure 7. Partie 2**).

Si, dans un premier cas, les dommages engendrés sont légers tels ceux causés par l'oxide nitrique fréquemment produit dans les cas d'inflammation, la molécule PARP détecte ces dommages et s'autopoly(ADP-ribosyl) dans le but de réparer les dommages causés à l'ADN (Okamoto 2002). À ce moment, la formation du complexe de transcription du gène Reg est interrompue et la transcription du gène Reg s'arrête causée par la non-disponibilité de la molécule PARP. Enfin, si les dommages causés à l'ADN sont très importants, (**Figure 7. Partie 3**) la molécule PARP est très rapidement recrutée auprès des dommages et le complexe ADN/protéines, essentiel à la transcription du gène Reg, n'est jamais formé (Akiyama 2001).

1.5.5 Mécanismes régulant l'expression et la fonction des facteurs Reg

Étant donné que la famille Reg contient plusieurs membres différents; Reg I, Reg II et Reg III et que chacun d'entre eux ont des patrons d'expression tissulaires différents, l'équipe de Bodeker a cherché à comprendre les interactions qui pouvaient survenir entre chacun de ces membres (Bodeker 1999). Il était déjà connu que la molécule Reg III possédait à la fois des activités anti-apoptotique, mitogénique, anti-inflammatoire et était aussi en mesure de promouvoir l'adhésion cellulaire à la matrice extra-cellulaire. De plus, la forme Reg I était aussi connue pour avoir une activité mitogénique. Étant donné que la polymérisation de la molécule Reg III pouvait être le mécanisme qui permettait de réguler l'activité de ces molécules et ainsi leur permettre de jouer leur rôle physiologique, Bodeker a vérifié la capacité de la molécule Reg III chez le rat à interagir avec elle-même par un mécanisme d'homodimérisation ainsi qu'avec les autres membres de la famille : Reg II, Reg I via un mécanisme d'hétérodimérisation (Bodeker 1999).

Les résultats générés par le système double-hybride chez la levure a permis de démontrer que leur prédiction était juste: la protéine Reg III chez le rat était en mesure d'interagir avec d'autres membres de la famille Reg (Bodeker1999). Les résultats démontrent que l'homodimérisation de Reg III est l'interaction la plus forte et préférentielle et que lorsque la protéine Reg III est mise en solution avec les autres membres de la famille, elle forme alors des dimères plutôt que des hétérodimères. Cette étude a donc permis de jeter les bases sur les mécanismes d'interaction des protéines de la famille REG.

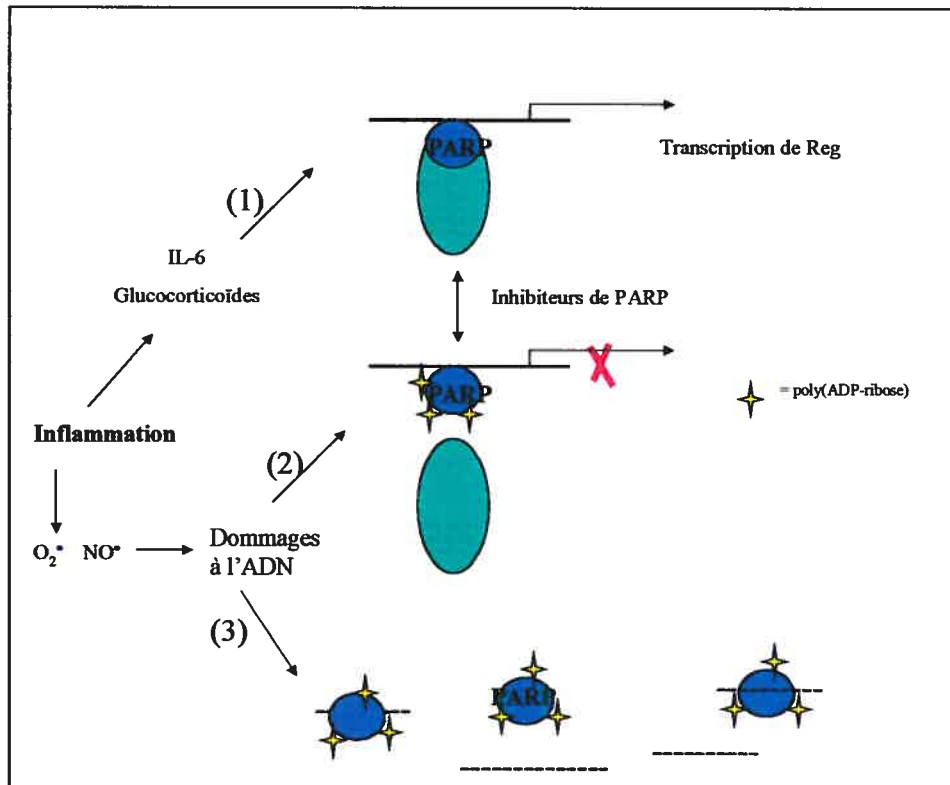


Figure 7. Rôles multiples de PARP-1 dans la réparation de l'ADN.

1) Le gène Reg est transcrit car PARP est incapable d'autopoly(ADP-riboyl)ation. 2) Si des dommages légers sont causés à l'ADN, PARP est recruté et répare les dommages et la transcription de Reg est interrompue. 3) Si les dommages causés sont très importants, le complexe nécessaire à la transcription de Reg n'est jamais formé. Adapté de Okamoto 2002

1.6 EXTL3 : le récepteur Reg

1.6.1 Les gènes EXT et les glycosyltransférases

Les études fonctionnelles ont révélées que les membres de la famille EXT étaient des glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des chaînes d'héparane sulfate. Ces molécules sont stratégiquement localisées à la surface cellulaire et dans la matrice extracellulaire car elles sont impliquées dans l'initiation de la formation des tétrasaccharides sur les résidus sérine des protéoglycans. La protéine EXTL3 contient deux activités glycosylstransférases (α 1,4-N-acétylglucosaminyltransférase I et II) qui sont nécessaires pour l'initiation et l'élongation de la biosynthèse des chaînes d'héparanes sulfates. EXTL3 serait impliqué de façon critique dans la biosynthèse de ces chaînes chez l'humain, la *Drosophile* et *C. elegans* (Osman 2004).

1.6.2 Rôles des membres de la famille EXT dans certaines pathologies humaines

Le syndrome d'exostoses multiples héréditaires (EXT) est une maladie squelettique autosomale dominante qui est caractérisée par la présence multiple d'excroissance de cartilage (exostoses) sur les os longs au niveau des épiphyses. Ce désordre qui touche les os, le type le plus commun de tumeurs osseuses bénignes, est estimé à environ 1 sur 50 000-100 000 (Duncan 2001). La plupart des patients atteints sont diagnostiqués avant l'âge de 5 ans mais les exostoses continuent leur croissance jusqu'à la puberté soit à la fermeture de la plaque de croissance. Les exostoses causent de la pression sur les tissus voisins et résultent en de la douleur, de la compression de la moëlle épinière et aussi au mauvais fonctionnement de l'articulation atteinte. Dans 2% des cas, l'excroissance devient maligne et se transforme en ostéosarcome ou en chondrosarcome (Van Hul 1998). Les trois loci causant la maladie ont été identifiés et caractérisés : EXT1, EXT2 et EXT3. Le gène EXT1 a été localisé sur le chromosome 8q24.1, le gène EXT2 sur le chromosome 11p11-p12 et le gène EXT3 sur le chromosome 19p.

Les mutations impliquées dans cette maladie ont été caractérisées et répertoriées par ordre d'importance : les mutations dans EXT1 et EXT2 sont les plus fréquentes et les plus susceptibles de causer la maladie alors que les mutations dans EXT3 sont impliquées dans un nombre moindre de patients et serait plus fréquente dans la population chinoise.

Depuis leur découverte, les gènes EXT1 et EXT2 ont été clonés et l'analyse de leur séquence a révélé une très forte homologie, spécialement dans la région C terminale. Subséquemment, deux EXT-like genes, EXTL1 et EXTL2, qui sont similaires à EXT1 et EXT2 ont été identifiés (Van Hul 1998). Les deux gènes ont été cartographiés respectivement à la position 1p36 et 1p11-p12 chez l'humain. Cette localisation a donc indiquée qu'aucun de ces deux *like* gènes étaient des candidats du gène EXT3 qui lui, est localisé sur le chromosome 19. Fait intéressant; le chromosome 1 est reconnue pour contenir de nombreuses régions codantes pour des gènes suppresseurs de tumeurs. Conséquemment, il a été proposé que les gènes EXTL1 et EXTL2 pouvaient aussi être des gènes suppresseurs de tumeurs (Kim 2001).

Un membre additionnel de cette famille est le gène EXTL3 et est localisé sur le chromosome 8p12-p21. L'identification de ce membre est basé sur l'homologie de séquences entre ce gène et les membres EXT1, EXT2, EXTL1 et EXTL2 (**Figure 8**). L'identité des acides aminés d'EXTL3 varie entre 26% et 31% par rapport aux autres membres mais le produit de traduction de ce dernier, est nettement plus long que ceux des autres membres de la famille. EXTL3 contient un peptide signal et un domaine transmembranaire dans sa région N-terminale que les autres protéines EXT ne contiennent pas. Enfin, l'expression d'EXTL3 chez l'humain est ubiquitaire mais peut varier selon les tissus et dans le temps (Osman 2000) (Osman 2003).

1.6.3 Implication des gènes EXT dans le développement

L'équipe de Stickens a été la première à suspecter une expression différentielle des gènes EXT dans le cadre de l'embryogénèse (Stickens 2000). Ces travaux ont permis de démontrer que les gènes EXT1 et EXT2 avaient des patrons d'expression différents dans l'os et dans le cartilage chez la souris à 13.5 jours de vie embryonnaire par rapport aux jours précédents. Par la suite, il a aussi été démontré que le gène EXTL3 avait aussi un profil d'expression différent selon les organes étudiés et dans le temps. En effet, le produit du gène EXTL3 est détectable dans une très grande variété de tissus chez la souris adulte mais principalement dans la rate et dans le cerveau. Lorsqu'on compare les profils d'expression d'EXTL3 dans le pancréas lors de l'embryogénèse et dans le pancréas adulte, on s'aperçoit que l'expression d'EXTL3 varie selon les étapes de formation de l'organe pour ensuite se stabiliser (Osman 2003).

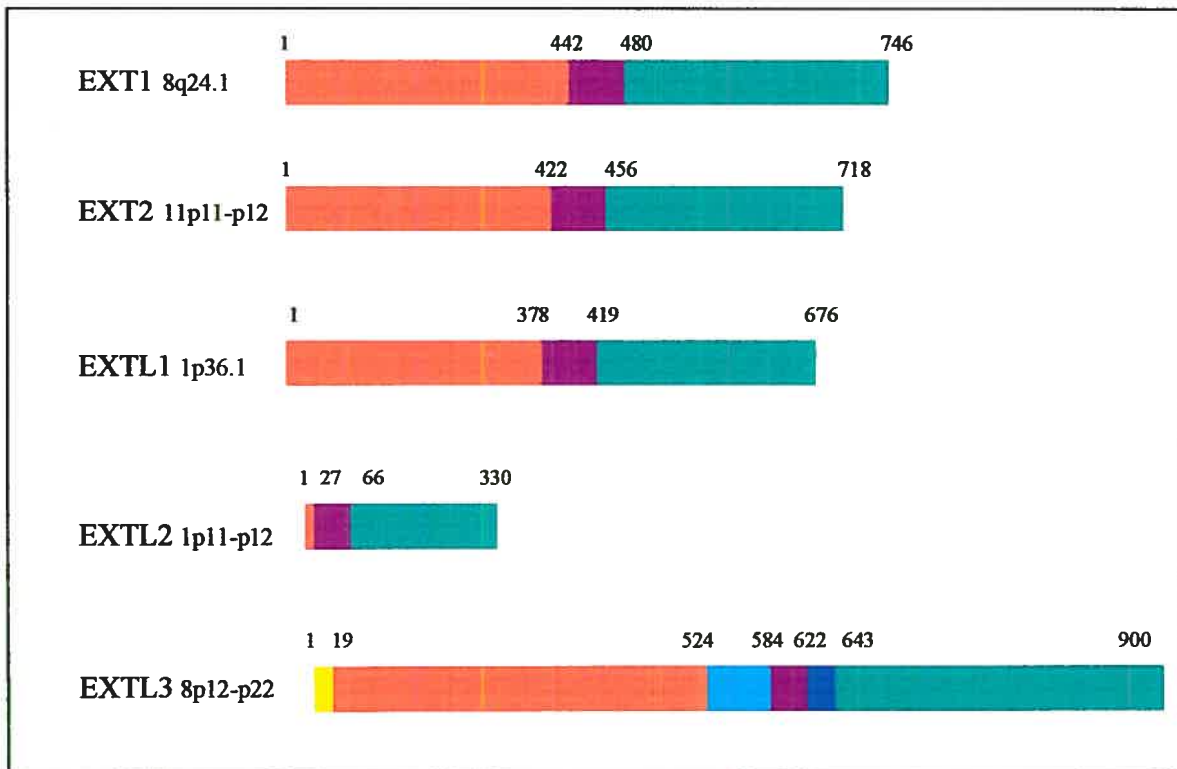


Figure 8. Membres de la famille EXT

La famille EXT est constituée des membres EXT1, EXT2, EXTL1, EXTL2 et EXTL3. La localisation chromosomique de chacun des membres est indiquée sur la figure tout comme le nombre d'acides aminés qui les constituent. Les différentes couleurs correspondent aux diverses régions des gènes de la famille EXT qui peuvent être comparées chez les différents membres. Les gènes EXT1, EXT2 et EXTL1 possèdent les mêmes sections et ne diffèrent que de quelques bases en terme de longueur. Par contre, les gènes EXTL2 et EXTL3 sont très différents des autres membres de la famille. Bien que le gène EXTL2 possède les mêmes sections que les gènes EXT1, EXT2 et EXTL1 il est beaucoup plus court que les autres. En ce qui a trait au gène EXTL3, il est le plus long membre de la famille et possède trois régions complètement différentes des autres membres de cette famille dont un domaine transmembranaire.

1.7 Les voies de signalisation impliquées dans les phénomènes d'inflammation

La molécule EXTL3 est une glycosyltransférase impliquée dans la biosynthèse des héparanes sulfate. Ces molécules interagissent avec une très grande variété de protéines et elles sont impliquées dans plusieurs réponses cellulaires. Récemment, Mizuno a répertorié qu'EXTL3 pouvait moduler l'expression de NF- κ B en présence de TNF α (Mizuno 2001). En plus du lien reliant EXTL3 et NF- κ B, la signalisation de NF- κ B est bien connue et est impliquée dans plusieurs maladies dont les phénomènes d'inflammation. Toujours dans les phénomènes d'inflammation, divers mécanismes sont connus tel que la signalisation de la cytokine pro-inflammatoire TNF α et son impact sur l'activation de NF- κ B. Dans les prochaines lignes, le facteur de transcription NF- κ B ainsi que la cytokine pro-inflammatoire TNF α seront décrit et les mécanismes les reliant seront expliqués.

1.7.1 NF- κ B

1.7.1.1 Généralités :

NF- κ B est un facteur de transcription qui a suscité beaucoup d'intérêt dû à sa régulation complexe, les nombreux stimuli qui peuvent l'activer, la grande quantité de gènes et de réponses qu'il peut lui-même activer, sa conservation à travers le temps et les espèces, ainsi que son implication dans plusieurs maladies humaines (Baldwin 2001). NF- κ B est un marqueur précoce de l'inflammation qui se fixe sur un motif d'ADN localisé dans une séquence activatrice intronique du gène de la chaîne légère des immunoglobulines k. La séquence consensus de l'oligonucléotide κ B de NF- κ B est une séquence décamérique connue soit : 5'-GGGACTTCC-3' (Zabel 1991). NF- κ B a été initialement découvert dans les extraits nucléaires de lymphocytes où cinq protéines appartenant à la famille NF- κ B ont été identifiées (NF- κ B1 ou p50/p105, NF- κ B2, ou p52/p100, RelA ou p65, protooncogène c-Rel et RelB). La caractéristique majeure de ce facteur de transcription est qu'il existe sous une forme inactive cytoplasmique et sous une forme active nucléaire (Baldwin 1996). Dans les cellules non stimulées, NF- κ B sous forme inactive (cytoplasmique) est complexé à des protéines inhibitrices I κ B, empêchant son entrée dans le noyau.

Toutes les protéines I κ B connues contiennent de multiples copies d'une séquence de 30 à 33 acides aminés dites séquences ankyrines. NF- κ B est séquestré au niveau du cytoplasme par différents mécanismes. L'inhibiteur I κ B α et les protéines précurseurs p100 et p105 sont capables de se fixer à la sous-unité p65, masquant ainsi le signal de localisation nucléaire (NLS) de NF- κ B. NF- κ B, libéré de son inhibiteur, migre sans le noyau et se fixe sur une région d'ADN correspondant à sa séquence décamerique spécifique. Cette fixation déclenche la production d'ARN messagers à l'origine d'une production de protéines membranaires. (Mercié 1998).

De nombreux agents sont des activateurs de NF- κ B : les cytokines, les activateurs de la protéine kinase C, les virus et les oxydants. L'activation de NF- κ B par sa translocation au noyau, joue un rôle central dans l'inflammation via son habileté à induire la transcription des gènes codants pour les cytokines pro-inflammatoires ou des molécules d'adhésion cellulaire dont : IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α , interféron γ , E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1, les protéines du CMH ainsi que des protéines virales (Tak 2001) (Umezawa 2002). Dans la voie d'activation classique de NF- κ B, la stimulation est effectuée par les cytokines pro-inflammatoires via le TNF α (Hayden 2004). De plus, de fortes évidences nous portent aujourd'hui à croire qu'une mauvaise régulation chronique de NF- κ B pourrait être à l'origine de maladies inflammatoires et même contribuer à l'oncogénèse (Poligone 2001).

1.7.2 Les effets biologiques du TNF α

La grande majorité des actions du TNF α répertoriées correspondent à la sécrétion de la forme soluble et mature de TNF α (Goetz 2003). Pendant le processus de synthèse du TNF α , la forme mature de 17 kDa est formée par le clivage protéolytique de la portion extracellulaire de la pro-TNF α . Le TNF α est donc exprimé sous deux formes soit la forme soluble et mature de 17 kDa et la forme transmembranaire de 26 kDa. Les évidences portent à croire que la forme transmembranaire est aussi biologiquement active et pourrait être responsable des effets locaux du TNF α . Les formes du TNF α , soluble et transmembranaire, sont retrouvées sous la conformation d'un homotrimer, une conformation essentielle à leur activité biologique.

La molécule de $\text{TNF}\alpha$ possède deux récepteurs de masses moléculaires distinctes soit 55 kDa (TNFR1) et 75 kDa (TNFR2) (Idriss 2000). La démonstration des deux récepteurs n'est plus à faire, par contre, les rôles distincts de ces deux récepteurs ne sont toujours pas clairs. La plupart des cellules expriment les deux récepteurs mais la signalisation associée à NF- κ B est médiée par le récepteur TNFR1, soit celui de 55 kDa (Tartaglia 1992). Une autre caractéristique des membres de la superfamille du TNF est qu'ils sont tous en mesure d'activer le facteur de transcription NF- κ B. L'activation de NF- κ B via les membres de la superfamille du TNF est médié via TNFR-associated factor (TRAF).

Bien que le récepteur du $\text{TNF}\alpha$ contienne un domaine de mort (death domain), dans la majorité des cas, le $\text{TNF}\alpha$ n'induit pas l'apoptose parce que le $\text{TNF}\alpha$ induit la voie de NF- κ B qui permet d'inhiber l'apoptose. Malgré toutes les activités répertoriées pour les membres de la famille TNF, plusieurs questions demeurent. Entre autre, comment se fait-il que les membres de cette famille soient en mesure d'activer à la fois les voies de signalisation de l'apoptose et de l'anti-apoptose, et ce, de façon simultanée? Comment peut-on expliquer que les phénomènes d'apoptose et de prolifération cellulaire soient activés dans des cellules via le même ligand? (Gaur 2003)

Enfin, les molécules NF- κ B, le $\text{TNF}\alpha$ et les cytokines pro-inflammatoires sont intimement liées et sont présentés à la **Figure 9**. En effet, les hétérodimères p50 et p65 sont impliqués dans l'activation des gènes pro-inflammatoires tels que IL-1 ou $\text{TNF}\alpha$ dans les monocytes humains et ces effets sont bloqués via la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Le mécanisme moléculaire précis de l'inactivation de NF- κ B via IL-10 est encore indéterminé.

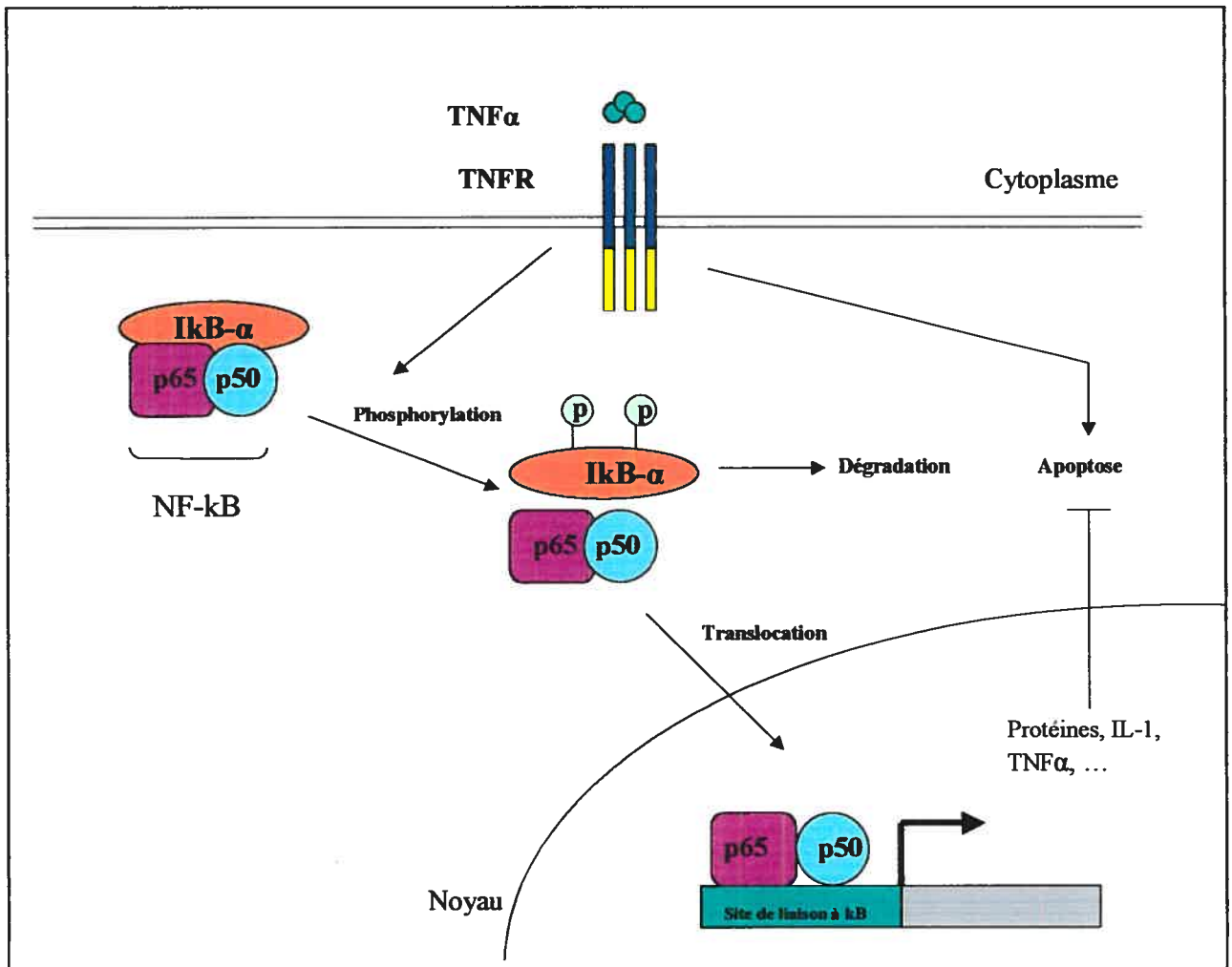


Figure 9. Schématisation de la signalisation reliant le TNF α et la voie de NF- κ B.

La signalisation du TNF α se fait via un récepteur membranaire trimérique qui entraîne ainsi la phosphorylation de la sous-unité I κ B- α de NF- κ B. Les sous-unités p50 et p65 sont alors libres et peuvent ainsi pénétrer dans le noyau et fixer le site de liaison à l'ADN prévu. La liaison permet alors l'activation des gènes à transcrire tel que ceux des cytokines pro-inflammatoire ou des molécules d'adhésion.

1.7.2.1 TRAF-2 : Co-récepteur du TNFR

Activés par la présence du $\text{TNF}\alpha$, les récepteurs de cette très grande famille entraînent des effets biologiques selon des processus de signalisation différents. En effet, quelques TNFR (TNF récepteurs), tel TNFR1 et Fas, utilisent leur domaine intracellulaire codant pour le domaine de mort (death domain) pour induire l'activation des caspases.

Par contre, la majorité des TNFR recrutent les TNFR-associated factor (TRAF) qui sont en fait des adaptateurs intracellulaire capables de promouvoir la survie cellulaire via l'activation de protéines kinases en aval et ultimement, activer les facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B.

Parmi la famille des TRAF, TRAF-2 est le prototype de la famille et a été isolé biochimiquement du complexe de signalisation de TNFR2. Celui-ci est connu pour interagir directement et médier les signaux des autres membres de la famille TNFR soit : CD30, CD40, CD27, Ox40, ATAR et LMP1 (Ye 1999). Il a aussi été montré que TRAF-2 pouvait interagir directement avec TNFR1 via la molécule adaptatrice TRADD et permettre ainsi de coupler leur signalisation (Hsu 1997).

Enfin, deux séquences consensus, une séquence majeure et une séquence mineure, codant pour la liaison de TRAF-2 ont été identifiées soit : $(P/S/A)_x(Q/E)_E$ codant pour la séquence majeure et $PxQxxD$ codant pour la séquence mineure (Ye 1999). Depuis l'identification de ces séquences consensus, plusieurs équipes ont tenté d'élucider la complexité de la transduction des signaux médiés par les TRAF sans toutefois pouvoir élaborer un modèle applicable à toutes les situations.

1.7.3 Autres cytokines pro-inflammatoires

Le $\text{TNF}\alpha$ et l'IL-1 sont les cytokines les plus impliquées dans les processus de dégradation du cartilage parce qu'elles permettent la production de protéases et la sécrétion d'autres cytokines. L'IL-1 a été la première cytokine pro-inflammatoire identifiée et elle est produite par la membrane synoviale, le tissu osseux et le chondrocyte. En effet la synthèse de collagène de type II est inhibée via son action et l'expression du collagène de type I est

également induite par l'IL-1. Aussi, elle inhibe la production de protéoglycans mais induit la production d'enzymes de dégradation du cartilage.

Le rôle de l'IL-1 n'est plus à prouver dans la pathogénèse de l'arthrose car plusieurs analogies peuvent être faites entre son effet *in vitro* et les données recueillies *in vivo*. Dans le cadre de modèles expérimentaux arthrosiques, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'IL-1 permet de diminuer la chondrolyse (Poireau 1996).

Outre les actions indépendantes du TNF α et de l'IL-1, elles peuvent aussi agir en synergie car le TNF α potentialise l'effet de l'IL1 bien qu'il serait moins délétère au cours de l'arthrose (Tracey 1993).

1.8 Les modèles animaux de l'arthrose

L'étude des mécanismes précoces déclenchant l'arthrose ne peut être étudiée directement chez l'homme dû à sa progression lente et à sa grande hétérogénéité au niveau clinique. Jusqu'à maintenant, plusieurs modèles animaux ont été développés avec plus ou moins de succès sans pour autant mettre en évidence les molécules impliquées dans la maladie humaine. Malgré tout, les modèles animaux sont essentiels pour permettre l'identification de nouvelles molécules clés impliquées dans la pathogénèse de l'arthrose afin de tenter résoudre la maladie humaine.

1.8.1 Les souris Pitx1

Le modèle de souris transgénique pour Pitx1 a été produit pour déterminer le rôle de Pitx1 dans la formation de certaines structures squelettiques. Ce modèle de souris a montré des problèmes sévères au niveau du développement des membres inférieurs et des mandibules. Les problèmes générés sont très différents entre les animaux hétérozygotes et les homozygotes. Les souris Pitx1 hétérozygotes sont phénotypiquement normales à la naissance et fertiles alors que les animaux homozygotes meurent à la naissance dû à la sévérité des anomalies cranio-faciales affectant ces souris. Du point de vue développemental, les anomalies observées démontrent que les fémurs sont plus courts chez les souris homozygotes, ils ne possèdent pas de rotules au niveau des genoux et le cartilage présent au niveau du fémur distal et du tibia est beaucoup moins important que chez les souris

hétérozygotes (Lanctôt 1999). Au niveau du développement osseux, l'absence de Pitx1 engendre aussi des différences entre les animaux hétérozygotes et homozygotes.

En plus du raccourcissement du tibia et du fémur chez les animaux homozygotes, les analyses histologiques ont montré que la perte d'expression totale de Pitx1 (Pitx1 $-/-$) entraînait la diminution de l'os cortical et de l'os trabéculaire (Lanctôt 1999). De plus, à l'extrémité distale du tibia, la quantité de chondrocytes hypertrophiées est augmentée et ce, sur une surface plus grande, mais produisent tout de même moins de matrice extracellulaire et presque aucune minéralisation.

D'après les études réalisées par Lanctôt, l'inactivation du gène Pitx1 chez la souris provoque une réduction de la taille des os des membres inférieurs, notamment le fémur et le tibia, alors que les membres supérieurs demeurent intacts. Il ne s'agit pas uniquement d'une réduction de la taille de ces membres par une altération de structure, mais plutôt d'une délétion de ces structures morphologiques. En effet, lors d'une délétion de Pitx1 chez la souris, des altérations significatives de structures squelettiques spécifiques sont remarquées dans une région des membres inférieurs (Szeto 1999). Ces changements anatomiques correspondent aux traits morphologiques et de croissance des os des membres supérieurs, suggérant qu'ils sont dépendants de l'expression de Pitx1 dans les populations mésenchymales des membres inférieurs. Par exemple, les diamètres du tibia et du péronée des souris Pitx1 mutantes sont similaires à ceux correspondants dans les membres supérieurs, soit le radius et le cubitus respectivement (Lanctôt 1999). De plus, le cartilage secondaire des joints du genou, comprenant la rotule et le fabella, ne se forme pas, ce qui résulte en une articulation qui ressemble plus à la jonction du coude. Toutefois, malgré les similarités de structure au niveau moléculaire, les membres inférieurs des souris Pitx1 $-/-$ n'expriment pas Tbx5, un marqueur spécifique des membres antérieurs. De plus, lors de l'inactivation de Pitx1, une calcification inhabituelle de la tête du tibia est observée et pourrait être due à une différenciation accélérée de la plaque de croissance. L'absence de cartilage articulaire dans les membres inférieurs de ces souris, ainsi que la chondrogenèse anormale observée, suggèrent un rôle pour Pitx1 dans la prolifération, la différenciation et/ou la signalisation dans le mésenchyme des bourgeons des membres inférieurs dorsaux.

1.8.2 Le facteur de transcription Pitx1 et sa régulation transcriptionnelle

Pitx1 est un facteur de transcription contenant un homéodomaine analogue à celui trouvé dans les gènes antérieurs spécifiques bicoïd et orthodenticle chez la Drosophile, et Otx-1 et Otx-2 chez les mammifères (Szeto 1999). Pitx1 est le prototype de la famille Pitx. Ce facteur active la transcription en se liant à une séquence en relation avec les sites cibles de bicoïde de la drosophile. Les protéines Pitx1 appartiennent toutes à la sous-classe des protéines à homéodomaine reliées à bicoïde, car elles codent pour une lysine définie au résidu 50 dans l'homéodomaine. Ce résidu, correspondant au neuvième résidu dans l'hélice de reconnaissance de l'homéodomaine, est le déterminant majeur de la spécificité de la liaison de l'ADN (Gehring 1994). Au niveau génomique, le gène Pitx1 se trouve proche du locus pour le syndrome de Treacher Collins Franceschetti, caractérisé par des malformations crânio-faciales (Crawford 1997). Lors du développement, son patron d'expression se situe au niveau de l'hypophyse, de l'épithélium maxillaire ainsi que dans le mésenchyme des membres inférieurs. Son rôle dans la formation des membres inférieurs, dans la fermeture du palais et le développement mandibulaire a été démontré. Le rôle de Pitx1 dans la spécification de l'identité des membres inférieurs est supporté à la fois par des expériences d'inactivation génique (Lanctôt 1999) (Szeto 1999), ainsi que par une analyse de l'expression ectopique du gène (Logan 1999). La récente littérature portant sur son rôle et sa régulation transcriptionnelle dans l'os et le cartilage demeure encore inconnu à ce jour.

1.9 Hypothèses et objectifs :

L'hypothèse du présent projet a été constituée suite à de l'observation de l'augmentation de l'expression du gène Reg dans les analyses moléculaires des souris Pitx1 $-/-$. À partir des résultats obtenus de la caractérisation des souris Pitx1 $-/-$, l'hypothèse du projet a été de **déterminer l'implication de la molécule Reg I et de son récepteur EXTL3 dans l'arthrose, notamment au niveau de l'inflammation et de la dégénérescence du cartilage articulaire.**

Pour ce faire, nous avons fixés divers objectifs soit de :

- 1- Déterminer le profil du gène Reg I chez les souris Pitx1 de type sauvage et knock-out dans des périodes de pré-ossification et de post-ossification embryonnaire.
- 2- Confirmer la sur-expression du gène Reg I et de son récepteur, EXTL3, par des expériences de transfections sur-exprimant le gène Pitx1.
- 3- Vérifier l'impact de la sur-expression de Pitx1 sur le co-activateur de Reg, PARP, par des expériences de transfections.
- 4- Déterminer à partir de cellules de patients, si les gènes Reg I et EXTL3 sont sur-exprimés dans la maladie de l'arthrose humaine.
- 5- Déterminer si les gènes Reg I et EXTL3 sont aussi impliquées dans les phénomènes d'arthrose traumatique.
- 6- Vérifier l'impact des cytokines pro-inflammatoires sur les molécules Reg I, EXTL3 et la voie de l'inflammation.
- 7- Générer des mutants de délétion des gènes Reg I et EXTL3 pour déterminer les domaines essentiels à la signalisation de chacune de ces molécules.
- 8- Vérifier l'impact de certains inhibiteurs sur la signalisation des gènes Reg I et EXTL3.

CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Plan de cette étude

La présente étude visait à identifier et à caractériser le facteur de croissance Reg I et de son récepteur EXTL3 dans la pathogenèse de l'arthrose.

Dans le but de déterminer quels domaines des molécules Reg I et EXTL3 étaient essentiels à la signalisation engendrée par la liaison de ces deux molécules, nous avons générés des mutants de délétion de chacune de ces molécules. Par l'entremise d'essais en transfections transitoires, nous avons tenté de déterminer la fonction de Reg I, le prototype de la famille, mais aussi d'établir un profil fonctionnel des mutants de Reg I ainsi que des mutants d'EXTL3, le récepteur de Reg.

L'utilisation de lignées cellulaires, d'échantillons de patients arthrosiques et de différents modèles animaux, nous a permis de montrer que la protéine Reg I joue un rôle important dans la fibrillation du cartilage articulaire et que sa signalisation était intimement liée dans le processus inflammatoire lié à l'arthrose.

2.2 Matériel

2.2.1. Les souris Pitx1 +/-

Les souris Pitx1 +/- et -/- ont été générées initialement par l'équipe du Dr. Jacques Drouin (IRCM) (Lanctôt 1999).

2.2.2. Les lignées cellulaires

Dans le cadre de cette étude portant sur la structure et la fonction de la protéine Reg I et de son récepteur EXTL3, plusieurs lignées cellulaires ont été étudiées et utilisées dans le cadre de transfections transitoires ou de coloration. Les lignées cellulaires utilisées et leur provenance sont présentées dans le **Tableau V**.

Tableau V. Lignées cellulaires utilisées et origine de chacune

Lignée cellulaire	Origine	Milieu de culture
MC3T3-E1	Ostéoblastes de souris	α MEM + 10% FBS
HEK 293	Cellules de reins humains	DMEM+ 10% FBS
208F Pires Puro	Fibroblastes de rat	DMEM+ 10% FBS

2.2.3 Caractéristiques cliniques des patients arthrosiques (OA) et sains (N)

Les analyses moléculaires ont été effectuées à partir de chondrocytes articulaires de sections de cartilage provenant de patients. Dans le cas des patients arthrosiques (OA), le cartilage articulaire a été prélevé lors d'un remplacement de l'articulation du genou ou de la hanche. Les patients avaient été diagnostiqués arthrosiques selon des critères pré-établis par les médecins traitants. Les échantillons de patients sains (N) ont été prélevés post-mortem et ceux-ci ont été sélectionnés en fonction de l'âge et du sexe des patients pour les fins de cette étude. Dans tous les cas, les patients et les sujets sains recrutés l'ont été suite à un consentement éclairé obtenu en vertu des approbations des Comités d'Éthique de l'Hôpital Ste-Justine et du CHUM/ Campus Notre-Dame.

2.3 Méthodes

2.3.1 Culture primaire de chondrocytes provenant de cartilage articulaire humain

Suite aux prélèvements effectués sur des patients arthrosiques (OA) lors de chirurgie ou chez les patients sains (N), le cartilage arthrosique a été digéré pendant 1 heure dans du milieu de culture Dubelco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Invitrogen Burlington, ON, Canada) contenant de la pronase 1mg/mL (Sigma-Aldrich), ainsi qu'un mélange de pénicilline à 100 U/mL et de streptomycine 100 μ g/mL (PEN/STREP 1%; Invitrogen, Canada). Suite à cette première digestion, le tissu est soumis à une deuxième digestion pendant 6 heures à 37°C dans une solution de collagénase à 2 mg/mL (Type IA; Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada).

Les cellules sont par la suite récupérées par filtration, à l'aide d'un tamis de 70 μM , suivi d'une centrifugation et sont par la suite mises en culture à haute densité (2×10^6 cellules/ 25cm^2) jusqu'à confluence dans du milieu DMEM supplémenté de sérum bovin fœtal (FBS 10%) et de PEN/STREP 1%. Les cellules sont maintenues dans un environnement humide à 37°C et à 5% de CO_2 pour favoriser leur croissance et ne sont utilisées qu'à leur premier passage (P-1).

2.3.2 Culture des lignées cellulaires

Les différentes lignées cellulaires utilisées dans le cadre de cette étude ont été cultivées dans leur milieu respectif (Tableau V) supplémenté de sérum bovin fœtal dans un environnement humide à 37°C et à 5% de CO_2 pour favoriser leur croissance.

2.3.3 Histologie sur sections de souris Pitx1

Les coupes de fémurs non-décalcifiés d'embryons de souris Pitx1 +/- et de type sauvage âgées de 7 mois ont été fixées dans du paraformaldéhyde 4% pendant 24 heures et déshydratées progressivement dans des bains d'éthanol. Les tissus fixés ont été enrobés dans du méthylmétacrylate (MMA), coupés au microtome (Leica SM2500) à une épaisseur de 5 μ . Par la suite, les extrémités distales des fémurs droits de souris Pitx1 +/- et de souris contrôles 129/Sv ont été soumises à la coloration de Goldner. Cette coloration permet de colorer les tissus calcifiés et les os en vert alors que la coloration rouge correspond au cartilage et à la moëlle osseuse.

2.3.4 Immunohistochimie

2.3.4.1 Immunohistochimie de cartilage articulaire humain

Les expériences d'immunohistochimie ont été effectuées sur des sections paraffinées de cartilage articulaire avec des anticorps réagissant aux protéines Reg I humaines (Dr. Wiseman, New York State University). Les échantillons de patients arthrosiques sont associés à des échantillons de patients normaux d'âge et de sexe appariés.

2.3.4.2 Immunohistochimie de cartilage articulaire de lapins

Les expériences d'immunohistochimie ont été effectuées sur des sections paraffinées de cartilage articulaire avec des anticorps (Dr. Wiseman, New York State University) réagissant aux protéines Reg I humaines, de rat et de lapins. Quatre animaux ont été utilisés soit deux lapins normaux et deux lapins ayant subi chirurgicalement une minésectomie. Les animaux ont été sacrifiés 8 semaines post-opération. Le grossissement observé est 83X.

2.3.5 Extraction d'ARN

2.3.5.1 À partir de chondrocytes articulaires de patients

Lorsque les chondrocytes articulaires isolés chez les patients arthrosiques atteignent la confluence, ils sont récoltés pour en extraire l'ARN. L'ARN total a été extrait des cellules préalablement traitées par la méthode au GTC, guanidium thiocyanate-phénol-chloroforme en utilisant le réactif *Trizol* (*Invitrogen*). L'ARN est par la suite précipité dans l'isopropanol, lavé avec de l'éthanol 70%, séché à l'air et récupéré dans de l'eau DEPC. La transcription inverse du produit isolé est réalisée avec 4 µg d'ARN.

2.3.5.2 À partir des souris Pitx1

Dans le cadre de l'extraction de l'ARN des membres inférieurs des souris Pitx1, le protocole d'extraction demeure le même mais les os isolés sont d'abord submergés dans une solution d'ARN ES, puis broyés sur glace à l'aide du polytron (Kinematica, PT 1300D) (3000 rpm X 2 minutes). Cet homogénat d'os est alors traité tel que mentionné dans la section 2.3.5.1.

2.3.6 Analyse d'expression génique

2.3.6.1 À partir d'ARN de chondrocytes articulaires

L'analyse d'expression génique a été produite à partir de chondrocytes articulaires de patients arthrosiques. Le RT-PCR semi-quantitatif est effectué à partir de 4 µg d'ARN isolé et est transcrit en ADN complémentaire en utilisant les oligos (dT) à 100 pmoles et 15 U/µl d'enzyme Thermoscript RT (Thermoscript TM Kit RT-PCR, Invitrogen). L'ADN complémentaire est alors amplifié avec les amorces spécifiques (Voir Tableau VI) et la taille des fragments obtenus est évaluée sur gel d'agarose après une coloration au bromure d'éthidium.

Tableau VI. Amorces utilisées pour l'amplification de gènes humains à partir de chondrocytes articulaires de patients

Gène	Amorce Sens	Amorce Anti-Sens	Taille (pb)	Conditions de PCR
Pitx1	5'-CCCACCTCCATGGACGCCTT-3'	5'-GTCAGCTGTTGTACTGGCACGC-3'	960	94°/45s, 70°/45s, 68°/1,2 min Pfx
PARP-1	5'-CATCCCTGGCCAAATAC-3'	5'-CCTGGTGCTGCTGGG-3'	724	94°/45s, 55°/45s, 72°/1,2 min Taq
Reg 1	5'-CCGCTAAGCATGGCTCAGAC-3'	5'-CAGCTTCCTCTAGTTTTTAAC-3'	550	94°/45s, 65°/45s, 68°/1 min Pfx
EXTL3	5'-CATGACAGGCTATATACCATGCTGC-3'	5'-GCTGCCCTAGATGAACTTGAA-3'	2700	94°/45s, 60°/45s, 68°/3 min Pfx
β-Actine	5'-GGAAATCGTGCGTGACAT-3'	5'TCATGATGGAGTTGAAGGTAGTI-3'	233	94°/45s, 55°/45s, 72°/1min Taq

Pfx : Platinum Pfx DNA polymérase (Invitrogen), Taq : Taq DNA polymérase (Invitrogen). Les trois température correspondent aux étapes de dénaturation, d'appariement et d'extension respectivement. Tous les échantillons ont été soumis à 35 cycles d'amplification.

2.3.6.2 Les souris Pitx1

Les analyses d'expression génique sur les souris Pitx1 ont été effectuées à la fois sur des souris de type hétérozygote et de type knock-out à des périodes de pré et post ossification, soit 13.5 jours et 18.5 jours de vie embryonnaire. Voir section 2.3.6.1 pour le protocole. Les conditions de PCR et les amorces utilisées sont présente dans le Tableau VII.

Tableau VII. Amorces utilisées pour l'amplification de gènes de souris à partir de l'ARN provenant des souris Pitx1 hétérozygotes et knock-out.

	Amorce Sens	Amorce Anti-Sens	Taille (pb)	Conditions de PCR
EXT1	5'-CGAATTCATGCAGGCCAAAAA-3'	5'-CTAGACTCAAAGTCGTTCAATGT-3'	2237	94°/45s, 58°/1min, 68°/2,5 min Pfx
EXT2	5'-ATGTGTGCGTCAGTCAAGTCC-3'	5'-GCAAGCTTCATAAGCTGCCAT-3'	2700	94°/45s, 58°/1min, 68°/2,5min Pfx
EXTL1	5'-CATGCTGTGGAGAAGAAAGTC-3'	5'-CCTCGCCTATGGCTTCTCT-3'	2016	94°/45s, 58°/1min, 68°/2,5min Pfx
EXTL3	5'-GAGCTACCTGGACCCTTTG-3'	5'-CCGCTTAACTGGCACCT-3'	480	94°/45s, 60°/45s, 68°/3min Pfx
Reg I	5'-CTGCTCAGCATGGCTAGGAAC-3'	5'-CAGGTGACTTCAGCCTTTGAAC-3'	550	94°/45s, 65°/45s, 68°/1min Pfx
Reg II	5'-ATGGCTCAGAACAATGTATAC-3'	5'-CAGGTGACTTTAGGCTCTGAAC-3'	520	94°/45s, 58°/1min, 68°/1 min Pfx

Pfx : Platinum *Pfx* DNA polymérase (Invitrogen), Taq : Taq DNA polymérase (Invitrogen). Les trois température correspondent aux étapes de dénaturation, d'appariement et d'extension respectivement. Tous les échantillons ont été soumis à 35 cycles d'amplification.

2.3.6.3 MC3T3-E1

L'analyse d'expression génique des cellules MC3T3-E1 et des cellules MC3T3-E1 transfectées avec un vecteur et avec le vecteur Pitx1 a été effectué de façon conforme à la méthode présentée à la section. 2.3.6.1. Les conditions de PCR et les amorces utilisées sont présentées dans le **Tableau VIII**.

Tableau VIII. Amorces utilisées pour l'amplification de gènes de souris à partir de cellules MC3T3-E1.

Gène	Amorce Sens	Amorce Anti-Sens	Taille (pb)	Conditions de PCR
Pitx1	5'-CCCACCTCCATGGACGCCTT-3'	5'-GTCAGCTGTTGTTACTGGCAAGCGT-3'	960	94°/45s, 70°/45s, 68°/1,2min Pfx
Pitx2	5'-CGCGGGGATCCGAGGACTG-3'	5'-AACACAGGATGGGTCGTACATAGC-3'	563	94°/45s, 70°/45s, 68°/1,2min Pfx
Reg I	5'-TCGTGGCTACTGTGTATCTCTG-3'	5'-CAGGTGACTTCAGCCTTTGAAC-3'	505	94°/45s, 65°/45s, 68°/1min Pfx
Reg II	5'-CAGGTGACTTTAGGCTCTGAA-3'	5'-CATGGCTCAGAACAATGTATACCT-3'	520	94°/45s, 58°/1min, 68°/1min Pfx
EXTL3	5'-GAGCTACCTGGACCCTTTG-3'	5'-CCGCTTAACTGGCACCT-3'	480	94°/45s, 60°/45s, 68°/3min Pfx
PARP-1	5'-AGGCCCTAAAGGCTCAGAAT-3'	5'-CCTTTAACTTCTTGAGGTAGGTAG-3'	3083	94°/45s, 55°/45s, 72°/1,2min Taq
GAPDH	5'-CACCATGGAGAAGGCCGGGG-3'	5'-GACGGACACATTGGGGGTAG-3'	418	94°/45s, 65°/30s, 72°/1min Taq
β-Actine	5'-GGAAATCGTGCGTGACAT-3'	5'TCATGATGGAATTGAATGTAGTT-3'	233	94°/45s, 55°/45s, 72°/1min Taq

Pfx : Platinum *Pfx* DNA polymérase (Invitrogen), Taq : Taq DNA polymérase (Invitrogen). Les trois température correspondent aux étapes de dénaturation, d'appariement et d'extension respectivement. Tous les échantillons ont été soumis à 35 cycles d'amplification.

2.3.7 Transfections transitoires de lignée cellulaires

Toutes les transfections présentées dans le cadre de cette étude ont été effectuées par la méthode au phosphate de calcium. 150 000 cellules sont mises en culture dans des plaques de 6 puits, 24 heures avant la transfection. Les différents ADN plamidiqes à transférer sont incubés en présence de tampon HBS (NaCl 280 mM, KCl 10 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, Dextrose 12 mM, HEPES 50 mM, pH=7.05), de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) et de CaCl₂ 2M et ce mélange est ajouté aux cellules adhérentes. Le rapporteur utilisé lors des lectures est un rapporteur NF- κ B couplé à la luciférase (NF- κ B3X-Luc, Invitrogen) et l'efficacité de transfection est mesurée par l'expression du gène de la β -galactosidase (pcmvB-gal, Clontech).

2.3.8 La protéine Reg I

2.3.8.1 Clonage du gène Reg murin dans le vecteur d'expression pFlagMac

Les 550 nucléotides codant pour la séquence de la protéine RegI (Genebank # 6677702) chez la souris ont été introduit dans le vecteur pFlagMac (Sigma) entre les sites de restriction HindIII et XhoI. Ce vecteur conduit à la production de la protéine Reg I en fusion avec l'étiquette moléculaire FLAG (5'-GACTACAAGGACGAT-3') qui permet de distinguer la protéine FlagReg I recombinante de la forme endogène. L'introduction du gène codant pour la protéine Reg dans ce vecteur nous a permis de produire et purifier de la protéine Reg I recombinante produite chez *E. Coli* DE3 (BLZ1).

2.3.8.2 Production de la protéine Reg I

Dans le but de produire la protéine Reg I, 200 mL de bouillon LB (Difco LB Broth, Miller, BD) est ensemencé avec un échantillon du produit congelé pFlagMac-Reg I contenu dans des bactéries DE-3. Le mélange ajouté de 100 ug/mL d'ampicilline est incubé à 37° pendant une nuit, sous agitation constante de 200 rpm.

Le lendemain, un échantillon de 40 mL de bouillon LB contenant les bactéries est encensé dans 400 mL de bouillon LB frais contenant aussi 100 µg/mL d'ampicilline et aussi 100 nM d'IPTG. Ce nouveau milieu est incubé environ 4 heures toujours à 37°C sous agitation.

Après l'incubation, le milieu contenant les bactéries fraîches est centrifugé 10 minutes à 5000 rpm à 4°C. Afin d'extraire les protéines, le culot est additionné de 5 mL de Solution A (50 mM Tris-HCl pH8.0, 0.5 mM EDTA), de 0,25 mg/mL de lysozyme et 50 µg/mL de sodium azide et incubé 5 minutes à la température. Par la suite, le culot est ré-incubé dans une deuxième solution contenant 0,5 mL de la Solution B (1.5 M NaCl, 0.1 M CaCl₂, 0.1 M MgCl₂) additionné de 0,02 mg/mL de DNaseI. Après l'incubation de ce nouveau mélange pendant 5 minutes additionnelles, le mélange est recentrifugé 1 heure à 7000 rpm. Le surnageant est alors récupéré et placé dans une colonne contenant la résine (Anti-flag M2 Agarose Affinity Gel, Sigma, MO, USA). La colonne contenant la résine et le surnageant est placé sur l'agitateur à 4°C toute la nuit. Les protéines sont éluées par la solution de glycine 0.1M pH=3.0 et la glycine est neutralisée par l'addition de 1M Tris-HCl pH=8.0. La production de la protéine est alors confirmée sur un immunobuvardage de type Western en utilisant l'anticorps anti-Flag à une dilution de (1:4000).

2.3.9. Génération et clonage des mutants de délétion de Reg I.

L'amplification par PCR du gène Reg I murin en présence des oligos du **Tableau IX** a permis de générer les formes mutantes du gène Reg I. **Voir Figure 23**. La réaction de départ nécessite 30 ng de plasmide. L'ajout de sites de restriction à l'intérieur de ces oligos a facilité le clonage du gène Reg I dans le vecteur pCi (pCi Mammalian Expression Vector, Promega, WI, USA). Une fois le produit de PCR obtenu, celui-ci est visualisé sur gel d'agarose 1% et les bandes d'agarose contenant les produits d'intérêts sont prélevées. Le produit de PCR isolé est purifié de l'agarose par la méthode de *QIAquick Gel extraction kit* (Qiagen) de façon conforme au protocole suggéré. Les produits de PCR ainsi que le vecteur pCI ont été digérés de deux façons différentes pour y introduire les mutants de délétion du gène Reg I soit avec les enzymes NheI et Sall pour le mutant Δ4 et les enzymes NheI et EcoRI pour les mutants Δ7 et Δ8.

Dans chacun des cas, les digestions ont été effectuées de façon successives dans les tampons respectifs à 37°C. Une fois les digestions effectuées, tous les produits ont été remis sur un gel d'agarose 1% et les bandes ont par la suite été prélevées et repurifiées par la méthode *QIAquick Gel extraction kit* (Qiagen). Par la suite, les différents mutants purifiés ont été ligués dans le vecteur pCI en présence d'ATP 1 mM et de l'enzyme ligase T4 (Invitrogen) ainsi que dans les conditions de tampon recommandées par le fabricant. Les produits de ces ligations ont été incubés à 14 °C overnight. Le vecteur pCI contenant les nouveaux mutants Reg ($\Delta 4$, $\Delta 7$ et $\Delta 8$) ont été transformés dans la souche bactérienne *E. Coli* DH5- α .

Tableau IX : Description des amorces utilisées par PCR et taille des fragments générés.

Identité du mutant	Amorce Sens	Amorce Anti-sens	Taille (pb)
$\Delta 4$	(NheI)5' ATATGCTAGCATGGCTAGGAACGCC3'	(SalI)5' ATATGTCGACACTGCTCCAGTGCCA'3	339
$\Delta 7$	(NheI)5' ATATGCTAGCATGGCTAGGAACGCC3'	(EcoRI)5' ATATGAATTCAGCCCAAGTTAAACG'3	168
$\Delta 8$	(NheI)5' ATATGCTAGCATGGCTAGGAACGCC3'	(EcoRI)5' ATATGAATTCTGGGCAACTGATCCT'3	105

Conditions de PCR : 94°/ 45s ,55°/ 45s, 68°/ 2 min . Taq Hifi

HiFi : Platimun Taq DN polymerase High Fidelity. La réaction de PCR a été effectuée sur 35 cycles.

2.3.10 Génération des mutants EXTL3

Les mutants de délétion du gène EXTL3 ont été générés par PCR puis clonés dans le vecteur pCI suivant les mêmes étapes que dans la section 2.3.9. Voir Figure 24. Les amorces et les enzymes utilisées ainsi que les conditions de PCR sont présentées dans le Tableau X.

Tableau X. Description des amorces utilisées par PCR et taille des fragments générés pour les mutants d'EXTL3.

Identité du mutant	Amorce Sens	Amorce Anti-sens
2,7 kB	(XhoI) 5'-ATATGCTAGCATGACAGGCTATACC-3'	(XbaI)5'-ATATGAATTCCTGCCCCTAGATGAC-3'
2,3 kB	(XhoI) 5'-ATATGATAGCCAGACCGAGCCTTCC-3'	(XbaI)5'-ATATGAATTCCTGCCCCTAGATGAC-3'
1,6 kB	(XhoI) 5'-ATATGCTAGCATGACAGGCTATACC-3'	(XbaI)5'-ATATGAATTCCTGGATGCGAGTCCT-3'
1,2 kB	(XhoI) 5'-ATATGATAGCCAGACCGAGCCTTCC-3'	(XbaI)5'-ATATGAATTCGCTGCGAGTCCTAAT-3'

Conditions de PCR : 94°/ 45s, 60°/ 45s, 68°/ 3 min, Pfx

Pfx : Platinum Pfx DNA polymérase (Invitrogen). La réaction de PCR a été effectuée sur 35 cycles.

2.4 Méthodes statistiques

Les expériences de transfusions transitoires ont été soumises à des tests statistiques dans le but de vérifier leur validité. Étant donné que le nombre d'échantillons dans chaque groupe se limite à trois, nous avons été obligé d'utiliser le test de Mann-Whitney car les données comparées sont non-paramétriques. Puisqu'il s'agit d'un test de rang, la valeur statistique est dans de très nombreux cas très similaire car elle est directement associée au nombre d'échantillon et au rang de ceux-ci. Dans le but d'améliorer les valeurs statistiques, le nombre d'échantillons devra être augmenté. De plus, dans certains cas, le test de Kruskal-Wallis a aussi été effectué et permet de valider l'ensemble d'une expérience. Dans tous les cas, la valeur statistique acceptable a été fixée à $p \leq 0,05$.

CHAPITRE 3 RÉSULTATS

3.1 La souris *Pitx1* hétérozygote

3.1.1 Analyse phénotypique des souris *Pitx1* +/-

Le modèle des souris *Pitx1* +/- a été produit dans le cadre d'une étude antérieure portant sur le développement des membres inférieurs. À la naissance, les souris *Pitx1* hétérozygotes semblent normales alors que les souris knock-out (ko) ne sont pas viables et meurent dû à leur incapacité à têter causée par une sévère hypoplasie bilatérale de la mandibule. Par contre, lorsque les souris *Pitx1* hétérozygotes vieillissent, il est facile de noter qu'elles ont de la difficulté à se déplacer. La comparaison des membres inférieurs des souris de type sauvage et des souris hétérozygotes a révélé une contraction inhabituelle des pattes arrières et une restriction dans le mouvement avant-arrière de ces mêmes pattes alors que la souris de type sauvage (wt), au même âge, ne présente pas ces anomalies. Le phénotype des souris *Pitx1* +/- âgées de 7 mois ressemble en plusieurs points aux traits caractéristiques de l'arthrose chez l'humain (**Figure 10**).

Dans le but de découvrir quelle était la cause des problèmes de mobilité des souris *Pitx1* +/-, nous avons procédé à des analyses radiologiques, histologiques et immunologiques des souris *Pitx1* +/- et des souris de type sauvage (wt). Tout d'abord, l'analyse radiologique a révélé une augmentation de la calcification aux articulations des membres inférieurs chez les individus hétérozygotes (**Figure 11**). L'augmentation de la calcification est jugée en fonction de l'intensité représentée par la couleur blanche sur la radiographie. Les souris *Pitx1* +/- subissent une augmentation de la calcification d'un côté plus que l'autre mais la calcification ne semble pas se retrouver d'un côté préférentiellement chez plusieurs souris *Pitx1* +/- (autant du côté gauche que du côté droit) tel que présenté à la **Figure 11**. L'augmentation de la calcification peut se retrouver à la fois au niveau des genoux, du bassin ou de la hanche. On peut aussi noter que chez les souris hétérozygotes, il y a apparition d'une scoliose secondaire possiblement causée par un mauvais alignement du bassin qui engendre une rotation anormale de celui-ci. De tous les cas observés, les souris de type sauvage (wt) ne présentaient jamais une augmentation de la calcification articulaire à 7 mois ni de scoliose secondaire.



Figure 10. Apparition de signes cliniques de l'arthrose chez les souris Pitx1 hétérozygotes.

Chez les souris Pitx1 hétérozygotes (+/-), les souris âgées de 7 mois, présentent une déformation des pattes inférieures ainsi qu'une plus grande rigidité dans le mouvement avant-arrière. Ces deux anomalies sont des signes cliniques fréquemment observés chez les patients humains souffrant d'arthrose.

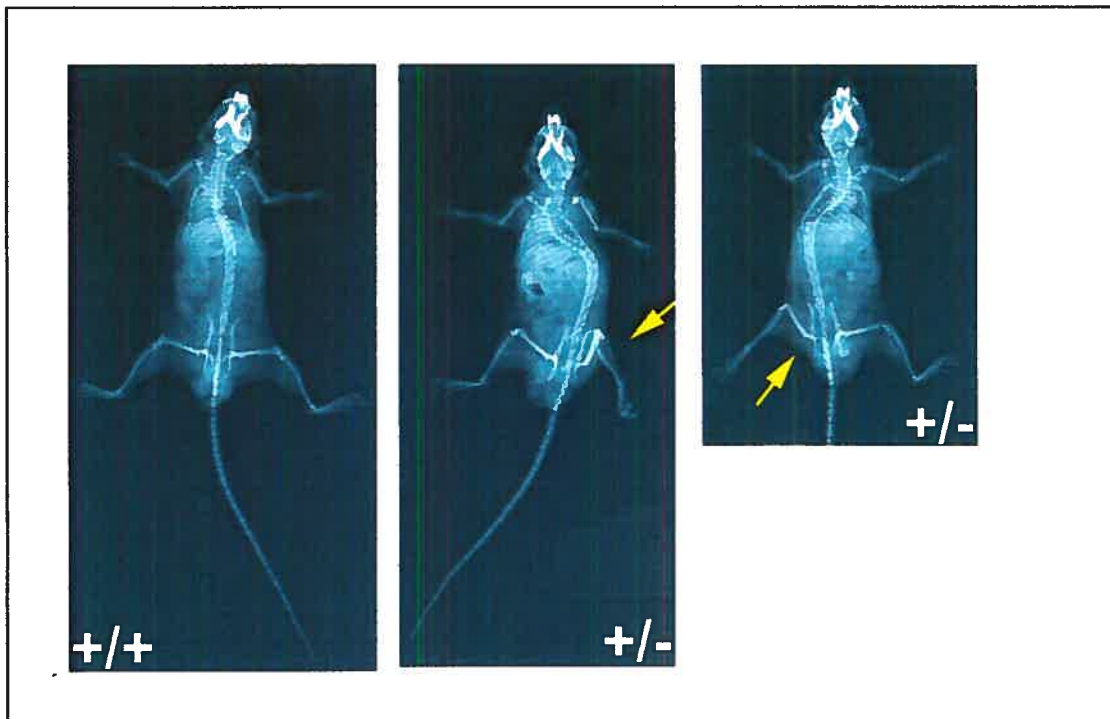


Figure 11. Examen radiologique des souris Pitx1 hétérozygotes.

À partir des images obtenues par radiographies (Faxitron MX20, USA) nous avons pu noter une augmentation de la calcification dans les articulations du bassin et des genoux chez les souris Pitx1 hétérozygotes (+/-). C'est l'augmentation de l'opacité blanche qui nous permet de dire que la calcification est supérieure chez les souris hétérozygotes Pitx1 comparés aux souris de type sauvage où on ne peut pas noter d'augmentation de calcification chez les souris du même âge. Les flèches jaunes sur les figures démontrent le côté où la souris est la plus affectée.

3.1.2 Analyse histologique des souris Pitx1 +/-

Dans le but de déterminer si les difficultés de déplacement des souris Pitx1 +/- pouvaient être secondaire à un problème au niveau de l'articulation et plus particulièrement au niveau du cartilage articulaire, des analyses histologiques ont été effectuées sur des sections de la tête fémorale de ces mêmes trois souris. La coloration au trichrome de Goldner permet de colorer en vert les os et tous les tissus calcifiés ce qui nous permet de les distinguer du cartilage, des tissus non-minéralisés et des cellules sanguines qui apparaissent en rouge. L'observation du grossissement 20X permet de voir les changements au niveau de l'articulation des souris hétérozygotes lorsqu'on les compare au type sauvage (+/+) (**Figure 12**). En effet, on observe facilement que le cartilage n'est pas d'épaisseur uniforme chez les deux souris hétérozygotes représentées ici et qu'en plus, on peut noter la présence de calcification au sein du cartilage, phénomène qui est tout à fait anormal chez une souris saine. Chez la souris hétérozygote, on observe même un début d'érosion et à certains endroits il y a une perte de cartilage. Les différences entre les souris hétérozygotes et la souris de type sauvage sont faciles à remarquer puisque la souris de type sauvage a un cartilage sain, sans présence de calcification, et il est d'une épaisseur continue tout le long de la section.

L'observation de l'ensemble de la tête fémorale droite des souris hétérozygotes et de la souris de type sauvage colorées au trichrome de Goldner permet de voir que dans le cas des souris Pitx1 hétérozygotes, il a une augmentation de l'os sous-chondral, de l'os trabéculaire ainsi que de l'os cortical (**Figure 13**). De plus, certaines coupes histologiques révélaient la présence d'une exostose. Tel que mentionné dans la **section 1.6.2**, les exostoses se manifestent par la présence d'une masse cartilagineuse habituellement près de la plaque de croissance. Dans les cas des souris Pitx1 hétérozygotes, les exostoses se situaient dans la région intra-articulaire ce qui est possible mais assez peu fréquent dans les exostoses humaines. Néanmoins, la présence de ces exostoses nous a permis d'orienter nos recherches vers les gènes de la famille EXT qui sont connus pour causer ce genre de tumeurs bénignes.

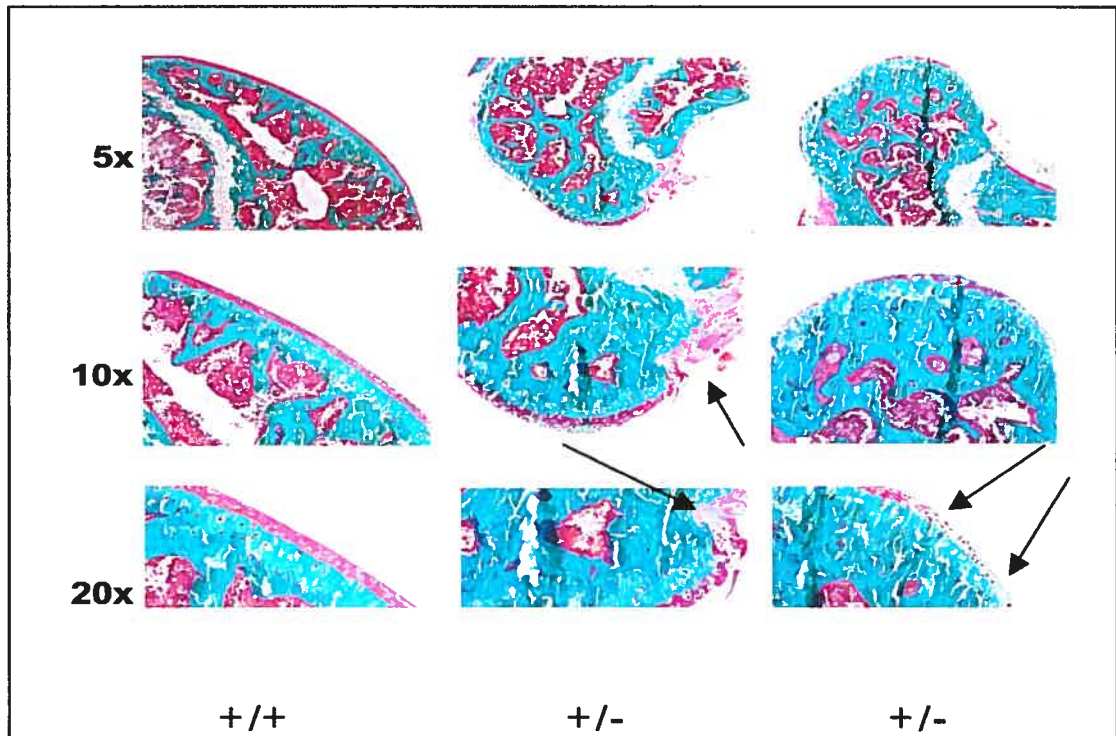


Figure 12. Coloration de Goldner sur des sections de fémurs de souris Pitx1 et de type sauvage.

Les colorations au trichrome de Goldner ont été effectuées aux extrémités distales des fémurs droits des souris de type sauvage et Pitx1 hétérozygotes âgées de 7 mois. Les sections histologiques ont été colorées par la méthode au trichrome de Goldner. Suite à cette coloration, l'os et les tissus calcifiés apparaissent en vert alors que le cartilage et la moëlle osseuse apparaissent en rouge. Le grossissement est indiqué à gauche de la figure. C'est l'observation du grossissement 20X qui permet de dénoter les différents changements affligeant le cartilage des souris Pitx1 hétérozygotes. À ce grossissement, on peut apercevoir du tissu calcifié dans le cartilage. On peut aussi noter que le cartilage n'est pas d'épaisseur uniforme et est à plusieurs endroits dégradé. Ces phénomènes sont observés dans les deux souris Pitx1 hétérozygotes alors que le cartilage est tout à fait normal chez la souris de type sauvage du même âge.

3.1.3 Analyse d'expression génique des souris Pitx1 $+/+$ et Pitx1 $-/-$.

Les analyses d'expression génique ont été effectuées par RT-PCR, en ciblant particulièrement les gènes de la famille EXT car des mutations dans les gènes EXT1 et EXT2 peuvent entraîner la formation de tumeur cartilagineuse tel que retrouvé sur les sections de têtes fémorales de souris Pitx1 $+/-$. L'expression des gènes EXT1, EXT2, EXTL1, EXTL3 a été comparée chez les souris de type sauvage (wt) et chez les souris de type knock-out (ko) à deux stades différents soit à : 13.5 et 18.5 jours de vie embryonnaire, ce qui correspond à la période de pré-ossification et post-ossification car celle-ci survient à 15.5 jours de vie embryonnaire chez la souris. Les résultats obtenus démontrent que l'expression des gènes EXT1, EXT2 et EXTL1 ne varie ni selon le génotype de la souris ni selon la période de vie embryonnaire. Par contre, on voit facilement sur la **Figure 14**, chez la souris de type knock-out (ko), que l'expression du gène EXTL3 est beaucoup plus importante et ce, que ce soit avant ou après l'ossification. Par contre, la souris Pitx1 $+/-$ n'exprime presque pas, ni avant, ni après l'ossification, le gène EXTL3.

Lors de l'analyse d'expression des gènes de la famille EXT chez les souris Pitx1, le profil d'expression du gène EXTL3 semblait nettement différent des autres membres de la famille EXT. Au même moment, la littérature scientifique révéla que le gène EXTL3 codait en fait pour le récepteur membranaire de la protéine Reg I (Kobayashi 2000). Les membres Reg I et Reg II ont donc été ajoutés à l'analyse d'expression et nous avons découvert que l'expression du gène Reg I était également augmentée à la fois selon le génotype de la souris et selon le moment du développement embryonnaire. En effet, la souris de type knock-out (ko) exprime plus fortement le gène Reg I que la souris de type sauvage à 13.5 jours de vie embryonnaire mais l'expression demeure la même à 18.5 jours de vie embryonnaire, chez la souris de type sauvage et la souris de type Pitx1 knock-out (ko). L'expression du gène Reg II était aussi légèrement augmentée chez les souris Pitx1 knock-out mais l'augmentation était tout de même moins importante que dans le cas du gène Reg I ou de son récepteur EXTL3.

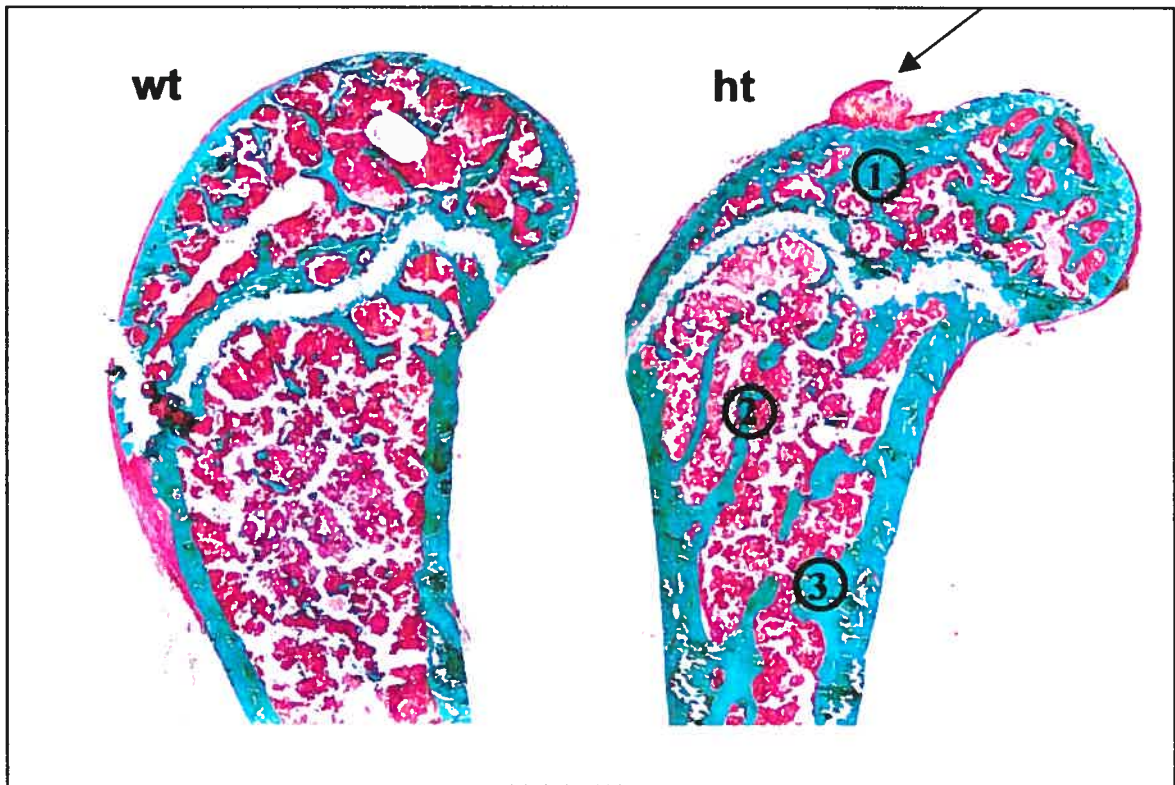


Figure 13. Comparaison de coupes histologiques de têtes fémorales de souris Pitx1 +/- et de type sauvage.

Les sections histologiques effectuées sur les têtes fémorales des souris Pitx1 hétérozygotes ont montré des différences notables comparées aux sections effectuées sur les souris de type sauvage. En effet, on peut noter une augmentation de l'os sous-chondral (1), de l'os trabéculaire (2) ainsi que de l'os cortical (3) chez les souris hétérozygotes. L'observation de plusieurs têtes fémorales colorées révélait la présence d'une exostose au dessus de la tête fémorale.

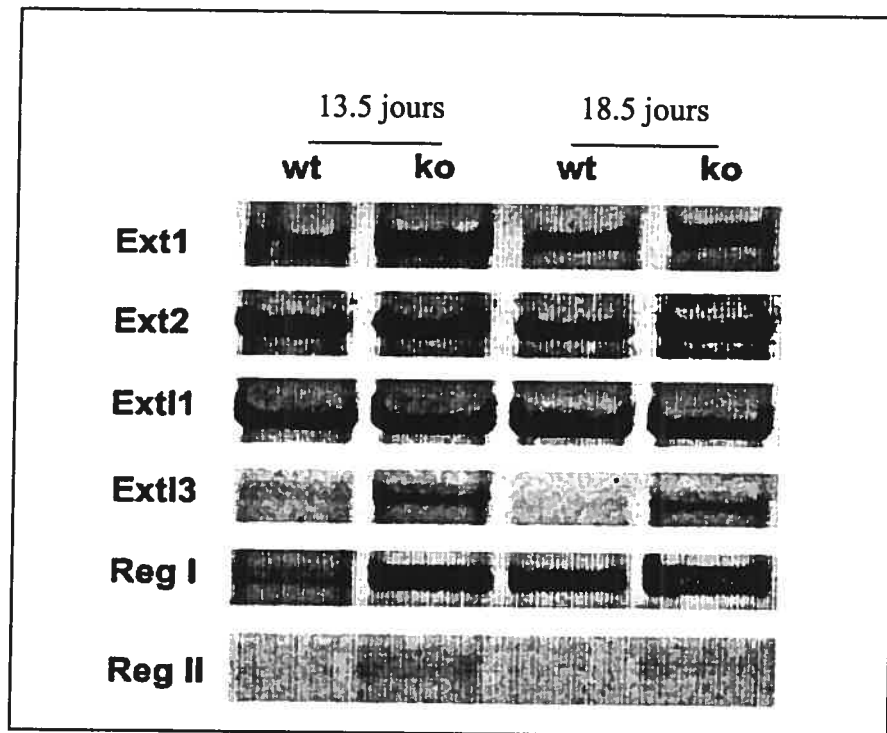


Figure 14. Expression des gènes de la famille EXT et Reg chez les souris normales et Pitx1 $-/-$.

L'expression des gènes codant pour les exostoses, EXT1 et EXT2, a été quantifiée par RT-PCR chez la souris de type sauvage et la souris knock-out pour Pitx1 à 13.5 et 18.5 jours de vie embryonnaire. L'expression de ces 3 gènes demeure inchangée selon le génotype de l'animal et le temps. En ce qui a trait au profil d'expression du gène EXTL3, on peut noter que ce gène est surexprimé par rapport à la souris de type sauvage. Étant donné qu'il est connu que EXTL3 code en fait pour le récepteur de protéine Reg I, nous avons quantifié les profils d'expression des gènes Reg I et Reg II. Après l'amplification des fragments par PCR, ceux-ci ont été séparés sur gel d'agarose 1% puis révélés à l'aide du bromure d'éthidium.

3.2 Analyse d'expression à partir des cellules MC3T3-E1.

3.2.1 Impact des expériences de gain de fonction de Pitx1 dans la lignée cellulaire MC3T3-E1

Suite à l'observation de la diminution du cartilage articulaire chez les souris Pitx1 $-/-$ et les résultats des expériences d'analyse d'expression génique chez les souris Pitx1 $+/+$ et Pitx1 $-/-$, nous avons voulu confirmer que la perte d'expression de Pitx1 entraînait la sur-expression de la molécule Reg I et d'EXTL3 chez les humains et dans divers phénomènes d'inflammation. Par l'entremise d'expériences en transfections stables sur des cellules MC3T3-E1, l'expression de chacun des gènes étudiés a été vérifiée. Le choix de la lignée cellulaire était justifié par le fait que l'os est un tissu atteint dans l'arthrose et chez les souris Pitx1 $+/-$.

La **Figure 15** présente les résultats de l'expérience de gain de fonction du gène Pitx1 effectuée par transfection stable sur des cellules MC3T3-E1. Dans trois conditions différentes, nous avons vérifié l'expression des gènes Pitx1, Pitx2, Reg I, Reg II et EXTL3 par des analyses de RT-PCR. L'ajout du vecteur vide entraîne curieusement, la perte d'expression du gène EXTL3. Il est concevable que le promoteur CMV puisse séquestrer des facteurs de transcription essentiels à l'expression d'EXTL3. La sur-expression de Pitx1 n'affecte en rien l'expression de Pitx2 mais entraîne la perte d'expression des gènes Reg I et Reg II. Étant donné que le vecteur vide entraînait déjà la perte d'expression d'EXTL3, nous ne pouvons pas conclure que la sur-expression de Pitx1 entraîne la perte d'expression de EXTL3. Afin de s'assurer que l'expression d'EXTL3 est liée à Pitx1, il serait nécessaire de refaire cette expérience en utilisant un autre vecteur tel que pSI qui contient un promoteur SV40.

Il devient donc évident à partir de ce moment que les molécules Pitx1 et Reg I sont inter-reliées car la perte d'expression de Pitx1 *in vivo* (**Figure 14**) entraîne la surexpression du gène Reg I alors que le gain d'expression de Pitx1 (**Figure 15**) entraîne plutôt la perte d'expression de celui-ci.

3.2.2 La perte de Pitx1 entraînerait-elle la sur-expression de PARP-1, un régulateur transcriptionnel connu de Reg I?

Les résultats précédents ont démontrés que la sur-expression de Pitx1 entraînait une perte d'expression des gènes Reg I et du gène Reg II. Nous avons vérifié si la modulation de l'expression du gène Reg I par le facteur de transcription était secondaire à des modifications de l'expression de la molécule PARP-1 étant donné que cette molécule est connue pour être un activateur transcriptionnel du gène Reg I (Okamoto 2002).

Tout comme dans les figures précédentes, les expériences de perte et de gain de fonction ont été effectuées. La **Figure 16** présente les résultats de l'expérience de perte de fonction où on voit facilement l'augmentation d'expression du gène PARP-1 en fonction du niveau d'expression de Pitx1. La **Figure 17** présente plutôt les résultats de l'expérience inverse soit le gain de fonction de Pitx1 et tout comme à la **Figure 15**, l'expression basale des gènes Pitx1 et PARP-1 dans les cellules MC3T3-E1 a d'abord été déterminée. Malheureusement, l'ajout du vecteur vide entraîne également la perte d'expression du gène PARP-1. Nous ne pouvons donc pas conclure que la sur-expression du gène Pitx1 entraîne la perte d'expression du gène PARP-1 car le vecteur vide agit via un mécanisme indéterminé. Toutefois, il serait concevable que l'utilisation d'un vecteur contenant un autre promoteur tel que SV40 ne puisse pas titrer un facteur essentiel à l'expression de PARP-1. Afin de clarifier cette ambiguïté, il sera nécessaire de refaire cette expérience. Par contre, étant donné que la molécule PARP-1 est un activateur transcriptionnel de Reg I, nous pouvons soupçonner que les molécules Pitx1, PARP-1 sont inter-reliées.

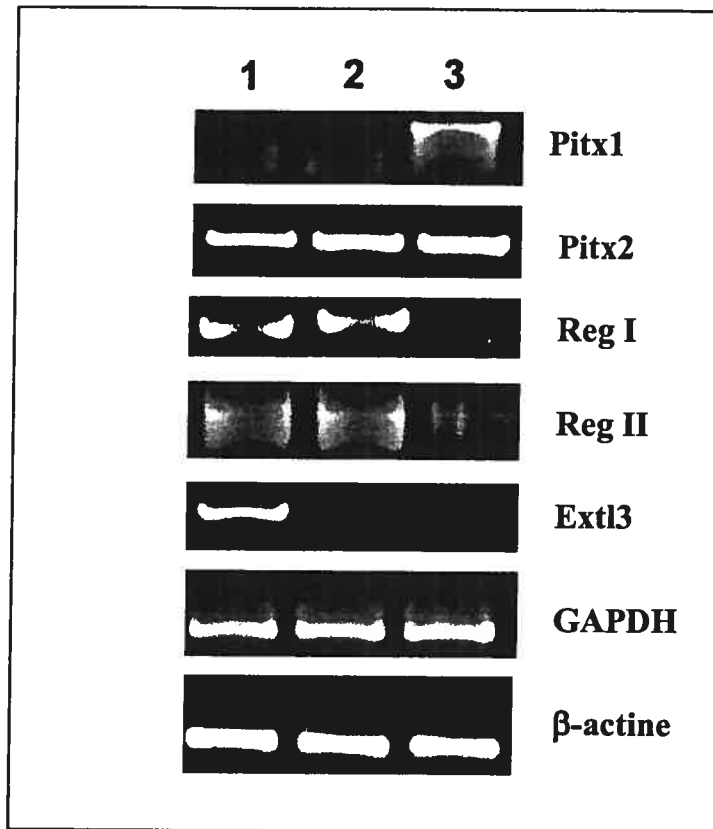


Figure 15. Sur-expression du gène Pitx1 dans des cellules MC3T3-E1 par transfection.

La colonne 1 représente le niveau basal des gènes candidats dans des cellules MC3T3-E1 où on peut voir un certain taux d'expression des gènes Pitx1, Pitx2, Reg I, Reg II et EXTL3. La colonne 2 représente les cellules MC3T3-E1 transfectée avec le vecteur vide. La colonne 3 représente les cellules MC3T3-E1 transfectée avec le vecteur pIRESpuro-Pitx1. Tel que présenté, la sur-expression du gène Pitx1 abolie l'expression des gènes Reg I et Reg II. L'expression d'EXTL3 est affectée à la fois par la présence du vecteur vide et de la sur-expression de Pitx1. L'expression du gène Pitx2 demeure constante tel que celle des gènes contrôles GAPDH et β -actine.

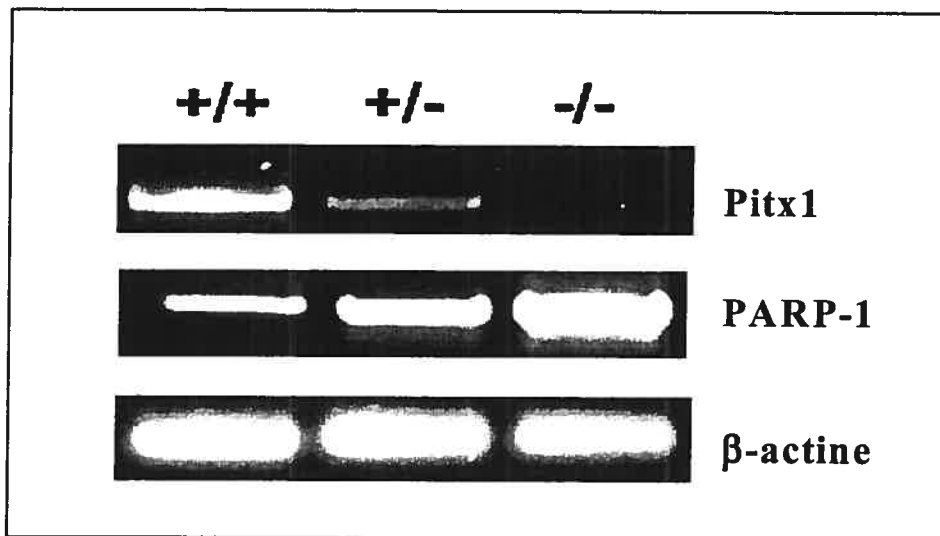


Figure 16. Expression du gène PARP-1, co-activateur de Reg, en fonction de la perte d'expression de Pitx1.

L'expression de PARP-1 a été mesurée en fonction de la perte d'expression du gène Pitx1. L'ARN a été prélevé à partir des membres supérieurs des souris Pitx1 hétérozygotes (+/-) et knock-out (-/-) et comparé au profil des souris de type sauvage (+/+). La perte d'expression de Pitx1 entraîne l'augmentation de PARP-1 de façon inversement proportionnelle au niveau d'expression de Pitx1.

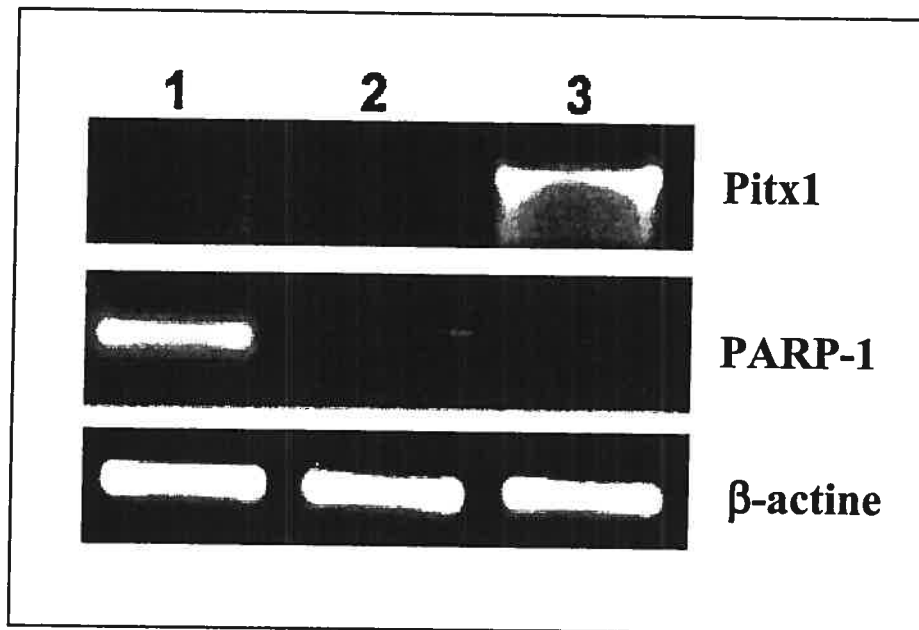


Figure 17. Perte d'expression du gène PARP-1 lors de la sur-expression de Pitx1.

Cette figure représente des transfections de cellules MC3T3-E1. La colonne 1 représente le niveau basal d'expression du gène PARP-1 dans les cellules MC3T3-E1. Dans la colonne 2, un vecteur vide a été transfecté. Enfin, dans la 3^e colonne, nous avons procédé à la sur-expression du gène Pitx1 par transfection. La perte d'expression totale du gène PARP-1 est obtenue à la fois en présence du vecteur vide et lors de la sur-expression du gène Pitx1.

3.3 Analyse du cartilage articulaire de patients arthrosiques

Les résultats d'expression présentés dans la **section 3.2** suggéraient fortement que la perte de Pitx1 entraînait directement la sur-expression de Reg I et d'EXTL3. De plus, les résultats générés initialement à partir des souris Pitx1 +/- concordaient avec les résultats obtenus à partir des lignées cellulaires. Afin de pouvoir conclure sur l'existence d'un lien entre les molécules Pitx1, PARP-1, Reg I et EXTL3 dans la pathologie de l'arthrose, nous devons effectuer les mêmes démonstrations à partir d'échantillons de cartilage de patients arthrosiques.

3.3.1 Analyse des profils d'expression des chondrocytes articulaires

Des chondrocytes articulaires de patients arthrosiques et de sujets sains ont été utilisés pour des analyses d'expression par RT-PCR semi-quantitatif. Les résultats obtenus sont les mêmes que ceux obtenus dans les modèles cellulaires. En effet, tous les sujets sains analysés présentaient un certain taux d'expression du gène Pitx1 alors que tous les patients arthrosiques analysés avaient une perte d'expression presque complète du gène Pitx1 (**Figure 18**).

Les conséquences sur les autres gènes étudiés sont les mêmes que ceux obtenus précédemment dans les expériences de gain et de perte de fonction du gène Pitx1 chez la souris. Chez les patients arthrosiques, la perte d'expression de Pitx1 entraîne la surexpression des gènes PARP-1, Reg I et EXTL3. Bien que l'expression soit augmentée chez tous les patients arthrosiques, la variabilité de l'expression est différente en fonction des individus et des fragments de cartilage utilisé pour générer ces cultures de chondrocytes articulaires (**Figure 18**).

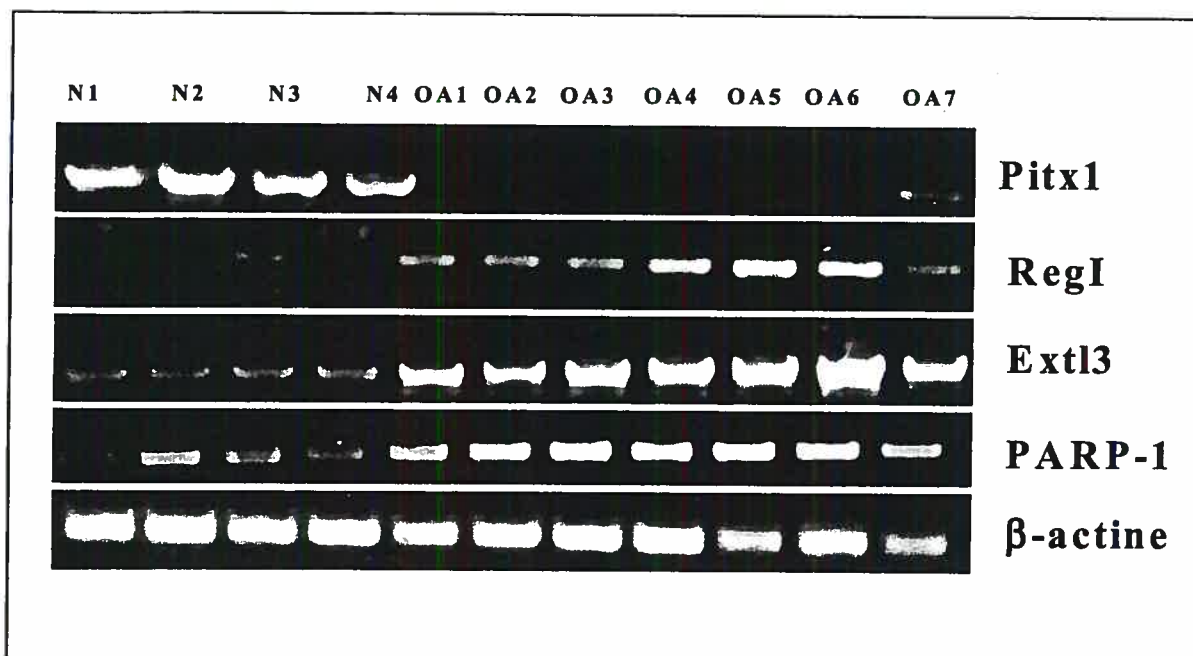


Figure 18. Comparaison des profils d'expression de Pitx1, PARP-1, Reg I, EXTL3 chez des sujets normaux et arthrosiques.

PCR semi quantitatif effectué à partir de chondrocytes articulaires de patients arthrosiques (OA) et de patients normaux (N) d'âge apparié. La perte d'expression du gène Pitx1 est évidente chez les patients arthrosiques. Tout comme dans les figures précédentes, la perte d'expression du gène Pitx1 chez les patients OA entraîne la sur-expression des gènes Reg I, EXTL3 et PARP-1.

3.3.2 Analyse de sections histologiques de cartilage humain par immunohistochimie

Les analyses d'immunohistochimie ont été effectuées sur des sections de cartilage de sujets sains et de patients arthrosiques (**Figure 19**). Les échantillons utilisés regroupaient des patients d'âge, de sexe et de poids appariés dans le but de comparer le profil d'expression des protéines Reg I. Les résultats obtenus démontrent une plus grande quantité de protéines Reg I chez les patients arthrosiques que chez les patients normaux. De plus, on peut aussi noter chez les patients arthrosiques, les chondrocytes observés sont hypertrophiés. Ces diverses caractéristiques sont rapportées par la littérature tout comme la tendance des protéines à s'agréger entre les cellules et à former des fibrilles insolubles à pH physiologique (Patard 2003).

3.4 Le lapin, un modèle animal de l'arthrose causée par un traumatisme

Bien que les expériences d'immunohistochimie sur les chondrocytes articulaires de patients révélaient un taux supérieur de protéines Reg I dans les cas d'arthrose humaine, nous avons voulu vérifier si la protéine Reg I pouvait être induite dans un modèle d'arthrose traumatique compte tenu du rôle naturel des membres de la famille Reg dans la régénération dans plusieurs tissus.

En effet, étant donné que l'expression de la protéine Reg I a été rapportée dans différents cas de régénération, initialement celui du pancréas, nous avons voulu vérifier si les protéines Reg I pouvaient être activées dans ce modèle d'arthrose induite par un traumatisme. Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle du lapin, qui est un animal qui ne développe pas d'arthrose de façon spontanée. Une ménisectomie a été réalisée afin d'induire l'arthrose chez les lapins, c'est à dire le prélèvement de façon chirurgicale du ménisque. Après 8 semaines de convalescence, les genoux des lapins ont été prélevés. Des animaux témoins ont aussi été utilisés et les niveaux d'expression de la protéine Reg I ont été comparés en immunohistochimie à l'aide d'anticorps monoclonaux réagissant contre la protéine Reg I. Tout comme dans l'expérience avec le cartilage humain, nous avons remarqué une augmentation importante de la protéine Reg I chez les lapins arthrosiques (**Figure 20**).

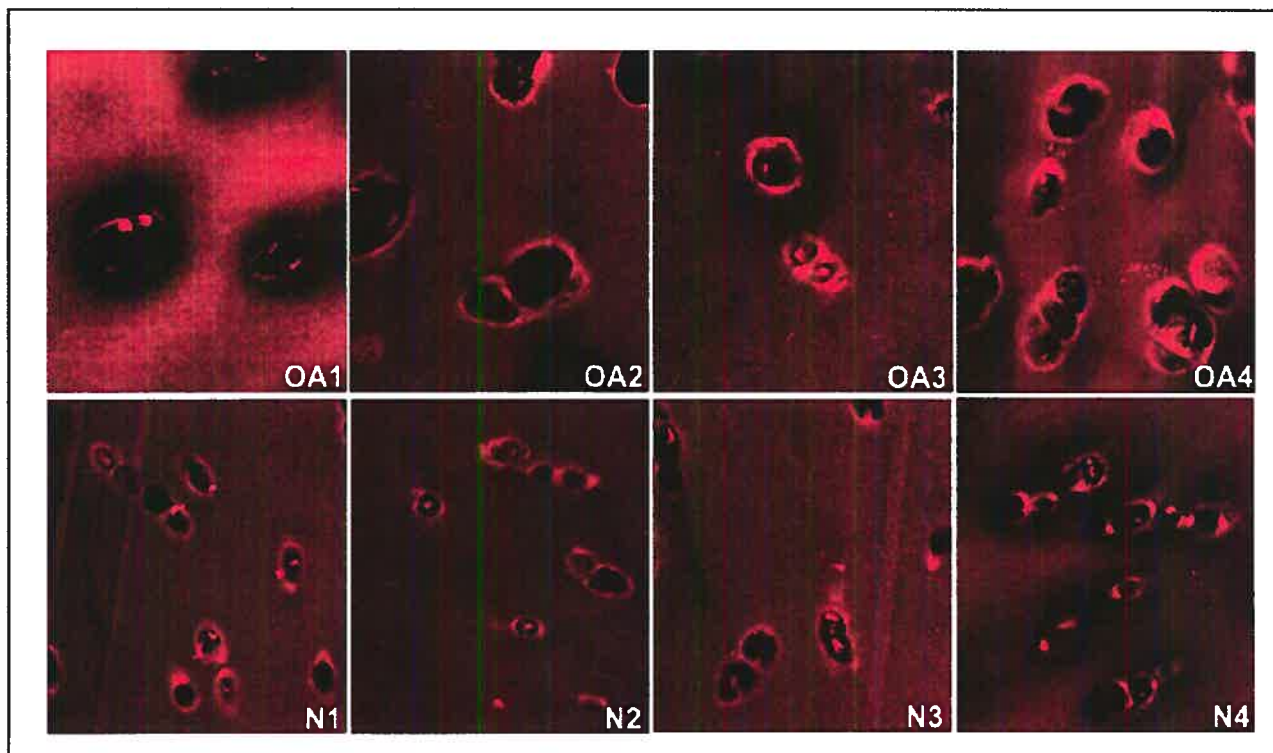


Figure 19. Analyse *in vivo* de la protéine Reg I sur du cartilage articulaire de patients normaux et arthrosiques.

Les expériences d'immunohistochimie ont été effectuées avec des anticorps monoclonaux réagissant contre la protéine humaine Reg I sur des sections paraffinées de cartilage de patients normaux (n=4) et arthrosiques (n=4) d'âge et de sexe appariés. Via microscopie confocale, on voit l'augmentation et l'accumulation des protéines Reg I chez les patients arthrosiques. On peut aussi noter l'hypertrophie des chondrocytes articulaires arthrosiques. Grossissement 83X.

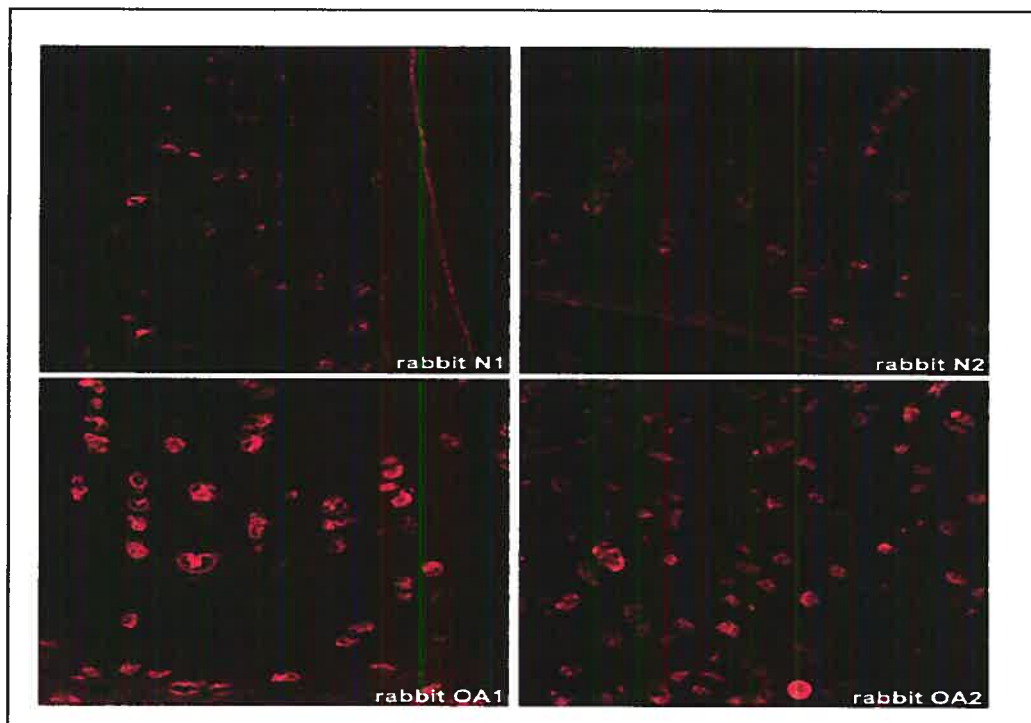


Figure 20. Analyse *in vivo* des protéines Reg I dans un modèle de lapin arthrosique.

Les expériences d'immunohistochimie ont été effectuées avec des anticorps monoclonaux réagissant contre la protéine Reg I de lapin sur des sections paraffinées de cartilage de lapin arthrosiques (n=2) et normaux (n=2). L'arthrose a été induite chirurgicalement par ménisectomie chez les lapins et les genoux ont été récupérés 8 semaines après la chirurgie pour les analyses histologiques. On peut noter l'augmentation des protéines Reg I chez les lapins arthrosiques lorsque l'on compare aux lapins normaux. Grossissement 83X.

3.5 Activation de la voie de NF- κ B via la protéine Reg I et EXTL3 dans l'arthrose.

Tel que mentionné dans la Section 1.7.1, le facteur de transcription NF- κ B est un joueur clé dans l'inflammation. En effet, il est reconnu comme un marqueur précoce de l'inflammation et il possède aussi la capacité d'induire les gènes codants pour les cytokines pro-inflammatoires. Étant donné que ce facteur de transcription pourrait aussi être à l'origine de certaines maladies inflammatoires, nous avons voulu vérifier si la sur-expression de Reg I et d'EXTL3 causées par la perte d'expression de Pitx1 pouvaient d'une façon ou d'une autre affecter la voie de signalisation de NF- κ B. Cet aspect est d'autant plus pertinent que plusieurs travaux récents ont suggérés un rôle anti-inflammatoire pour certains membres de la famille Reg.

Les protéines Reg I ont donc été produites et purifiées dans le but de les ajouter aux cellules transfectées pour vérifier l'impact de l'ajout de protéines Reg I exogènes. Le récepteur EXTL3 a été au préalable transfecté car les cellules HEK-293 n'expriment pas ce récepteur. Les protéines ont été produites suite à une induction à l'IPTG et la confirmation du produit recueilli a été visualisé par un immunobuvardage de type Western et correspond au poids attendu de 35 kDa (**Figure 21**).

Dans le but de déterminer les mécanismes inflammatoires liés à l'arthrose, nous avons d'abord vérifié si le récepteur de Reg, EXTL3, pouvait amplifier l'activation de NF- κ B via la cytokine TNF α . Les expériences effectuées en transfection transitoire (**Figure 22**) ont démontré que l'ajout de la cytokine inflammatoire TNF α augmente l'activation de NF- κ B d'un facteur 6X alors que l'addition du récepteur EXTL3 en présence de la cytokine TNF α augmente cette activation pour atteindre un facteur 20X par rapport à des cellules contrôles sans présence de cytokine.

Nous avons par la suite vérifié si l'addition des protéines Reg I pouvait aussi activer NF- κ B. En effet, l'addition de 10 ng/mL de protéines recombinantes purifiées Reg I permet d'augmenter l'activation de la voie de NF- κ B jusqu'à 6 fois, tel qu'illustré à la **Figure 23**.

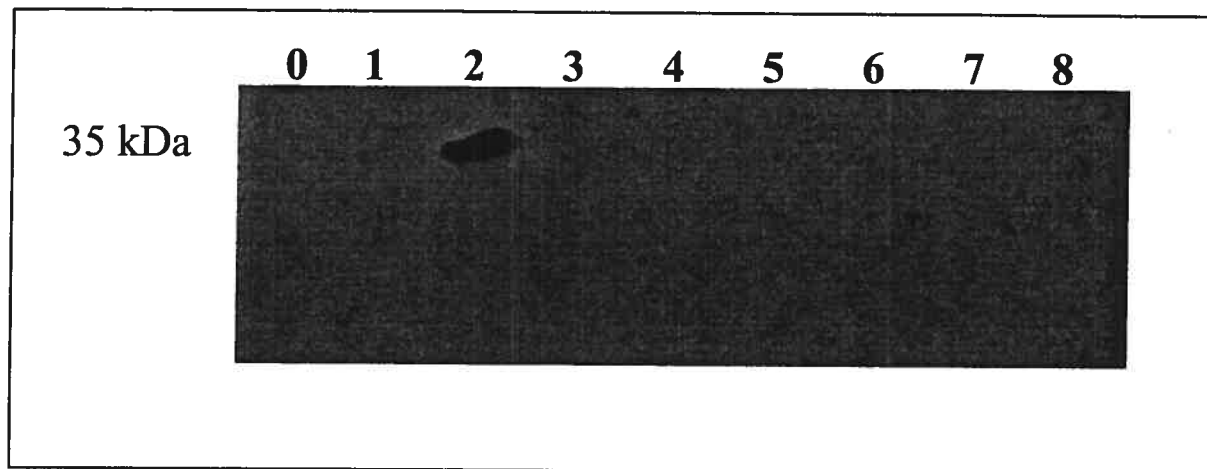


Figure 21. Détection de la protéine REG via Western Blot avec anticorps Anti-Flag (1 :4000).

La protéine recombinante Reg I est produite chez E. Coli se retrouve dans la fraction 2 après l'élution et le poids obtenu correspond au poids attendu de la protéine de 35 kDa. Les numéros un à huit correspondent aux fractions recueillies.

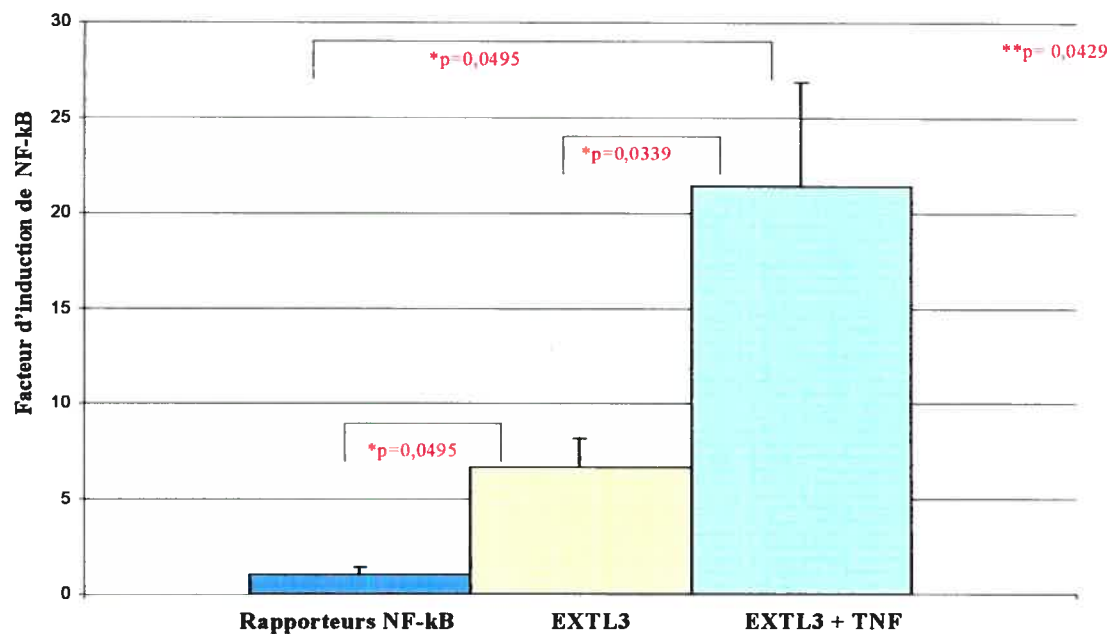


Figure 22. Effet du récepteur Reg (EXTL3) sur l'activation de la voie NF- κ B induite par TNF α .

La présence de la cytokine TNF α (10 ng/mL) a été ajoutée à des cellules HEK-293 en transfection transitoire. L'utilisation d'un rapporteur NF- κ B couplé à la luciférase (NF- κ B3X-Luc) permet de noter une activation de la voie NF- κ B d'un facteur 6X alors que la présence de la cytokine TNF α , ajoutée aux cellules transfectées exprimant le récepteur EXTL3, double cette activation pour la porter à un facteur 20X comparé aux cellules soumises à aucun traitement.

* Valeurs significatives selon le test de Mann-Whitney.

** L'ensemble du test est aussi significatif selon le test de Kruskal-Wallis.

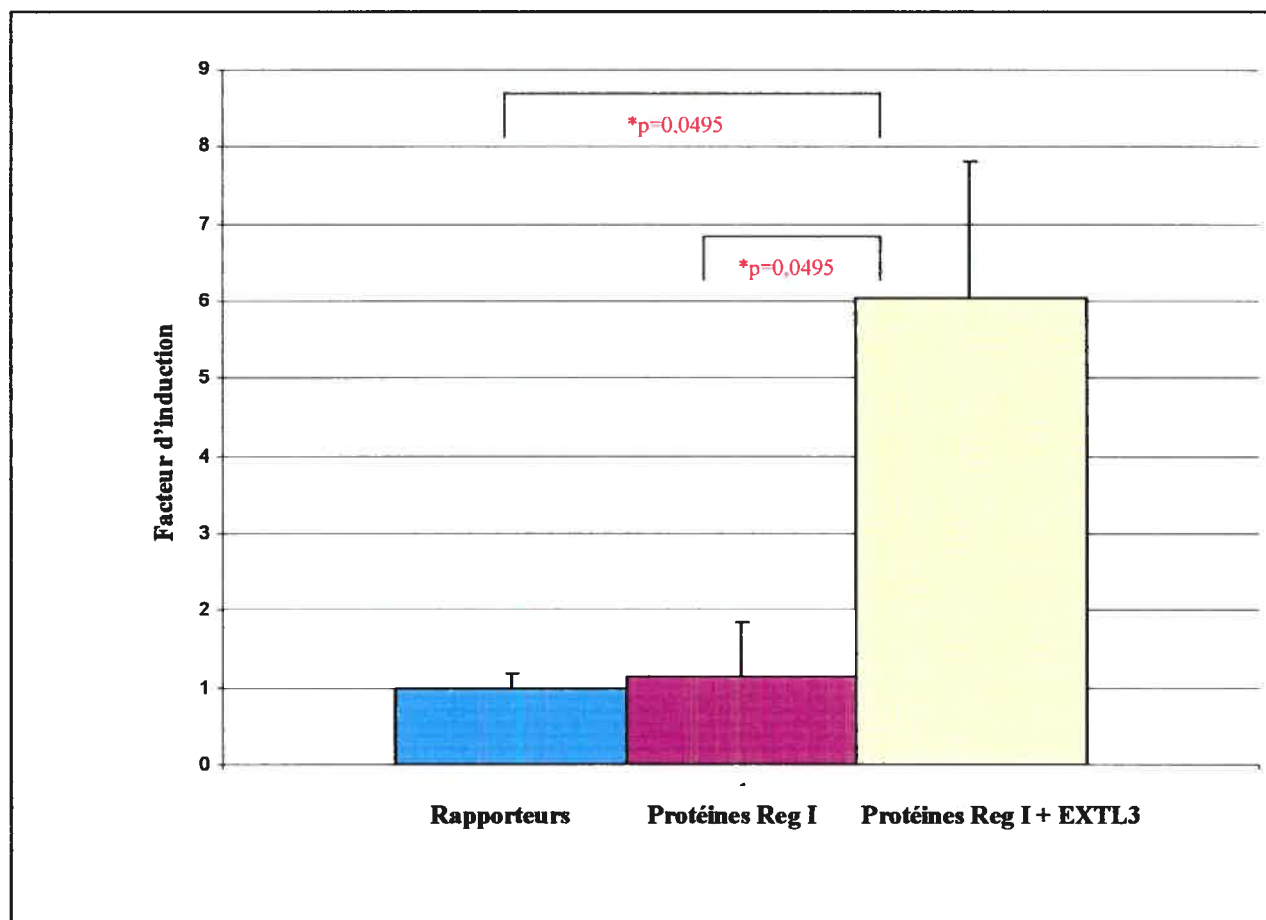


Figure 23. Activation de la transcription du gène NF- κ B par les protéines Reg I.

L'addition de 10 ng/mL de protéines purifiées Reg I ne permet pas directement l'activation de la voie de NF- κ B dans les cellules HEK-293 car celles-ci ne possèdent pas le récepteur EXTL3 endogène. Par contre, lorsque l'on ajoute le récepteur et les protéines purifiées Reg I la voie de NF- κ B est activée par un facteur de 6X.

* Valeurs significatives selon le test de Mann-Whitney.

3.6 Génération des mutants de délétion de Reg I et EXTL3.

Après avoir confirmé que voie de NF- κ B pouvait être activée par les protéines Reg I ainsi que par le récepteur EXTL3, en présence de la cytokine TNF α , (**Figure 22 et 23**) nous avons voulu déterminer quels domaines des molécules Reg I et EXTL3 étaient essentiels à l'activation de NF- κ B. Des mutants de délétions ont donc été générés par PCR (**Section 2.3.9 et 2.3.10**). Les mutants générés à partir du gène Reg I possèdent tous la même extrémité N terminale alors que les mutants du gène EXTL3 sont très différents les uns des autres car deux d'entre eux sont amputés du domaine transmembranaire. En effet, à cause de la présence d'un domaine transmembranaire, nous nous retrouvons avec des formes solubles de différentes longueurs (2,3 kB et 1,2 kB) et des formes membranaires de deux longueurs différentes (2,7 kB et 1,6 kB). Les quatre mutants du gène EXTL3 possèdent tous le domaine de liaison à TRAF-2 encodé par les acides aminés SVEE (**Figure 24 et 25**).

3.6.1 Mutants de délétion de Reg I et du récepteur EXTL3: résultats préliminaires

Après avoir généré les divers mutants des gènes Reg I et EXTL3 tel que présenté aux **Figures 24 et 25**, nous avons débuté les essais en transfection transitoire dans le but de déterminer le profil d'activité de chacun des mutants sur l'activation de NF- κ B. Nous pouvons penser qu'étant amputé de plusieurs domaines essentiels, les mutants ne soient plus en mesure d'entraîner une signalisation optimale. Malheureusement, les résultats générés sont très variables et ne nous ont pas permis de tirer des conclusions quant à la capacité de chacun d'activer ou non la voie de signalisation de NF- κ B.

Diverses expériences pourraient être entreprises de façon simultanée au processus de caractérisation des mutants afin de faciliter l'interprétation des résultats obtenus. La caractérisation de l'expression de certaines molécules dans la lignée cellulaire HEK-293 deviendra essentielle. En effet, il sera nécessaire de connaître les profils d'expression de tous les membres des familles Reg et EXTL3 dans la lignée cellulaire HEK-293 afin de vérifier si l'expression de certains de ces membres masquerait les effets des mutants.

Ce travail de caractérisation a d'ailleurs été entrepris et a révélé l'expression de la molécule Pitx1 endogène et l'absence du récepteur EXTL3 dans cette lignée cellulaire. Les résultats concernant l'expression de Reg I dans cette même lignée cellulaire ne sont toujours pas concluants. Par la suite, il faudra aussi vérifier si les mutants Reg I sont réellement sécrétés via des expériences d'immunobuvardage et effectuer des tests de liaison afin de confirmer que les mutants possèdent toujours la capacité à lier leur récepteur EXTL3.

Les résultats préliminaires des essais en transfection sont présentés en **Annexe** du présent document car bien qu'ils ne soient pas reproductibles, ils s'inscrivent dans un important projet de caractérisation des gènes Reg I et EXTL3 dans un modèle de maladie inflammatoire. Ces expériences seront reprises dans différentes conditions afin de mieux caractériser la capacité des mutants à activer la voie de NF-kB.

De façon parallèle, les différents mutants générés du récepteur EXTL3 ont aussi été transfectés dans des cellules HEK-293 et les résultats sont présentés aux **Annexes 3 et 4**. Parmi les résultats présentés à l'**Annexe 4**, le résultat du mutant de 2,3 kB se démarque des autres résultats générés. En effet, l'observation de la figure suggère que le mutant EXTL3 2,3 kB pourrait se comporter comme un dominant négatif. Ce résultat est d'autant plus intéressant que ce mutant d'EXTL3 ne possède pas de domaine transmembranaire.

Bien que les expériences de transfections transitoires avec les mutants de délétion n'ont pas permis d'établir des profils d'activités clairs tant qu'à leur capacité ou incapacité d'activer la voie de NF-kB, nous avons tout de même soumis les mutants Reg I et EXTL3 nouvellement générés à la présence de la cytokine pro-inflammatoire TNF α dans le but de déceler des réponses particulièrement différentes d'un mutant à l'autre. Ces résultats sont présentés aux **Annexes 2 et 4**. Les résultats préliminaires présentés ne permettent pas de tirer aucune conclusion mais s'insèrent dans un important projet de caractérisation des mutants des gènes Reg I et EXTL3.

3.7 Présence du domaine de liaison à TRAF-2 dans le récepteur EXTL3

Étant donné que les résultats engendrés par les transfections transitoires généraient parfois des résultats contradictoires, nous avons donc cherché à savoir si le récepteur EXTL3 ne pouvait pas interagir avec un autre récepteur pour expliquer la fluctuation de certains des résultats obtenus. En utilisant la séquence codante pour EXTL3 (Genbank #41281366), nous avons découvert que le domaine de liaison à TRAF-2 se retrouvait dans la séquence codante du récepteur Reg/EXTL3. Tel que le présente le **Tableau XI**, la séquence consensus est présente dans les co-récepteurs CD30, CD40, CD27, ATAR, Ox40 et LTBR et maintenant aussi dans le récepteur EXTL3. La présence du domaine de liaison à TRAF-2 dans le récepteur EXTL3 suggère fortement qu'il puisse interagir avec le récepteur du TNF α puisque TRAF-2 est un des « TNFR-associated factor » connu du récepteur de TNF α . Les principales conséquences d'une interaction entre le récepteur EXTL3 et un récepteur additionnel, soit celui du TNF α , seront présentées et détaillées dans la section discussion.

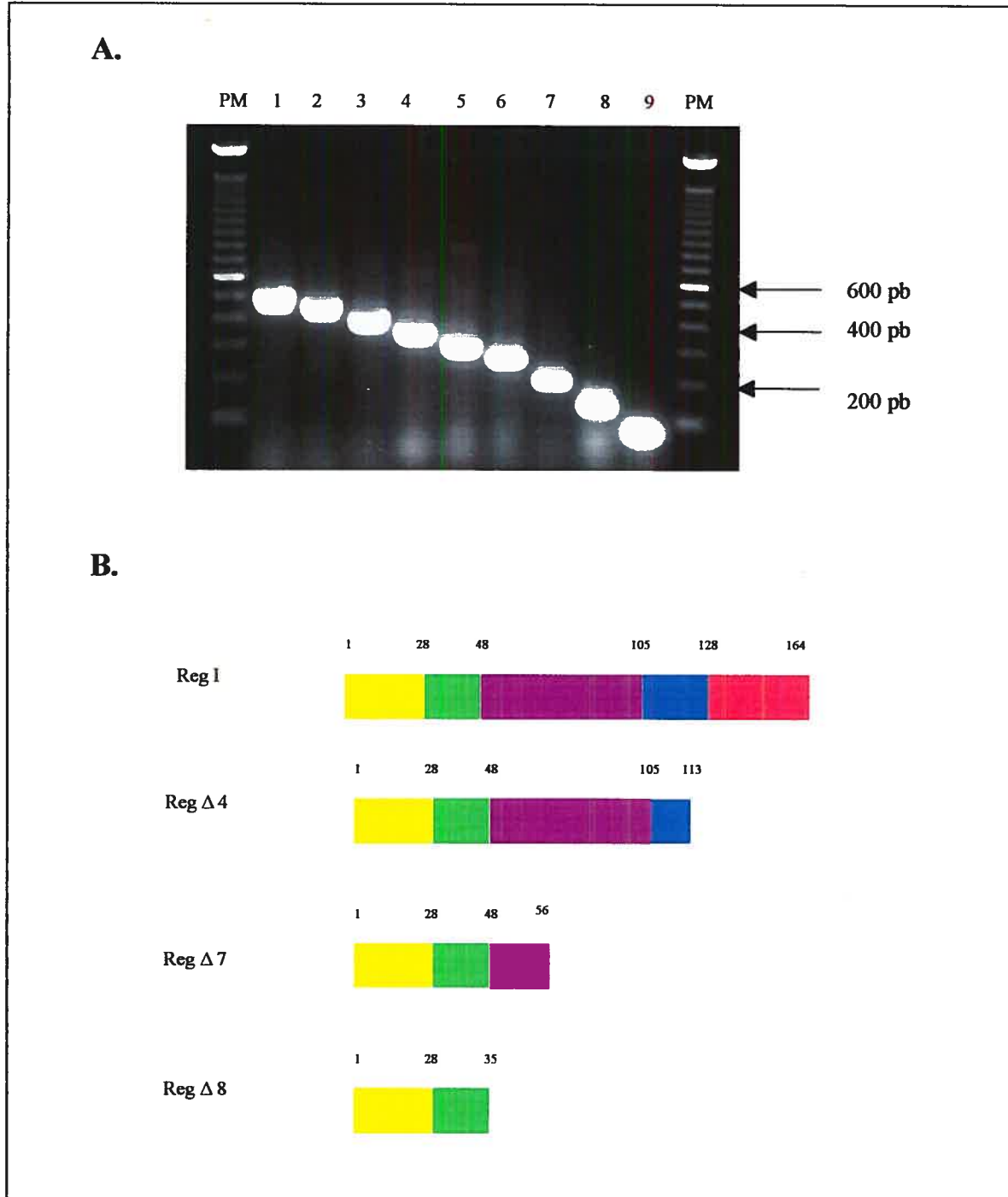


Figure 24. Génération des mutants de délétion du gène Reg I.

A. Les différents mutants ont d'abord été générés par PCR. Les annotations PM correspondent aux échelles de poids moléculaire. Les colonnes #4, #7 et #8 correspondent respectivement aux mutants Reg Δ 4, Δ 7 et Δ 8. B. Représentation schématique des mutants Δ 4, Δ 7 et Δ 8 clonés.

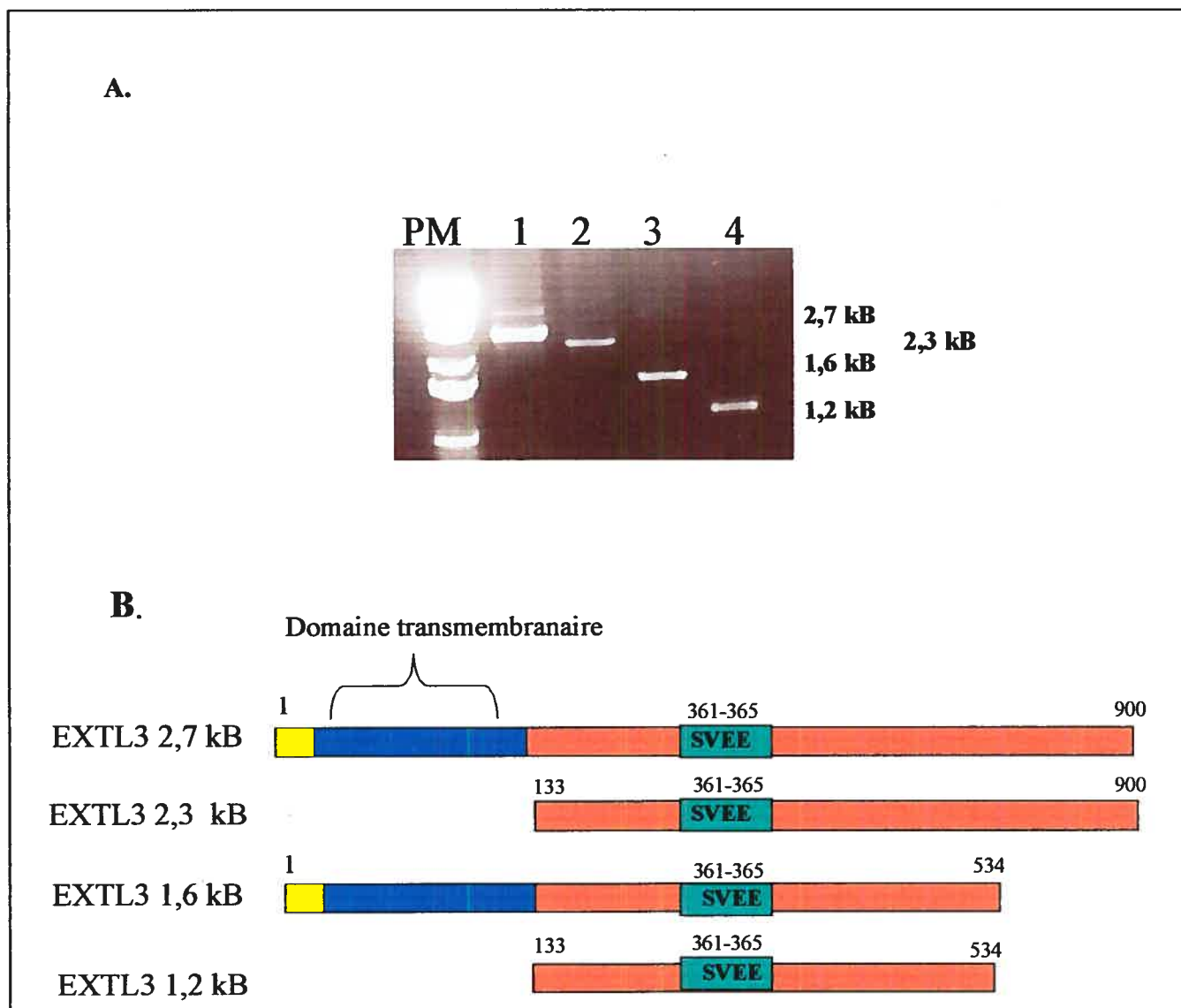


Figure 25. Génération des mutants de délétion du gène EXTL3.

Les mutants d'EXTL3 ont d'abord été générés par PCR. **B.** Représentation schématique des mutants générés où les mutants de 2,7 et 1,6 kB possèdent le domaine transmembranaire alors que les mutants 2,3 et 1,2 kB ne le possèdent plus. Le domaine de liaison pour le facteur TRAF-2 (SVEE) est présent sur les quatre mutants générés.

Tableau XI. Présence du domaine de liaison à TRAF-2 dans le gène codant pour EXTL3.

Séquence consensus de TRAF-2		
(P, S, A, T), x, (Q, E), E		
Comparaison des domaines de liaison de TRAF-2 humain		
TNFR2 p75	PFSKEECAFRS	(Ye 1999)
CD 30	HYPEQETEPPL	(Bulfone-Paus 1999)
CD 40	AAPVQETLHGC	(Bulfone-Paus 1999)
CD 27	TIPIQEDYRKP	(Ye 1999)
ATAR	TVAVEETIPSF	(Ye 1999)
Ox 40	RTPIQEEQADA	(Ye 1999)
LTBR	STPHQEDGKAW	(Ye 1999)
EXTL3	ARSFEEEMEGD	

ATAR: TNFR family member. LTBR: Lymphotoxin beta receptor.

3.8 Effet de la glucosamine sur la fonction du récepteur Reg et sa signalisation.

La glucosamine permet de soulager les douleurs mais son mécanisme d'action n'a toujours pas été élucidé. Dans un autre ordre d'idée, la streptozocine est un autre agent chimique qui permet de détruire le pancréas de certains animaux afin de les rendre diabétiques (Kolb 1987). Par contre, les structures chimiques de la glucosamine et de la streptozocine sont très semblables car la streptozocine possède un noyau central identique à celui de la D-glucosamine HCl (**Figure 26**). Compte tenu que le récepteur EXTL3 est aussi une glycosyltransférase, nous avons testé si la glucosamine pouvaient moduler la fonction du récepteur Reg/EXTL3 et/ou la signalisation dans le cadre de transfections transitoires et d'expériences d'immunohistochimie.

La **Figure 27** présente l'effet de la glucosamine sur la protéine Reg I, en présence et en absence de son récepteur EXTL3. Les résultats obtenus démontrent une l'inhibition presque totale de l'activité de NF-kB en présence de la protéine Reg I et du récepteur EXTL3. L'activité de NF-kB en présence de glucosamine est 12 fois moins élevée qu'en absence de glucosamine (1 mg/mL). La glucosamine ajoutée dans le milieu des cellules fraîchement transfectées n'a pas d'effet sur les cellules transfectées uniquement avec un vecteur sur-exprimant Reg I.

Par la suite, la glucosamine a été ajoutée à des fibroblastes 208F dans le but de vérifier si l'effet inhibiteur de la glucosamine était médié via une interférence dans la liaison à Reg I à son récepteur EXTL3 et ce, en présence et en absence de $TNF\alpha$. La lignée cellulaire 208F a été sélectionnée car elle présente naturellement de hauts niveaux de protéines Reg I et du récepteur EXTL3. Comme le démontre la **Figure 28**, l'utilisation de la glucosamine réduit considérablement la liaison de la protéine Reg I à son récepteur EXTL3 et ce malgré la présence de la cytokine $TNF\alpha$, qui habituellement amplifie la liaison de la protéine à son récepteur.

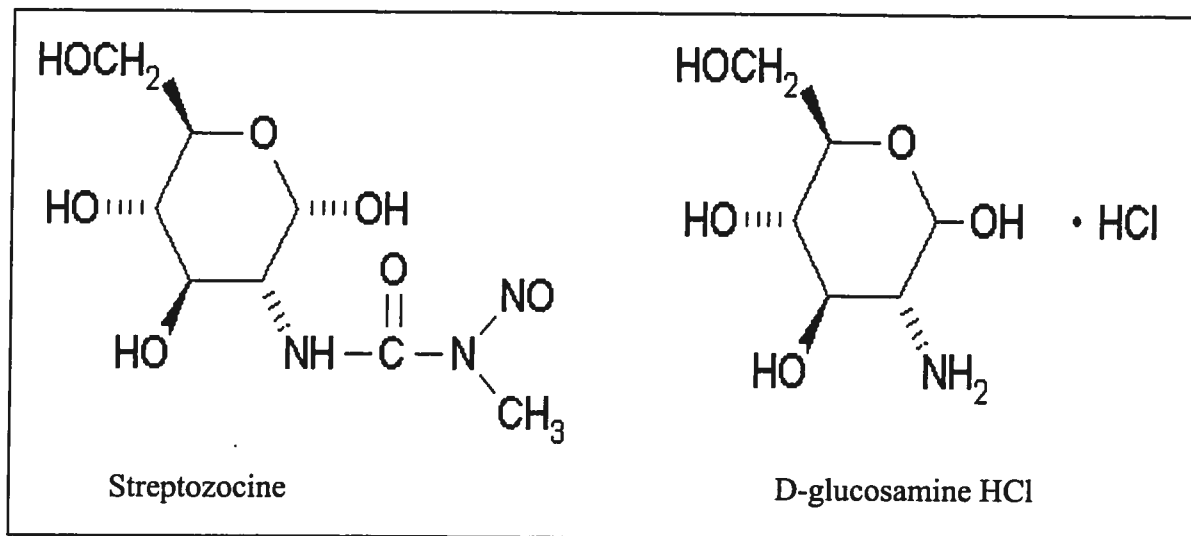


Figure 26. Représentation chimique des molécules de la streptozocine et de la D-glucosamine HCl.

La streptozocine possède un anneau glucosamine similaire à celui de la D-glucosamine-HCl.

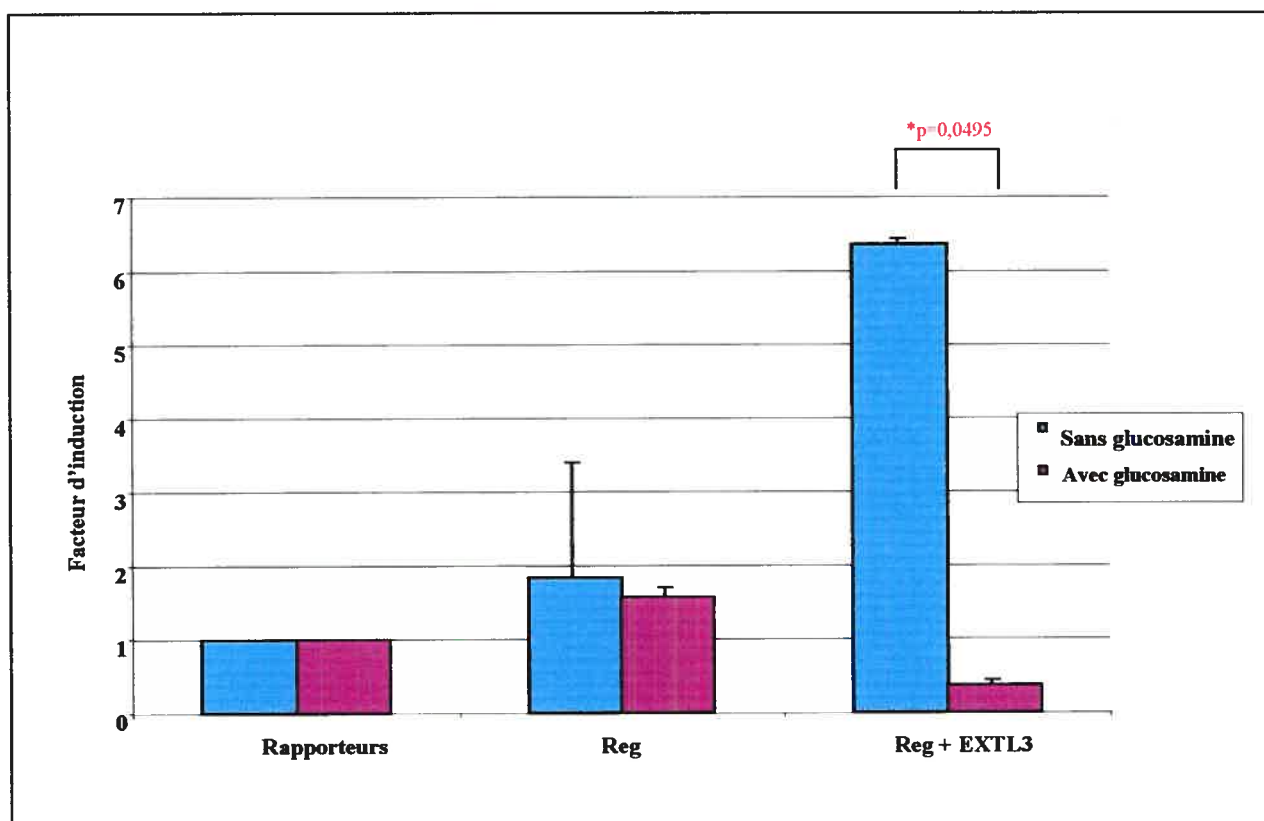


Figure 27. Comparaison des effets inhibiteurs de la glucosamine sur l'activation de NF- κ B.

L'ajout de la glucosamine permet une inhibition presque totale de l'activation de la voie de NF- κ B et ce, malgré la présence de la protéine Reg I et de son récepteur EXTL3 et ce par un facteur 12X.

* Valeurs significatives selon le test de Mann-Whitney.

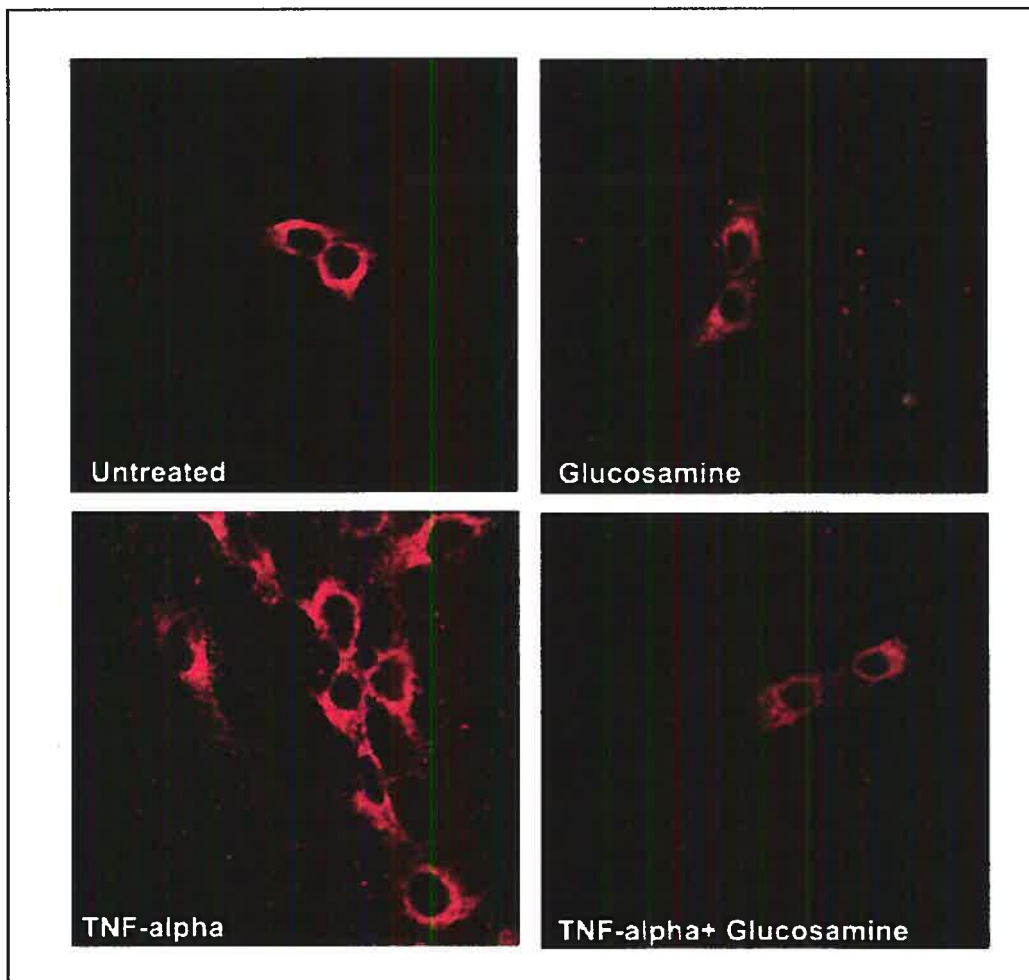


Figure 28. Inhibition de la liaison de la protéine Reg I en présence de glucosamine.

Utilisation de la glucosamine comme agent inhibiteur de la liaison de la protéine Reg I à son récepteur EXTL3. La liaison de la protéine Reg I à son récepteur EXTL3 est inhibée en présence de 1mg/mL de glucosamine et ce, malgré la présence de $\text{TNF}\alpha$.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Les résultats présentés dans ce mémoire ont permis de mettre en évidence le rôle joué par le facteur de croissance Reg I et son récepteur dans l'inflammation associée à l'arthrose ainsi que de caractériser le mécanisme sous-jacent à la transduction du signal de Reg I dans l'activation de NF- κ B. Ces données montrent clairement que la signalisation de la protéine Reg I est impliquée dans le processus inflammatoire et suggèrent une convergence des voies de signalisation de Reg I avec celles des cytokines pro-inflammatoires. L'élucidation de ces mécanismes déterminera la pertinence pathophysiologique de Reg I et de son récepteur, EXTL3, dans l'arthrose. Ces molécules pourraient devenir des marqueurs pertinents et constituer de nouvelles cibles moléculaires, desquelles pourraient découler de meilleures interventions pharmacologiques. De plus, l'identification du domaine de liaison à TRAF-2 dans le récepteur EXTL3 nous laisse croire que ce récepteur transmembranaire puisse interagir directement ou indirectement avec le récepteur du TNF α , soit TNFR1. Cette interaction s'avère nouvelle et permet de présenter différents modèles d'interactions possibles entre la protéine Reg I, son récepteur EXTL3 sur la voie de l'inflammation en présence de la cytokine pro-inflammatoire TNF α .

4.1 Est-ce que la perte de Pitx1 est directement liée à l'arthrose?

Dans le cadre d'une étude antérieure, le laboratoire du Dr. Moreau a démontré que la diminution du facteur de transcription Pitx1 au cours de la vie adulte semblait être la source du mécanisme pathogénique causant l'arthrose. Le facteur de transcription Pitx1 est essentiel pour le développement des membres inférieurs durant les stades précoces de l'embryogenèse. Les études réalisées chez ces souris Pitx1 $-/-$ démontrent une chondrogenèse anormale, caractérisée par une forte calcification de la tête du tibia et du fémur. En ce qui a trait aux souris hétérozygotes, celles-ci sont normales jusqu'à environ 7 mois et à partir de ce moment, elles développent des signes associés à l'arthrose tel que des problèmes de marche dus à des raideurs dans les articulations des membres inférieurs. Les analyses radiographiques et histologiques de ces souris à sept mois présentent des traits morphologiques typiques de l'arthrose, soit une forte augmentation de la minéralisation des membres inférieurs chez les souris hétérozygotes par rapport au type sauvage **Figures 10 et 11**.

Nous pouvons donc penser que la perte d'expression de Pitx1 serait un événement important dans le développement de la maladie de l'arthrose. Les souris Pitx1 +/- deviennent donc un modèle animal fort pertinent dans l'étude de l'arthrose et permet d'investiguer les conséquences physiologiques entraînées par la perte de Pitx1. De plus, les **Figures 18 et 19** mettent aussi en évidence la perte de l'expression du gène Pitx1 et la sur-expression des gènes Reg I et du récepteur Reg dans les chondrocytes articulaires chez tous les patients atteints d'arthrose testés à ce jour.

4.2 Mécanismes liés à l'activation de l'expression du récepteur Reg I et de ses ligands

Les analyses histologiques effectuées sur les sections des têtes fémorales des souris Pitx1 +/- permettent de mettre en évidence une fibrillation et une calcification du cartilage, ainsi que des irrégularités de la surface du cartilage dues à l'érosion de ce dernier **Figures 12 et 13**. Les analyses moléculaires effectuées à partir des souris Pitx1 -/-, Pitx1 +/- et des lignées cellulaires ont permis d'associer la perte de Pitx1 à une sur-expression du gène de Reg I. Toujours dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé différents modèles, humain et animal, qui nous permettent de lier la surexpression de la protéine Reg I à deux causes différentes que nous détaillerons dans les lignes suivantes.

4.2.1 La sur-expression de la protéine Reg I est-elle liée à une prédisposition génétique ou plutôt à un mécanisme naturel de protection du cartilage?

Grâce aux différentes études effectuées dans les dernières décennies, plusieurs des maladies affectant la population ont pu être associées à des causes génétiques. Bien que plusieurs gènes de susceptibilité aient été découverts, toutes les maladies génétiques ne peuvent pas être expliquées ou causées par la présence ou l'absence d'un seul gène. Parfois, une maladie est causée lorsqu'il y a accumulation de différents facteurs génétiques et aussi environnementaux. Dans le cas de l'arthrose, il n'a jamais été clairement établi que cette pathologie était directement liée à l'absence ou à la surexpression de certains gènes. Par contre, plusieurs gènes de susceptibilité ont été identifiés tel que mentionné dans le **Tableau I** (Aigner 2003) (Brandi 2001).

Étant donné que l'arthrose est une maladie qui se développe en vieillissant chez l'humain, on peut penser que son développement serait lié à l'extinction d'un gène ou d'une famille de gènes. Les résultats présentés dans cette étude portent à croire que certains hommes seraient prédisposés génétiquement à une sur-expression de la protéine Reg I. Tel que le démontre la **Figure 18**, tous les patients arthrosiques testés avaient déjà perdu l'expression complète du gène Pitx1. Cette prédisposition génétique engendrerait la surexpression du récepteur EXTL3 et conséquemment, de la protéine Reg I. Par contre, on pourrait aussi penser que la protéine Reg I est activée dans les stades précoces de la maladie dans le but de régénérer le cartilage articulaire endommagé. Dans la cascade des événements, on peut penser que la perte de l'expression du gène Pitx1 est un facteur qui précède l'apparition des premiers symptômes de l'arthrose et que la surexpression du récepteur EXTL3 et de la protéine Reg I seraient des conséquences directes de la perte du gène Pitx1.

4.2.2 La protéine Reg I est-elle impliquée dans la régénération des tissus musculosquelettiques?

Les expériences effectuées à partir du lapin comme modèle animal dans l'étude de l'arthrose représente un bon exemple de l'activation du système Reg I/EXTL3 suite à un événement traumatique. En effet, l'activation de la protéine Reg I est bien connue au niveau de la régénération tissulaire. La protéine Reg I a été découverte dans un contexte de régénération pancréatique, on peut donc présumer qu'il s'agit d'une fonction naturelle et physiologique qui pourrait également être activée dans les processus de régénération tissulaire associés au cartilage ou dans certaines pathologies comme l'arthrose (Terazono 1988).

Cette hypothèse selon laquelle la protéine Reg I serait sur-exprimée dans des pathologies d'ordre musculosquelettiques est une toute nouvelle hypothèse proposée par notre équipe et permettrait d'expliquer de nombreux cas d'arthrose développés chez des sportifs de haut niveaux qui sur-utilisent leurs articulations à de hautes intensités et qui doivent souvent cesser ou diminuer les entraînements à cause d'apparitions de blessures (Vad 2000).

L'activation de la protéine Reg I serait donc liée à deux causes distinctes soit d'une part, une prédisposition génétique et d'autre part, une cause traumatique. Ces deux facteurs engendraient non seulement la surexpression de la protéine Reg I mais aussi de son récepteur EXTL3 qui favoriserait le développement de l'arthrose humaine, tel que le démontre la **Figure 29**.

4.3 La protéine Reg I est-elle impliquée dans les étapes précoces du développement de l'arthrose?

Le développement de l'arthrose est étudié depuis de nombreuses années mais il s'avère encore aujourd'hui très nébuleux. Nous proposons donc ici quelques nouvelles hypothèses pour expliquer le développement de l'arthrose en association avec la perte de Pitx1 et la sur-expression de Reg I et EXTL3.

La formation de fibrilles de protéines Reg I serait le premier événement physiologique observable et il est bien illustré dans une des sections du cartilage arthrosique de la **Figure 19** où on peut apercevoir une déposition massive de protéines Reg I entre les chondrocytes. Les protéines Reg I ont tendance à former des fibrilles insolubles à pH physiologique et les chondrocytes s'hypertrophient (Graf 2001). Au point de vue biomécanique, l'accumulation de fibrilles va capter le surplus de calcium disponible et ainsi entraîner progressivement la calcification locale de l'articulation et avec le temps, entraîner une calcification plus importante touchant toute l'articulation.

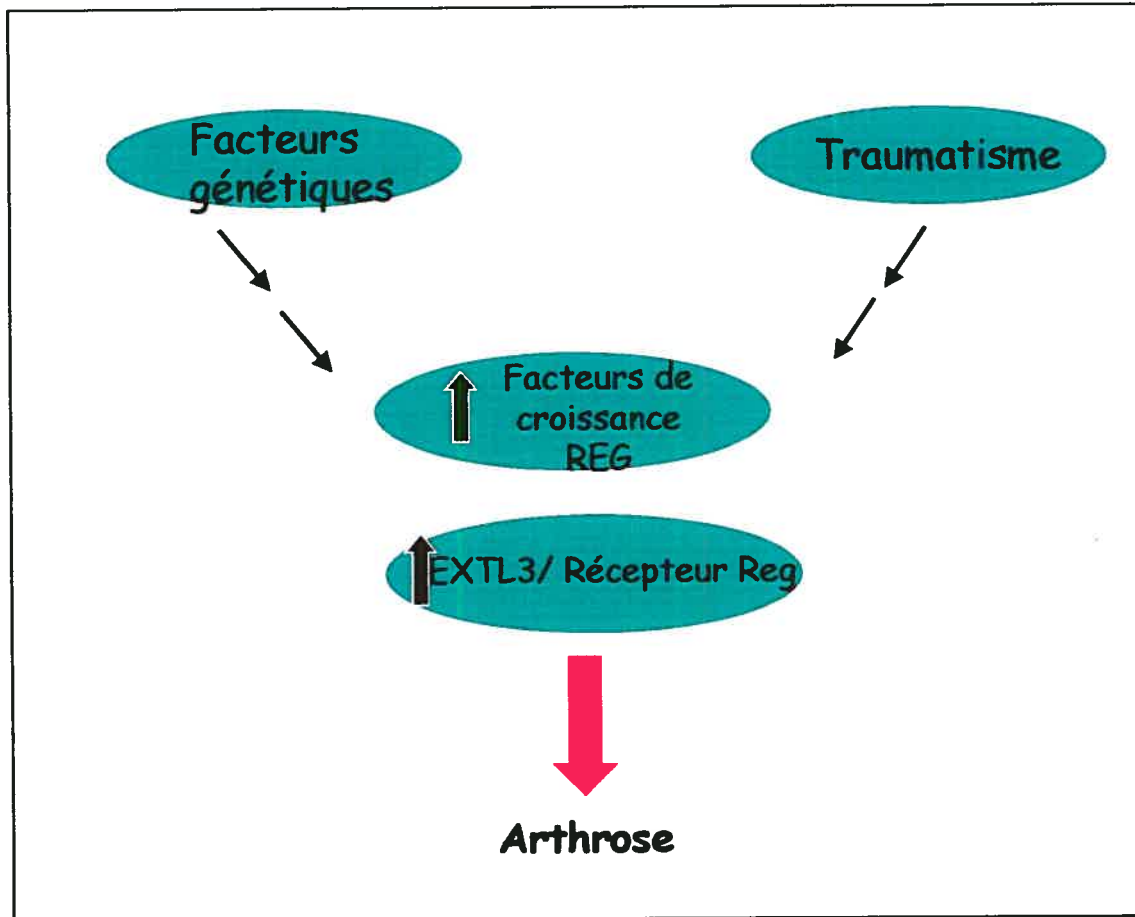


Figure 29. Implication des facteurs génétiques et traumatiques dans le développement de l'arthrose.

Les facteurs génétiques et les facteurs traumatiques ont tous deux un impact sur l'augmentation des facteurs de croissance Reg ainsi que du récepteur, EXTL3. Tous ces facteurs seraient directement liés à l'apparition des symptômes de l'arthrose.

4.4 Convergence des cytokines pro-inflammatoires vers le système Reg I/EXTL3

La présence et l'action des cytokines pro-inflammatoires n'est plus à confirmer dans la pathologie de l'arthrose et ce phénomène est bien documenté (Martel-Pelletier 1999). Les principaux effets des cytokines, présentés dans la **Section 1.7.3**, permettent de maintenir l'équilibre entre les phénomènes d'anabolisme et de catabolisme pour maintenir l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la matrice extracellulaire du cartilage.

Dans le cadre de cette étude sur les facteurs de croissance de la famille Reg, nous avons vérifié l'impact de la protéine Reg I et de son récepteur EXTL3 sur la cytokine pro-inflammatoire $\text{TNF}\alpha$. Tel que le démontre la **Figure 22**, le récepteur EXTL3 amplifie l'effet de l'activation de NF- κ B via les cytokines pro-inflammatoires tel $\text{TNF}\alpha$ (Mizuno 2001). Nous proposons donc que les cytokines pro-inflammatoires convergent vers le système Reg I/EXTL3 car l'ajout de la cytokine pro-inflammatoire a systématiquement un effet sur l'activation de la voie de NF- κ B qui est médiée par les protéines Reg I et leur récepteur EXTL3. De plus, les protéines Reg I sont déjà connues pour répondre aux stimuli inflammatoires car elles sont naturellement activées dans les phénomènes d'inflammation. Le modèle à la **Figure 30** propose donc un système qui sous-entend une auto-régulation puisque le système Reg I/EXTL3 favorise la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires mais ce même système Reg I/EXTL3 répond aussi aux actions des cytokines pro-inflammatoires sécrétées tel que le $\text{TNF}\alpha$.

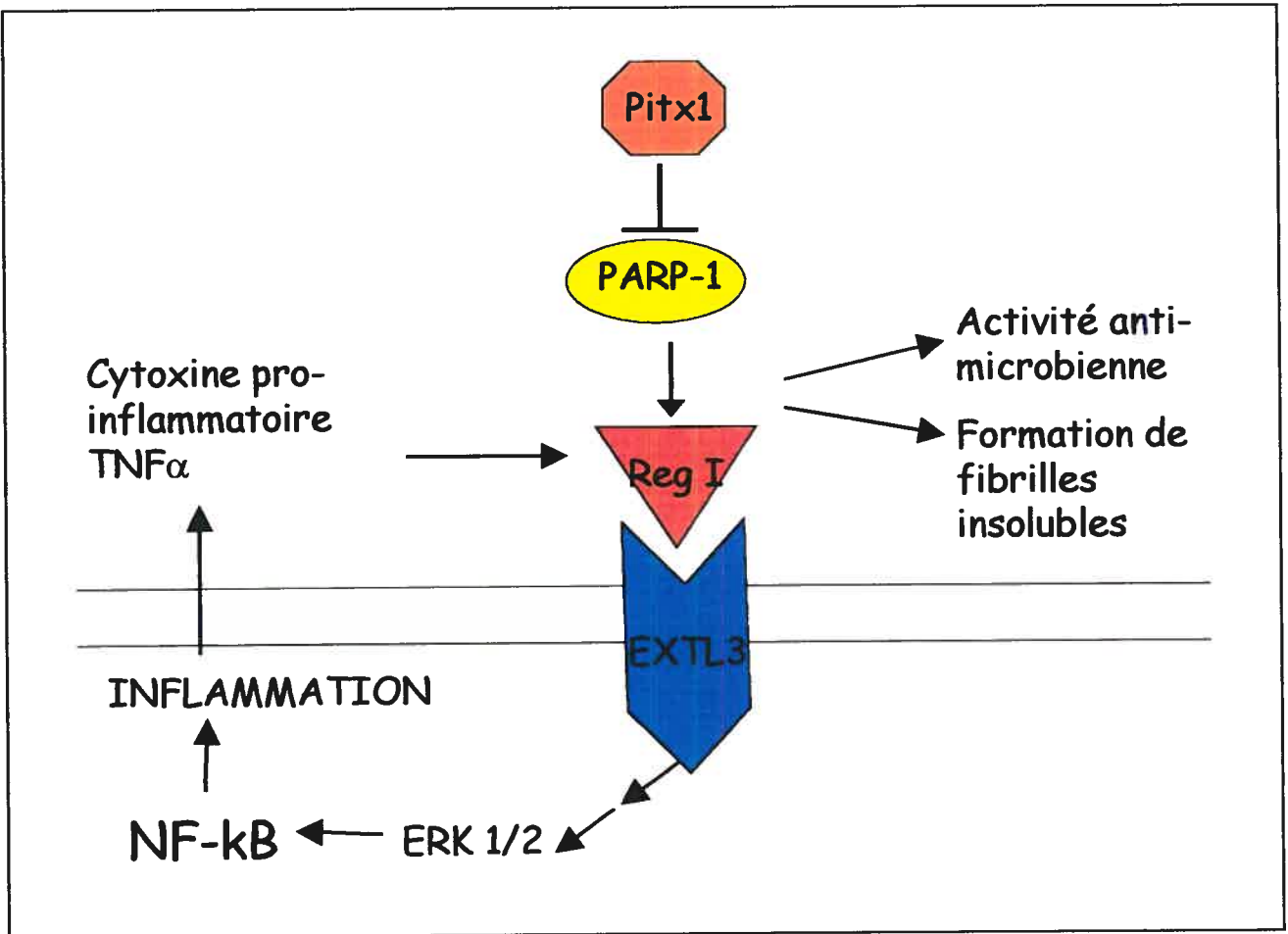


Figure 30. Schématisation de l'interaction entre Pitx1, PARP-1, Reg I et EXTL3.

Le facteur de transcription Pitx1 réprime l'activité de PARP-1 qui lui est en mesure d'activer le gène Reg I. La liaison de la protéine Reg I à son récepteur EXTL3, permet l'activation de la voie des ERK et de l'inflammation via NF-kB et favorise ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires tel TNF α .

4.5 EXTL3, est-il simplement qu'un autre co-récepteur capable d'interagir avec TNFR1?

Il est connu que la signalisation via le récepteur du TNF nécessite la présence de plusieurs co-récepteur et co-facteurs tel les TRAF. Différentes molécules peuvent interagir avec le récepteur TNFR1 tel que LMP1, IL-15R, IL-1 suite à l'identification de domaine codant pour des domaines d'interaction communs **Tableau XI** (Bulfone-Paus 1999). Puisque nous avons identifié un motif de liaison de TRAF-2 dans la séquence codante de EXTL3, nous proposons maintenant que ce récepteur membranaire soit aussi capable d'interagir avec le récepteur de TNF. La **Figure 31** démontre un modèle possible d'interaction entre EXTL3 et TNFR1. Le récepteur EXTL3 étant ubiquitaire et déjà associé à la membrane, il est un candidat idéal pour interagir avec le TNFR1. De plus, tout comme certains des autres co-récepteurs connus, EXTL3 est en mesure d'induire la survie cellulaire et d'activer NF-kB. La signalisation du TNFR1 est connue et présentée à la **Figure 31, partie B**. Ce récepteur est en mesure d'induire l'inflammation et la survie cellulaire via la cascade de signalisation associée au facteur TRAF-2. Par contre, ce récepteur peut aussi engendrer l'apoptose via le recrutement de FADD et l'activation des caspases (Inoue 2000) (Dempsey 2003).

Premièrement, puisque nous savons que le récepteur EXTL3 contient un site potentiel de liaison à TRAF-2 et que le récepteur TNFR1 active la voie de NF-kB via le recrutement de TRAF-2, il est concevable que le récepteur EXTL3 puisse faciliter le recrutement de TRAF-2 au récepteur TNFR1 empêchant la liaison de la molécules FADD. La signalisation engendrée permet donc l'activation accrue de NF-kB et ceci est supporté expérimentalement par nos travaux et ceux de Mizuno qui montrent que la surexpression d'EXTL3 amplifie de plusieurs fois l'activation de NF-kB par TNF α en absence de son ligand Reg I (Mizuno 2001). De plus, les molécules TRAF sont connues pour interagir de façon directe ou indirecte, avec les queues cytoplasmiques de certaines molécules dans le but de transmettre des signaux associés à des désordres inflammatoires ou immunitaires (Inoue 2000). La liaison du récepteur EXTL3 au domaine TRAF-2 du TNFR1, via son domaine cytoplasmique serait donc une voie de signalisation additionnelle dans un nouveau système de maladie inflammatoire, l'arthrose.

Deuxièmement, étant donné qu'il a déjà été souligné que la protéine Reg I peut agir en tant que molécule anti-inflammatoire, nous proposons que la liaison de la protéine Reg I à son récepteur pourrait réduire, voir même inhiber l'interaction du récepteur Reg I/EXTL3 avec TRAF-2 empêchant ainsi EXTL3 d'agir comme co-récepteur de TNFR1 **Figure 31, partie A**. À ce moment, l'activation de NF- κ B ne se fait plus et la voie de l'inflammation n'est plus activée. On pourrait aussi penser que la présence du ligand Reg I empêche possiblement de stabiliser TNFR1 ou encore, que Reg I empêche le TNF α d'activer directement TNFR1.

Dernièrement, le modèle proposé à la **Figure 31** permet aussi d'expliquer partiellement certains des résultats obtenus avec les mutants de délétion de Reg I et d'EXTL3. Dans ce sens, nous avons montré que l'utilisation de la cytokine pro-inflammatoire TNF α entraîne une activation de NF- κ B importante lorsque le récepteur EXTL3 est présent **Figure 22**. Selon le modèle proposé, **Figure 31**, nous pouvons penser que les délétions engendrées ne permettent plus aux mutants de Reg I de réagir à la cytokine soit par le manque d'un domaine essentiel ou encore parce que la protéine Reg délétee bloque le site de liaison sans toutefois engendrer la signalisation via EXTL3, essentielle à l'activation de NF- κ B. En ce qui a trait aux divers mutants d'EXTL3 nous pouvons présager que la perte de nombreux acides aminés dont la perte du domaine transmembranaire, nous pouvons suspecter que la délétion engendrerait un changement conformationnel du récepteur qui ne lui permettrait plus d'interagir avec le TNFR1, ce qui entraînerait une inhibition de NF- κ B.

Évidemment, toutes ces hypothèses devront être vérifiées par diverses expérimentations. Des expériences de co-immunoprécipitation avec un anticorps anti-EXTL3 pourraient être entreprises afin de vérifier l'affinité réelle d'EXTL3 envers TRAF-2. Malheureusement, aucun anticorps commercial d'EXTL3 n'est disponible, cela implique donc que cet anticorps d'EXTL3 soit développé par notre laboratoire. Une méthode alternative serait l'introduction d'une étiquette moléculaire dans la protéine EXTL3 tel que FLAG qui possède que 8 acides aminés en N-terminal ou dans une autre section de la molécule pour éviter de créer des interférences.

Par la suite, des transfections stables dans des cellules HEK pourraient être effectuées afin de surexprimer le transgène Flag-EXTL3 afin de le discriminer du EXTL3 endogène. Par la suite, le niveau d'expression sera vérifié par RT-PCR chez les différents clones et sera confirmé au niveau protéique par des immunobuvardages de type Western afin de s'assurer que blot le Flag-EXTL3 est réellement produit. Des extraits membranaires de cellules traitées dans des conditions différentes pourraient alors être recueillies et cela permettrait des expériences de co-immunoprécipitation avec les molécules Flag-EXTL3 avec un anticorps Flag disponible commercialement. Les protéines co-immunoprécipitées avec EXTL3 seraient séparées sur un gel SDS-Page et détectées après par immunobuvardage. Évidemment, l'utilisation des mutants EXTL3 nouvellement générés permettraient de vérifier si l'interaction avec TRAF-2 est fait de façon directe ou indirecte via un autre partenaire.

Somme toute, les hypothèses nouvellement proposées permettent de suspecter que le récepteur EXTL3 joue un rôle important dans les phénomènes inflammatoires et nous permet de penser que cette molécule et ses divers ligands seraient des cibles thérapeutiques potentielles.

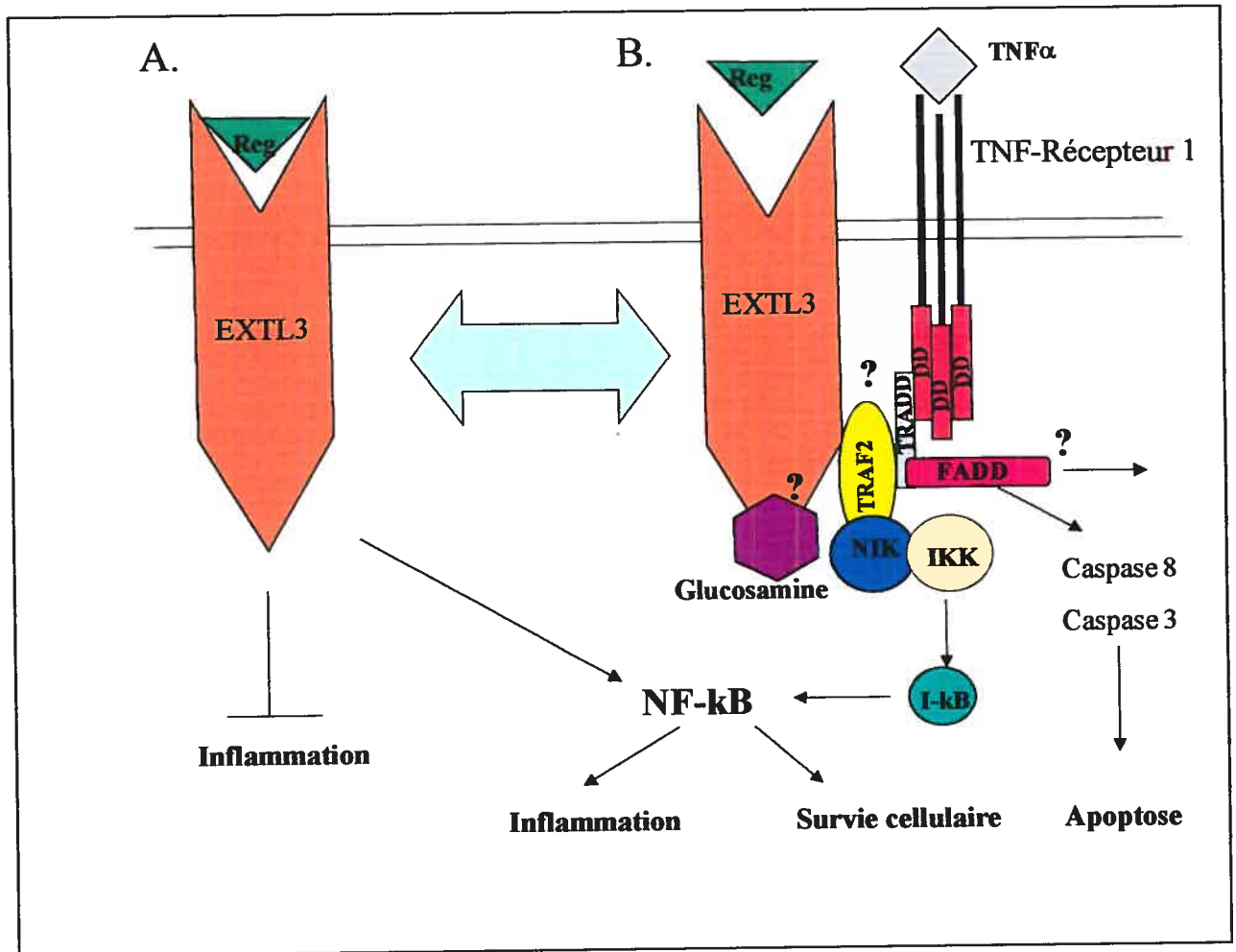


Figure 31. Schématisation de l'interaction possible entre le récepteur EXTL3 et TNFR1.

A. Conformation possible du récepteur EXTL3 alors qu'il n'interagit pas avec le récepteur TNFR1. Dans cette conformation, la voie de NF-kB peut être activée mais la liaison de Reg I ou un autre membre de la famille Reg présent en grande quantité pourrait aussi empêcher l'inflammation. B. Conformation possible du récepteur EXTL3 lorsqu'il interagit avec le TNFR1 via le domaine d'interaction TRAF-2. Le recrutement de TRAF-2 au récepteur TNFR1 provoque le départ de FADD et inhibe la voie de l'apoptose. Lors de l'ajout de la glucosamine, le récepteur EXTL3 subit un changement de conformation et alors, ni le récepteur EXTL3 ni TNFR1 est en mesure d'activer la voie de NF-kB.

4.6 Est-ce que tous les membres de la famille Reg sont en mesure d'homodimérisation ou d'hétérodimérisation?

La présence de plusieurs membres dans la famille Reg porte à croire que ces protéines ont des rôles redondants mais ils ne sont pas tous exprimés dans les mêmes tissus et ne sont pas activés par les mêmes molécules (Zhang 2003). Très peu d'études ont été effectuées sur les interactions entre les membres de la famille Reg et seule l'étude de Bodeker a permis de montrer que Reg III était en mesure d'homodimériser et d'hétérodimériser (section 1.5.5).

Dans le but de tenter d'expliquer certains comportements de la protéine Reg I, nous pouvons penser que celle-ci est tout aussi en mesure d'homodimériser ou encore, d'hétérodimériser ce qui expliquerait entre autre son effet mitogénique à faible dose et apoptotique à forte concentration. Nous pouvons donc proposer que la protéine Reg I est capable d'interagir avec d'autres membres de la même famille dans le but d'optimiser la signalisation.

Considérant que la protéine Reg I serait en mesure de lier d'autres membres de la famille, il serait donc possible de croire que les mutants de délétions générés dans le cadre de cette étude arrivent aussi à se lier à des molécules endogènes de Reg I et pourrait ainsi engendrer une certaine signalisation indépendante de celle générée par les mutants seulement et ainsi restaurer en partie la signalisation essentielle pour activer la voie de NF-kB et de l'inflammation. En ce qui a trait aux comportements des formes délétées de Reg, différentes hypothèses peuvent être proposées pour expliquer leurs comportements. Premièrement, l'ablation des acides aminés peut entraîner une perte d'affinité envers le récepteur EXTL3, ce qui provoquerait une diminution de l'activation de NF-kB. Deuxièmement, contrairement à la première hypothèse proposée, les délétions effectuées pourraient engendrer une augmentation de l'affinité envers le récepteur ce qui pourrait moduler d'avantage l'activité de la forme du mutant de Reg ou encore empêcher l'activité du récepteur en favorisant la liaison des autres membres de la famille Reg. Troisièmement, on peut aussi penser que les divers mutants, Reg Δ 4, Reg Δ 7 et Reg Δ 8 sont aussi en mesure d'homodimériser ou encore, ont perdu cette capacité à dimériser. Dernièrement, les mutants pourraient empêcher les formes endogènes des membres de la famille Reg à homodimériser ou hétérodimériser et ainsi empêcher l'activation de NF-kB.

Des études de co-immunoprécipitations seront à prévoir dans la suite de ce projet dans le but de déterminer si la protéine Reg I est en mesure de lier d'autres membres de la famille et aussi dans le but de vérifier lesquels des mutants générés peuvent interagir avec le prototype Reg I. En effet, on peut suspecter que tous les mutants ne pourront pas interagir ensemble car un domaine de liaison est sûrement présent dans la protéine Reg I initiale. Des anticorps des membres de la famille Reg ayant été commercialisés depuis peu, il sera maintenant possible de vérifier avec exactitude la nature des interactions de la protéine Reg I avec les mutants générés via cette étude. Il serait aussi possible d'effectuer des essais de radio-liaison en utilisant l'iode¹²⁵ comme agent marquant les protéines Reg et ainsi vérifier leur capacité d'homodimérisation, d'hétérodimérisation et l'affinité des mutants de Reg pour le récepteur EXTL3.

4.7 La glucosamine interfère dans la liaison de la protéine Reg I à son récepteur EXTL3.

Les études portant sur récepteur EXTL3 ont montré que celui-ci était en fait une glycosyltransférase qui possède la capacité à transférer des sucres. Dans un autre ordre d'idée, la glucosamine constitue un sucre aminé et est une molécule très en vogue dans le traitement alternatif de l'arthrose. Différentes études ont montré les effets bénéfiques de l'utilisation de glucosamine chez les patients souffrant d'arthrose des membres inférieurs lorsque comparé à des groupes placebo. Le sulfate de glucosamine est constitué de glucosaminoglycans qui sont des constituants normaux du cartilage articulaire humain et il est étudié depuis plus de 20 ans (Richy 2003). Bien que les patients arthrosiques semblent obtenir un soulagement réel en consommant de façon quotidienne la glucosamine et que les études à long terme confirment cette amélioration, le mode d'action de la glucosamine et ses cibles thérapeutiques demeurent encore inconnues.

Étant donné la nature du récepteur et celle de la glucosamine, nous avons vérifié si ces deux molécules seraient capables d'interagir ensemble. Comme le démontre la **Figures 27** la glucosamine permet d'inhiber totalement l'activation de NF- κ B et ce, en présence du récepteur EXTL3.

De plus, les expériences d'immunohistologie ont clairement démontrées qu'en présence de glucosamine, il y avait une diminution importante des protéines Reg I au niveau de la membrane. Au niveau de la quantification de l'inhibition de la voie de NF-kB, les expériences en transfections transitoires ont tout aussi clairement démontrées que la glucosamine permettait une inhibition presque complète de la voie de NF-kB soit environ, d'un facteur 12X **Figure 27**. Il est par contre possible que la perte du signal de Reg I en présence de glucosamine puisse être causée par différents mécanismes.

Premièrement, la glucosamine pourrait inhiber l'expression de Reg I, EXTL3 ou les deux à la fois. Pour examiner cette possibilité, des analyses d'expression en présence et en absence de glucosamine seront nécessaires. Deuxièmement, la glucosamine pourrait affecter la liaison de Reg I à son récepteur par un changement de conformation. Pour tester cette hypothèse, l'utilisation de protéines Reg I marquées à l'iode¹²⁵ ou tritiées permettront de faire des tests de compétition en présence de glucosamine. Toutefois, il faudra s'assurer que la glucosamine n'affecte pas l'expression ou la localisation de Reg I et de EXTL3.

La possible capacité de la glucosamine à interagir avec le récepteur EXTL3 est une nouvelle découverte d'importance capitale car malgré l'utilisation fréquente de ce produit par les patients dans le but de soulager leurs symptômes, aucune équipe n'a permis, jusqu'à ce jour de déterminer son mécanisme d'action. Nous proposons donc que le récepteur EXTL3 est une cible thérapeutique de la glucosamine et les différentes hypothèses liées au mécanisme d'interaction entre le récepteur et la glucosamine sont proposées **Figure 31**.

Tout d'abord, étant donné que la présence de la glucosamine simultanée à celle de la cytokine pro-inflammatoire $TNF\alpha$ empêche l'activation presque totalement de NF-kB, nous pouvons postuler que tout le système EXTL3/TNFR1 soit perturbé par l'action de la glucosamine. **Figure 31, partie B.** L'activité catalytique du récepteur EXTL3 étant situé dans la région C terminale, à proximité du domaine d'interaction de TRAF-2, il est donc concevable que la glucosamine induise un changement conformationnel dans cette région catalytique qui empêche non seulement le récepteur EXTL3 de lier TRAF-2 mais qui doit aussi modifier l'interaction existante entre EXTL3 et TNFR1 au point d'inhiber l'activation directe de TNFR1 par $TNF\alpha$.

Il sera intéressant de répéter cette expérience avec les mutants de délétion d'EXTL3 nouvellement générés dans le but de vérifier si la glucosamine permet l'inhibition de la voie de NF-kB et ce, malgré l'ablation de plusieurs acides aminés au niveau du récepteur EXTL3. Ces essais avec les mutants de délétion nous permettraient de déterminer avec exactitude le site d'action de la glucosamine au niveau du récepteur EXTL3. Enfin, la possible identification du site d'action de la glucosamine s'avère une découverte majeure au niveau fondamental mais tout aussi importante au niveau clinique car elle permettra de tester de nouveaux composés capables de bloquer à différents niveaux la signalisation du TNFR1 et/ou de moduler l'interaction de Reg I avec son récepteur.

BIBLIOGRAPHIE

Abe M, Nata K, Akiyama T, Shervani NJ, Kobayashi S, Tomioka-Kumagai T, Ito S, Takasawa S, Okamoto H. *Identification of a novel Reg family gene, Reg IIIdelta, and mapping of all three types of Reg family gene in a 75 kilobase mouse genomic region.* Gene. 2000 Apr 4;246(1-2):111-22.

Aigner T, Dudhia J. *Genomics of osteoarthritis.* Curr Opin Rheumatol. 2003 Sep;15(5):634-40.

Akiyama T, Takasawa S, Nata K, Kobayashi S, Abe M, Shervani NJ, Ikeda T, Nakagawa K, Unno M, Matsuno S, Okamoto H. *Activation of Reg gene, a gene for insulin-producing beta-cell regeneration: poly(ADP-ribose) polymerase binds Reg promoter and regulates the transcription by autopoly(ADP-ribosylation).* Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jan 2;98(1):48-53.

Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. *The PARP superfamily.* Bioessays. 2004 Aug;26(8):882-93.

Baldwin AS Jr. *Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease.* J Clin Invest. 2001 Jan;107(1):3-6.

Baldwin AS Jr. *The NF-kappaB and I kappa B proteins: new discoveries and insights.* Annu Rev Immunol 1996; 14: 649-83

Bernard-Perrone FR, Renaud WP, Guy-Crotte OM, Bernard P, Figarella CG, Okamoto H, Balas DC, Senegas-Balas FO. *Expression of REG protein during cell growth and differentiation of two human colon carcinoma cell lines.* J Histochem Cytochem. 1999 Jul;47(7):863-70.

Bimmler D, Schiesser M, Perren A, Scheele G, Angst E, Meili S, Ammann R, Graf R. *Coordinate regulation of PSP/reg and PAP isoforms as a family of secretory stress proteins in an animal model of chronic pancreatitis.* J Surg Res. 2004 May 15;118(2):122-35.

Bird HA. *Controversies in the treatment of osteoarthritis.* Clin Rheumatol. 2003 Sep;22(3):165-7.

Bodeker H, Keim V, Fiedler F, Dagorn JC, Iovanna JL. *PAP I interacts with itself, PAP II, PAP III, and lithostathine/regIalpha.* Mol Cell Biol Res Commun. 1999 Sep-Dec;2(3):150-4

Brandt K. *Paracetamol in the treatment of osteoarthritis pain.* Drugs. 2003;63 Spec No 2:23-41.

Brandi ML, Gennari L, Cerinic MM, Becherini L, Falchetti A, Masi L, Gennari C, Reginster JY. *Genetic markers of osteoarticular disorders: facts and hopes*. Arthritis Res. 2001;3(5):270-80. Epub 2001 Jul 4.

Bulfone-Paus S, Bulanova E, Pohl T, Budagian V, Durkop H, Ruckert R, Kunzendorf U, Paus R, Krause H. *Death deflected: IL-15 inhibits TNF-alpha-mediated apoptosis in fibroblasts by TRAF2 recruitment to the IL-15Ralpha chain*. FASEB J. 1999 Sep;13(12):1575-85.

Burr DB. *Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage. 2004;12 Suppl A:S20-30.

Carr AJ. *The genetic basis of severe osteoarthritis*. Ann R Coll Surg Engl. 2003 Jul;85(4):263-8

Chevalier X. *Physiopathogenesis of osteoarthritis. The arthritis cartilage*. Presse Med. 1998 Jan 17;27(2):81-7.

Conrozier T, Flipo RM. *Current management of osteoarthritis. Part 1: pharmacological strategies*. Rev Med Interne. 2003 Mar;24(3):183-8.

Crawford MJ, Lanctôt C, Tremblay JJ, Jenkins N, Gilbert D, Copeland N, Beatty B et Drouin J. *Human and murine PTX1/Ptx1 gene maps to the region for Treacher Collins syndrome*. Mamm Genome, 8 1997, 841-845.

D'Ambrosia R. *Epidemiology of osteoarthritis*. Orthopedics. 2005 Feb;28:s201-5.

Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. *The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily*. Cytokine Growth Factor Rev. 2003 Jun-Aug;14(3-4):193-209.

Dhar DK, Udagawa J, Ishihara S, Otani H, Kinoshita Y, Takasawa S, Okamoto H, Kubota H, Fujii T, Tachibana M, Nagasue N. *Expression of regenerating gene I in gastric adenocarcinomas: correlation with tumor differentiation status and patient survival*. Cancer. 2004 Mar 15;100(6):1130-6

Dieppe PA, Lohmander LS. *Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis*. Lancet. 2005 Mar 12;365(9463):965-73.

Duncan G, McCormick C, Tufaro F. *The link between heparan sulfate and hereditary bone disease: finding a function for the EXT family of putative tumor suppressor proteins*. J Clin Invest. 2001 Aug;108(4):511-6.

Felson DT, Anderson JJ, Naimark A. *Obesity and knee osteoarthritis: The Framingham study*. Ann Intern Med 1988: 109:18-24

Gaur U, Aggarwal BB. *Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily*. *Biochem Pharmacol*. 2003 Oct 15;66(8):1403-8.

Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, Affolter M, Otting G, Wuthrich K. *Homeodomain-DNA recognition*. *Cell*. 1994 Jul 29;78(2):211-23.

Gerbaud V, Pignol D, Loret E, Bertrand JA, Berland Y, Fontecilla-Camps JC, Canselier JP, Gabas N, Verdier JM. *Mechanism of calcite crystal growth inhibition by the N-terminal undecapeptide of lithostathine*. *J Biol Chem*. 2000 Jan 14;275(2):1057-64.

Goetz FW, Planas JV, MacKenzie S. *Tumor necrosis factors*. *Dev Comp Immunol*. 2004 May 3;28(5):487-97.

Graf R, Schiesser M, Scheele GA, Marquardt K, Frick TW, Ammann RW, Bimmler D. *A family of 16-kDa pancreatic secretory stress proteins form highly organized fibrillar structures upon tryptic activation*. *J Biol Chem*. 2001 Jun 15;276(24):21028-38. Epub 2001 Mar 16.

Gouze JN, Bianchi A, Becuwe P, Dauca M, Netter P, Magdalou J, Terlain B, Bordji K. *Glucosamine modulates IL-1-induced activation of rat chondrocytes at a receptor level, and by inhibiting the NF-kappa B pathway*. *FEBS Lett*. 2002 Jan 16;510(3):166-70.

Grainger R, Cicuttini FM. *Medical management of osteoarthritis of the knee and hip joints*. *Med J Aust*. 2004 Mar 1;180(5):232-6.

Gu Z, Rubin MA, Yang Y, Deprimo SE, Zhao H, Horvath S, Brooks JD, Loda M, Reiter RE. *Reg IV: a promising marker of hormone refractory metastatic prostate cancer*. *Clin Cancer Res*. 2005 Mar 15;11(6):2237-43.

Gupta S. *Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis*. *Int J Oncol*. 2003 Jan;22(1):15-20.

Hamerman DS. *The biology of osteoarthritis*. *N Engl J Med* 1989; 320: 1322-30

Hartupee JC, Zhang H, Bonaldo MF, Soares MB, Dieckgraefe BK. *Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel member of the human regenerating protein family: Reg IV*. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Apr 16;1518(3):287-93.

Hayden MS, Ghosh S. *Signaling to NF-kappaB*. *Genes Dev*. 2004 Sep 15;18(18):2195-224.

Hsu H, Solovyev I, Colombero A, Elliott R, Kelley M, Boyle WJ. *ATAR, a novel tumor necrosis factor receptor family member, signals through TRAF2 and TRAF5*. J Biol Chem. 1997 May 23;272(21):13471-4.

Idriss HT, Naismith JH. *TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)*. Microsc res tech 2000; 50 (3):184-95

Ilic MZ, Martinac B, Handley CJ. *Effects of long-term exposure to glucosamine and mannosamine on aggrecan degradation in articular cartilage*. Osteoarthritis Cartilage. 2003 Aug;11(8):613-22.

Iovanna J, Orelle B, Keim V, Dagorn JC. *Messenger RNA sequence and expression of rat pancreatitis-associated protein, a lectin-related protein overexpressed during acute experimental pancreatitis*. J Biol Chem. 1991 Dec 25;266(36):24664-9

Inoue J, Ishida T, Tsukamoto N, Kobayashi N, Naito A, Azuma S, Yamamoto T. *Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling*. Exp Cell Res. 2000 Jan 10;254(1):14-24.

Kelley's Textbook of Rheumatology. Edward D. Harris Jr. 7th edition. Pages 380-390 et 1496-1499.

Kiji T, Dohi Y, Takasawa S, Okamoto H, Nonomura A, Taniguchi S. *Activation of regenerating gene (Reg) in rat and human hearts in response to acute stress*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Mar 18.

Kim BT, Kitagawa H, Tamura J, Saito T, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Sugahara K. *Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode alpha 1,4- N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/ heparin biosynthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jun 19;98(13):7176-81. Epub 2001 Jun 5.

Kinoshita Y, Ishihara S, Kadowaki Y, Fukui H, Chiba T. *Reg protein is a unique growth factor of gastric mucosal cells*. J Gastroenterol. 2004 Jun;39(6):507-13.

Kobayashi S, Akiyama T, Nata K, Abe M, Tajima M, Shervani NJ, Unno M, Matsuno S, Sasaki H, Takasawa S, Okamoto H. *Identification of a receptor for reg (regenerating gene) protein, a pancreatic beta-cell regeneration factor*. J Biol Chem. 2000 Apr 14;275(15):10723-6.

Kolb H., *Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice*. Diabetes Metab Rev. 1987 Jul;3(3):751-78.

Knowlton RG, Kaltzen PL, Moskowitz RW. *Genetic linkage of a polymorphism in the type II collagen gene to primary osteoarthritis associated with chondrodysplasia*. N Engl J Med 1990; 32:526-30

Kobayashi S, Akiyama T, Nata K, Abe M, Tajima M, Shervani NJ, Unno M, Matsuno S, Sasaki H, Takasawa S, Okamoto H. *Identification of a receptor for reg (regenerating gene) protein, a pancreatic beta-cell regeneration factor*. J Biol Chem. 2000 Apr 14;275(15):10723-6.

Lajeunesse D, Hilal G, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. *Subchondral bone morphological and biochemical alterations in osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage. 1999 May;7(3):321-2.

Lanctot C, Moreau A, Chamberland M, Tremblay ML, Drouin J. *Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene*. Development. 1999 May;126(9):1805-10.

Lantz M, Thysell H, Nilsson E, Olsson I. *On the binding of tumor necrosis factor (TNF) to heparin and the release in vivo of the TNF-binding protein I by heparin*. J Clin Invest. 1991 Dec;88(6):2026-31.

Largo R, Alvarez-Soria MA, Diez-Ortego I, Calvo E, Sanchez-Pernaute O, Egado J, Herrero-Beaumont G. *Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes*. Osteoarthritis Cartilage. 2003 Apr;11(4):290-8.

Laurine E, Manival X, Montgelard C, Bideau C, Berge-Lefranc JL, Erard M, Verdier JM. *PAP IB, a new member of the Reg gene family: cloning, expression, structural properties, and evolution by gene duplication*. Biochim Biophys Acta. 2005 Mar 10;1727(3):177-87

Lee BI, Mustafi D, Cho W, Nakagawa Y. *Characterization of calcium binding properties of lithostathine*. J Biol Inorg Chem. 2003 Feb;8(3):341-7. Epub 2002 Nov 16.

Logan M et Tabin C. *Role of Pitx1 upstream of TBx4 in specification of hindlimb identity*. Science, 283, 1999, 1736-1739.

Martel-Pelletier J. *Pathophysiology of osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage. 2004;12 Suppl A:S31-3

Mercie P, Seigneur M, Bilhou-Nabera C, Boisseau MR, Bernard P. *Nuclear transcription factor kappa B (NF-kappa B)* Rev Med Interne. 1998 Dec;19(12):945-7.

Mizuno K, Irie S, Sato TA. *Overexpression of EXTL3/EXTR1 enhances NF-kappaB activity induced by TNF-alpha*. Cell Signal. 2001 Feb;13(2):125-30.

Namikawa K, Fukushima M, Murakami K, Suzuki A, Takasawa S, Okamoto H, Kiyama H. *Expression of Reg/PAP family members during motor nerve regeneration in rat*. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Jun 24;332(1):126-34.

Nata K, Liu Y, Xu L, Ikeda T, Akiyama T, Noguchi N, Kawaguchi S, Yamauchi A, Takahashi I, Shervani NJ, Onogawa T, Takasawa S, Okamoto H. *Molecular cloning, expression and chromosomal localization of a novel human REG family gene, REG III*. *Gene*. 2004 Sep 29;340(1):161-70.

Nguewa PA, Fuertes MA, Valladares B, Alonso C, Perez JM. *Poly(ADP-ribose) polymerases: homology, structural domains and functions. Novel therapeutical applications*. *Prog Biophys Mol Biol*. 2005 May;88(1):143-72.

O'Connor P, Orford CR, Gardner DL. *Differential response to compressive loads of zones of canine hyaline articular cartilage: micromechanical, light and electron microscopic studies*. *Ann Rheumat Dis* 1988; 47:414-20.

Okamoto H, Takasawa S. *Recent advances in the Okamoto model: the CD38-cyclic ADP-ribose signal system and the regenerating gene protein (Reg)-Reg receptor system in beta-cells*. *Diabetes*. 2002 Dec;51 Suppl 3:S462-73.

Osman NM, Kagohashi Y, Udagawa J, Otani H. *Alpha1,4-N-acetylglucosaminyltransferase encoding gene EXTL3 expression pattern in mouse adult and developing tissues with special attention to the pancreas*. *Anat Embryol (Berl)*. 2003 Dec;207(4-5):333-41. Epub 2003 Nov 15.

Osman NM, Naora H, Otani H. *Glycosyltransferase encoding gene EXTL3 is differentially expressed in the developing and adult mouse cerebral cortex*. *Brain Res Dev Brain Res*. 2004 Jul 19;151(1-2):111-7.

Patard L, Lallemand JY, Stoven V. *An insight into the role of human pancreatic lithostathine*. *JOP*. 2003 Mar;4(2):92-103.

Poiraudeau S. *Effects of growth factors on the articular cartilage*. *Rev Prat*. 1996 Dec 1;46 (19 Spec No):S11-4

Poiraudeau S, Berenbaum F, Corvol M. *Cartilage degradation and articular inflammation*. *Rev Prat* 1996 Nov 15;46(18):2180-5

Poligone B, Baldwin AS. *Positive and negative regulation of NF-kappaB by COX-2: roles of different prostaglandins*. *J Biol Chem*. 2001 Oct 19;276(42):38658-64. Epub 2001 Aug 16.

Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. *Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair*. *Clin Orthop Relat Res*. 2001 Oct;(391 Suppl):S26-33

Ravaud P, Auleley GR. *Causes and evolutive profiles of osteoarthritis*. *Rev Prat*. 1996 Nov 15;46(18):2173-7.

Richy F, Bruyere O, Ethgen O, Cucherat M, Henrotin Y, Reginster JY. *Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: a comprehensive meta-analysis*. Arch Intern Med. 2003 Jul 14;163(13):1514-22.

Rossignol M. *Primary osteoarthritis and occupation in the Quebec national health and social survey*. Occup Environ Med. 2004 Sep;61(9):729-35.

Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Takeda J, Nanakin A, Hisatsune H, Seno H, Takasawa S, Okamoto H, Fujimori T, Chiba T. *REG Ialpha protein may function as a trophic and/or anti-apoptotic factor in the development of gastric cancer*. Gastroenterology. 2005 Mar;128(3):642-53.

Shinmei M, Okada Y, Masuda K. *The mechanism of cartilage degradation in osteoarthritic joint*. Semin Arthritis Rheum 1990;19(4) 16-20.

Stecher RM. Heberden's Nodes. *Heridity in hypertrophic arthritis of the finger joints*. Am J Med Science 1941 :201:801

Stickens D, Brown D, Evans GA. *EXT genes are differentially expressed in bone and cartilage during mouse embryogenesis*. Dev Dyn. 2000 Jul;218(3):452-64.

Szeto DP, Rodriguez-Esteban C, Ryan AK, O'Connell SM, Liu F, Kioussi C, Gleiberman AS, Izpisua-Belmonte JC, Rosenfeld MG. *Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development*. Genes Dev. 1999 Feb 15;13(4):484-94.

Tak PP, Firestein GS. *NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases*. J Clin Invest. 2001 Jan;107(1):7-11.

Tartaglia LA, Goeddel DV. *Two TNF receptors*. Immunol Today. 1992 May;13(5):151-3.

Taylor-Fishwick DA, Rittman S, Kendall H, Roy L, Shi W, Cao Y, Pittenger GL, Vinik AI. *Cloning genomic INGAP: a Reg-related family member with distinct transcriptional regulation sites*. Biochim Biophys Acta. 2003 May 20;1638(1):83-9.

Terazono K, Yamamoto H, Takasawa S, Shiga K, Yonemura Y, Tochino Y, Okamoto H. *A novel gene activated in regenerating islets*. J Biol Chem. 1988 Feb 15;263(5):2111-4

Tracey KJ, Cerami A. *Tumor necrosis, other cytokines and diseases*. Ann Rev Cell Biol 1993; 9:317-43

Tyler JA. *Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines.* Biochem J. 1989 Jun 1;260(2):543-8.

Unno M, Yonekura H, Nakagawara K, Watanabe T, Miyashita H, Moriizumi S, Okamoto H, Itoh T, Teraoka H. *Structure, chromosomal localization, and expression of mouse reg genes, reg I and reg II. A novel type of reg gene, reg II, exists in the mouse genome.* J Biol Chem. 1993 Jul 25;268(21):15974-82

Unno M, Nata K, Noguchi N, Narushima Y, Akiyama T, Ikeda T, Nakagawa K, Takasawa S, Okamoto H. *Production and characterization of Reg knockout mice: reduced proliferation of pancreatic beta-cells in Reg knockout mice.* Diabetes. 2002 Dec;51 Suppl 3:S478-83.

Urban JPGA. *The chondrocyte: a cell under pressure.* Br J rheumatol 1994;33:901-8

Vad VB, Bhat AL. *The athlete with early knee arthritis.* Phys Med Rehabil Clin N Am. 2000 Nov;11(4):881-94.

Van Hul W, Wuyts W, Hendrickx J, Speleman F, Wauters J, De Boulle K, Van Roy N, Bossuyt P, Willems PJ. *Identification of a third EXT-like gene (EXTL3) belonging to the EXT gene family.* Genomics. 1998 Jan 15;47(2):230-7.

Watanabe T, Yonekura H, Terazono K, Yamamoto H, Okamoto H. *Complete nucleotide sequence of human reg gene and its expression in normal and tumoral tissues. The reg protein, pancreatic stone protein, and pancreatic thread protein are one and the same product of the gene.* J Biol Chem. 1990 May 5;265(13):7432-9.

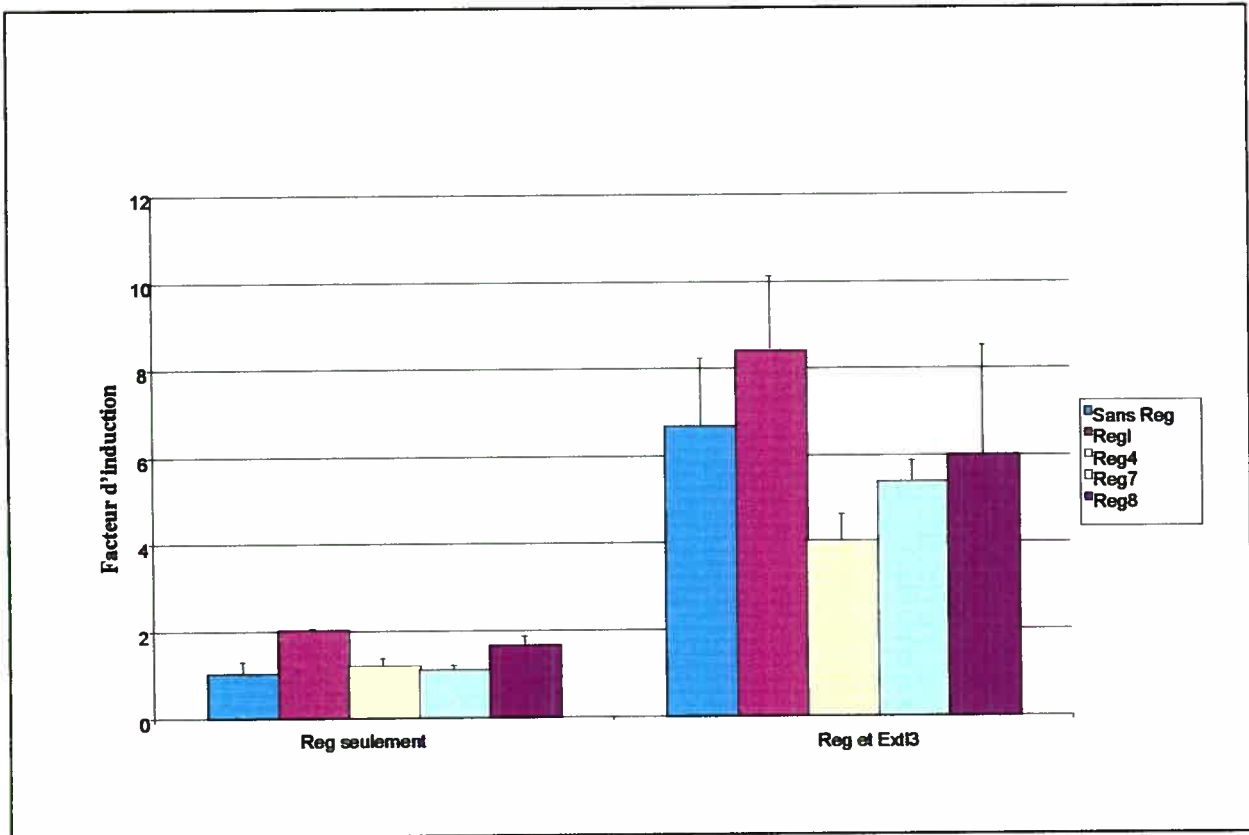
Ye H, Park YC, Kreishman M, Kieff E, Wu H. *The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2.* Mol Cell. 1999 Sep;4(3):321-30.

Yonemura Y, Takashima T, Miwa K, Miyazaki I, Yamamoto H, Okamoto H. *Amelioration of diabetes mellitus in partially depancreatized rats by poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors. Evidence of islet B-cell regeneration.* Diabetes. 1984 Apr;33(4):401-4

Zabel U, Schreck R, Bauerle PA. *DNA binding of purified transcription factor NF- κ B.* J Biol Chem 1991; 266: 252-60

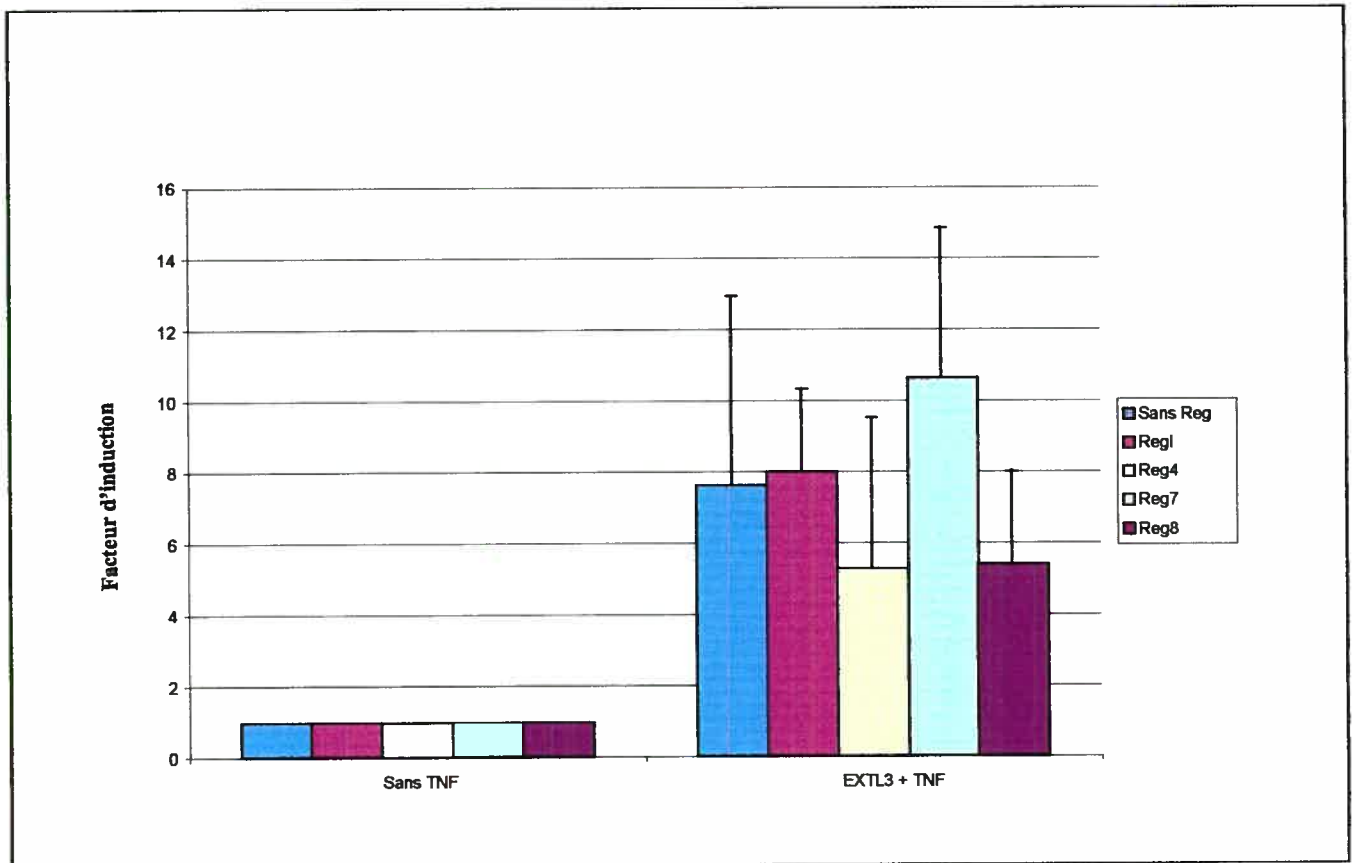
Zhang YW, Ding LS, Lai MD. *Reg gene family and human diseases.* World J Gastroenterol. 2003 Dec;9(12):2635-41.

ANNEXES



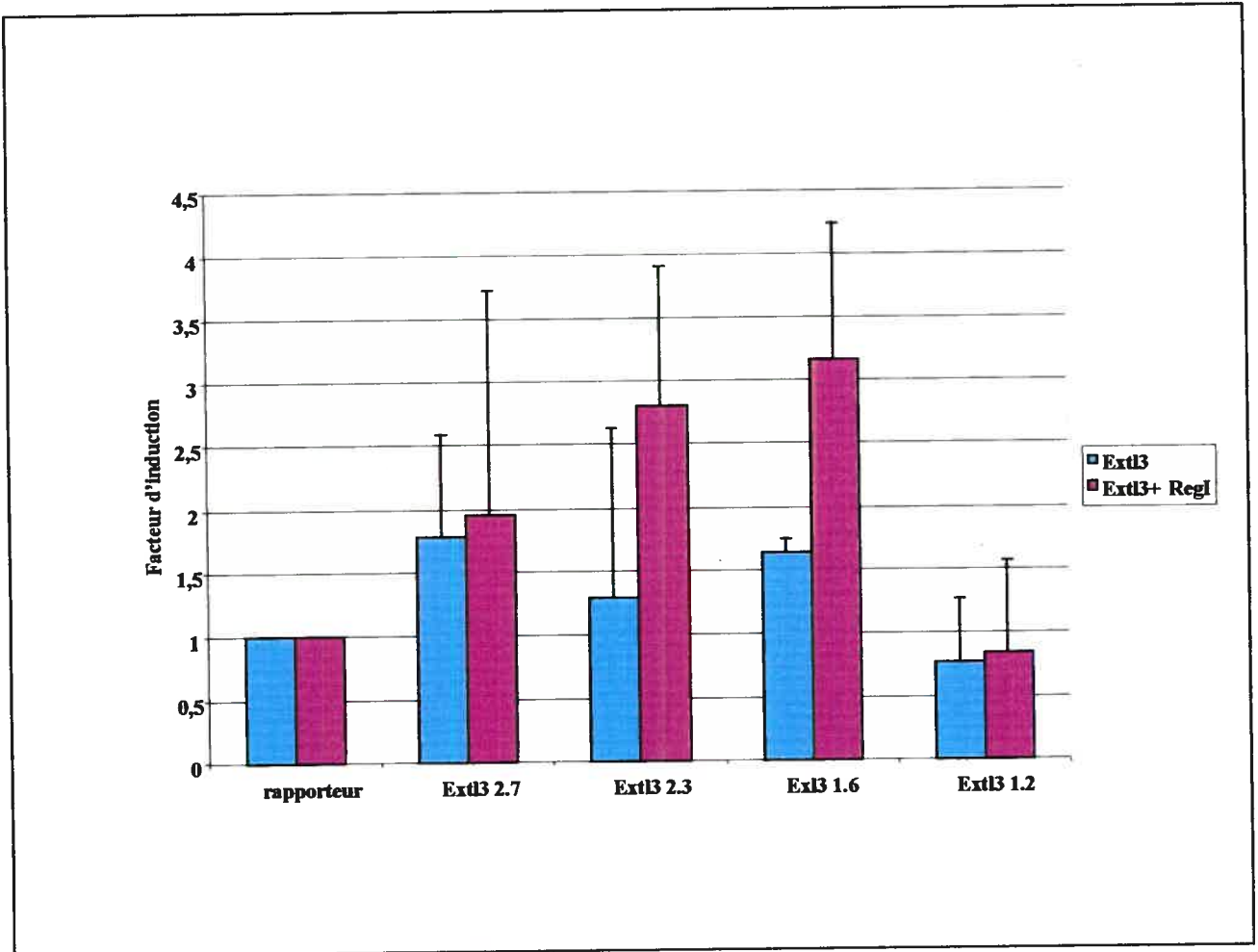
ANNEXE 1. Résultats préliminaires des divers mutants Reg I, Reg Δ 4, Reg Δ 7 et Reg Δ 8 sur l'activation de NF-kB.

Les essais préliminaires de transfections transitoires avec les divers mutants Reg I ne nous permettent pas d'établir un profil caractéristique pour chacun des mutants. Malgré la délétion de nombreux acides aminés, l'activation de la voie de NF-kB ne semble pas affectée pour tous les mutants. Cette expérience devra être complétée afin de pouvoir déterminer avec justesse les domaines essentiels de Reg I pour l'activation de la voie de NF-kB.



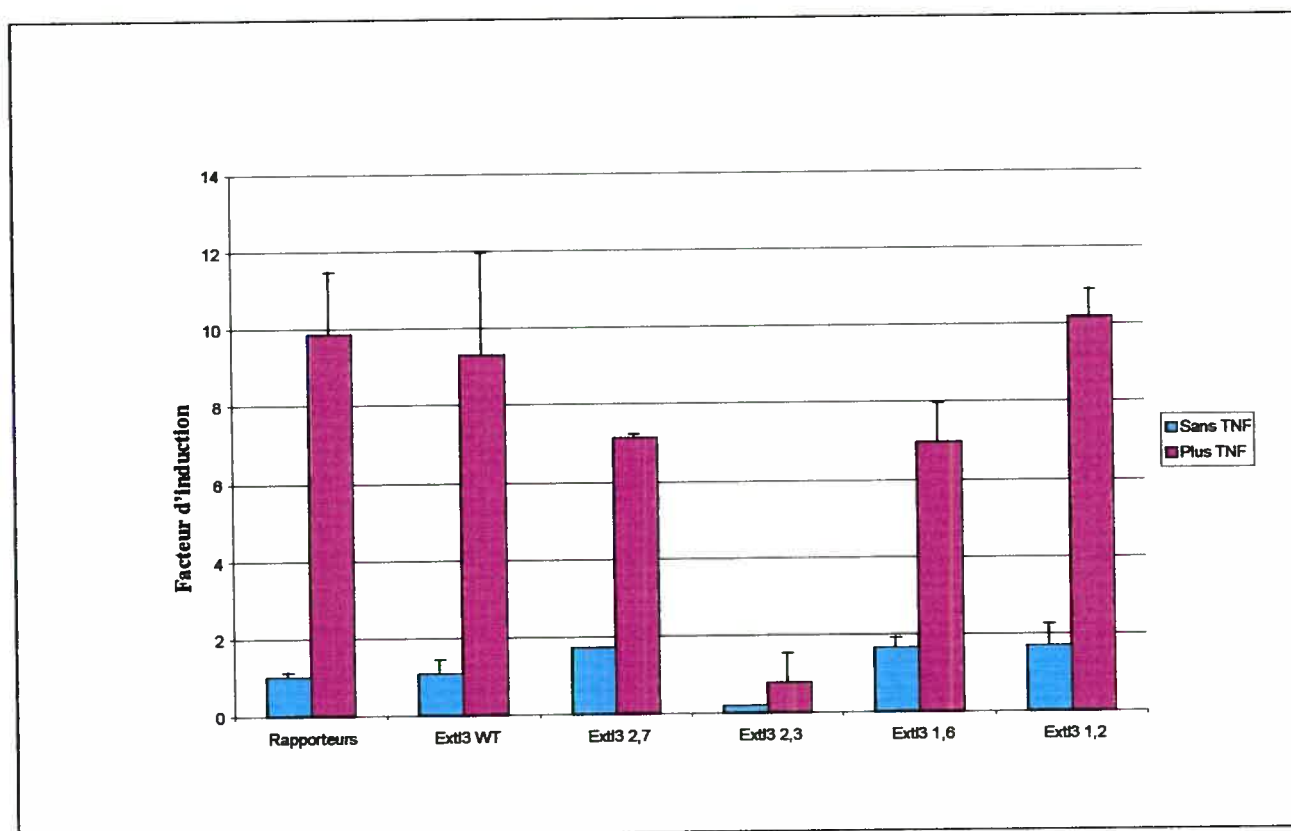
ANNEXE 2. Résultats préliminaires de l'impact de la cytokine pro-inflammatoire $TNF\alpha$ sur l'activation de la voie de $NF-\kappa B$ sur les mutants de délétion Reg I.

Les résultats préliminaires semble montrer que l'ajout de la cytokine pro-inflammatoire $TNF\alpha$ augmente l'activation la voie de $NF-\kappa B$ de façon importante lorsque l'a compare à l'activation en absence de cytokine. La grandeur des écarts type ne nous permet pas de dépister une réaction différente d'un mutant par rapport à un autre en présence de la cytokine par rapport lorsque cette cytokine $TNF\alpha$ est absente. Ces expériences seront effectuées à nouveau afin de pouvoir établir un profil de réaction pour chacun des mutants.



ANNEXE 3. Résultats préliminaires de l'impact des délétions sur EXTL3 sur l'activation de la voie de NF-kB en présence ou en absence de la protéine Reg I.

Les résultats préliminaires des mutants de délétion d'EXTL3 ne sont pas assez reproductibles pour tirer une conclusion concernant leur capacité à activer ou non la voie signalisation NF-kB et ce en absence ou en présence de la protéine Reg I. Les résultats à venir nous permettront d'établir des profils pour chacun des mutants de délétion du gène EXTL3 afin de caractériser leur capacité à lier la protéine Reg I malgré les acides aminés manquants.



ANNEXE 4. Résultats préliminaires de l'effet du $TNF\alpha$ sur les mutants de délétion d'EXTL3.

La présence de la cytokine pro-inflammatoire a été ajoutée au milieu de transfection dans le but de vérifier si elle permettait toujours l'activation de la voie de NF- κ B via tous les mutants d'EXTL3. Parmi les résultats présentés, l'inhibition de l'activation via le mutant de 2,3 kB pourrait devenir fort intéressant. En effet, celui-ci semble vouloir agir en tant que dominant négatif malgré l'absence de son domaine transmembranaire. La suite de ces expériences nous permettra de confirmer la capacité ou l'incapacité du mutant de 2,3 kB d'agir comme dominant négatif et de caractériser les autres mutants.