

Université de Montréal

**Rôle de la méthylation de l'ADN dans la régulation de l'expression
des gènes 15-LOX-1 et 15-LOX-2 dans le cartilage**

Par

Guireh Gadid Guedi

Programme de Biologie moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise ès sciences (M.Sc) en biologie moléculaire, option maladies complexes

Janvier 2018

© Gadid Guedi, 2018

Résumé

L'arthrose se caractérise, entre autres, par la dégradation du cartilage articulaire et l'inflammation de la synoviale. Ces caractéristiques sont dues à l'augmentation de la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires et cataboliques. Les mécanismes moléculaires, qui en sont à l'origine, ne sont pas bien connus.

Des études préliminaires ont montré que l'expression des gènes 15-LOXs, ayant un rôle anti-catabolique et anti-inflammatoire, est diminuée dans le cartilage arthrosique. Notre hypothèse est que la méthylation d'ADN des promoteurs proximaux des gènes 15-LOX-1 et 15-LOX-2 inhibe leurs expressions dans le cartilage arthrosique. Notre objectif est de déterminer s'il y a une corrélation entre leur expression et la méthylation de leurs promoteurs.

L'expression de ces gènes, dans les cartilages arthrosiques et non arthrosiques, a été évaluée par immunohistochimie et RT-PCR en temps réel. L'effet de la déméthylation par l'AZA-DC, agent déméthylant, sur leur expression a été évalué par RT-PCR. Les taux de méthylation des sites CpG au niveau des promoteurs de la 15-LOX-1(29 sites) et 15-LOX-2 (12 sites), dans les cartilages arthrosiques dégradés ou intacts, ont été évalués par pyroséquençage.

Nos résultats confirment une diminution de l'expression des gènes 15-LOXs dans le cartilage arthrosique et une augmentation significative de l'expression des gènes 15-LOXs sous l'effet de l'AZA-DC. Nous avons également montré l'absence des différences de méthylation des sites CpG des promoteurs des gènes 15-LOXs entre les cartilages arthrosiques dégradés et intacts. Les taux de méthylation des sites CpG sont globalement faibles.

Ces résultats suggèrent que la répression de l'expression de gènes 15-LOXs, dans le cartilage arthrosique n'est pas due à la méthylation d'ADN.

Mots-clés : arthrose, méthylation de l'ADN, régulation de l'expression des gènes 15-LOXs.

Abstract

Osteoarthritis is characterized, among other things, by the breakdown of articular cartilage and the inflammation of the synovium. These features are due to increased synthesis of pro-inflammatory and catabolic mediators. The molecular mechanisms underlying these changes are poorly known.

Preliminary work indicates that the 15-LOXs genes have an anti-catabolic and anti-inflammatory role and that their expression is decreased in OA cartilage. Our hypothesis is that DNA methylation of the proximal promoters of the 15-LOX-1 and 15-LOX-2 genes inhibits their expression in OA cartilage. Our goal is to determine whether there is a correlation between their expression and the methylation of their promoters.

Expression of these genes in both OA and normal cartilage was evaluated by immunohistochemistry and real-time RT-PCR. The effect of 5-AZA, a demethylating agent, on their expression was evaluated by RT-PCR. The methylation levels of their proximal promoters in degraded or intact osteoarthritic cartilage were evaluated by pyrosequencing.

Our results showed a decrease in 15-LOX gene expression in OA cartilage. We also observed a significant increase in 15-LOXs gene expression upon treatment with 5-AZA-DC. In addition, we demonstrated that there were no differences in the methylation levels of CpG sites of 15-LOXs gene promoters between degraded and intact osteoarthritic cartilages. Methylation rates of CpG sites are generally low

These results suggest that repression of 15-LOXs gene expression in osteoarthritic cartilage is not due to DNA methylation.

Key words: Osteoarthritis, DNA methylation, regulation of gene expression 15-LOXs.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	xii
Remerciements	xv
Chapitre I : Introduction	1
I. L'arthrose	2
I.1. L'épidémiologie de l'OA	2
I.2. Les symptômes.....	2
I.3. Les facteurs de risque de l'arthrose.....	3
I.3.1. Les facteurs de risque systémique.....	3
I.3.1.1. Le vieillissement et le sexe	3
I.3.1.2. Les prédispositions génétiques et l'ethnicité	3
I.3.2. Les facteurs de risque local.....	4
I.3.2.1. L'obésité	4
I.3.2.2. Certains métiers et activités physiques	5
I.3.2.3. L'alimentation.....	5
I.3.2.4. Les blessures au niveau de l'articulation et les autres facteurs.	5
I.4. Les traitements de l'arthrose	6
I.4.1. Les traitements non pharmacologiques.....	6
I.4.2. Les traitements pharmacologiques.....	6
I.4.2.1 Les analgésiques	6
I.4.2.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	6
I.4.2.3. Les corticostéroïdes	7

I.4.2.4. La viscosupplémentation et les autres médicaments.....	7
I.4.3. Les traitements chirurgicaux et les cellules souches.....	8
II. La structure de l'articulation du genou et la physiopathologie de l'arthrose du genou.....	8
II. 1 La structure de l'articulation du genou.....	8
II. 1.1 Le cartilage articulaire.....	9
II. 1.2 La membrane et le liquide synovial.....	11
II. 1.2.1 La membrane synoviale.....	11
II. 1.2.2 Le liquide synovial.....	13
II. 1.3 L'os sous-chondral.....	13
II. 2 La physiopathologie de l'arthrose de genou.....	14
II. 2.1. Le déséquilibre du métabolisme des chondrocytes.....	15
II. 2.2. Les facteurs cataboliques impliqués dans l'OA : les protéases.....	17
II. 2.3. Les cytokines pro-inflammatoires.....	18
II. 2.4. Les radicaux libres.....	18
II. 2.5. Les eicosanoïdes.....	19
II. 3. La biosynthèse des eicosanoïdes.....	19
II. 3.1 La voie de la cyclo-oxygénase (COX).....	20
II. 3.1.1. La synthèse des prostaglandines.....	23
II. 3. 1. 2. La synthèse de prostacycline I2 (PGI2).....	25
II. 3. 1. 3. La synthèse de thromboxane A2 (TXA2).....	25
II. 3.2. La voie des lipoxygénases (LOXs).....	26
II. 3. 2. 1. La 5-lipoxygénase (5-LOX).....	27
II. 3. 2. 2. Les 12-lipoxygénases (12-LOXs).....	27
II. 3. 2. 3. Les 15-lipoxygénases (15-LOX).....	28
II. 4. La régulation des gènes 15-LOXs.....	30
II. 4.1. Régulation de l'expression du gène 15-LOX-1.....	30
II. 4.2. La régulation de l'expression du gène 15-LOX-2.....	31

III. 2. L'analyse de l'effet de la 5-AZA-DC sur l'expression des gènes 15-LOX-1 et 15 -LOX-2 par RT-PCR en temps réel.	51
III.3. L'Étude <i>in silico</i> des promoteurs proximaux des gènes 15-LOXs et la conception des amorces	52
III.4. La quantification des taux de méthylation des sites CpG du promoteur proximal des gènes 15-LOXs du cartilage arthrosique dégradé et du cartilage non dégradé.	52
III.4 1. Extraction d'ADN à partir du cartilage	52
III.4. 2 la conversion au bisulfite de sodium	53
III.4. 3. L'amplification par PCR	54
III. 4. 4. Le pyroséquençage	56
III.5. L'analyse statistique	59
Chapitre III : Résultats.....	60
I. L'évaluation de l'expression des gènes 15-LOX-1 et 15-LOX-2 dans les cartilages arthrosiques et non arthrosiques	61
I.1 La réduction importante de la quantité d'ARNm dans les cartilages arthrosiques par rapport aux cartilages non arthrosiques.	61
I. 2 La diminution de l'expression des protéines 15-LOXs dans les cartilages arthrosiques	62
II. L'effet du 5-aza-2'-deoxycytidine (5 AZA DC) sur l'expression des gènes 15 -LOX-1 et 15-LOX-2 dans les chondrocytes	64
III. L'étude <i>in silico</i> des promoteurs des gènes 15-LOXs.....	65
III.1 L'étude <i>in silico</i> du promoteur de 15-LOX-1	65
III.2 L'étude <i>in silico</i> de promoteur de 15-LOX-2.....	67
IV. La quantification des taux de méthylation des sites CpG du promoteur proximal des gènes 15-LOXs du cartilage arthrosique dégradé ou non dégradé.....	69
IV. 1. La quantification des taux de méthylation du promoteur proximal du gène 15 -LOX-1 ..	69
IV.1.1 L'amplification par PCR du promoteur proximal du gène 15-LOX-1.....	69
IV.1.2 L'évaluation des taux de méthylation des sites CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-1 par pyroséquençage.....	71

IV. 2.1.1. Les taux de méthylation de la région comprise entre +88 et +1.	71
IV. 2.1.2. Les taux de méthylation de la région comprise entre -1 et -160.	72
IV. 2.1.3. Les taux de méthylation de la région comprise entre -160 et -443.	73
IV. 2.1.4. Taux de méthylations des sites CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-1	75
IV.2 L'évaluation des taux de méthylations des sites CpG du promoteur proximal du gène 1- LOX-2	77
IV.2.1 Amplification par PCR du promoteur proximal du gène 15-LOX-2	77
IV. 2.2 Les taux de méthylations des sites CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-2	77
Chapitre IV : Discussion.....	81
Perspectives.....	91
Conclusion.....	96
Références	i
Annexe 1: Tableau VII: Taux de méthylations des sites CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-1	xvii
Annexe 2 : Tableau VIII : Taux de méthylation des sites CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-2	xviii

Liste des tableaux

Tableau I : amorces utilisées dans la PCR en temps réel	50
Tableau II : Les étapes de la conversion bisulfite dans le thermocycleur. Modifié du manuel de la conversion au traitement bisulfite (EpiTect Bisulfite, 2014).	54
Tableau III : Les amorces de PCR des gènes 15-LOX-1 et 15-LOX-2.....	55
Tableau IV : La composition du mélange réactionnel de PCR	56
Tableau V : conditions et étapes de la PCR	56
Tableau VI : Les amorces de séquençage des gènes 15 -LOX-1 et 15-LOX-2.....	59
Tableau VII: Taux de méthylation des sites CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-1	xvii
Tableau VIII : Taux de méthylation des sites CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-2.....	xviii

Liste des figures

Figure 1: Schéma de l'articulation du genou chez l'Homme.....	9
Figure 2: Structure du cartilage.....	11
Figure 3: Représentation schématique d'une synoviale normale.....	12
Figure 4: La structure du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral dans l'articulation humaine.....	14
Figure 5: Schématisation de l'évolution de l'arthrose.....	15
Figure 6: Schéma du déséquilibre du métabolisme.....	16
Figure 7: Schéma de la modélisation du rôle du stress mécanique et des actions des médiateurs cataboliques et inflammatoires.....	17
Figure 8: Schéma des voies de synthèse des leucotriènes, lipoxines, des prostaglandines, des prostacyclines et des thromboxanes à partir d'AA.....	20
Figure 9: Action des cyclo-oxygénases.....	21
Figure 10: La voie de biosynthèse des prostaglandines, des thromboxanes et de la prostacycline.....	22
Figure 11: Représentation schématique du couplage fonctionnel entre PGES et les COXs.....	25
Figure 12: La voie de la lipoxygénase: synthèse des leucotriènes et des lipoxines (LX).	27
Figure 13: Schéma de la synthèse des médiateurs anti-inflammatoires par les 15 -LOX-1 et 15-LOX- 2.....	29
Figure 14: Structure des nucléosomes.....	33
Figure 15: Schéma de la condensation de la chromatine et de la double hélice au chromosome métaphasique.....	34
Figure 16: Schéma des principales modifications des histones..	36
Figure 17: Schéma des étapes de la biogenèse d'un micro-ARN et leur mode d'action.	39
Figure 18: Représentation schématique de la méthylation d'ADN qui convertit la cytosine en 5- méthyle-cytosine par les actions de la méthyltransférase d'ADN (Dnmt).	40
Figure 19: Les mécanismes de l'inhibition de la transcription par méthylation de l'ADN.	42
Figure 20 : Principe de la conversion au bisulfite de sodium.....	53
Figure 21 : Schéma de la Purification du brin biotinylé avant le séquençage.....	57
Figure 22 : Schéma de l'incorporation d'un nucléotide complémentaire à celui du brin biotinylé par la polymérase et sa révélation par la formation d'un pic après la transformation du pyrophosphate ou PPi en ATP.....	58
Figure 23: Niveaux d'expression des gènes 15-LOXs dans les cartilages arthrosiques (N=4) et non arthrosiques (N=4).....	61

Figure 24: Images montrant l'expression au niveau protéique des gènes 15- LOXs dans les cartilages arthrosiques (B, E) et non arthrosiques (A, D).....	63
Figure 25: Les niveaux d'expression des gènes 15-LOXs des chondrocytes et cellules C28, traités ou non avec l'agent déméthylant (5-AZA-DC).	64
Figure 26: Localisation des îlots CpG et représentation schématique des sites de fixation des facteurs de transcription, des sites CpG et des amorces de PCR et de séquençage dans le promoteur proximal du gène 15- LOX-1.....	66
Figure 27: La séquence de la région d'intérêt du promoteur du gène 15-LOX-1 et le schéma de la localisation des sites CpG et des sites de fixation des facteurs de transcription.	66
Figure 28: Localisation des îlots CpG et représentation schématique des sites de fixation des facteurs de transcription, des sites CpG et des amorces de PCR et de séquençage dans le promoteur proximal du gène 15-LOX-2.....	68
Figure 29: La séquence de la région d'intérêt du promoteur du gène 15-LOX-2 et le schéma de la localisation des sites CpG et des sites de fixation des facteurs de transcription.	68
Figure 30: Image du gel obtenue après migration électrophorétique de 4 µl d'ADN de chaque produit PCR dans un gel d'agarose de 2 % (B).....	69
Figure 31: Image du gel des produits PCR obtenue après migration électrophorétique de 4 µl d'ADN de chaque produit PCR dans un gel d'agarose de 2 %.....	70
Figure 32: Image du gel des produits PCR obtenue après migration électrophorétique de 4 µl d'ADN de chaque produit PCR dans un gel d'agarose de 2 %.	71
Figure 33: Pyrogrammes de la région comprise entre +88 et +1.	72
Figure 34: Pyrogrammes de la région comprise entre -1 et -160, séquencée par les amorces 15-LOX-1-S1A (A) et 15-LOX-1-S1B (B).	73
Figure 35: Pyrogramme de la région du promoteur de 15-LOX-1 comprise entre -160 et -443, séquencée par les amorces 15-LOX-1-S3B.....	74
Figure 36: Pyrogramme de la région du promoteur de 15-LOX-1 comprise entre -160 et -443, séquencée par les amorces 15-LOX-1-S3A.	75
Figure 37: Image du gel des produits PCR obtenue après migration électrophorétique de 4 µl d'ADN de chaque produit PCR dans un gel d'agarose de 2 %.	77
Figure 38: Pyrogrammes obtenus par pyroséquençage d'ADN bisulfite, issus d'échantillons arthrosiques dégradés et non dégradés en utilisant l'amorce de séquençage 15-LOX-2-S1A (A).....	78
Figure 39: Pyrogrammes obtenus par pyroséquençage d'ADN bisulfite, issus d'échantillons arthrosiques dégradés et non dégradés en utilisant l'amorce 15-LOX-2-S1B (B).	79

Figure 40: Taux des méthylations des sites CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-2, obtenus par pyroséquençage à partir d'ADN extraits des cartilages arthrosiques dégradés (N=11) et intacts (N=9)..... 80

Figure 41: Schéma montrant les rôles possibles des modifications épigénétiques dans la pathogenèse de l'arthrose..... 85

Figure 42: Modèle de l'activation transcriptionnelle 15-LOX-1 médiée par SMYD3 et de l'inhibition du gène médié par SMCX pour le remodelage de la chromatine. 87

Liste des abréviations

AA	Acide arachidonique
ADAMTs	A Disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
ADN	Acide désoxyribonucléique
AID	Activation-induced deaminase
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Activating protein-1 ou protéine activatrice-1
AR ou RA	Arthrite rhumatoïde
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
5-AZA-DC	5-Azacytidine-2'-deoxycytidine.
CA	Cartilage articulaire
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
Col-II	Collagène de type II
COX (1 ou 2)	Cyclo-oxygénase (1 ou 2)
COXibs	Inhibiteurs des COXs
CpG	Cytosine phosphate Guanine
cPGES	Cytoplasmic prostaglandine E synthase
DNMT	DNA methyltransferase
DPE	Dowstream promoter element
EGF	Facteur de croissance épidermique ou Epidermal Growth Factor
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay ou retard sur gel
GATA	Facteur de transcription se fixant au site de fixation GATA
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GSH	Glutathion

H3-K4	Lysine 4 de l'histone 3
HAT	Histone acétyltransferase
HDAC	Histones déacétylases
HETE	Acide hydroxyeicosatétraénoïque
HODE	Acide hydroxy-octadecadiénique
HPETE	Acide hydroxyperoxyeicosatétraénoïque
HPODE	Acide hydroperoxy-octadecadiénoïque
IL	Interleukine
LA	Acide linoléique
LOX	Lipoxygénase
LT	Leucotriène
LTB4	Leucotriène B4
LTC	Leucotriène C
LTE	Leucotriène E
LX	Lipoxines
MAPEG	Membrane-associated protein involved in eicosanoid and Glutathion metabolism
MEC	Matrice extracellulaire
miR	Micro-RNA
MMP	Matrix metalloproteinase
mPGES	Microsomal prostaglandine E synthase
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NOS	Nitric Oxide Synthase
NuRD	Nucleosome Remodeling Deacetylase
OA	Ostéoarthrose
PCR	Polymerase chain reaction
PGE2	Prostaglandine E2
PGG2	Prostaglandine G2

PGH2	Prostaglandine H2
PGI2	Prostacycline
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
ROS	Reactive oxygen species
Sp1	Specificity protein-1
TNF- α	Tumor necrosis factor α
TRBP	TAR RNA binding protein
TSA	Trichostatine A
TXA2	Thromboxane
UTR	Untranslated Transcribed Region

Remerciements

Je remercie Dr. Richard Bertrand, directeur du programme de biologie moléculaire, pour son soutien, sa disponibilité et ses conseils.

Je remercie mon directeur de recherche, Dr. Hassan Fahmi, qui m'a donné l'opportunité de préparer ma maîtrise dans son laboratoire. Je lui suis très reconnaissant pour tous ses conseils et la formation dont j'ai bénéficié.

Je remercie mon codirecteur, Dr. Mohamed Benderdour, pour son soutien, ses conseils et son ouverture d'esprit.

Je remercie également, Dre. Johanne Martel-Pelletier et Dr. Jean-Pierre Pelletier, de m'avoir reçu dans l'unité de recherche en arthrose où j'ai pu réaliser mes travaux.

Mes remerciements vont également à tous les membres de l'Unité de Recherche en Arthrose, plus particulièrement Dr. Hassan Afif, François Mineau, Frédéric Paré, Yassine Ouhaddi et Lourès Habouri, pour leurs conseils, leur expertise et leur écoute.

Je remercie mon épouse, Habone Ali Ibrahim, pour son infaillible soutien et sa gaité permanente.

Je remercie tous celles et ceux qui, d'une manière directe ou d'une autre, ont participé à la réalisation de ce mémoire de maîtrise.

Chapitre I : Introduction

I. L'arthrose

L'arthrose (OA) est la maladie articulaire la plus fréquente chez les personnes âgées (1). Elle se caractérise par une dégénérescence progressive du cartilage articulaire, par l'inflammation de la synoviale et par le remodelage de l'os sous-chondral. L'OA est une maladie incapacitante qui constitue un fardeau économique et social considérable.

I.1. L'épidémiologie de l'OA

Première cause de consultation en médecine générale dans les pays développés, on estime que 14,2 % des adultes canadiens en sont affectés, soit 4,4 millions de personnes qui présentent des symptômes et des signes cliniques (2-4). La prévalence augmente avec l'âge. On estime que 60 % des adultes de plus de 75 ans en souffrent (5). Avec le vieillissement de la population et l'augmentation de la proportion des personnes en surpoids, on prévoit qu'au Canada, la prévalence et le nombre moyen de patients atteints d'OA devraient augmenter dans les prochaines années. D'ici 30 ans, ce nombre devrait plus que doubler, avec environ 10,4 millions de personnes souffrant d'arthrose. L'OA du genou, des mains, du rachis et de la hanche sont les plus fréquentes. Les articulations des coudes, des chevilles, de l'épaule et du poignet sont rarement affectées par l'OA.

I.2. Les symptômes

Le principal symptôme de l'arthrose est une douleur chronique au niveau articulaire. Les patients présentent une raideur articulaire avec une gêne fonctionnelle et parfois des déformations des articulations. Un épanchement ou une enflure, une faiblesse musculaire et un craquement lors des mouvements de l'articulation, sont d'autres symptômes de l'arthrose.

Le diagnostic est fait par un médecin lors d'un examen physique des articulations. Ensuite, des radiographies peuvent être réalisées pour confirmer le diagnostic (6). La radiologie classique aux rayons X permet de connaître le grade de la maladie et l'état de destruction au niveau de l'articulation, dans les cas d'arthrose avec modification osseuse. Cependant elle ne permet pas d'évaluer l'évolution des tissus mous au niveau de l'articulation comme la synoviale ou les tendons. L'imagerie moderne comme l'imagerie à résonance magnétique

(IRM) donne plus de précision sur l'évolution de l'arthrose et remplace progressivement la radiologie classique.

I.3. Les facteurs de risque de l'arthrose

La cause exacte de l'OA est inconnue, mais plusieurs facteurs augmentent le risque d'OA. C'est donc une maladie multifactorielle. Les facteurs de risque sont classés en facteurs de risque systémique et en facteurs de risque local. Les facteurs de risque systémique sont le vieillissement, l'ethnie, le sexe et les prédispositions génétiques, alors que le surpoids et les blessures aux genoux ainsi que certains métiers sont les facteurs de risque local.

I.3.1. Les facteurs de risque systémique

I.3.1.1. Le vieillissement et le sexe

De nombreuses études ont démontré que le vieillissement favorise l'initiation et le développement de l'arthrose (7). Il est considéré comme étant le facteur de risque le plus important pour le développement de la maladie. La prévalence de l'OA augmente avec l'âge. Cependant, le vieillissement ne cause pas l'OA, mais les mécanismes par lesquels, il influence l'OA, sont inconnus. Il est toutefois associé à des changements dans la structure du cartilage et dans la fonction des chondrocytes. On observe, entre autres, l'amincissement du cartilage et d'autres changements qui conduisent à une diminution des propriétés biomécaniques. Le raccourcissement des télomères est associé à l'OA du genou (8, 9).

Le sexe féminin est associé à une prévalence élevée de l'OA. Les femmes ont plus à risque d'être atteintes de l'arthrose du genou que les hommes, particulièrement à la ménopause, ce qui suggère un rôle protecteur des œstrogènes (10).

I.3.1.2. Les prédispositions génétiques et l'ethnicité

Bien que l'OA soit une maladie multifactorielle, les facteurs génétiques sont déterminants dans la pathogenèse de l'arthrose; ils représentent au moins 40 % de risque de l'arthrose du genou. Pour l'ensemble des arthroses, l'héritabilité est de 50 % ou plus; ce qui indique que la moitié de la variation de la susceptibilité à la maladie dans la population

est expliquée par des facteurs génétiques (11). Des études épidémiologiques (des études des jumeaux) ont démontré que de nombreux gènes jouent un rôle crucial dans l'apparition de l'arthrose. Les gènes candidats sont ceux impliqués dans la régulation des réponses inflammatoires comme les cytokines et autres médiateurs pro-inflammatoires, et des gènes codant pour des constituants du cartilage et du métabolisme osseux (12). Par exemple, les gènes codant pour le récepteur de vitamine D, la collagène II (Col-II), la collagène IX, des gènes de facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline (IGF-1) se sont révélés être impliqués dans la susceptibilité, du niveau de gravité de l'arthrose et peuvent représenter des cibles thérapeutiques (12).

L'arthrose du genou est plus fréquente chez les femmes noires américaines et jamaïcaines que chez les femmes blanches. Ce qui suggère une différence de susceptibilité à l'OA selon l'appartenance à une ethnie ou à une autre.

I.3.2. Les facteurs de risque local

I.3.2.1. L'obésité

La surcharge pondérale est associée à l'arthrose dite secondaire. Elle augmente le risque de l'OA du genou et de la hanche. Ce surpoids exerce un stress mécanique sur les articulations du genou, de la hanche et des vertèbres (13). On estime que 27 % des cas d'arthroplastie de la hanche et 69 % des cas d'arthroplastie du genou peuvent être attribués à l'obésité. L'obésité augmente aussi le risque de l'OA de la main même s'il n'y a pas de pression physique sur l'articulation de la main. L'amélioration clinique observée après la perte de poids est plus liée à la perte de masse graisseuse qu'à la perte globale de poids. Ceci suggère que le tissu adipeux est impliqué dans la physiopathologie de l'arthrose en produisant des médiateurs comme la leptine ou l'adiponectine, la résistine ou la visfatine. L'injection de la leptine dans l'articulation du genou augmente la production des protéases MMP-2, MMP-9, la cathepsine D, ADAMTS-4 et -5, impliquées dans la dégradation du cartilage (14, 15). Ces médiateurs seraient impliqués dans la pathogenèse de l'arthrose.

I.3.2.2. Certains métiers et activités physiques

Des études ont démontré que les personnes ayant des métiers exigeant des activités physiques intenses avaient plus de risques de développer l'arthrose par rapport à ceux n'ayant pas ces fonctions. Par exemple, les mineurs, les travailleurs dans la construction, les plombiers, les manutentionnaires et les préposés à l'entretien ménager avaient plus de risque de développer l'arthrose du genou. Les fermiers, les manutentionnaires, les culturistes et les plombiers avaient plus de risques d'avoir une arthrose au niveau de la hanche. Les travailleurs du textile ont, pour leur part, plus de risques de développer l'arthrose de la hanche et des poignets.

I.3.2.3. L'alimentation

Le rôle des facteurs alimentaires dans la pathogenèse de l'OA fait l'objet d'un intérêt considérable. Cependant, les résultats des études sont contradictoires. L'un des facteurs nutritionnels les plus prometteurs pour l'arthrose est la vitamine D. De faibles taux en vitamine D sont associés à la pathogenèse de l'arthrose. Des personnes avec de faibles taux de vitamine D avaient trois fois plus de risque de développer l'arthrose du genou par rapport à celles dont le taux est normal, bien que le traitement à la vitamine D n'ait pas donné des résultats significatifs (16). Un faible apport alimentaire en vitamine C a également été associé à un risque accru de progression, mais pas de l'incidence de l'arthrose du genou radiographique et symptomatique (16).

I.3.2.4. Les blessures au niveau de l'articulation et les autres facteurs.

La lésion tissulaire est le deuxième facteur de risque majeur de l'OA (17). Les athlètes, comme les joueurs de soccer et de football, sont exposés à un risque élevé d'arthrose due à l'incidence élevée de ménisectomies et de blessures des ligaments croisés (18). Dans l'étude de Framingham, la prévalence des lésions méniscales était beaucoup plus élevée chez les sujets souffrant d'arthrose du genou radiographique (82 %) que ceux sans OA (25 %) (16).

D'autres facteurs, comme un mauvais alignement des os au niveau des jambes, augmentent le risque d'arthrose (19).

I.4. Les traitements de l'arthrose

Les stratégies thérapeutiques dans le traitement de l'OA peuvent être classées en trois catégories : traitements non pharmacologiques, pharmacologiques et chirurgicaux. Ces traitements permettent, en général, de soulager les symptômes comme la douleur, l'enflure, l'inflammation (20). Actuellement, il n'y a pas de traitement curatif efficace contre l'OA.

I.4.1. Les traitements non pharmacologiques

Les traitements non pharmacologiques sont nombreux et peuvent commencer dès le début la maladie. Le patient doit recevoir les informations relatives à sa maladie, doit avoir une bonne hygiène de vie, une alimentation saine apportant les vitamines D et C et le calcium. Il doit avoir un poids santé (doit maigrir s'il est en surpoids) et doit faire des exercices physiques adaptés comme la natation ou la marche (21). Les aides à la marche comme une canne ou une béquille permettront de réduire la douleur. Ces traitements peuvent être prescrits en combinaison avec les traitements pharmacologiques.

I.4.2. Les traitements pharmacologiques

Les traitements médicamenteux sont prescrits selon la gravité de la maladie et parfois, plusieurs traitements sont donnés en combinaison pour soulager la douleur, l'inflammation et d'autres symptômes.

I.4.2.1 Les analgésiques

Au début de la maladie, lorsque le patient présente une douleur légère à modérée, des analgésiques sont prescrits pour soulager la douleur (20, 21). L'acétaminophène ou le paracétamol est un analgésique prescrit pour diminuer la douleur, mais n'a pas d'effet sur l'inflammation. Les analgésiques ne sont pas efficaces contre la douleur chronique intense au stade avancé de la maladie. De plus, l'excès d'analgésiques, comme le paracétamol, peut causer des dommages au niveau du foie (21).

I.4.2.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les analgésiques ne sont plus efficaces lorsque le patient a une douleur plus sévère et une inflammation. Dans ce cas, des AINS sont prescrits pour réduire la douleur, l'inflammation, l'enflure et la raideur. Il existe deux types d'AINS.

- Les AINS traditionnels sont l'acide acétylsalicylique (aspirine) et l'ibuprofène. Ce sont des antipyrétiques anti-inflammatoires, comme les analgésiques. En effet, les AINS inhibent les cyclo-oxygénases (COXs) qui sont responsables de la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires comme la prostaglandine et le thromboxane. Ces AINS ont des effets secondaires comme les malaises gastriques, la diarrhée et les crampes abdominales.
- La nouvelle classe d'AINS appelé COXibs correspond à des inhibiteurs spécifiques de la COX-2. Ils sont plus connus sous le nom de Vioxx (Rofecoxibs) et Celebrex (celecoxib, phamacia). Ils n'ont pas de toxicité gastro-intestinale parce qu'ils n'inhibent pas la COX-1, protectrice de la muqueuse gastrique. Les inhibiteurs des COXs spécifiques et non spécifiques peuvent augmenter le risque d'événements cardiovasculaires (22).

I.4.2.3. Les corticostéroïdes

Lorsque les analgésiques et les anti-inflammatoires n'ont pas les effets escomptés, les patients reçoivent des injections intra-articulaires de corticostéroïdes comme traitement à court terme. Les corticostéroïdes (la cortisone principalement) sont injectés dans le but de réduire l'inflammation, l'enflure et d'améliorer la mobilité de l'articulation. Les corticostéroïdes sont plus puissants que les AINS et ont moins d'effets indésirables sur le système gastro-intestinal (21). Cependant, les corticostéroïdes ne peuvent pas être administrés à long terme en raison de leurs nombreux effets secondaires comme l'ostéoporose, l'amincissement de la peau et la pression artérielle plus élevée.

I.4.2.4. La viscosupplémentation et les autres médicaments

La viscosupplémentation consiste en l'injection d'acide hyaluronique dans l'articulation (23). Elle favorise la viscosité du liquide synovial et, par conséquent, les glissements des surfaces articulaires, les unes contre les autres, ce qui permet de réduire les frictions et donc la douleur. L'acide hyaluronique est connu pour ses propriétés anti-inflammatoires en inhibant la synthèse de la prostaglandine E2 (PGE₂), un médiateur pro-inflammatoire. L'action de l'acide hyaluronique est plus lente, mais plus prolongée par rapport à celle des corticostéroïdes (24).

Il existe d'autres méthodes complémentaires telles que la prise des substances comme la glucosamine ou la chondroïtine qui semblent soulager les symptômes. Les opiacés sont prescrits lorsque la douleur n'est plus réduite par les autres médicaments comme les AINS et les corticostéroïdes.

I.4.3. Les traitements chirurgicaux et les cellules souches

L'opération chirurgicale est utilisée en dernier recours lorsque la combinaison des autres traitements a échoué. Elle consiste en un remplacement partiel ou total de l'articulation par une prothèse (25), ce qui favorise la disparition de la douleur et améliore la qualité de vie des patients. Elle a une durée de vie de 10 à 20 ans (28).

L'injection intra-articulaire de cellules souches est au stade expérimental et n'a pas permis la guérison totale des patients. L'injection de cellules souches mésenchymateuses est prometteuse, car elle permet de diminuer la douleur et permet une régénération du cartilage à certains endroits (26). Elle n'a été réalisée que chez des patients souffrants de l'OA du genou. Il s'agit d'une méthode longue, coûteuse et qui, pour le moment, ne permet pas de guérir. Elle est inaccessible pour la majorité des patients.

En résumé, les traitements actuels permettent de réduire les symptômes, mais n'empêchent pas la progression de la maladie.

II. La structure de l'articulation du genou et la physiopathologie de l'arthrose du genou

II. 1 La structure de l'articulation du genou

L'articulation du genou est une articulation synoviale, ou diarthrose, permettant les mouvements de flexion et d'extension sans douleur de la jambe. C'est la zone de rencontre des extrémités osseuses du fémur et du tibia, recouverte par l'os sous-chondral et par le cartilage (Figure 1). Dans la cavité articulaire se trouve le liquide synovial, sécrété par la membrane synoviale. L'extrémité osseuse du fémur présente deux condyles de forme sphérique alors que l'os du tibia a un plateau de forme concave. Pour mieux articuler ces deux formes et permettre la stabilité du genou et des principaux mouvements de flexion et d'extension, l'articulation est maintenue en contact par des structures de soutien, deux

ménisques qui s'interposent entre les deux épiphyses, des haubans musculaires et des tendons, et un appareil capsulo-ligamentaire. Le cartilage, la synovie et l'os sous-chondral sont trois éléments importants dans la fonction articulaire. Les mouvements sont facilités par le liquide synovial. Le cartilage protège l'os et a un rôle d'amortisseur des chocs. Il fait en sorte que les surfaces de l'articulation glissent facilement les unes contre les autres.

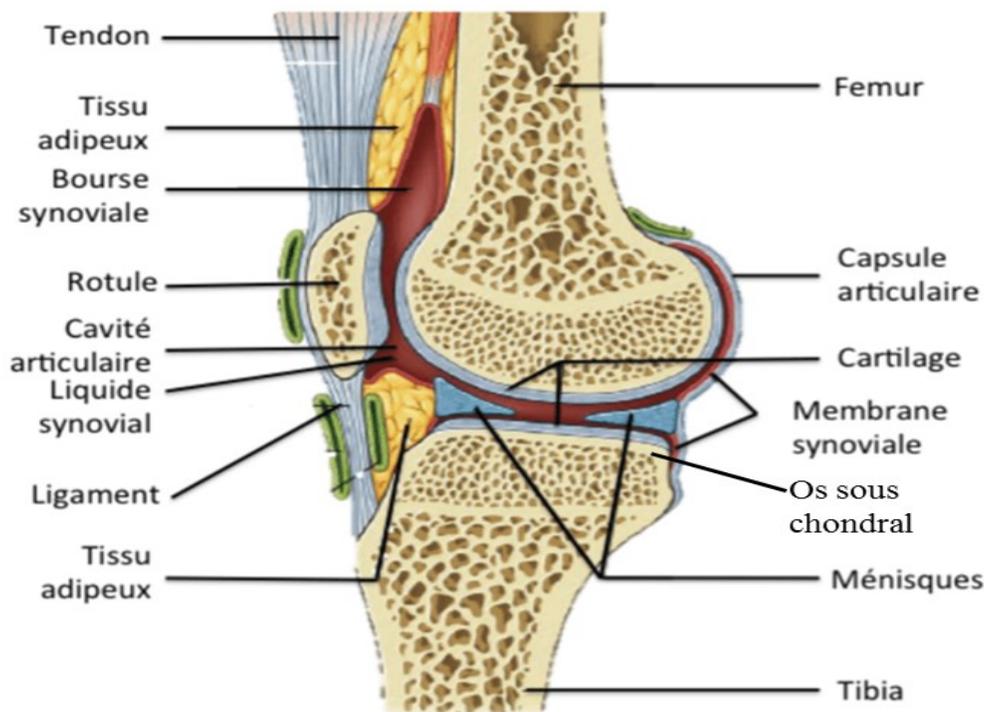


Figure 1: Schéma de l'articulation du genou chez l'Homme. Adapté de Drake et al., (27).

II. 1.1 Le cartilage articulaire

Le cartilage articulaire (CA) normal est un tissu conjonctif blanc, translucide, de type hyalin, ayant une épaisseur variable de 2 à 4 mm d'épaisseur qui couvre les surfaces osseuses (28). La fonction principale du CA est d'assurer l'absorption et la répartition des forces qui s'appliquent sur l'articulation. Il permet le glissement des surfaces osseuses grâce à un coefficient de friction extrêmement faible. Il est résistant, élastique et lubrifié. Il est dépourvu des vaisseaux sanguins et lymphatiques, et n'est pas innervé. Il est constitué d'une matrice extracellulaire et d'un seul type de cellule qui représente environ 2 % du poids total du cartilage : les chondrocytes (28, 29).

La matrice extracellulaire (MEC) est composée majoritairement d'eau (70 à 80 %), le reste étant représenté par un réseau de fibres de collagènes, principalement de type II, dans lequel sont emprisonnées des molécules très hydrophiles que sont les protéoglycanes (PG). Elle contient aussi de petites quantités de collagène V, VI, IX et XI. Les protéoglycanes sont formés de multiples monomères appelés agrécanes branchés d'une façon non covalente sur l'acide hyaluronique (31). Les agrécanes sont liés de manière covalente à des glycosaminoglycanes formés de chaînes de chondroïtine sulfate, de kératane sulfate et constituent à eux seuls 90 % du poids total des protéoglycanes. Les protéoglycanes, grâce à leur forte teneur en eau, sont responsables de l'élasticité du cartilage tandis que les fibres de collagènes assurent la rigidité du cartilage.

Les chondrocytes sont des cellules hautement différenciées, mesurant environ 30 à 40 μm de diamètre, noyées dans la matrice extracellulaire et qui n'ont pas de contact entre elles. Ils sont responsables de l'homéostasie de la matrice extracellulaire en assurant la production et la dégradation de tous les composants du cartilage grâce à l'équilibre de ses activités cataboliques et anaboliques. Ils renferment les organites nécessaires à la production des composantes de la matrice extracellulaire, comme le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, vésicules sécrétoires (32). Ils se nourrissent à partir du liquide synovial, produisent du collagène, des protéoglycanes et des inhibiteurs des métalloprotéinases (TIMPS) pour le maintien de la matrice extracellulaire (activités anaboliques). Ils synthétisent aussi des protéases (métalloprotéinases, ADAMTs), des cytokines, des eicosanoïdes et des radicaux libres impliqués dans la dégradation du cartilage (activités cataboliques).

Chez l'adulte, le cartilage articulaire est formé de quatre couches ou zones histologiques différenciées selon l'organisation des chondrocytes, l'orientation des fibrilles de collagène, la quantité d'eau, le type et la quantité des PG présents (28, 29) : 1) la couche superficielle ou tangentielle, 2) la couche intermédiaire ou de transition, 3) la couche profonde ou radiale et 4) la couche calcifiée (Figure 2). Cette dernière couche est localisée immédiatement après une ligne de démarcation (*tidemark*), qui la sépare de la zone profonde. Elle permet d'isoler, physiquement et mécaniquement, le cartilage de l'os sous-chondral en formant une barrière vis-à-vis des vaisseaux de l'os (33).

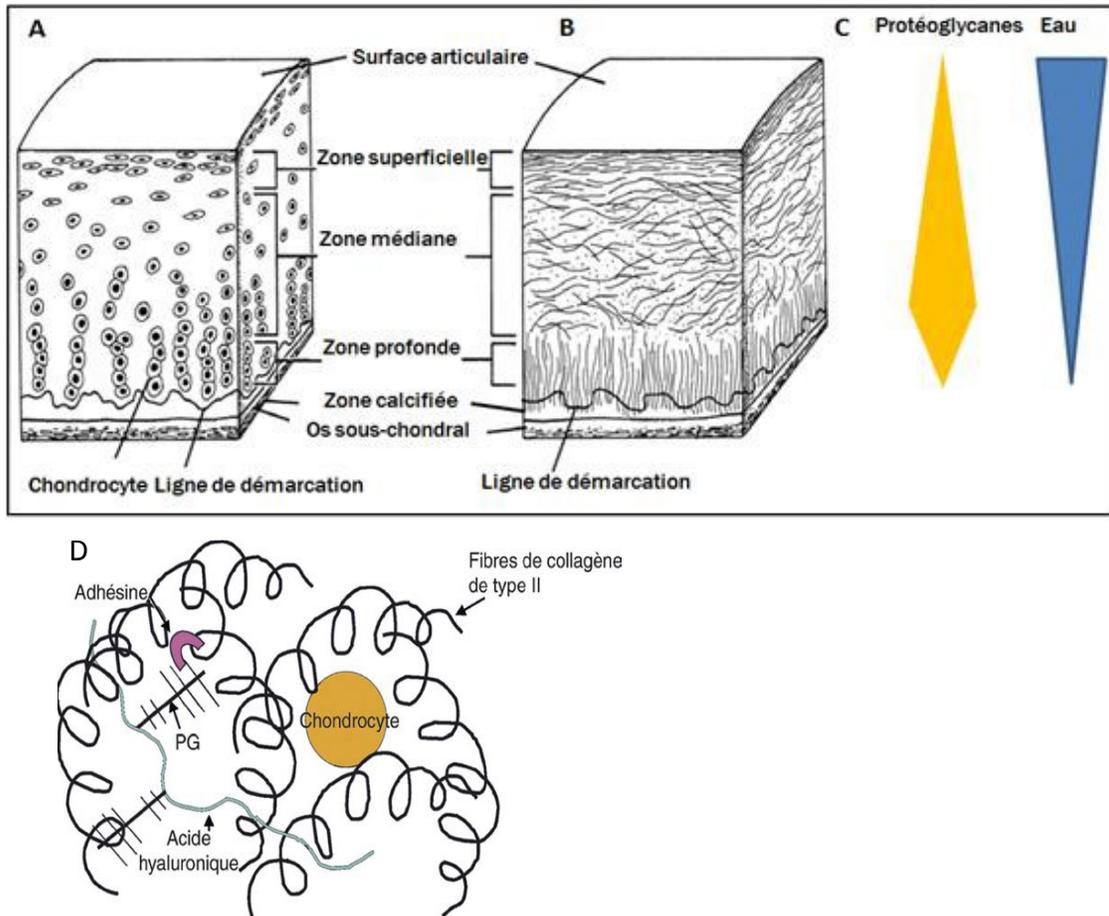


Figure 2: Structure du cartilage. Quatre couches sont décrites dans le cartilage artériel adulte :
A : organisation des chondrocytes de la couche superficielle (denses, plats et parallèles à la surface), intermédiaire (gros et arrondis) et profonde (groupés en colonne, orientés perpendiculairement à la surface).
B : orientation des fibres de collagènes de la zone superficielle (fines et tangentiels), intermédiaire (épaisses et enchevêtrées), et profonde (épaisses et perpendiculaires).
C : les changements des teneurs en eau et en PG entre les différentes couches sont également schématisés.
D : organisation au niveau moléculaire du cartilage dans la zone médiane. Adaptée de Buckwalter (31).

II. 1.2 La membrane et le liquide synovial

II. 1.2.1 La membrane synoviale

La membrane synoviale est un tissu conjonctif lâche qui tapisse la face interne d'une diarthrose. Elle est bordée à l'extérieur par la capsule articulaire et les formations ligamentaires. Elle assure la fonction mécanique de lubrification et la nutrition du cartilage par l'intermédiaire du liquide synovial qu'elle sécrète. Elle joue un rôle de défense contre les agressions extérieures et peut être considérée comme un organe immunitaire. Elle permet également le contrôle du volume synovial et l'élimination des

métabolites et des produits de dégradation de la MEC de la cavité articulaire. Elle joue donc un rôle important dans le maintien de la physiologie et du fonctionnement normal de l'articulation. La membrane synoviale est composée de deux couches : la couche sous-intimale (subintima), en contact avec la capsule articulaire, et la couche bordante (intima) en contact avec la cavité articulaire (34, 35) (Figure 3).

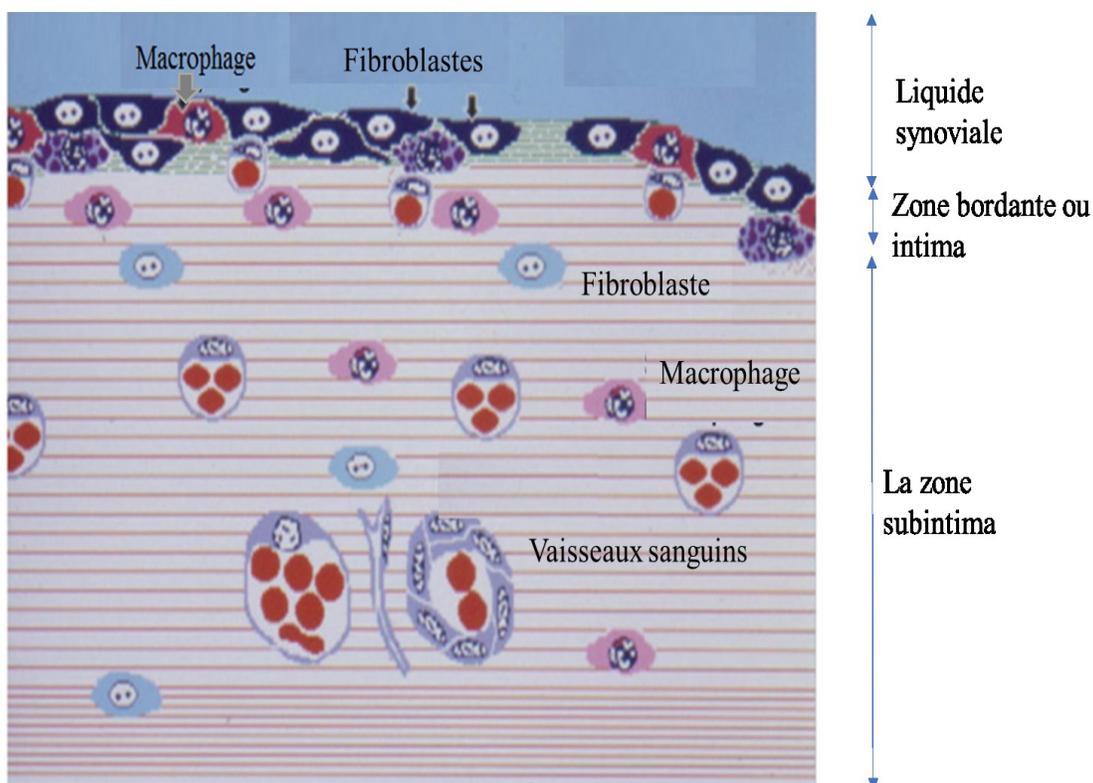


Figure 3: Représentation schématique d'une synoviale normale. L'intima contient des fibroblastes spécialisés (noirs, indiqués par des flèches) exprimant VCAM-1, DAF et UDPGD, et des macrophages spécialisés (indiqués par flèche) exprimant Fcγ RIIIa. La subintima plus profonde contient des homologues relativement non spécialisés (étiquetés). Modifié de d'Edwards JC. et al., (35).

La couche bordante ou intima a une épaisseur qui varie entre 20 à 41 μm selon le type synovial, et est composée d'une à quatre assises de cellules (synoviocytes). Ces cellules endothéliiformes, ayant des contacts avec le liquide synovial, sont deux types :

- Les synoviocytes de type A qui ressemblent aux macrophages, d'où le surnom de « macrophages synoviaux » (36). Elles possèdent des prolongements cytoplasmiques dont l'axe est occupé par des mitochondries alignées. Elles ont un appareil de Golgi développé, des grandes vacuoles ainsi que des lysosomes (en relation avec une fonction phagocytaire). Les vésicules sont souvent localisées près du bord des membranes

plasmiques. Elles nettoient les articulations en éliminant les produits de dégradation ou les déchets comme les débris cellulaires (37, 38). Ces cellules participent également à l'initiation des réponses immunes en conditions pathologiques (38). Elles expriment, à leur surface, des CMH II qui peuvent présenter l'antigène aux cellules immunitaires.

➤ Les synoviocytes de type B qui sont apparentées aux fibroblastes et qui sont qualifiées de *fibroblast-like cells* avec une fonction sécrétoire. Elles ont une forme plus massive, sont caractérisées par le développement important du réticulum endoplasmique rugueux et de vésicules sécrétoires. Elles sécrètent, entre autres, des collagènes de type I et II, des fibronectines et de l'acide hyaluronique dans le liquide synovial (36, 38).

La subintima est aussi riche en cellules, mais elle est plus vascularisée. Elle contient, entre autres, des fibroblastes, des macrophages, différentes fibres de collagènes, des terminaisons nerveuses, des artérioles, des capillaires et des vaisseaux lymphatiques. Cette vascularisation importante permet la nutrition des cellules de la membrane synoviale, la formation du liquide synovial, le recrutement des cellules immunitaires en cas d'inflammation et la régulation de la température articulaire (34).

II. 1.2.2 Le liquide synovial

La fonction du liquide synovial est la nutrition et la lubrification de l'articulation. Sa composition est très proche de celle du plasma dont il dérive. Il contient, en plus de l'eau et des sels minéraux, des petites molécules (glucose, acide urique, bilirubine), des protéines et de l'acide hyaluronique sécrété par les synoviocytes. Le rôle de lubrification de ce liquide s'explique par sa viscoélasticité due à l'acide hyaluronique qui est une longue chaîne d'un polymère de disaccharides. Un déficit de l'acide hyaluronique est observé lors de l'arthrose (39).

II. 1.3 L'os sous-chondral

L'os sous chondral est un tissu osseux de 1 à 2 mm d'épaisseur qui constitue une zone de transition entre le cartilage et l'os. Il se trouve sous le cartilage calcifié (Figure 4) et contribue à l'amortissement des chocs. C'est un tissu vascularisé constitué des cellules formant l'os que sont les ostéoblastes et ostéocytes. Chimiquement, l'os est

constitué de deux composantes organiques et minérales. Le collagène de type I est le constituant principal des composantes organiques alors que l'hydroxyapatite, de formule $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, est le constituant minéral de l'os. Il comprend la plaque osseuse sous-chondral et l'os trabéculaire sous-jacent (40). L'os sous-chondral fournit un soutien structurel au cartilage articulaire. Plusieurs études ont montré le rôle puissant du métabolisme cellulaire anormal de l'os sous-chondral dans l'initiation et la progression de l'arthrose (41).

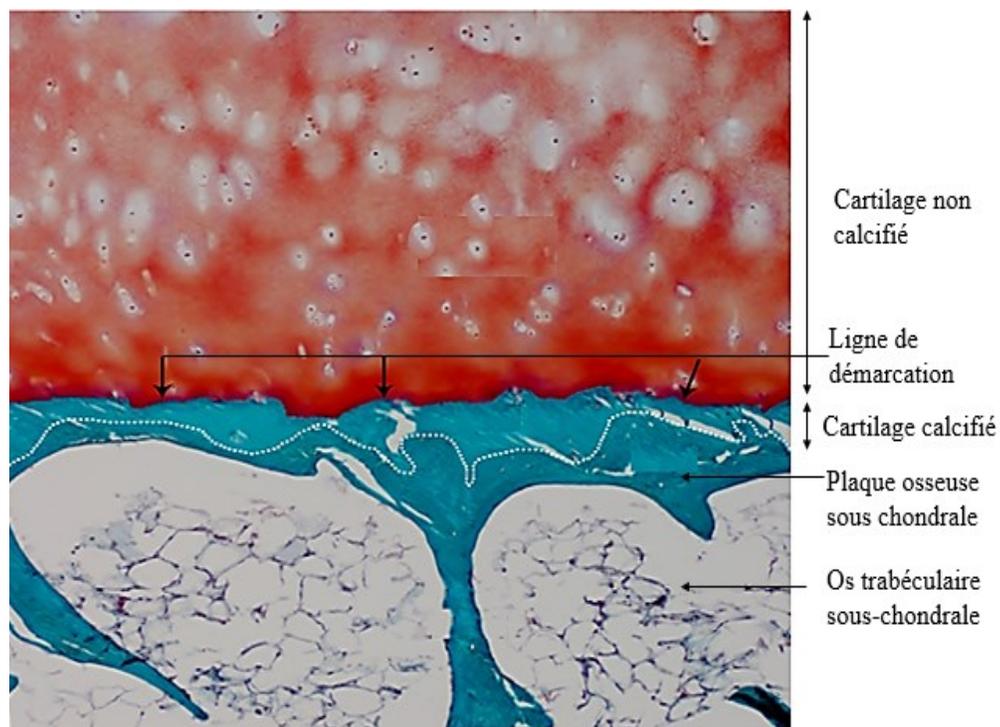


Figure 4 : La structure du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral dans l'articulation humaine. Modifié de Li et al.,(40) .

II. 2 La physiopathologie de l'arthrose de genou

L'arthrose se caractérise par une destruction du cartilage, par l'inflammation de la synoviale et par des modifications de l'os sous-chondral (Figure 5). Au cours du processus arthrosique, le cartilage s'assombrit et se ramollit, ce qui a pour conséquence de modifier ses propriétés d'amortissement des chocs. Il se fissure, s'érode et s'amincit pour ensuite

disparaître totalement, laissant l'os sous-chondral à nu. Les modifications de l'os sous-chondral induites sont la formation d'ostéophytes et le sclérose de l'os sous-chondral.

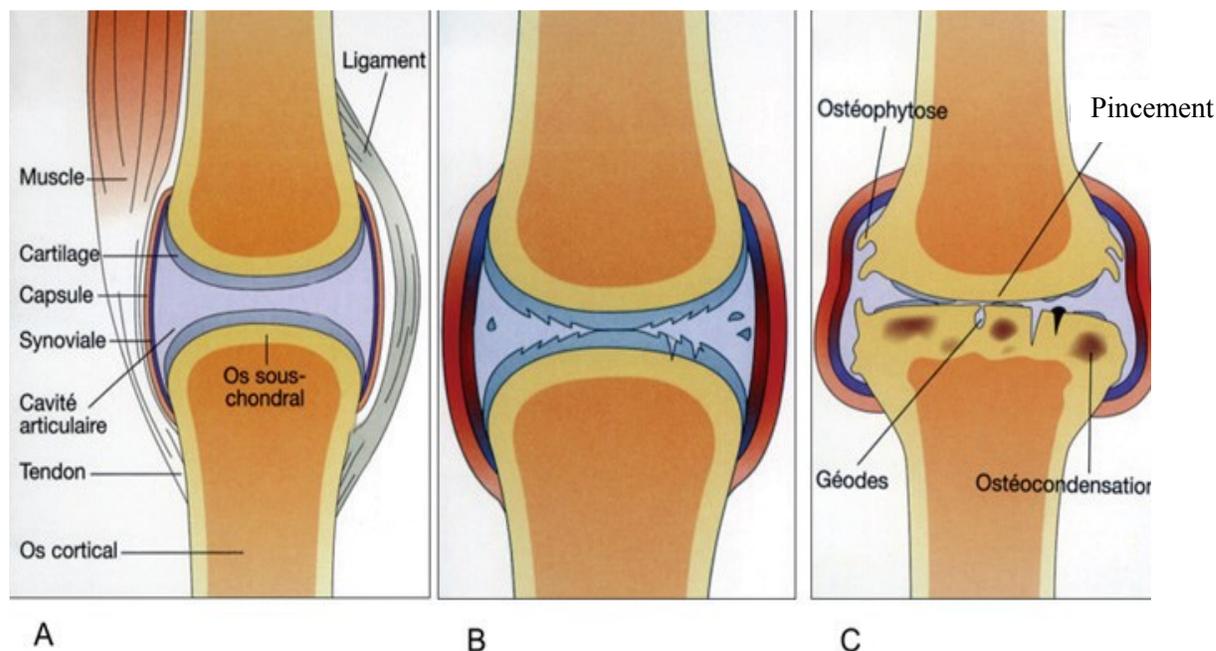


Figure 5: Schématisation de l'évolution de l'arthrose. A : Articulation non arthrosique; B : Dégradation du cartilage et inflammation de la synoviale; C : Dégradation importante du cartilage, inflammation de la synoviale et remodelage de l'os sous chondral. C'est une dégradation du cartilage qui va jusqu'à l'usure complète, associée à des remaniements de l'os sous-chondral, une production d'ostéophytes et des épisodes limités d'inflammation de la synoviale. Source de l'image www.lecofer.org. Consulté le 04/04/2016

II. 2.1. Le déséquilibre du métabolisme des chondrocytes.

Dans le cartilage sain existe un équilibre entre les activités anaboliques et cataboliques qui est crucial pour le maintien de l'homéostasie du cartilage (42). Les chondrocytes produisent les collagènes, protéoglycanes, et antiprotéases qui sont des médiateurs anaboliques, permettant la synthèse de la matrice extracellulaire du cartilage. Elles produisent aussi des médiateurs cataboliques, notamment les métalloprotéinases et les ADAMTSs.

Les synoviocytes produisent aussi des collagènes, des cytokines pro-inflammatoires, des eicosanoïdes.

Dans le cartilage normal, il y a un équilibre entre la synthèse des médiateurs cataboliques et des médiateurs anaboliques. L'arthrose est associée à la perte de cet équilibre. Les modifications caractérisant l'arthrose seraient dues à la perte de l'équilibre

entre les activités anaboliques et cataboliques provoquées par les facteurs de risque (43-45). Une augmentation de la production des médiateurs cataboliques et pro-inflammatoires au profit des médiateurs anaboliques et anti-inflammatoires serait responsable de la dégradation du cartilage, de l'inflammation de la synoviale et du remodelage de l'os sous chondral (46) (Figure 6).

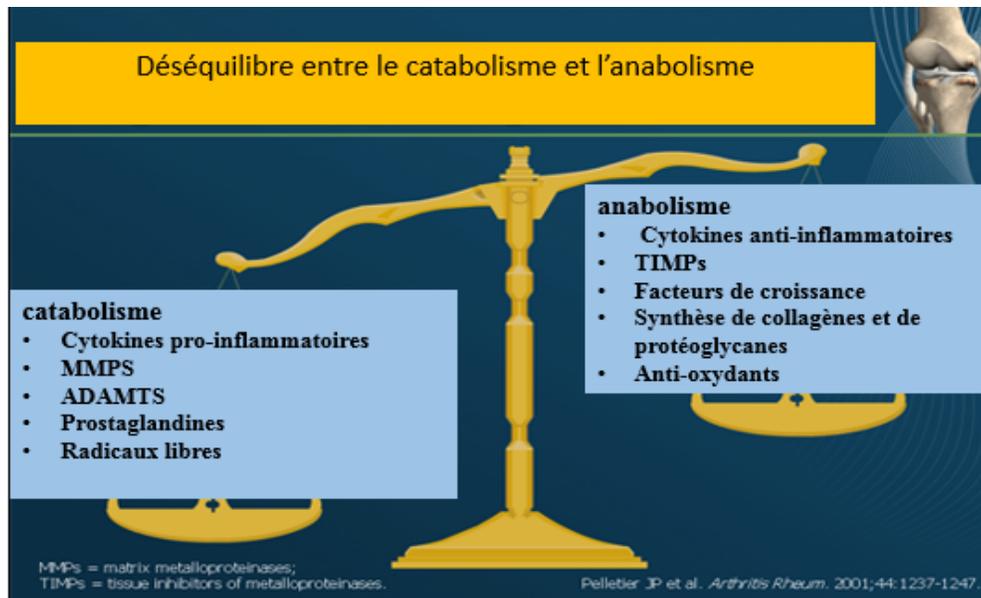


Figure 6: Schéma du déséquilibre du métabolisme. Modifié de Pelletier.J et al.,(47)

En effet, l'arthrose est associée à une libération accrue, des protéases, des radicaux libres, des eicosanoïdes et des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-6, IL17 et IL-18 par les chondrocytes, mais également par les cellules de la synoviale (Figure 7). Ces cytokines sont retrouvées dans le liquide synovial.

L'IL-1 β et le TNF- α sont largement reconnus pour le rôle dans la pathogenèse de l'OA (48). Au niveau des chondrocytes, ces cytokines stimulent le catabolisme en favorisant l'expression des protéases et en diminuant la biosynthèse des protéoglycanes et du collagène de type II. L'IL-1 et le TNF- α contribuent aussi à la pathogenèse de l'OA, en induisant la production des médiateurs pro-inflammatoires comme les eicosanoïdes [la prostaglandine E2 (PGE₂)] et les radicaux libres [l'oxyde nitrique (NO)] (49). L'ensemble de ces effets altère l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme, favorisant ce dernier,

et contribue aux changements phénotypiques des chondrocytes, entraînant, en plus de dégradation de la MEC, la mort des chondrocytes (50).

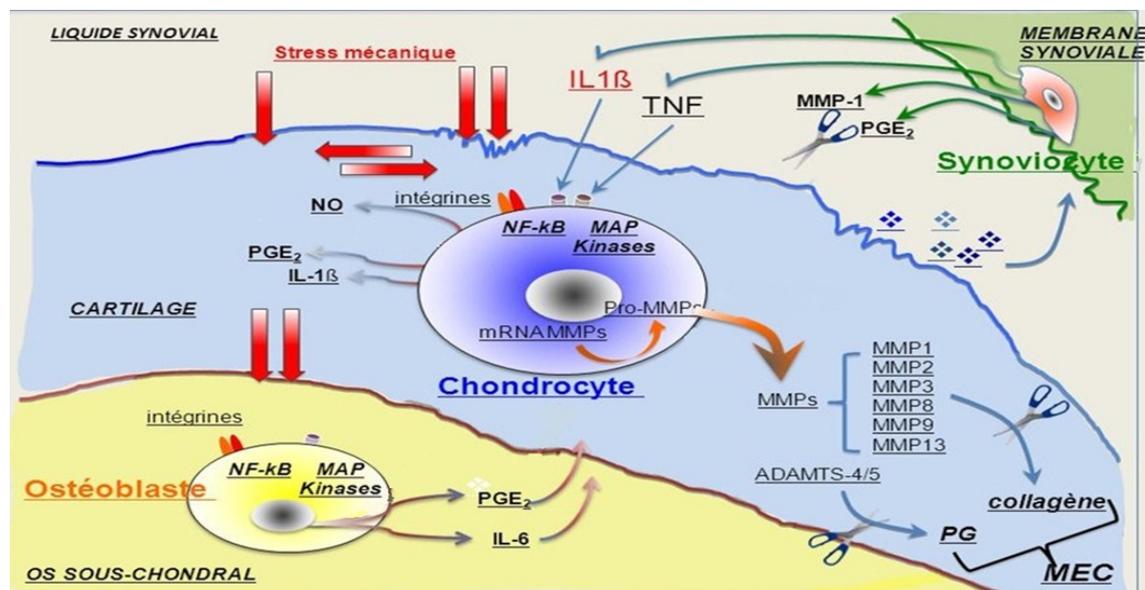


Figure 7: Schéma de la modélisation du rôle du stress mécanique et des actions des médiateurs cataboliques et inflammatoires. L'augmentation des activités cataboliques pourrait être impliquée à la pathogenèse de l'arthrose. Modifié de Gabay O. et al.,(51) .

II. 2.2. Les facteurs cataboliques impliqués dans l'OA : les protéases

Les protéases, dont la synthèse est augmentée lors de l'OA, sont impliquées dans la dégradation du cartilage. Elles sont directement responsables de la dégradation des constituants de la matrice extracellulaire du cartilage. Elles se subdivisent en trois groupes : les métalloprotéinases, les protéases à cystéine et les protéases à sérine.

Les métalloprotéinases jouent un rôle majeur dans la destruction du cartilage. Elles comprennent les métalloprotéases (MMPs), ADAM et ADAMTS (*A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*). Cette famille d'enzymes, dont l'activité dépend du zinc, comprend plus de 26 membres : MMP-1,-2 -8, -13, -24, -25,-26. Elles dégradent les constituants de la MEC du cartilage comme les collagènes, les gélatines, les agrécans, la fibronectine, la lamine. Par exemple, la métalloprotéase MMP-13 est responsable de la dégradation du collagène II, principal constituant de la MEC (47). La surexpression de la MMP-13 accélère le développement de l'OA chez la souris (52). Les ADAMTS sont une famille de 20 peptidases (ADAMTs-1 à ADAMTs-20) qui dégradent

les agrécanes, constituants majeurs de la MEC. Les ADAMTs -4 et -5 sont des enzymes clés dans l'OA humaine (53, 54). La délétion d'ADAMTs-5 inhibe la dégradation du cartilage chez les souris arthrosiques (55). Les autres protéases contribuent aussi à la dégradation de la MEC.

II. 2.3. Les cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines pro-inflammatoires sont les interleukines (IL- 1 β , IL-18, IL-8, IL-6, et IL-17) et le facteur de nécrose tumoral α (TNF- α). Ils sont fortement exprimés dans les cartilages OA et dans la membrane synoviale. Les cytokines IL-1 et TNF- α jouent un rôle majeur dans l'OA en stimulant une libération importante des protéases, des eicosanoïdes (prostanoïdes, leucotriènes) et des radicaux libres oxygénés (49, 56). Ils se fixent sur leur récepteur et agissent par les voies de signalisation MAP kinase, P38 et NF- κ B (Figure 7). Ils inhibent la biosynthèse des constituants de la MEC du cartilage tels que les collagènes et les protéoglycanes.

L'IL-1 est le principal acteur du catabolisme et de l'inflammation au cours de l'OA. Il comprend deux isoformes (IL-1 α et IL-1 β) qui sont, entre autres, sécrétées par les monocytes, les macrophages et les chondrocytes. Ils induisent la prolifération des lymphocytes T, les chimiotactismes et la production des facteurs cataboliques et pro-inflammatoires tels que le TNF-alpha, l'IL-6, les eicosanoïdes, les protéases et les radicaux libres oxygénés.

II. 2.4. Les radicaux libres

Les radicaux libres oxygénés jouent un rôle dans la pathogenèse de l'OA. Les ROS peuvent provenir des activités de la cellule, dont notamment de celles de la chaîne respiratoire mitochondriale, des oxydases des peroxyosomes, ainsi que des activités d'origines externes (ultra-violet, rayons X). Lorsque la production de ROS dépasse les capacités antioxydantes de la cellule, un stress oxydatif se produit. Ce qui entraîne des dommages structuraux et fonctionnels du cartilage, comme la mort cellulaire et la dégradation de la matrice (57, 58).

Les dérivés réactifs de l'azote comprenant des radicaux libres, comme l'azote nitrique (NO) et les dérivés non radicalaires, sont impliqués dans la pathogenèse de l'OA.

Le NO est produit dans le cartilage et contribue à la pathogenèse de l'OA en induisant la production d'IL-1 et l'apoptose des chondrocytes, en augmentant l'activité des MMPs et en inhibant la synthèse de collagène et des protéoglycanes (59). La production de NO, à partir de L-arginine, est catalysée par une enzyme appelée oxyde nitrique synthase ou NOS (60). L'inhibition de la forme inductible de NOS ou iNOS réduit la progression expérimentale de l'OA *in vivo* (61, 62).

II. 2.5. Les eicosanoïdes

Les eicosanoïdes constituent une famille complexe de molécules à vingt atomes de carbone dérivant d'un acide gras polyinsaturé comme l'acide arachidonique ou l'acide linoléique (63). Ils comprennent les prostanoïdes (prostaglandines, la prostacycline et les thromboxanes) et les leucotriènes (64). Ce sont des médiateurs lipidiques intercellulaires et intracellulaires intervenant dans des nombreux processus physiologiques et pathologiques, notamment dans ceux de la douleur et de l'inflammation. Ils sont impliqués dans la protection de la muqueuse gastrique, dans l'agrégation plaquettaire et dans les processus pathologiques comme le cancer, l'asthme et les maladies auto-immunes (65). Ils sont également impliqués dans l'OA.

Ils agissent de façon autocrine ou paracrine et la plupart de leurs récepteurs sont liés à la protéine G.

II. 3. La biosynthèse des eicosanoïdes

Ces médiateurs lipidiques dérivent des acides gras polyinsaturés, principalement de l'acide arachidonique. Ils proviennent également des acides linoléiques (oméga 3 et oméga 6) qui sont apportés par l'alimentation parce qu'ils ne peuvent être synthétisés par les cellules. Certains eicosanoïdes comme les leucotriènes sont des pro-inflammatoires alors d'autres comme les lipoxines, les résolvins et protectines sont des anti-inflammatoires.

La première étape de la biosynthèse des eicosanoïdes est l'activation de la phospholipase A2, qui entraîne la libération d'acide arachidonique des phospholipides de la membrane. La quantité d'acide arachidonique libérée détermine celle des eicosanoïdes produits. On observe une augmentation de la production des eicosanoïdes lors d'une

inflammation. L'acide arachidonique libéré peut être transformé généralement selon trois voies majeures et donner naissance aux eicosanoïdes (Figure 8) : 1) la voie de la cyclo-oxygénase donnant naissance aux prostaglandines, thromboxanes ; 2) la voie de la lipoxygénase à l'origine des leucotriènes, des lipoxines, des resolvines et 3) la voie de cytochrome p450. Nous décrivons les deux premières voies qui sont les plus importantes.

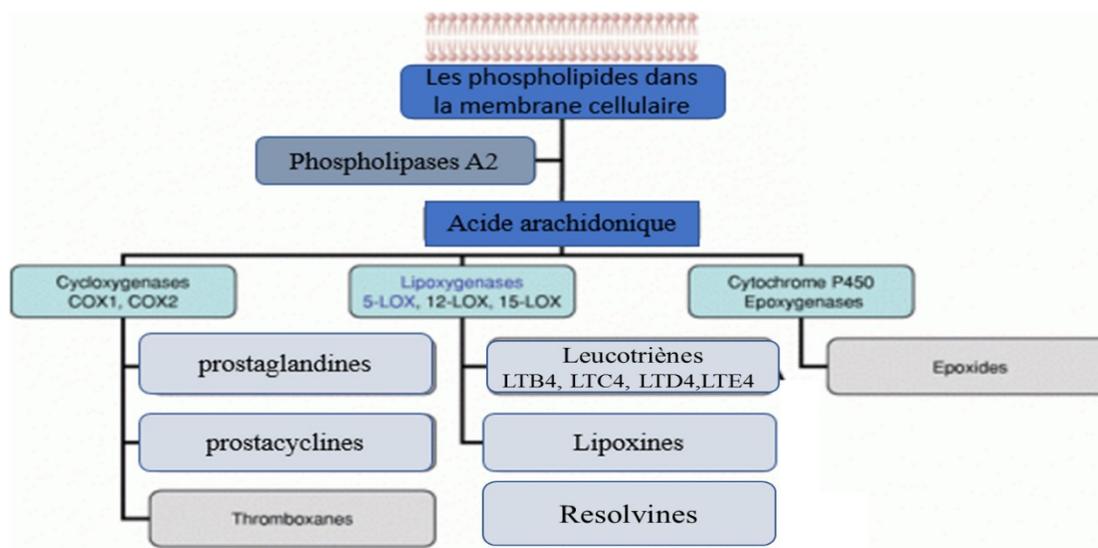


Figure 8 : Schéma des voies de synthèse des leucotriènes, lipoxines, des prostaglandines, des prostacyclines et des thromboxanes à partir d'AA. Modifié de www.lappart-des-spasmos.fr/forum/aa-cascade-inflammation-t18607. Consulté le 04/04/2016.

II. 3.1 La voie de la cyclo-oxygénase (COX)

Les cyclo-oxygénases sont des enzymes membranaires ayant un poids moléculaire d'environ 70 Kda. Il existe deux isoformes de COX : la COX-1 et la COX-2 qui ont des fortes homologies, dont 60 % des acides aminés, en commun (66). Les COXs possèdent une activité cyclo-oxygénase qui convertit l'AA en prostaglandines G2 (PGG2) en insérant deux molécules d'oxygènes, ainsi qu'une activité peroxydase qui réduit PGG2 en PGH2 (Figure 9).

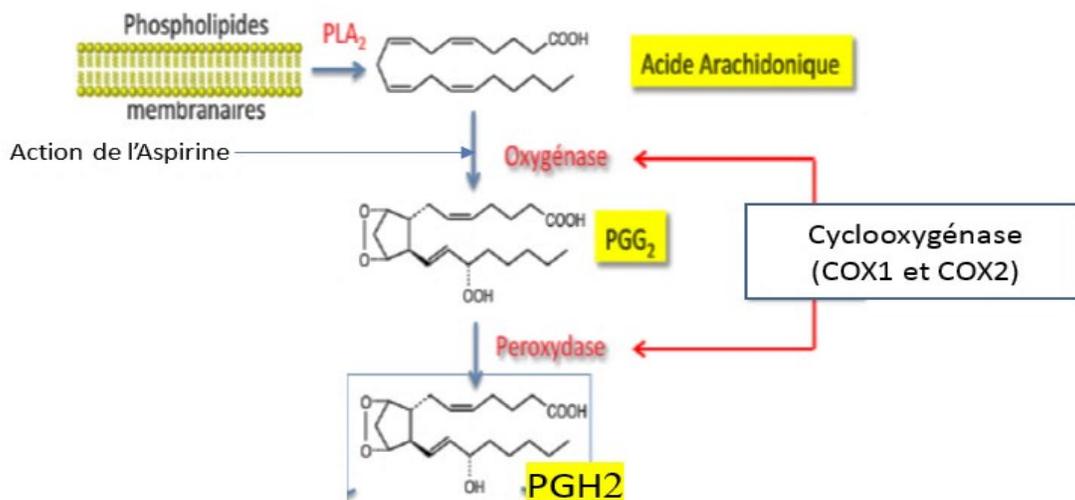


Figure 9: Action des cyclo-oxygénases. PLA₂ : phospholipase A2. PGG₂ : prostaglandines G₂. PGH₂ : prostaglandine H₂. Modifié de http://untori2.crihan.fr/unspf/2015_Bordeaux_Nuhrich_AINS/res/AINS_A_Nuhrich_2015.pdf. Consulté le 15/10/2017

La COX-1 est une enzyme membranaire possédant un groupe hème. Elle est produite suite à l'expression constitutive du gène PTGS1 (COX-1) localisé sur chromosome 9. Elle est impliquée dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, notamment dans la protection de la muqueuse gastrique et dans le maintien de l'hémodynamique rénale. Elle est fixée à la membrane du réticulum endoplasmique et à l'enveloppe nucléaire, et elle est fonctionnelle sous forme d'homodimère. Elle possède trois domaines distincts : 1) un domaine de liaison à la membrane composé d'hélices alpha dans lequel se loge l'acide arachidonique, 2) un domaine catalytique bifonctionnel et 3) un domaine *EGF-like* formé par deux doubles feuillet bêta. Elle convertit l'AA en PGG₂ qui est transformé en PGH₂.

La COX-2 est codée par un gène localisé sur le chromosome 1 possédant, en général, une expression inductible. Son expression est induite par les cytokines pro-inflammatoires (IL-1) et par le facteur de transcription NF-κB. Elle est associée à la production accrue des prostaglandines lors des processus inflammatoires. Elle a été fortement incriminée dans les conditions pathologiques. Elle est associée aux maladies dégénératives articulaires comme l'OA et l'arthrite rhumatoïde (AR) (67), des maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson (68), et des maladies prolifératives comme le cancer (69).

En plus des COX-1 et COX-2, une autre isoforme de COX, la COX-3, dérivant du même gène que la COX-1, est exprimée au niveau du cortex cérébral et au niveau du cœur. La COX-3 partage les mêmes propriétés catalytiques que les COX-1 et COX-2 (70) .

Les COXs convertissent l'AA en PGG2 puis en endoperoxide PGH2, composé instable transformé par les isomérases en prostanoïdes qui sont les prostaglandines, les prostacyclines et les thromboxanes(TXA2). Les enzymes permettant cette dernière étape, aussi appelées enzymes terminales, sont les prostaglandines synthases, les prostacyclines synthases et les thromboxanes synthases.

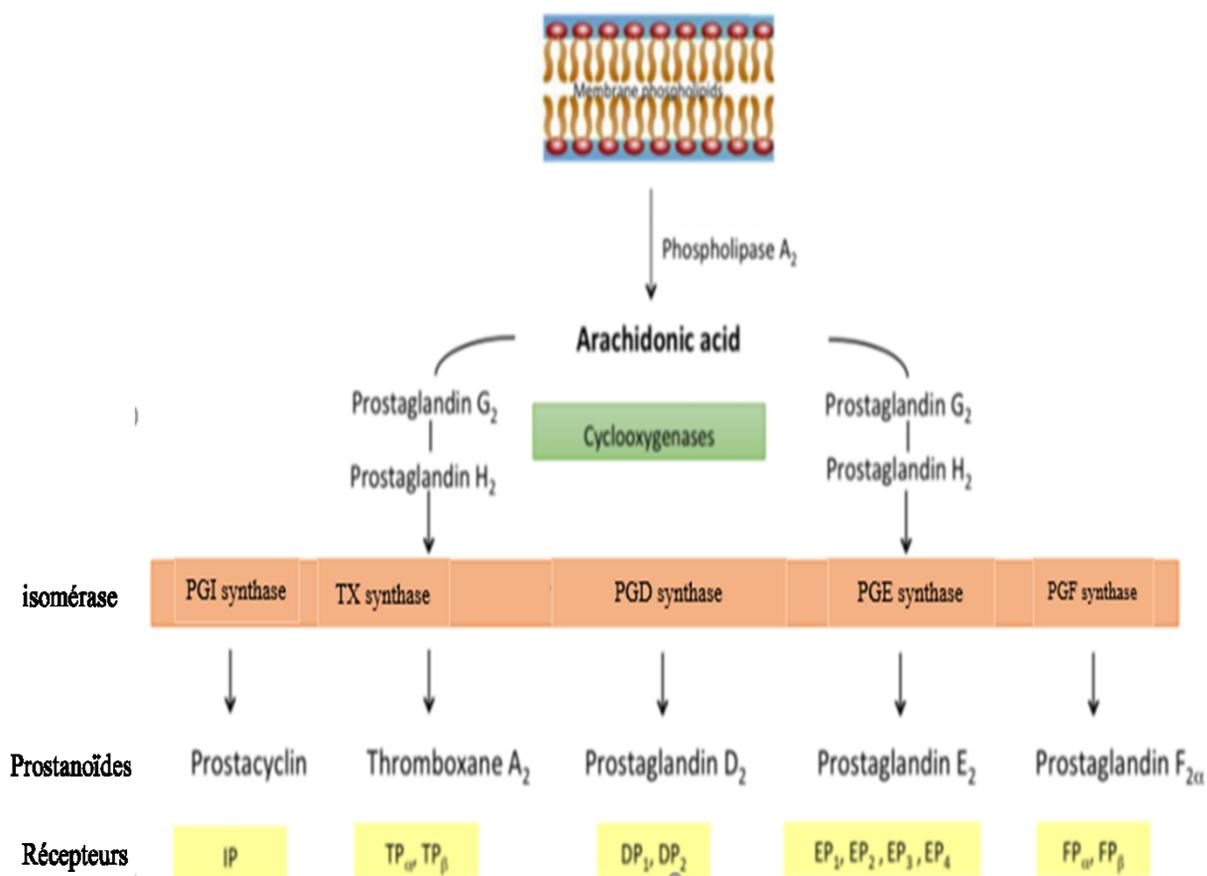


Figure 10: La voie de biosynthèse des prostaglandines, des thromboxanes et de la prostacycline. Modifié de FitzGerald et al., (71)

II. 3.1.1. La synthèse des prostaglandines

L'endoperoxide PGH₂ instable est transformé en prostaglandines E₂, D₂, I₂ et F_{2α} par différentes prostaglandines synthases spécifiques. Les prostaglandines sont présentes dans la plupart des tissus et organes. Ce sont des médiateurs lipidiques autocrines et paracrines qui agissent, entre autres, sur les plaquettes sanguines, l'endothélium, l'utérus et les mastocytes. Elles agissent sur des récepteurs membranaires couplés aux protéines G. L'activation des protéines G peut activer ou inhiber la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) selon le type de cellules. Cette activation peut aussi activer la voie de signalisation de l'inositol trisphosphate (IP₃) et ainsi induire la libération du calcium intracellulaire. D'autres agissent sur des récepteurs nucléaires activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR γ), des facteurs de transcription comme, par exemple, l'activation de la protéine-1 (AP-1), du facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT) et de NF- κ B (72).

La prostaglandine E₂ (PGE₂) est le prostanoïde le plus abondant au niveau du corps humain et est impliquée dans le processus inflammatoire et dans la dégradation du cartilage lors de l'OA (73). La prostaglandine E₂ synthase (PGES) existe sous trois isoformes : 1) PGES cytosolique (cPGES), 2) mPGES-1, et 3) mPGES-2. Les synthases cPGES et mPGES-2 ont une expression constitutive alors que l'enzyme mPGES-1 est de type inductible.

La cPGES (PGES cytoplasmique) est ubiquitaire et a une expression constitutive. Fonctionnellement, elle est couplée à la COX-1 durant la biosynthèse de la prostaglandine E₂ dans la réponse immédiate (Figure 11). La réaction catalysée par la cPGES nécessite le glutathion comme cofacteur. La PGE₂ générée par la cPGES est impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que la protection gastro-intestinale, la reproduction, le flux sanguin rénal, l'ostéogenèse, l'homéostasie pulmonaire, les fonctions immunitaires et certaines fonctions neuronales qui conduisent à la douleur aiguë dans la périphérie et dans le système nerveux central (74, 75).

La mPGES-2 (microsomal PGES type 2) a une expression constitutive. Elle est présente dans le cerveau, le cœur, les reins, les muscles squelettiques et dans le foie. Elle

peut être couplée avec la COX-1 ou la COX-2 durant la biosynthèse de PGE2 et permet donc la biosynthèse de PGE2 dans les conditions normales et pathologiques (76).

La mPGES-1 (microsomal PGES type1) est la première PGES identifiée. Elle se nommait autrefois *microsomal glutathion transferase-1 like-1* (MGST1-L1). La réaction catalysée par la mPGES-1 nécessite le glutathion (77) comme cofacteur, comme pour la cPGES (78). Elle est couplée fonctionnellement à COX-2, catalyse la biosynthèse immédiate de la PGE2 et est impliquée dans l'inflammation, la fièvre, la douleur et le cancer. Elle est de type inductible et appartient à la superfamille des *membrane-associated protein involved in eicosanoid and glutathione metabolism* (MAPEG). Elle est exprimée au niveau de la prostate, du testicule, du placenta, de la glande mammaire, de la vessie, du cartilage et du tissu synovial. Au niveau cellulaire, la mPGES-1 est localisée dans la membrane périmoléculaire et du réticulum endoplasmique et est séparée dans la fraction microsomique lors d'un fractionnement cellulaire (78, 79). La mPGES-1 est induite par les stimuli qui induisent, à leur tour, l'expression de la COX-2, les cytokines, les facteurs de croissance, les lipopolysaccharides (LPS) et les promoteurs tumoraux. La prostaglandine PGE-2 générée par mPGES-1 est impliquée dans des processus physiologiques (la protection de la muqueuse intestinale et des voies respiratoires et rénales) et pathologiques (douleur, inflammation, fièvre). Il est associé à la destruction du cartilage et à l'inflammation lors de l'arthrose.

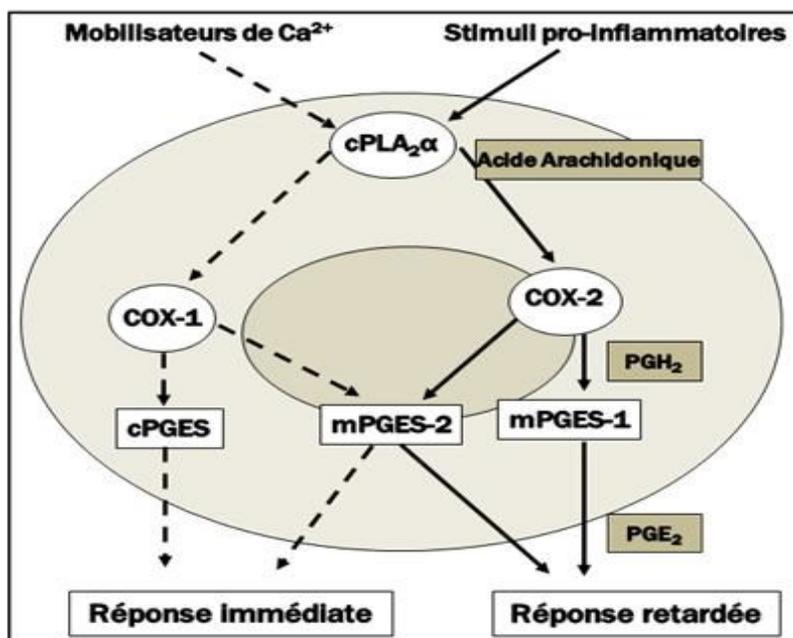


Figure 11: Représentation schématique du couplage fonctionnel entre PGES et les COXs. Adapté de Hara et al.,(74).

II. 3. 1. 2. La synthèse de prostacycline I2 (PGI2)

La PGI synthase catalyse la transformation de PGH₂ en prostacycline I₂, un prostanoloïde produit par l'endothélium vasculaire, qui agit comme un vasodilatateur et un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire en se fixant sur son récepteur IP. Il est également impliqué dans la réponse à la douleur (80). Les liquides synoviaux des patients arthrosiques ou atteints d'arthrite rhumatoïde contiennent un taux élevé de PGI₂, et l'utilisation d'antagoniste du récepteur IP de PGI₂ a montré des effets anti-inflammatoires (81)

II. 3. 1. 3. La synthèse de thromboxane A2 (TXA2)

La synthase de thromboxane A catalyse la formation du TXA₂ à partir de PGH₂ (Figure 10). Il est synthétisé par les plaquettes sanguines (thrombocytes). Le TXA₂ est un vasoconstricteur majeur, contrairement à PGI₂, et induit l'agrégation plaquettaire en se fixant sur son récepteur TP. En cas de plaie, le thromboxane A₂ participe à la coagulation sanguine en favorisant la formation d'un caillot sanguin, ou thrombus, par les plaquettes sanguines. Le TXA₂ induit la synthèse des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 β et TNF- α (82). Son implication dans les maladies arthritiques n'est pas démontrée.

II. 3.2. La voie des lipoxygénases (LOXs)

Cette voie donne principalement lieu à la biosynthèse des leucotriènes, des hydroxyeicosatétraénoïque (HETEs), des hydroxyoctadécadiénique (HODEs), des lipoxines et des hepoxilines (Figure 12), qui sont impliquées dans plusieurs réponses biologiques importantes comme l'inflammation et les réactions d'hypersensibilités. Les LOXs constituent une famille d'enzymes qui incorporent l'oxygène à une position bien déterminée au niveau des acides gras polyinsaturés. Elles contiennent un atome de fer non hémique fixé à des résidus histidines et isoleucines (83). Les différentes oxygénases sont la 5-, 8-, 12-, 15-LOXs, nommées selon la position du carbone de l'AA subissant l'oxygénation. Dans les tissus humains, trois types de LOX ont été caractérisés. Il s'agit des 5-LOX, 12-LOX et 15-LOX. La 15-LOX possède deux isoformes : la 15-LOX-1 et 15-LOX-2.

L'AA est métabolisé par les LOXs en acide hydroperoxy-eicosatétraénoïque (HPETEs) qui, après une réaction de réduction, conduit à la formation du HETEs, tandis que la conversion de l'acide linoléique conduit préférentiellement à la formation de HODE (84).

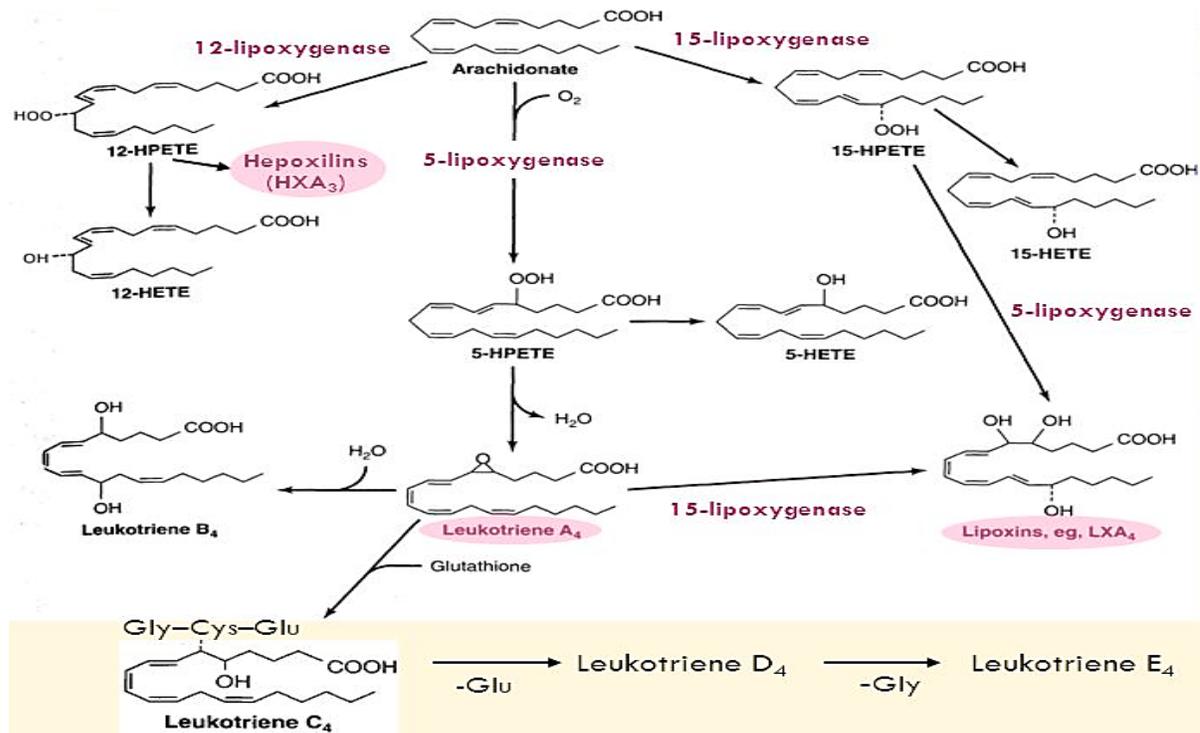


Figure 12: La voie de la lipoxygénase: synthèse des leucotriènes et des lipoxines (LX). Modifié de <http://www.gremi.asso.fr/images/LTLX>. Consulté le 28 octobre 2017.

II. 3. 2. 1. La 5-lipoxygénase (5-LOX)

Le gène 5-LOX se situe sur le chromosome 10 et comporte 14 exons, séparés par 13 introns. Il code pour une enzyme, la 5-LOX, ayant pour rôle d'ajouter une molécule d'oxygène à l'acide arachidonique au carbone numéro 5. Il s'agit de l'enzyme initiale intervenant dans la biosynthèse des leucotriènes (64) et est impliquée dans la régulation de l'inflammation (85). Les LTs sont de puissants médiateurs de l'inflammation et des réactions allergiques. Dans le cas de la 5-LOX, le HPETE est métabolisé pour former un composé instable, le leucotriène A₄ (LTA₄), qui sera converti en acide 5-hydroxyeicosatétraénoïque (5HETE) ou hydrolysé en LTB₄ par une hydrolase ou encore en cystéinyl-leucotriènes, LTC₄, LTD₄ et LTE₄ (Figure 12).

II. 3. 2. 2. Les 12-lipoxygénases (12-LOXs)

Les gènes 12-LOXs sont localisés sur les chromosomes 17 et comportent 14 exons. Ils codent pour des enzymes qui catalysent préférentiellement la fixation de

l'oxygène sur le carbone 12 de l'acide arachidonique. Ces enzymes transforment ainsi l'AA en 12-HPETE qui est alors réduit en 12-HETE par la glutathion peroxydase (Figure 12). Le 12-HPETE est aussi transformé en hépoxilines (HXs).

Il existe trois isoformes de 12-LOX selon les cellules dans lesquelles elles ont été identifiées en premier : la 12-LOX plaquettaire, la 12-LOX leucocytaire et la 12-LOX épidermique (86). La 12-LOX plaquettaire est considérée comme inhibiteur de l'agrégation plaquettaire. La 12-LOX épidermique joue un rôle dans la protection de la peau des mammifères. La 12-LOX leucocytaire n'est pas exprimée chez l'humain.

Les 12-LOXs sont exprimées dans de nombreux tissus comme, par exemple le cerveau et l'hypothalamus. Elles sont impliquées dans des nombreuses maladies comme le diabète, le cancer de l'utérus et l'OA. Les enzymes 12-LOX auraient des propriétés anti-inflammatoires et protectrices des cartilages selon des études menées dans notre laboratoire (87).

II. 3. 2. 3. Les 15-lipoxygénases (15-LOX)

Les gènes 15-LOX-1 (ALOX15) et de la 15-LOX-2 sont situés sur le chromosome 17. Ils codent pour des enzymes qui catalysent l'oxygénation du carbone 15 des acides gras polyinsaturés. Les gènes 15-LOXs sont exprimés dans les chondrocytes articulaires. Les enzymes 15-LOXs sont présentes dans de nombreux types cellulaires, notamment dans les réticulocytes, les leucocytes, les monocytes, les macrophages et les cellules épithéliales. Les 15-LOXs transforment l'AA en acide 15(S)-hydroperoxyeicosatétraénoïque 15(S)-HpETE qui est le précurseur des lipoxines (Figures 13) et de 15-HETE. Elles transforment l'acide linoléique (LA) en 13-HODE et le acide docosahexaénoïque (DHA) en resolvines et en protectines (88).

La 15-LOX-1 transforme préférentiellement l'acide linoléique en 13(S)-HODE (Figure13).

La 15-LOX-2 présente seulement 40 % d'identité avec celle de la 15-LOX-1. Elle, en revanche, convertit préférentiellement l'AA plutôt que le LA et synthétise principalement du 15-HETE.

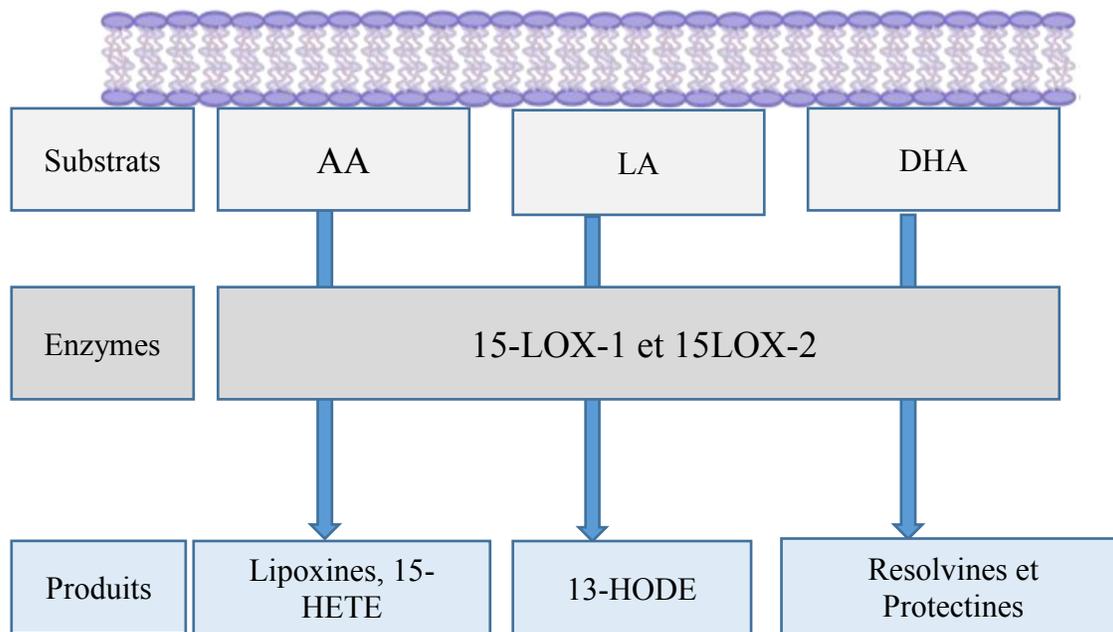


Figure 13: Schéma de la synthèse des médiateurs anti-inflammatoires par les 15-LOX-1 et 15-LOX-2. DHA; acide docosahexaénoïque. AA : acide arachidonique. LA : acide linoléique. Modifié de Dobrian et al., (88)

Plusieurs études ont démontré que les 15-LOXs et ses métabolites ont des propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices. Les métabolites des 15-LOXs inhibent la production du TNF- α , cytokine clé dans l'arthrite rhumatoïde (AR) (89, 90). De plus, les métabolites 15-HETE et 13-HODE sont des ligands du récepteur PPAR γ (91, 92) dont l'activation supprime la production des protéases MMPs dans plusieurs types cellulaires, notamment dans les chondrocytes et les synoviocytes. Des travaux de notre laboratoire (84) ont démontré que les chondrocytes expriment 15-LOX-1 et 15-LOX-2. Ils ont également montré que le traitement avec les métabolites 13-HODE et 15-HETE, des 15-LOX-1 et 15-LOX-2, entraîne une diminution de l'expression de MMP-1 et MMP-13, induites par l'IL-1 β . Ils induisent aussi une diminution de la dégradation du collagène II. Le traitement avec les métabolites des 15-LOXs a, en outre, entraîné une suppression de l'expression des protéases MMP-13 et ADAMTS-5, des iNOS et de la mPGES-1. Ces effets suggèrent fortement un rôle protecteur des 15-LOXs par diminution de la production de ces protéases

(MMP-1 et MMP-13) et enzymes (iNOS et mPGES-1). En plus de ces métabolites, les 15-LOXs produisent des molécules anti-inflammatoires telles que les lipoxines, les résolvines et les protectines (93). Les métabolites des enzymes 15-LOXs inhibent la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires comme IL-6, IL-8, COX-2, iNOS et les actions de certains d'autres eux, en inhibant les voies de signalisation MAP Kinase, P38, PI3K/ATK, JAK/STAT (94-96). Les lipoxines et les 15-HETEs stimulent l'expression de PPAR γ en inhibant les voies de signalisation MAP kinase et PI3K/ATK (95, 96). Les lipoxines inhibent la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires en diminuant les niveaux des facteurs de transcriptions NF-KB et AP-1 dans les noyaux (96). Elles augmentent les niveaux des facteurs protecteurs comme NAB1, Nrf2 et PPAR γ dans les noyaux cellulaires. L'activation de Nrf2 bloque la stimulation de la métalloprotéinase-13 (MMP-13), la prostaglandine E2 (PGE2) et de l'oxyde nitrique (NO) par l'IL-1 β . La résolvine se fixe aussi sur un récepteur couplé à une protéine G, bloque l'activation de l'adénylate cyclase, inhibe la voie ATK et celle induite par TNF α (94). Ce qui entraîne l'inhibition de la synthèse des médiateurs pro-inflammatoire et de leur action. En conséquence, les 15-LOXs peuvent contrer l'inflammation par la production de classes distinctes de métabolites anti-inflammatoires. Les 15-LOX-1 et 2 ont un rôle anti-inflammatoire et protecteur contre la destruction du cartilage. Une modification de la régulation de l'expression de ces gènes joue un rôle primordial dans la pathogenèse de l'arthrose.

II. 4. La régulation des gènes 15-LOXs

II. 4.1. Régulation de l'expression du gène 15-LOX-1

Le gène 15-LOX-1 est un gène situé sur le chromosome 17 et est aussi appelé *arachidonate 15-lipoxygenase* (ALOX15). Il est formé par 11 Kbp de nucléotides et comprend 14 exons et 13 introns. Il code pour une protéine de 75 kDa constituée de 662 acides aminés. Cette protéine est une enzyme qui catalyse l'oxygénation du carbone C15 des acides gras polyinsaturés, des acides arachidoniques (97) et des acides linoléiques. Elle préfère l'acide linoléique qu'elle transforme en 13-HpODE qui est ensuite réduit en 13-HODE. Elle catalyse également la transformation de l'AA en 15-HpETE qui est le précurseur des lipoxines et des 15-HETE.

Plusieurs facteurs contrôlent l'expression du gène 15-LOX-1. Par exemple, les cytokines anti-inflammatoires, IL-4 et IL-13 stimulent l'expression du gène 15-LOX-1 dans un certain nombre de types de cellules, y compris les monocytes/macrophages, les lymphocytes T, et dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses (98). De plus, les modifications de la chromatine, qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes, ont été signalées pour moduler l'expression 15-LOX-1. L'acétylation des histones semble stimuler l'expression de la 15-LOX-1 alors que la désacétylation des histones régulerait négativement l'expression de la 15-LOX-1 (99). Les méthylations des histones contrôleraient aussi l'expression de ce gène.

II. 4.2. La régulation de l'expression du gène 15-LOX-2

Le gène 15-LOX-2 est situé sur le bras court du chromosome 17 et est constitué de 14 exons et de 13 introns, couvrant 9,7 Kb de séquence au total (100). Ce gène code pour l'enzyme 15-LOX-2, membre de la famille des lipoxygénases, qui présente 38 à 39 % d'acides aminés identiques à la 15-lipoxygénase de type 1 et la 12-lipoxygénase; elle présente 44 % d'identité avec la 5-lipoxygénase (101). Cette protéine de 76 kDa convertit préférentiellement l'acide arachidonique en 15-HpETE; elle catalyse moins la transformation d'acide linoléique en 13-HODE contrairement à la 15-LOX-1.

Ce gène exprimé dans le cartilage joue un rôle protecteur et un rôle anti-inflammatoire (84). C'est aussi un gène suppresseur de tumeur dans la plupart des cancers, comme dans le cancer de la prostate. Il est exprimé dans le tissu épithélial normal de la prostate. Il est aussi exprimé dans les poumons, dans la peau et sur la cornée (101-103). Ce gène 15-LOX-2 possède, dans son promoteur, des sites de fixation pour plusieurs facteurs de transcription. Certains facteurs de transcriptions ont des stimulateurs comme SP1 alors d'autres sont des inhibiteurs comme Sp3 (104). Dans les tissus cancéreux, l'expression du gène 15-LOX-2 est inhibée.

III. La régulation épigénétique des gènes

Toutes les cellules somatiques d'un être humain possèdent les mêmes gènes, mais n'expriment pas les mêmes gènes une fois différenciées. Cette différence d'expression pourrait s'expliquer par des modifications épigénétiques. Les modifications épigénétiques sont des changements dans l'expression des gènes, héréditaires lors de la mitose et méiose, et qui ne résultent pas des modifications de la séquence de l'ADN (105). Il s'agit, entre autres, de modifications des histones, de la méthylation d'ADN, du remodelage chromatinien dépendant de l'ATP et des ARN non codants. Elles sont impliquées dans des processus biologiques normaux comme le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, la régénération des tissus et dans un grand nombre de pathologies comme dans les cancers, les maladies neurodégénératives (106, 107). La chromatine est le support de ces modifications épigénétiques.

III. 1. La structure de la chromatine

Dans les cellules eucaryotes, la chromatine est une structure complexe, dynamique et formée d'ADN et des protéines. On distingue parmi ces protéines des histones et des protéines non histones. Ces dernières sont très variées et comprennent des facteurs de transcription aux protéines associés à la réplication et au remodelage de la chromatine. Les histones sont des petites protéines relativement bien conservées, très riches en acides aminés basiques qui s'associent en conséquence à l'ADN par des interactions électrostatiques fortes pour former des structures appelées nucléosomes (108) (Figure 14). Ils sont de 5 sortes : histones H1, H2A, H2B, H3 et H4. Le nucléosome est l'unité fondamentale de la chromatine et comprend un filament d'ADN de 146 paires de bases enroulées autour d'un octamère d'histones, composé de deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 (109). L'octamère est formé d'un tétramère central (histones H3 et H4) flanqué de deux dimères H2A et H2B. Les extrémités C-terminales des histones forment le cœur du nucléosome (structures globulaires formées d'hélices alpha). Les extrémités N-terminales des histones émergent à la surface du nucléosome formant des queues qui portent des sites des modifications post-traductionnelles (acétylation, méthylation par exemple).

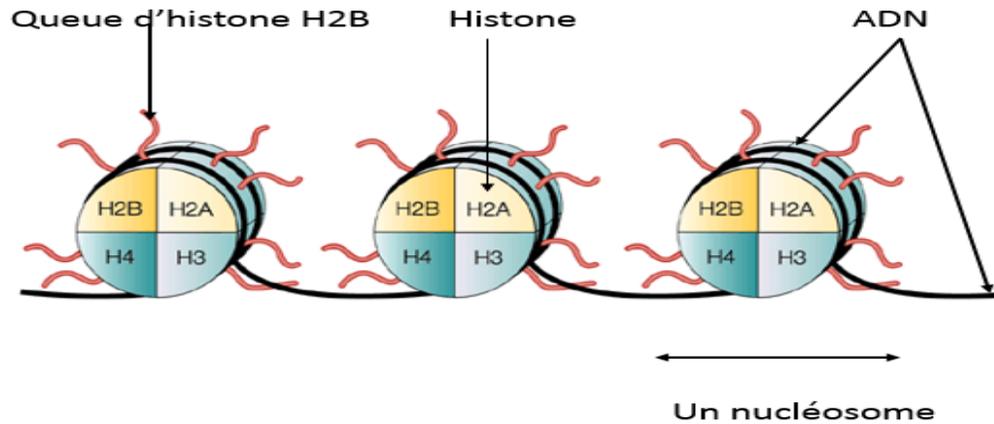


Figure 14: Structure des nucléosomes. ADN de 146 paires de bases (en noir) entoure le cœur de chaque nucléosome, constitué de 8 histones (2 histones H4, 2 H3, 2 H2A et 2 H2B). Modifié de Marks et al., (110).

À l'état décondensé, la chromatine correspond à un nucléofilament ou une fibre de 11 nm de diamètre ayant l'aspect d'un collier de perles. Les nucléosomes constituent les perles reliées par l'ADN internucléosomale. L'enroulement du nucléofilament autour de l'octamère permet la formation d'une fibre de 30 nm. Cette compaction de la chromatine nécessite l'histone H1 qui est une histone permettant la condensation. Les fibres de 30 nm peuvent subir des compacions ou se replier pour former des fibres de 60 à 300 nm. Le dernier niveau de condensation de la chromatine est atteint lorsque la fibre se replie pour former un chromosome métaphasique (Figure 15).

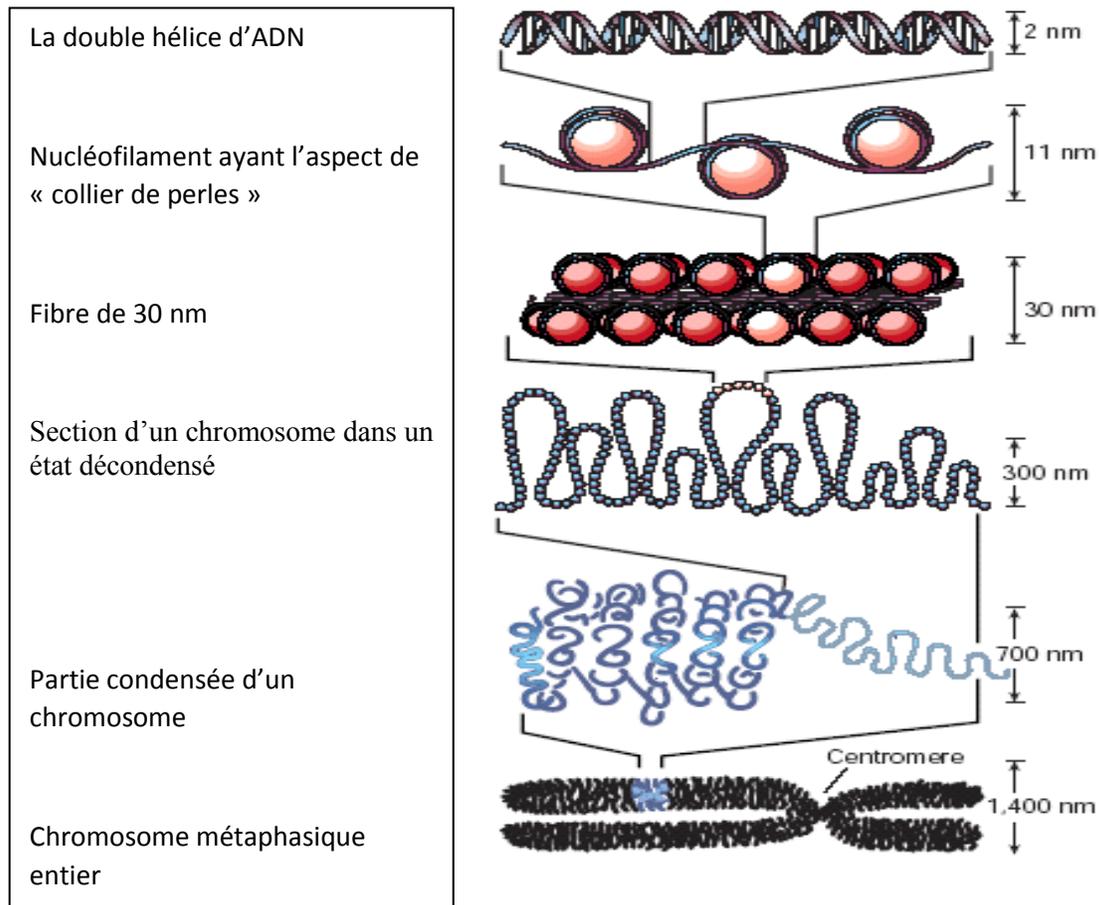


Figure 15: Schéma de la condensation de la chromatine et de la double hélice au chromosome métaphasique. Il y a plusieurs niveaux d'organisation atteints par enroulement (fibres de 11 nm, de 30 nm, 60nm) avant le stade de chromosome métaphasique très condensé. Modifié de Felsenfeld et Groudine (111) .

En sus de cette fonction d'empaquetage, qui permet de condenser le filament d'ADN de 2 m de long dans un noyau de 6 μm de diamètre en moyenne, la chromatine, par son organisation dynamique, joue un rôle dans la transcription, dans la recombinaison et dans la réparation de l'ADN. Dans le noyau d'une cellule en interphase, on observe effectivement la chromatine décondensée, appelée euchromatine qui est transcriptionnellement active, et l'hétérochromatine ou chromatine condensée, qui est transcriptionnellement inactive. Il existe également l'hétérochromatine constitutive, formée des séquences répétées, très condensées (au niveau des télomères et des centromères) et l'hétérochromatine facultative qui se décondense en euchromatine pour l'expression des gènes. Les cellules possèdent trois mécanismes leur permettant de

modifier la structure de la chromatine. Elles peuvent échanger les histones grâce aux protéines chaperons d'histones comme ASF1, CAF1 (112). Les variantes histones H2A.Z permettent la transcription et la réparation de l'ADN par décondensation chromatinienne. Le deuxième mécanisme est le remodelage chromatinien utilisant l'ATP. En effet, les nucléosomes empêchent l'accès des facteurs de transcriptions à l'ADN. L'énergie de l'ATP est utilisée pour affaiblir les liens histones-ADN, ce qui permet l'altération du nucléosome (113). Le troisième mécanisme est les modifications post-traductionnelles des histones. Ces modifications correspondent à des méthylations, des acétylations, des phosphorylations et des ubiquitinations des acides aminés des extrémités N-terminales des histones.

L'expression des gènes dépend de l'état de la chromatine et des modifications épigénétiques. Les modifications des histones et les méthylations d'ADN interagissent dans la régulation de l'expression des gènes, surtout lors du développement embryonnaire, de la reprogrammation des cellules somatiques et lors de la tumorigénèse (114).

III. 2. Les modifications des histones

Les extrémités N terminales des histones (queues des histones) sont les cibles des modifications post-traductionnelles telles que les acétylations, les méthylations, les phosphorylations et les ubiquitinations des histones (Figure 16). Ces modifications jouent un rôle clé dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes en influençant l'accessibilité de la chromatine ou en recrutant des complexes protéiques impliqués dans l'expression des gènes (115). Les modifications des histones constituent un code histone pour des protéines, qui le reconnaissent et qui régulent l'expression des gènes. Nous détaillerons les acétylations et les méthylations des histones qui constituent les modifications des histones les plus courantes.

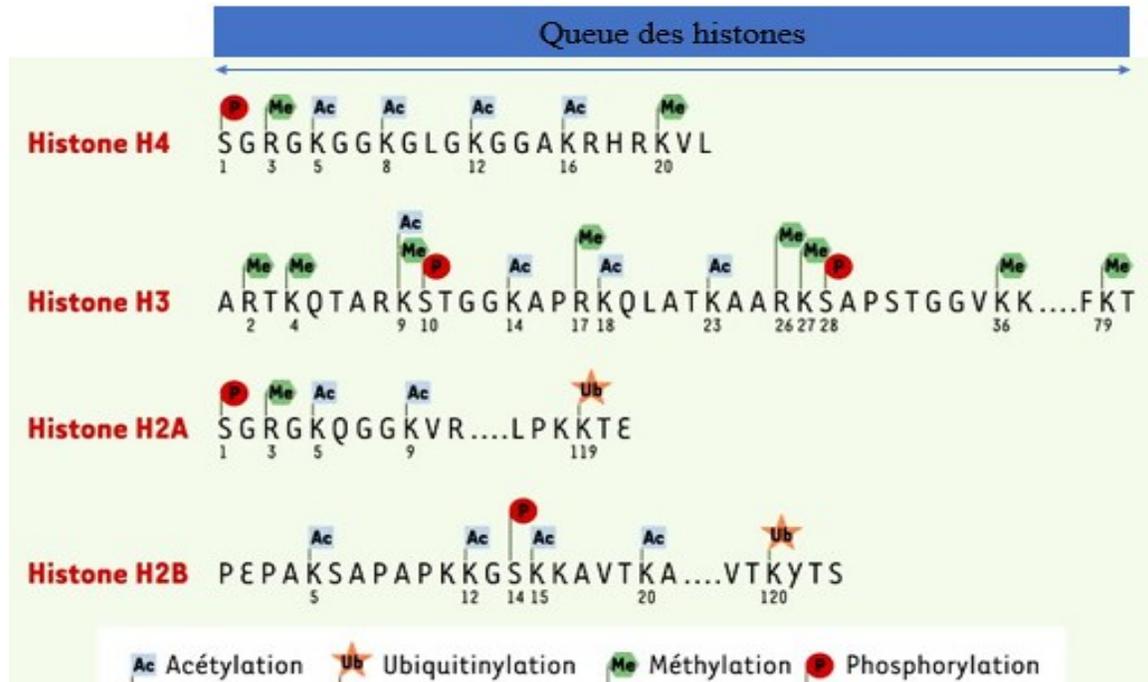


Figure 16: Schéma des principales modifications des histones. Les lettres telles qu'A, R, T, Q, S, V représentent les acides aminés. Les acétylations n'affectent que les lysines (K). Les lysines et arginines peuvent être méthylées. Modifié de N. Lacoste et J. Côté (116).

III. 2.1 Les acétylations et les désacétylations des histones

L'acétylation des histones se produit sur les lysines des queues des histones. Elle est gouvernée par les actions de deux familles d'enzymes antagonistes : 1) les acétyltransférases des histones (HAT) qui placent un groupement acétyle sur la lysine, et 2) les histones désacétylases (HDAC) qui enlèvent le groupement acétyle. Les HATs sont qualifiées de *writers*, contrairement aux HDACS qui sont des *erasers*.

En général, l'acétylation des histones permet l'expression des gènes en facilitant l'accessibilité de la chromatine par la suppression des interactions électrostatiques entre histones et ADN, et en recrutant des complexes protéiques dits *readers* qui sont impliqués dans l'activation des gènes (117). La désacétylation des histones est associée, en général, à la répression des gènes par la formation de l'hétérochromatine (118).

III. 2.2 La méthylation des histones

La méthylation des histones affecte les lysines et les arginines des queues des histones. Elles sont gouvernées, comme l'acétylation, par deux familles d'enzymes antagonistes : 1) les histones méthyltransférases (HMT) qui placent les groupements méthyles sur les lysines ou les arginines, et 2) les histones déméthylases qui enlèvent les groupements méthyles de ces acides aminés (119). Les lysines peuvent être mono, di ou triméthylés alors que les arginines peuvent être mono ou diméthylés.

Les méthylations des histones n'ont pas d'effet direct sur le degré de condensation de la chromatine, mais constituent des sites de fixation pour des complexes protéiques dits *readers* impliqués dans la régulation de l'expression des gènes (115). Selon les types de méthylations, elles peuvent conduire à l'activation de la transcription, comme lors de la triméthylation de la lysine 4 des histones 3, ou à la répression des gènes, comme lors de la triméthylation des lysines 9 et 27 des histones 3.

En plus des modifications des histones, l'expression des gènes peut être régulée par les micro-ARNs.

III. 3. La régulation de l'expression des gènes par les micro-ARNs

Les micro-ARNs sont des courts acides ribonucléiques, simples brins, non codants, relativement conservés et qui régulent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel (120).

III. 3.1 La biogenèse des micro-ARNs

Les micro-ARNs, des courts ARNs non codants d'environ 21 nucléotides, proviennent des introns, des exons (rarement) et des régions non codants (3'UTR) des ARNm. Ils proviennent parfois des régions intergéniques. Un gène codant pour un micro-ARN est transcrit majoritairement par l'ARN polymérase II en transcrit primaire ou pri-miRNA. Dans le noyau, ce dernier est clivé par un complexe protéique ou microprocesseur comprenant une RNase III (DROSHA) et son cofacteur (DGCR8) en une structure tige-

boucle appelée pre-miRNA, constitué d'environ 70 nucléotides. Ce pré-miRNA est ensuite exporté vers le cytoplasme par la protéine appelée exportin 5 (121). Dans le cytoplasme, la structure tige-boucle est clivée par la ribonucléase III, Dicer, associée à son cofacteur TRBD, en un duplex micro-ARN double brin, d'environ 21 nucléotides. Un des deux brins est ensuite associé avec une protéine argonaute pour former le complexe mi-RISC, à l'origine de la répression des gènes (Figure 17).

III. 3.2. La régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes par les micro-ARNs

On estime que 60 % des gènes humains, codant pour des protéines sont régulés par les micro-ARNs. Ils sont impliqués dans le fonctionnement normal des organes ou tissus et dans des nombreuses maladies. Ils jouent un rôle dans lors du développement embryonnaire, dans le maintien de la pluripotence, dans la différenciation cellulaire et dans d'autres domaines (122). Leur expression anormale est associée à des maladies comme les cancers, la maladie d'Alzheimer, l'arthrose.

Leur mode d'action est connu. Ils exercent une régulation spécifique grâce à l'appariement du micro-ARN mature contenu dans le complexe miRISC avec une séquence partiellement complémentaire, situé généralement dans le 3'UTR de l'ARNm cible. Cette fixation entraîne la dégradation de l'ARNm ou la répression de sa traduction (Figure 17).

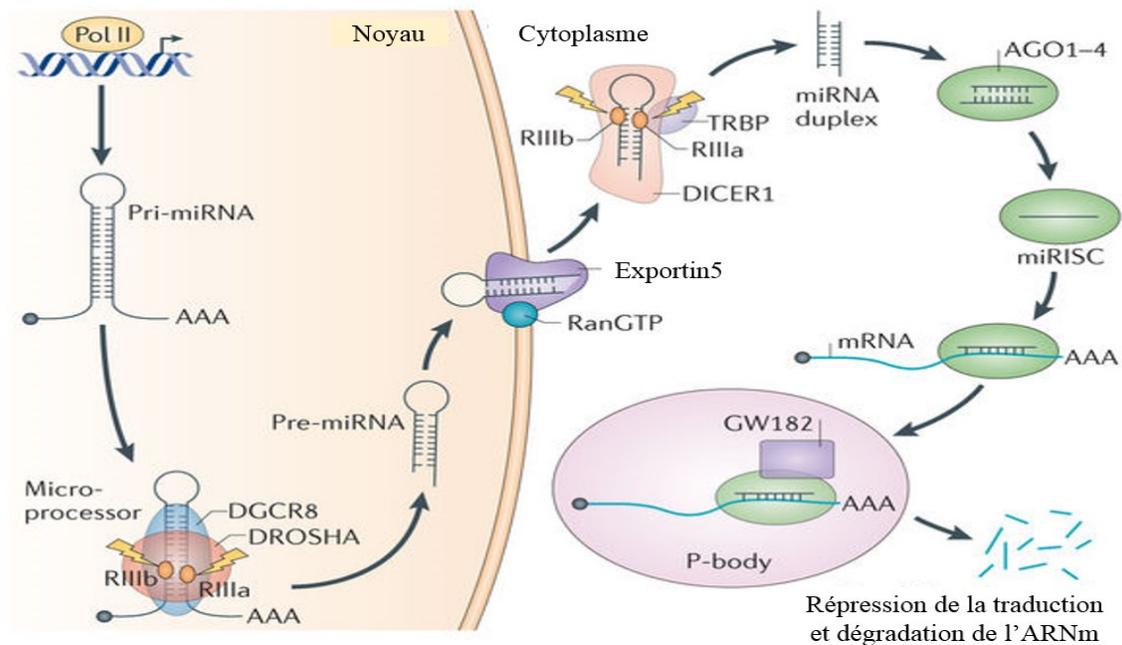


Figure 17: Schéma des étapes de la biogenèse d'un micro-ARN et leur mode d'action. Modifié de Lin et Gregory (123).

III. 4. La méthylation d'ADN

La méthylation de l'ADN est un mécanisme clé, impliqué dans la régulation de l'expression des gènes. Elle est, en général, corrélée à la répression des gènes. Elle joue un rôle clé dans l'*imprinting* génomique, dans l'inactivation du chromosome X, dans le *silencing* des transposons et dans la différenciation cellulaire lors du développement embryonnaire (124). Elle consiste en l'addition d'un groupement méthyle à la cytosine du dinucléotide CpG dans l'ADN pour former du 5-méthylcytosine.

III. 4.1. La méthylation par les méthyltransférases de l'ADN

Les méthyltransférases (DNMTS) catalysent la méthylation de l'ADN. Elles permettent l'ajout du groupement méthyle sur le carbone 5 de la cytosine suivie par guanine (CpG). Cette modification a lieu juste après la réplication de l'ADN (125). Les ADN méthyltransférases sont : DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b, DNMT3L. Chez les mammifères, ces enzymes possèdent deux domaines principaux : 1) un domaine N-terminal, de taille variable, possédant des fonctions de régulation, et 2) une région C-terminale catalytique, à l'exception de la DNMT3L (64). Le mode d'action des enzymes

est le même : elles reconnaissent le substrat, elles entraînent le basculement de la cytosine ciblée hors de la double hélice et elles forment un complexe covalent avec le carbone 6 de la cytosine. Ensuite, elles catalysent le transfert du groupement méthyle du cofacteur S- adénosylméthionine (AdoMet, SAM) sur la position C5 de la cytosine, permettant la formation d'une 5-méthylcytosine et la libération de la S-adenosylhomocystéine (AdoHcy, SAH) (Figure 18) (125). L'enzyme DNMT2 possède une très faible activité méthyltransférase et est impliquée dans la méthylation de l'ARNt (126).

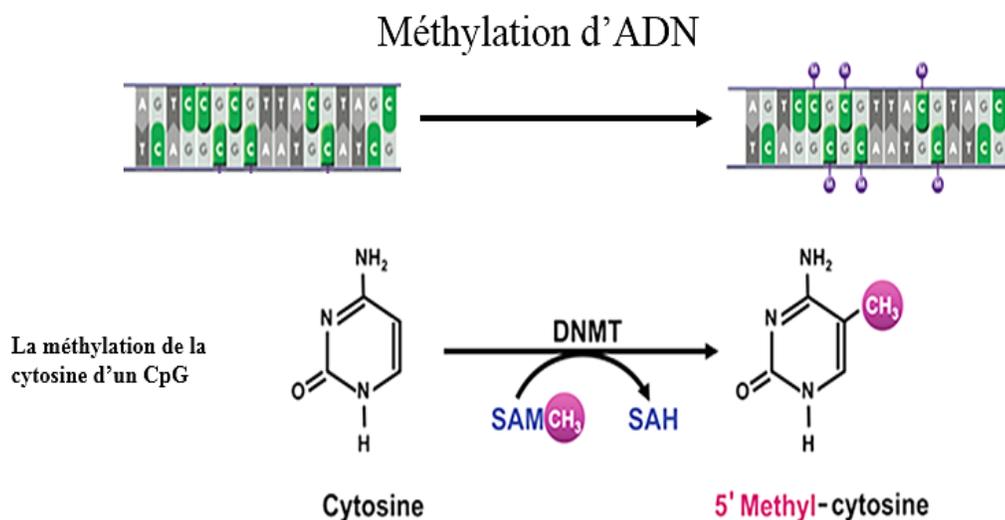


Figure 18: Représentation schématique de la méthylation d'ADN qui convertit la cytosine en 5-méthyle-cytosine par les actions de la méthyltransférase d'ADN (Dnmt). La méthylation de l'ADN se fait au niveau de CpG. SAM: S-adenosylmethionine, SAH: S-adenosylhomocystéine. Modifié de Samir Zakhari (127).

Les méthyltransférases sont classées en deux catégories selon leur substrat et leur mode d'action : 1) les méthyltransférases de novo (comprenant les DNMT3a, 3b et 3L), et 2) de maintenance dont DNMT1 est l'unique représentante. L'enzyme DNMT1 est une méthyltransférase de maintenance parce qu'elle permet le maintien des profils de méthylation au cours des divisions cellulaires. Elle reconnaît préférentiellement l'ADN hémiméthyle et méthylera le brin « fille » en copiant le profil de méthylation présent sur le brin « parental » lors de la réplication de l'ADN (64). Par contre, les enzymes DNMT 3a et 3b sont responsables de l'établissement des profils de méthylation lors du développement embryonnaire. Elles n'ont pas de préférence pour l'ADN hémiméthylé et sont fortement exprimées lors du développement embryonnaire.

III. 4.2. Les sites de méthylations et les conséquences sur la transcription des gènes

La méthylation de l'ADN se produit principalement sur le carbone 5 de la cytosine de dinucléotides CG, appelés CpG, et rarement dans les dinucléotides CA, CC ou CT (128). Environ 70 % de tous les dinucléotides CpG dans le génome sont fortement méthylés et il existe environ 29 000 CpG dans tout le génome humain (129). Les sites CpG sont peu abondants et inégalement répartis dans le génome humain. Certains gènes comme MMP13 ou ADAMTS ont des promoteurs contenant peu des sites CpG, qualifiés des promoteurs à « CpG clairsemé », alors que d'autres gènes ont des promoteurs plus riches en sites CpG qui sont très présents dans les îlots CpG (130, 131). Ces îlots CpG sont concentrés dans les régions promotrices ou, parfois, dans le premier exon de 60 % de l'ensemble des gènes humains. Ils échappent en général à la méthylation d'ADN (130, 132, 133). Dans les cellules somatiques, la plupart des îlots CpG sont non méthylés quel que soit l'état d'expression des gènes, à l'exception des ceux des gènes impliqués dans le *silencing* ou la répression à long terme des gènes, comme dans les cas du gène du chromosome X inactivé, les gènes spécifiques des cellules germinales ou les gènes impliqués dans la répression tissus spécifiques (132). En revanche, les sites CpG situés dans les régions répétées ou les transposons, les régions intergéniques, qui sont des régions moins denses en sites CpG, sont hyperméthylés (132, 134). Ceci permet la stabilité chromosomique et le contrôle de l'expression des gènes.

La méthylation de l'ADN, au niveau du promoteur, inhibe généralement la transcription du gène concerné. Trois mécanismes complémentaires semblent être impliqués dans cette inhibition (Figure19). Les méthylations peuvent empêcher directement l'accès au promoteur de la machinerie de la transcription comme les facteurs de transcription. La méthylation de l'ADN peut également modifier la position des nucléosomes et empêcher la fixation des facteurs de transcription. Elles créent aussi des sites de fixation spécifiques aux protéines se liant à l'ADN méthylé (MBP ou *methyl-binding protein*) qui recrutent les complexes protéiques de remodelage chromatinien. Ces complexes contiennent des enzymes de modifications des histones, des ADN méthyltransférases et de corépresseurs transcriptionnels, et entraînent la formation de

l'hétérochromatine (125, 135). Chez les mammifères, il existe trois familles de protéines MBPS qui reconnaissent les sites CpG méthylés : 1) la famille des protéines contenant un domaine MBP (*methyl-CpG binding domain*), 2) la famille des protéines contenant des doigts de zinc (Kaiso, ZBTB4 et ZBTB38), et 3) la famille des protéines contenant le domaine SRA (*set and ring associated domain*) (136). La famille des protéines, ayant un domaine MBP, est constituée de 16 sous-groupes repartis trois en groupe : 1) les méthyltransférases des histones (HMT-MBP, histone méthyltransférases *methyl-binding domain*), 2) les protéines MeCP, et 3) les acétyltransférases des histones (HAT-MBP, histones acétyltransférases *methyl-binding protein*). Les protéines MeCP2 sont le groupe le plus important et sont associées avec des histones déacétylases (HDACS) et des complexes de remodelage de la chromatine, comme NurD et MeCP1 impliqués dans la répression de la transcription (125) (Figure 19).

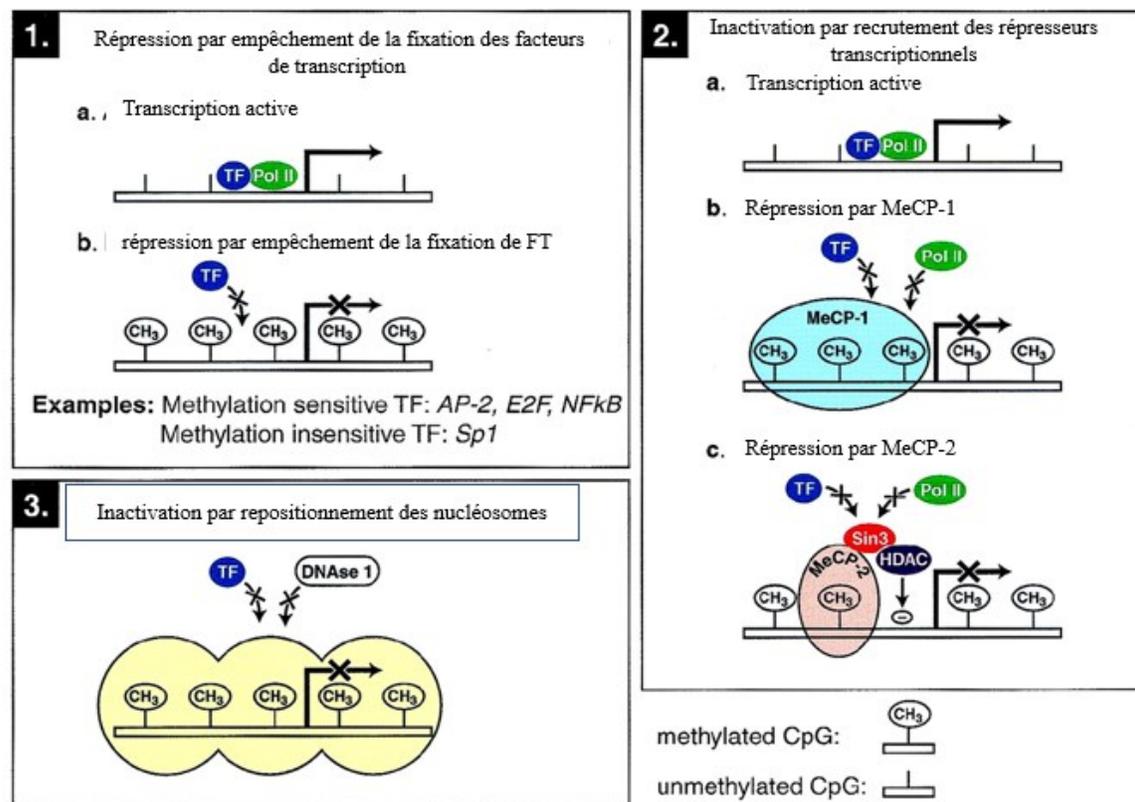


Figure 19: Les mécanismes de l'inhibition de la transcription par méthylation de l'ADN. Modifié de Rakesh Singal et Gordon D. Ginder (137)

L'épigénome de chaque cellule ou tissu est unique. Il peut changer temporellement et spatialement en réponse aux facteurs environnementaux internes et externes, incluant la nourriture, les exercices et le tabagisme (138). Cela signifie que le profil de méthylation des cellules d'un tissu peut changer.

La déméthylation de l'ADN est associée à une expression accrue des gènes. Elle a lieu lors de la reprogrammation épigénétique ou de la différenciation cellulaire durant la vie embryonnaire, ce qui entraîne l'expression de certains gènes dans certains tissus alors qu'ils sont inhibés dans d'autres tissus. Des altérations de la méthylation ou hypométhylations sont observées dans des maladies auto-immunes chez les personnes atteintes de polyarthrite rhumatoïde (107). Cette déméthylation peut se faire de deux façons : la déméthylation de façon active ou de façon passive. La déméthylation passive se fait par l'inhibition de la méthylation de maintenance; par exemple, par inhibition de l'action de DNMT1 lors de la réplication de l'ADN entraînant une perte progressive des méthylations à chaque division cellulaire. Au contraire, la déméthylation active nécessite l'activité d'une ou de plusieurs enzymes et peut se produire indépendamment de la réplication de l'ADN. Trois familles d'enzymes sont impliquées dans cette déméthylation : 1) les enzymes de la famille Tet, (*Ten-eleven-translocation*) qui modifie les 5 -méthylcytosines par hydroxylations et oxydations, 2) les enzymes de la famille AID/APOBEC qui désaminent les bases 5-méthylcytosine, et 3) des glycolases qui activent le système de réparation par excision de base (BER) (139).

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Les réactifs

Les amorces de séquençage, de PCR, de RT-PCR en temps réel, les réactifs RNAlater, Trizol, la reverse transcriptase (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ou M-MLV RT*), le mélange *Fast SYBR Green Master*, les antibiotiques (pénicilline et streptomycine) et le sérum fœtal bovin (FBS) ont été achetés chez Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Le milieu de culture *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (DMEM) a été acheté chez Wisent (ST-Bruno, QC, Canada). Le kit *Vectastain ABC Kit* pour la révélation en immunohistochimie a été acheté chez Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). Les anticorps anti-15-LOX-1 et anti-15-LOX-2, produits de Cayman Chemical ont été achetés chez le fournisseur Cedarlane Labs (Burlington, ON, Canada). Afin de réaliser les extractions d'ADN des cartilages, le kit *DNeasy maxi plant* a été acheté chez Qiagen (Montréal, QC, Canada). La conversion au bisulfite de l'ADN extrait a été faite avec le kit *Epiect bisulfite* (Qiagen). Pour amplifier l'ADN converti, le kit *TaKaRa EpiTaq™ HS* a été acheté chez le fournisseur Cedarlane Labs. Pour le pyroséquençage, nous avons acheté chez Qiagen les produits suivants : les cartouches (*PyroMark Q24 cartridge*), les plaques (*PyroMark Q24 plate*), les réactifs (*PyroMark Golde Q24 reagents*), les ADN contrôles (*Epiect-PCR contrôle DNA set*), les tampons de dénaturation, de lavage et d'hybridation. Pour purifier l'ARN, le kit *RNeasy mini* a été acheté chez Qiagen. Le cartouche, *PyroMark Q24 cartridge*, contient les puits dans lesquels sont placés les enzymes, substrats et nucléotides du *PyroMark Golde Q24 reagents*. Les réactions de pyroséquençage se sont déroulées dans les puits des plaques de *PyroMark Q24 plate*. Les tampons de lavage et de dénaturation contribuent à la purification de la matrice simple brin nécessaire au pyroséquençage.

II. La sélection des échantillons et culture cellulaire

II. 1 Les tissus humains

Les cartilages humains ont été obtenus à partir de genoux provenant des patients ayant subi une arthroplastie totale du genou pour arthrose (n= 20, l'âge moyen est de 69 ans avec un écart type de 14 ans). Presque que la moitié des genoux proviennent des hommes et l'autre moitié des femmes. Ces patients ont donné leur accord pour l'utilisation

des organes prélevés. Les patients ont été évalués par des rhumatologues qui ont suivi les critères du Collège de rhumatologie (140). Les cartilages non dégradés ont été prélevés dans la zone profonde et intacte du cartilage issu des patients. Les cartilages dégradés ont été obtenus à partir des morceaux de cartilage dans la zone dégradée. Les cartilages ont été prélevés rapidement, dans les 24 heures après l'opération chirurgicale. Les cartilages non arthrosiques ont été prélevés des genoux de personnes décédées avec l'accord de leur famille ou tuteur (N=8, l'âge moyen est de 58 ans avec un écart type de 15 ans). Les cartilages ont été coupés en petits fragments puis stockés immédiatement à moins -80 °C. Les morceaux de cartilages destinés à l'extraction d'ARN ont été coupés en petits morceaux dans une solution RNAlater avant l'extraction des ARN totaux. Le protocole expérimental et l'utilisation des cartilages humains ont été approuvés par le comité d'éthique du CRCHUM.

II.2 L'isolement et la culture des chondrocytes

Les chondrocytes ont été isolés à partir des cartilages arthrosiques issus des genoux. Les cartilages ont été prélevés très rapidement, dans des conditions aseptiques. Chaque cartilage a été coupé en petits fragments puis digéré pendant une heure avec 1mg/ml de pronase (Invitrogen) et ensuite avec 2mg/ml de collagénase de type II (Invitrogen) pendant 6 heures à 37°C. Les chondrocytes ont été obtenus par centrifugation du surnageant et récupération du culot. Le culot contenant les chondrocytes a été résuspendu avec du DMEM (Wisent) contenant 10% de FBS (Invitrogen) et 1% d'antibiotiques (100 unités/ml pénicilline et 100ug/ml de streptomycine, Invitrogen). Ils ont été comptés, repartis dans des plaques de 12 puits et chaque puit a reçu environ 70 000 chondrocytes. Ils ont cultivé pendant 48 heures, dans un milieu contenant DMEM (Wisent) avec 10 FBS (Invitrogen) et 1% d'antibiotiques (Invitrogen). Ils ont été lavés puis traités ou non avec un agent déméthylant, le 5-Aza-2'deoxyctine (5-AZA-DC; Sigma-Aldrich) avec une concentration de 1µM. Le 5-AZA-DC inhibe la DNMT1 qui permet le maintien de la méthylation d'ADN lors de la réplication d'ADN. Il s'incorpore dans l'ADN et empêche la progression de la DNMT1, ce qui inhibe la copie du profil de méthylation sur le brin d'ADN nouvellement synthétisé. Ils ont été cultivés pendant 5 semaines dans des plaques de 12 puits avec un milieu de culture contenant du DMEM (Wisent) appauvri contenant

que 2.5% de FBS (Invitrogen) et 1% des antibiotiques (pénicilline et de la streptomycine, Invitrogen). Les chondrocytes non traitées ont servi de témoin.

Les plaques de 12 puits ont été placées à 37 °C, dans un incubateur contenant 5% de CO₂ et 95% d'air. Les milieux de culture des chondrocytes ont été changés à tous les 2 jours. Les plaques ont été récupérés ensuite, pour l'extraction des ARNs totaux.

II.3. La lignée cellulaire C28

La lignée des cellules C28 a été donnée généreusement par le docteur Goldring Mari.B (*HSS Research Institute*, New York). Ces cellules C28 sont des chondrocytes humains immortalisés. Les cellules C28 ont été cultivées dans un milieu DMEM(Wisent) contenant 10 FBS (Invitrogen) et 1% d'antibiotiques (Invitrogen), dans des flasques de 25 cm² jusqu'à confluence. Ensuite, elles ont été trypsinisées, centrifugées et le culot contenant les cellules a été résuspendu. Elles ont été comptées et placées dans des plaques de 12 puits. Elles ont été traitées, ou non, avec l'agent déméthylant d'AZA-DC à 1µM dans un milieu DMEM (Wisent) appauvri en sérum fœtal bovin (Invitrogen) (2,5%) pendant 24 heures. Ces cellules se multiplient rapidement et sont plus pratiques dans les expériences de stimulation avec la 5-AZA-DC. Les plaques ont été placées dans un incubateur contenant 5% de CO₂ et 95% d'air, à 37 °C.

III. Les méthodologies

III. 1 L'analyse de l'expression des gènes 15 -LOX-1 et 15-LOX-2 dans les cartilages arthrosiques et non arthrosiques

III. 1.1. L'évaluation des proportions d'ARNm par RT-PCR en temps réel.

Pour analyser les niveaux d'expression des ARNm de ces deux gènes dans le cartilage arthrosique dégradé par rapport au cartilage non arthrosique, une RT-PCR en temps réel a été réalisée. Les molécules d'ARN ont été extraites, puis une reverse transcription a été réalisée avant une PCR quantitative.

III. 1.1.1. L'extraction d'ARN des cartilages

Les cartilages arthrosiques et non arthrosiques ont été broyés dans l'azote liquide. Nous avons utilisé 8 échantillons de cartilages arthrosiques et non arthrosiques. Les ARNs ont été extraits, immédiatement après la récolte des cartilages en utilisant les réactifs de Trizol (Invitrogen) et purifiés par le kit *RNeasy mini kit* (Qiagen) en accord avec les instructions les accompagnant et tel que décrit précédemment(141). L'ajout de Trizol et puis de chloroforme a permis la séparation des ARNs totaux des autres constituants du cartilage. Ensuite la phase aqueuse contenant les ARN a été récupérée. De l'éthanol est additionné afin de créer un environnement optimal pour la liaison des ARNs sur la couche de silice après transfert sur la colonne d'extraction du kit *RNeasy mini* (Qiagen). Les ARNs sont lavés avec les tampons de lavage du kit (tampons RW1 et RPE) et purifiés par plusieurs centrifugations successives puis élués dans 40 µL d'eau ultra pure *RNase-Free* (Invitrogen). Les ARNs ont été dosé au *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific). À une Do de 260 nm, les concentrations variaient entre 25 et 40 ng/µl. Le rapport absorbance 260/280 était compris entre 1,8 et 2,1 pour chaque échantillon. Les conditions de l'extraction de l'ARN ont été mises en place en utilisant des cartilages arthrosiques initialement. Les ARN extraits ont été conservés à -80 °C.

III. 1.1.2. La transcription inverse

La reverse transcription des ARNs totaux permet de synthétiser les cDNA monocaténaire correspondants. Elle a été réalisée en utilisant la reverse transcriptase, *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ou M-MLV RT* (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Elle a nécessité une solution de 50µl contenant, entre autres, des amorces hexanucléotidiques aléatoires, l'ADN polymérase, la reverse transcriptase, des inhibiteurs des RNases, des nucléotides et l'ARN. Chaque réaction de transcription inverse a été réalisée en trois exemplaires. Ensuite, la reverse transcription se fait dans un thermocycleur à 42 °C pendant 15 min et la dénaturation de la polymérase se fait à 99 °C pendant 5 min. les cDNA formés ont immédiatement, été conservés à -20 °C.

III. 1.1.3. LA PCR quantitative

La PCR quantitative permet de suivre en temps réel l'amplification de la matrice d'intérêt en utilisant *Rotor gene Q* (Qiagen) et en suivant les instructions du guide. Elle utilise un agent fluorescent, le SYBR green, qui s'intercale dans le petit sillon de l'ADN nouvellement formé. Elle permet de quantifier l'expression des gènes 15-LOXs. Nous avons déterminé initialement les amorces à l'aide du programme Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Elle a été réalisée en utilisant le mélange *Fast SYBR™ Green Master Mix* (Invitrogen) en suivant les instructions l'accompagnant. Les réactions ont été faites en triple exemplaire. Pour chaque réaction, nous avons utilisé 12,5 µl d'une solution contenant chacune 5 µl de CDNA, 7,5 µl de mélange composé de *mix SYBR green*, des amorces et de la Taq polymérase. Les conditions du thermocycleur ont été : une étape de l'activation de l'enzyme à 95 °C pendant 10 min, suivie de 40 cycles de trois étapes (dénaturation à 95 °C pendant 10 secondes, une hybridation avec les amorces à 57 °C pendant 20 secondes et une élongation à 72 °C pendant 20 s) pour l'amplification. Nous avons utilisé le gène de ménage GAPDH qui est le plus utilisé et un contrôle ne contenant pas l'enzyme(142). L'importance et la spécificité des amplifications ont été vérifiées, par migration électrophorétique sur un gel d'agarose de 1 %. Les amorces du tableau I ont été utilisées.

L'expression relative des ARNm de deux gènes a été quantifiée selon la méthode $\Delta\Delta Ct$. Le Ct (pour « Cycle Threshold ») correspond à une valeur seuil à partir de laquelle la fluorescence devient détectable. Il est directement proportionnel à la quantité de la matrice initiale (d'ARNm du gène). Plus il y a de matrices initialement, plus le Ct est faible. Nous avons déterminé les Ct pour chaque échantillon. À chaque cycle de phase exponentielle, la quantité de produits PCR formés est donc en théorie doublée. Un calcul en 3 étapes permet la quantification relative du niveau d'expression du gène d'intérêt par rapport à celle du gène de ménage :

- Étape 1 : Normalisation par rapport au gène de ménage pour chaque échantillon :

$$Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ gène de ménage} = \Delta Ct$$

- Étape 2 : Variance entre 2 échantillons:

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ échantillon 1 (cartilage arthrosique)} - \Delta Ct \text{ échantillon 2 (cartilage normal)}$

- Étape 3 : Détermination de la variation du nombre de copie ou ARNm du gène d'intérêt entre les échantillons comparés = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Les pourcentages d'ARNm des gènes 15-LOXs dans le cartilage arthrosique par rapport cartilage non arthrosique ont été calculés.

Tableau I : amorces utilisées dans la PCR en temps réel.

Gène	Taille du produit en Pb	TM en °C	Types d'amorces et séquences
15- LOX-1	142	57.5	Sens 5' -TGGTTATTTTCAGCCCCCATC-3'
		61.5	Antisens 5' -TGTGTTCACTGGGTGCAGAGA-3'
15-LOX-2	156	57.8	Sens 5' -GCATCCACTGATTGGACCTT-3'
		59	Antisens 5' -GCTGGCCTTGAAGTTCTGAC-3'
GAPDH	319	59.5	Sens 5' - CAGAACATCATCCCTGCCTCT-3'
		60	Antisens 5' -GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG-3'

III. 1.2 L'analyse de l'expression protéique par immunohistochimie

Les échantillons de cartilages ont été traités pour immunohistochimie comme décrite précédemment (84). Les échantillons sont fixés dans du paraformaldehyde à 4 % et mis dans la paraffine. Ensuite, des sections de 5 µm d'échantillons inclus dans la paraffine ont été déparaffinées dans du xylène et réhydratées dans l'éthanol graduellement dilué. Pour permettre la perméabilité membranaire des chondrocytes, les échantillons ont ensuite été préincubés avec de la chondroïtinase ABC (0,25 U/ml dans une solution saline tamponnée au phosphate [PBS, pH 8,0]) pendant 60 minutes à 37 °C, suivi d'une incubation de 30 minutes avec du Triton X-100 (0,3 %) à température ambiante. Les lames ont été lavées dans du PBS et ont été placées dans une solution de 2 % de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pendant 15 minutes pour bloquer l'activité de la peroxydase endogène. Elles ont ensuite été incubées pendant 60 minutes avec de sérum normal (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) pour saturer les sites non spécifiques et

recouvertes d'anticorps primaires (anticorps anti-15-LOXs) pendant 24 heures à 4 °C dans une chambre humidifiée. Chaque lame a été lavée trois fois dans du PBS (pH 7,4) et incubée avec le second anticorps dirigé contre l'anticorps anti-15-LOX. La révélation a été faite en utilisant la méthode complexe avidine-biotine (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories).

La coloration a été développée avec 3,3'-diaminobenzidine (Vector Laboratories) contenant du peroxyde d'hydrogène. Les lames ont été contre-colorées avec de l'éosine. La spécificité de la coloration a été évaluée en remplaçant l'anticorps primaire avec IgG non immune (Chemicon, Temecula, CA, USA), à la même concentration que l'anticorps primaire. L'évaluation des chondrocytes positifs a été réalisée en utilisant une méthode précédemment publiée (84). Pour chaque échantillon, six champs microscopiques ont été examinés sous le grossissement 40 X. Le nombre total de chondrocytes et le nombre de chondrocytes colorés positivement ont été évalués, et les résultats ont été exprimés en pourcentage de chondrocytes colorés positivement (score cellulaire).

III. 2. L'analyse de l'effet de la 5-AZA-DC sur l'expression des gènes 15-LOX-1 et 15-LOX-2 par RT-PCR en temps réel.

Les plaques de 12 puits contenant les cellules traitées ou non ont été récupérées, rincées avec du PBS stérile. Les ARN totaux des cellules ont été extraits par les réactifs de Trizol (Invitrogen) en accord avec les instructions fournies avec le kit. L'ajout de Trizol et puis de Chloroforme a permis la séparation des ARNs totaux des autres constituants des cellules. Les ARNs contenus dans la phase aqueuse ont été précipités avec de l'isopropanol et lavés avant sa résuspension dans de l'eau ultra pure sans RNase. Puis, ils ont été quantifiés avec le *Nanodrop* et nous avons réalisé un test de leur qualité par électrophorèse de gel 1 % en étudiant la migration des ARN 18S et 28 S. Nous avons ensuite converti ces ARNs en cDNA en utilisant la reverse transcriptase, *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* ou *M-MLV RT* (Invitrogen). Nous avons réalisé un qPCR pour quantifier les niveaux d'expression des gènes 15-LOXs dans les cellules traitées par rapport aux témoins. Nous avons utilisé le mélange *Fast SYBR™ Green Master Mix* (Invitrogen) et amplifié dans *Rotor gene Q* (Qiagen) avec les mêmes conditions et les

mêmes amorces que lors de la quantification de l'expression de ces gènes dans les cartilages arthrosiques et non arthrosiques.

La méthode de la quantification relative des ARNms des 15-LOXs utilisant le $\Delta\Delta C_t$ a été choisie comme précédemment. Le nombre de copies d'ARNm de chaque gène 15-LOX, dans les cellules traitées, a été calculé par rapport à celui dans les cellules non traitées.

III.3. L'Étude *in silico* des promoteurs proximaux des gènes 15-LOXs et la conception des amorces

Les gènes 15-LOX-1 et 15-LOX-2 sont situés sur le chromosome 17 et sont également appelés arachidonate 15-lipoxygénase (ALOX15 et ALOX15B respectivement). Nous avons récupéré les séquences de chaque gène dans le site web <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. Les deux gènes comprennent chacun 14 exons et 13 introns.

Nous avons récupéré les 2000 premiers nucléotides du promoteur proximal de chaque gène. Cette région joue un rôle important dans la transcription des gènes 15-LOXs. Nous avons localisé les îlots CpG grâce au programme *MethPrimer*.

Nous avons déterminé les sites de fixation des facteurs de transcriptions potentiels, (les plus probables) se fixant dans cette région en utilisant les logiciels de prédiction TFBING, AliBaba2.1 et Biosciences. Nous avons ensuite déterminé les amorces de PCR de l'ADN convertie par le traitement bisulfite et les amorces de séquençage les plus efficaces dans cette région grâce au logiciel *PyroMark Assay design 2.0*.

III.4. La quantification des taux de méthylation des sites CpG du promoteur proximal des gènes 15-LOXs du cartilage arthrosique dégradé et du cartilage non dégradé.

III.4 1. Extraction d'ADN à partir du cartilage

Les molécules d'ADN du cartilage arthrosique dégradé et du cartilage arthrosique non dégradé ont été extraites. Avant l'extraction, le cartilage a été placé dans l'azote liquide et broyé. L'extraction s'est faite avec le kit *DNeasy® Plant Mini Kit* (Qiagen) et en conformité avec les instructions fournies avec le kit. En effet, des tampons

de lyse (AP1 et AP2) ont été ajoutés aux poudres de cartilages (750mg) pour lyser les chondrocytes. L'ajout de RNase A a permis la dégradation des ARN. Les débris cellulaires et les précipités formés par les protéines et les polysaccharides ont été éliminés par centrifugation. Les surnageants contenant, entre autres, l'ADN, ont été placés sur des colonnes de filtration (colonnes QIAshredder) qui ont permis de retenir les débris cellulaires et les précipités restants après centrifugation. Un tampon de liaison, contenant de l'éthanol a été ajouté à chaque filtrat contenant l'ADN. Chaque mélange a été placé sur une colonne de centrifugation DNeasy contenant une membrane qui retient l'ADN. Les contaminants comme les protéines et les polysaccharides restants sont éliminés après centrifugations et lavage. L'ADN pure a été élué par le tampon d'éluion AE. L'ADN extraits ont été dosés au *Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)* à 260 nm puis précipités à l'aide de l'isopropanol en présence de NaCl. Ils ont été resuspendus avec de l'eau ultra pure, ne contenant pas de DNase, et les concentrations d'ADN des échantillons variaient entre 40 et 65 ng/μl pour l'ADN double brin. Une lecture de l'absorbance à 280 nm et 230 nm permet de déterminer la pureté de l'ADN ; en effet le rapport de DO 260 nm / 280 nm était globalement compris entre 1,8 et 2,0. Les échantillons d'ADN ont été conservé à -20 °C.

III.4. 2 la conversion au bisulfite de sodium

Le traitement au bisulfite de sodium de l'ADN entraine la désamination des cytosines non méthylées en uraciles, comme illustré sur la figure 20. Les cytosines non méthylées sont converties en uraciles puis en thymidine à la suite de la PCR. Les cytosines méthylées ne sont pas modifiées.

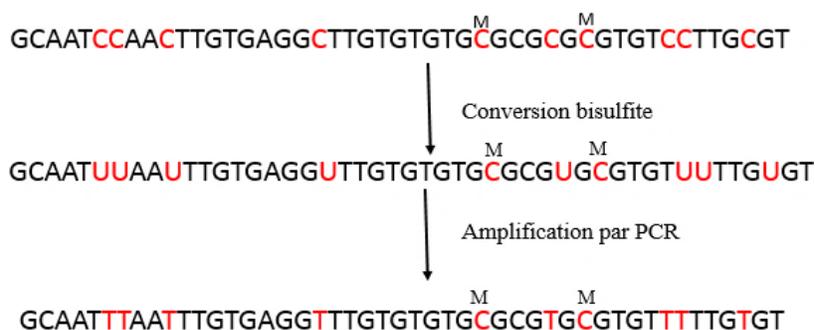


Figure 20 : Principe de la conversion au bisulfite de sodium. M : Groupe méthyle.
Modifié de https://en.wikipedia.org/wiki/Combined_bisulfite_restriction_analysis. Vue le 05-11-2017

Après ce traitement, on obtient une séquence d'ADN modifiée dans laquelle seules les cytosines méthylées persistent alors que les cytosines non méthylées sont converties en uraciles. Cette technique permet de transformer une information épigénétique difficile à analyser en une information de type polymorphisme de base (C ou T) qui peut facilement être étudié par de nombreuses techniques, dont le pyroséquençage. Le traitement au bisulfite de sodium a été réalisé à l'aide du kit « *EpiTect Bisulfite Kit* » (Qiagen), selon les recommandations du fournisseur. 500 ng d'ADN sont ajoutés à une solution de bisulfite et à un tampon « *DNA protect buffer* », qui prévient la fragmentation de l'ADN généralement associé à ce traitement et accroît la dénaturation de l'ADN indispensable à la conversion des cytosines en uraciles.

Cette conversion comprend les différentes étapes décrites dans le tableau II et est réalisée à l'aide d'un thermocycleur. Ensuite les molécules d'ADN convertis ont été placées sur une colonne pour les désulfoner et pour les laver. Elles ont été quantifiées au *Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)*.

Tableau II : Les étapes de la conversion bisulfite dans le thermocycleur. Modifié du manuel de la conversion au traitement bisulfite (*EpiTect Bisulfite*, 2014).

Les étapes	Durées en minutes	Température en °C
Dénaturation	5	95
Incubation	25	60
Dénaturation	5	95
Incubation	85	60
Dénaturation	5	95
Incubation	175	60
Repos	Indéfinie*	20

*L'ADN converti peut être laissé dans le thermocycleur pendant une nuit sans que la performance ne soit perdue.

III.4. 3. L'amplification par PCR

L'ADN converti, issu des cartilages arthrosiques dégradés et non dégradés, a été amplifié par PCR avec le kit *TaKaRa EpiTaq™ HS* selon les instructions l'accompagnant. Nous avons déterminé les régions d'intérêt des deux gènes en étudiant les informations

présentes dans la littérature et en déterminant la localisation des îlots CpG. La région d'intérêt du promoteur du gène 15-LOX-1 se situe entre -478 et +88 selon les études *in silico*. La région d'intérêt du gène 15-LOX-2 se situe entre -250 et +1 par rapport au site d'initiation de la traduction. Les amorces ont été conçues avec le logiciel *PyroMark Assay design 2.0* (Tableau III). La capacité d'amplification de l'ADN, de chaque couple d'amorces, a été testée avec de l'ADN humain contrôle 0 % méthylé, 50 % méthylé et 100 % méthylé, de l'ADN génomique non converti et de l'ADN converti provenant des cartilages arthrosiques dégradés et intacts. L'amorce antisens possède la particularité d'être couplée à une molécule de biotine, permettant sa purification lors du pyroséquençage. La composition du mélange réactionnel de PCR et des conditions de PCR sont décrites dans les tableaux IV et V. L'activation de la Taq polymérase est faite à 94°C pendant 5 min, ensuite 40 cycles de trois phases (dénaturation, hybridation et élongation) ont permis l'amplification des régions d'intérêt des promoteurs des 15-LOXs. Les modifications nécessaires ont été faites pour optimiser l'amplification. Des migrations sur gel d'Agarose 2 % des produits PCR ont permis d'évaluer leur abondance et leur spécificité.

Tableau III : Les amorces de PCR des gènes 15-LOX-1 et 15-LOX-2

Gènes cibles	Amorces	Début	TM en °C	Taille du produit en Pb	Séquences
15-LOX-1	15-LOX-1-F1	-236	58	244	GATAGTGGTTTTTATTTTTTGTTTT
	15-LOX-1-R1	+7	56	244	AACCCATCTTACTCAAAAATATTTC
	15-LOX-1-F3	-478	56	308	TTTTTTTGTAATTTAATTGTGAGGTTT
	15-LOX-1-R3	-171	59	308	AAACAAAATTCAACCCCAATCC
	15-LOX-1-F4	-127	58	217	GGAGTTGATTGGAGATTTGTTATTTATA
	15-LOX-1-R4	+89	59	217	TACTAACCCACCAACCACAACACTACAC
15- LOX-2	15- LOX-2-F1	-282	57	280	GGTTTGGTATTATTATTGAAAGGTTT
	15- LOX-2-R1	-1	59	280	TACCAACCTAAATCCAACCTCTCTAC

Tableau IV : La composition du mélange réactionnel de PCR

Les produits	Volume pour un échantillon.	Concentration final
La polymérase, <i>Takara epitaq hs (5U/ul)</i>	0.25 ul	1.25/50 ul
Tampon 10 X <i>epitaq pcr Buffer (sans MG²⁺)</i>	5ul	1x
MgCl ₂ (25mM)	5ul	2.5mM
Mélange de dNTP (2,5 nM de chaque)	6 <ul	0.3mM
Solution d'ADN	Variable*	2 ng/ul
Primer 1	1ul	0,4uM
Primer 2	1ul	0,4uM
Eau distillée stérilise	À compléter jusqu'à 50 ul (22,75)	

*La quantité d'ADN utilisée dépend de la concentration de la solution d'ADN converti.

Tableau V : conditions et étapes de la PCR

Nombre des cycles	1	40			1	1
Les étapes	Activation de la Taq	Dénaturation	Hybridation	Élongation	Élongation	Stockage
Température	94	94	55 à 60*	72	72	4
Durée	5 min	30 s	20 s	20 s	10 min	5 min

* la température d'hybridation varie selon le couple d'amorces de PCR.

III. 4. 4. Le pyroséquençage

L'ADN amplifié a été séquencé par pyroséquençage avec *Pyromark Q24* en accord avec leur guide d'utilisation. Le pyroséquençage permet de quantifier les taux de méthylation des sites CpG. Il est basé sur le principe du « séquençage par synthèse » qui implique l'utilisation d'une seule matrice d'ADN (le brin biotinylé). Pour purifier ce brin biotinylé, les produits PCR, déposés dans une plaque de 24 puits, sont mis au contact d'une solution contenant des billes de Streptavidine, fixant les molécules de biotine. Cette fixation se fait par une agitation de 5 min à 1300 rpm. Les produits de PCR sont ensuite retenus par des filtres couplés à un système d'aspiration sous vide afin de retenir seulement les produits de PCR ayant fixé la Streptavidine. Ils sont ensuite plongés successivement dans des bacs contenant de l'éthanol à 70 %, une solution de dénaturation puis une solution

de lavage. Ces étapes permettent de dénaturer des amplicons afin de ne garder que les simples brins couplés à la biotine/streptavidine. La fixation de la streptavidine aux amplicons (1) et la purification du brin biotinylé (2) sont présentées sur la figure 21.

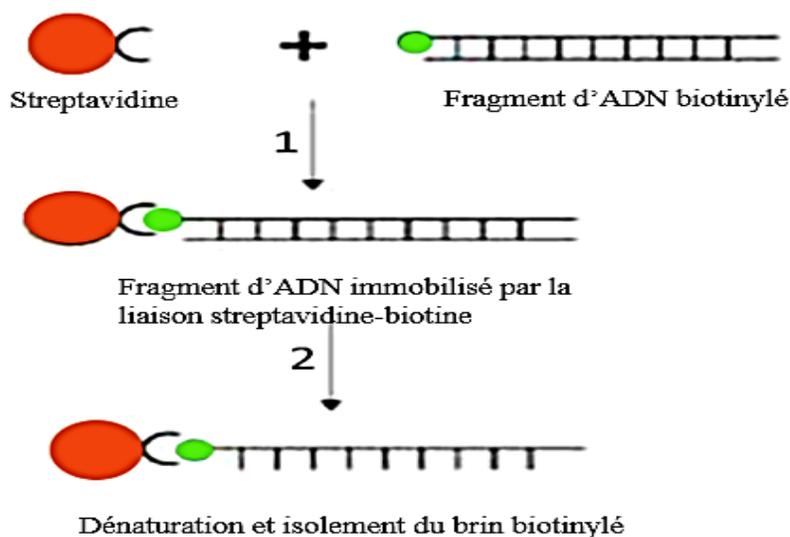


Figure 21 : Schéma de la Purification du brin biotinylé avant le séquençage. Modifié du guide du Pyroséquençage.

Les brins d'ADN biotinylés ont été déposés, après arrêt de l'aspiration sous vide, dans une plaque de 24 puits contenant les amorces de séquençage. Auparavant, le plan du *run* ou la répartition des amorces de séquençage et des échantillons d'ADN dans les plaques ont été réalisés en utilisant le logiciel PyroMark Q24 2.0.7. Ces amorces ont été conçues grâce au logiciel *PyroMark Assay 2.0* et ont été testées (Tableau VI). Ils se sont hybridés avec les brins d'ADN par une incubation à 80 °C pendant 2 min. la cartouche a été remplie avec les volumes adéquates en nucléotides, en enzymes et substrats. Le plan du *run* contient aussi les séquences de références et permet de déterminer les quantités des nucléotides, des substrats et d'enzymes à mettre dans la cartouche. La plaque et la cartouche chargée ont été ensuite, déposées dans l'appareil *PyroMark Q24*. Une Clé USB contenant le plan du *run* a été introduit dans l'appareil et le séquençage a commencé après avoir choisi ce plan du *run*. L'appareil a injecté dans un premier temps le mélange d'enzymes : ADN polymérase, ATP sulfurylase, Luciférase et Apyrase ; puis leur substrat, l'Adénosine 5'phosphosulfate et la Luciférine. Les nucléotides ont ensuite être ajoutés les uns après les autres, d'après la séquence de référence. Si le nucléotide injecté est complémentaire de la séquence à analyser, l'ADN polymérase l'incorpore dans le brin en

cours de synthèse (Figure 22). Cette incorporation libère un pyrophosphate ou PPi, utilisé par l'ATP sulfurylase pour produire de l'ATP. Ensuite, l'ATP est utilisée par la luciférase pour entraîner la production d'oxyluciférase et l'émission d'un signal lumineux. Le signal lumineux est alors enregistré par un capteur, puis retranscrit sous forme de pic, l'ensemble des pics constituant un pyrogramme. L'apyrase a pour fonction de dégrader les nucléotides en excès ou non incorporés si le nucléotide attendu ne correspond pas à celui injecté. La hauteur d'un pic est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés pour chaque base injectée. L'ensemble de ces étapes sont schématisées dans la figure 22.

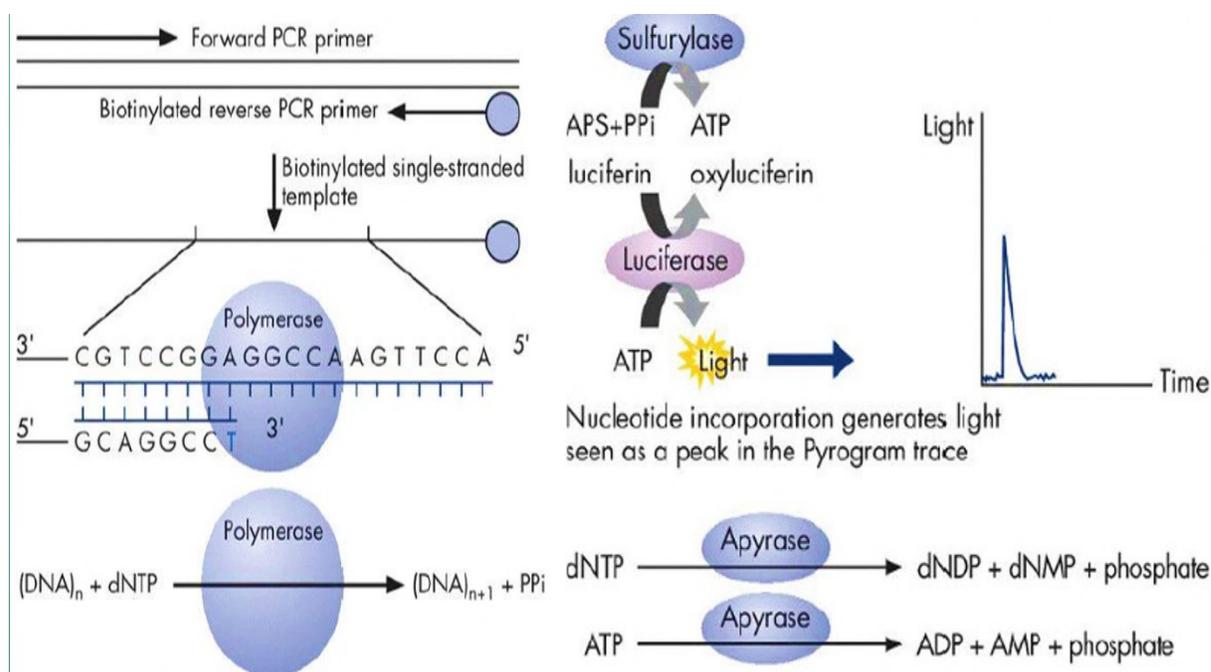


Figure 22 : Schéma de l'incorporation d'un nucléotide complémentaire à celui du brin biotinyllé par la polymérase et sa révélation par la formation d'un pic après la transformation du pyrophosphate ou PPi en ATP. Tiré du guide du pyroséquenceage (*PyroMark® Q24 Advanced User Manual*).

L'appareil de pyroséquenceage fournit le taux de méthylation en comparant la hauteur des pics de C et de T au niveau de chaque site CpG. La présence d'un seul pic de C, indique que le site est méthylé dans tous les brins d'ADN. La présence d'un seul pic T indique que le site est non méthylé dans tous les brins (les cytosines non méthylées ont été converties lors du traitement bisulfite). Un site CpG est hypométhylé, lorsque le taux de méthylation est inférieur à 33 %, il est hyperméthylé si le taux de méthylation est supérieur ou égal à 80 % et hémiméthylé si le taux de méthylation est proche de 50 %.

Tableau VI : Les amorces de séquençage des gènes 15 -LOX-1 et 15-LOX-2

Gènes cibles	Amorces	Début	TM en °C	Taille du produit en Pb	Séquences
15-LOX-1	15-LOX-1-S1A	-185	48	100	GGTTGAATTTTGTGTTTTGAAGTTT
15-LOX-1	15-LOX-1-S1B	-135	39	50	GGTAGGAGGAGTTGA
15-LOX-1	15-LOX-1-S3A	-468	45	100	ATTTAATTTGTGAGGTTTGT
15-LOX-1	15-LOX-1-S3B	-328	41	110	ATTTTATTTAGTTTGTGTTTGT
15-LOX-1	15-LOX-1-S4	-23	46	87	AGGAGAGAAATATTTTGTAGTAAG A
15-LOX-2	15-LOX-2-S1A	-252	42	100	TTTTTAAATTTAGGGTATTTTAG
15-LOX-2	15-LOX-2-S1B	-97	46	77	AGTGGTAATAATTAGGGGTA

III.5. L'analyse statistique

Les résultats de RT-PCR sont exprimés en moyenne et écart-type et les différences significatives ont été déterminées par le test t bilatéral de *Student*. Les différences significatives des résultats du comptage des pourcentages des cellules marqués après l'immunohistochimie ont été aussi évaluées par le même test. L'importance des différences de méthylation des sites CpG entre cartilage arthrosique dégradé et non dégradé a été évaluée par des tests comme le test t bilatéral de *Student* ou par le test t multiple. Les différences sont significatives lorsque la valeur de p est inférieure à 0,05. Ce qui a permis de faire apparaître les différences significatives des données observées entre les différents types de cartilages par exemple. Ces tests ont été réalisés à l'aide du logiciel *GraphPad Prism 7.03* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Chapitre III : Résultats

I. L'évaluation de l'expression des gènes 15-LOX-1 et 15-LOX-2 dans les cartilages arthrosiques et non arthrosiques

I.1 La réduction importante de la quantité d'ARNm dans les cartilages arthrosiques par rapport aux cartilages non arthrosiques.

Pour évaluer l'expression des gènes 15-LOXs, au niveau de l'ARNm, dans les cartilages arthrosiques et non arthrosique, une RT-PCR en temps réel a été réalisée. L'expression relative de ces gènes dans le cartilage arthrosique, en pourcentages, a été calculée par rapport à celui normal. L'expression de GAPDH a été utilisée pour la normalisation. Les résultats ont montré une diminution significative des quantités d'ARNm de deux gènes 15-LOXs dans le cartilage arthrosique par rapport à celui normal (réduction moyenne d'environ 42 % pour 15-LOX-1 et de 38% pour 15-LOX-2) (Figure 23). Le test statistique de Mann-Whitney montre que cette réduction est significative ($p=0.0286$). Cette réduction pourrait s'expliquer par une diminution de la transcription des gènes 15-LOX-1 et -2.

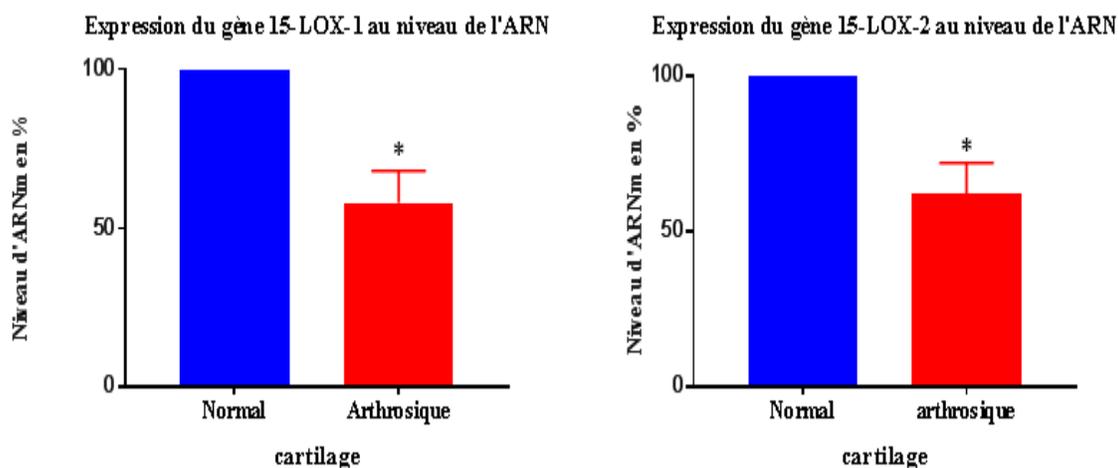


Figure 23: Niveaux d'expression des gènes 15-LOXs dans les cartilages arthrosiques (N=4) et non arthrosiques (N=4). Les niveaux d'expression ont été quantifiés par qPCR après extraction d'ARN des cartilages par une méthode combinant Trizol et RNasy mini kit. Les différences significatives ont été étudiées par le test non paramétrique de Mann-Withney. Les valeurs de p sont inférieures à 0,05 ($p=0.0286$).

Cette diminution du niveau d'ARNm des 15-LOXs s'accompagne-t-elle d'une diminution de la synthèse des enzymes 15-LOXs?

I. 2 La diminution de l'expression des protéines 15-LOXs dans les cartilages arthrosiques

Pour quantifier l'expression, au niveau protéique, des 15-LOXs, la technique d'immunohistochimie a été réalisée. Les pourcentages des cellules marquées ont été calculés à partir d'observation microscopique. Les résultats ont montré une diminution significative du marquage, pour les deux enzymes, dans le cartilage arthrosique par rapport au cartilage non arthrosique (Figure 24). Le test statistique de Mann-Whitney indique une différence significative ($p=0.02$). Les pourcentages des cellules marquées sont plus faibles dans le cartilage arthrosique pour les enzymes 15- LOX-1 et 15-LOX-2 (réduction de 30 pour 15-LOX-1 et 28 % pour 15-LOX-2). Les marquages sont spécifiques car ils ne sont pas observés dans les contrôles négatifs (incubés avec IgG non immune).

Ces résultats montrent que la synthèse des enzymes 15-LOX-1 et -2 est diminué dans les cartilages arthrosiques (Figure 24). Cette diminution de l'expression des gènes 15-LOXs pourrait s'expliquer par une hyperméthylation de leur promoteur proximal.

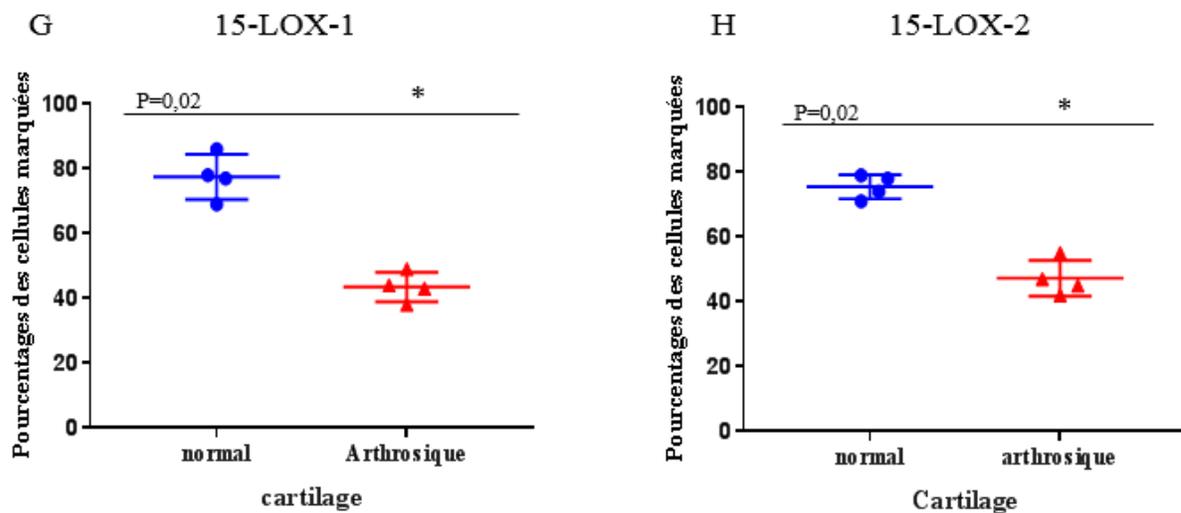
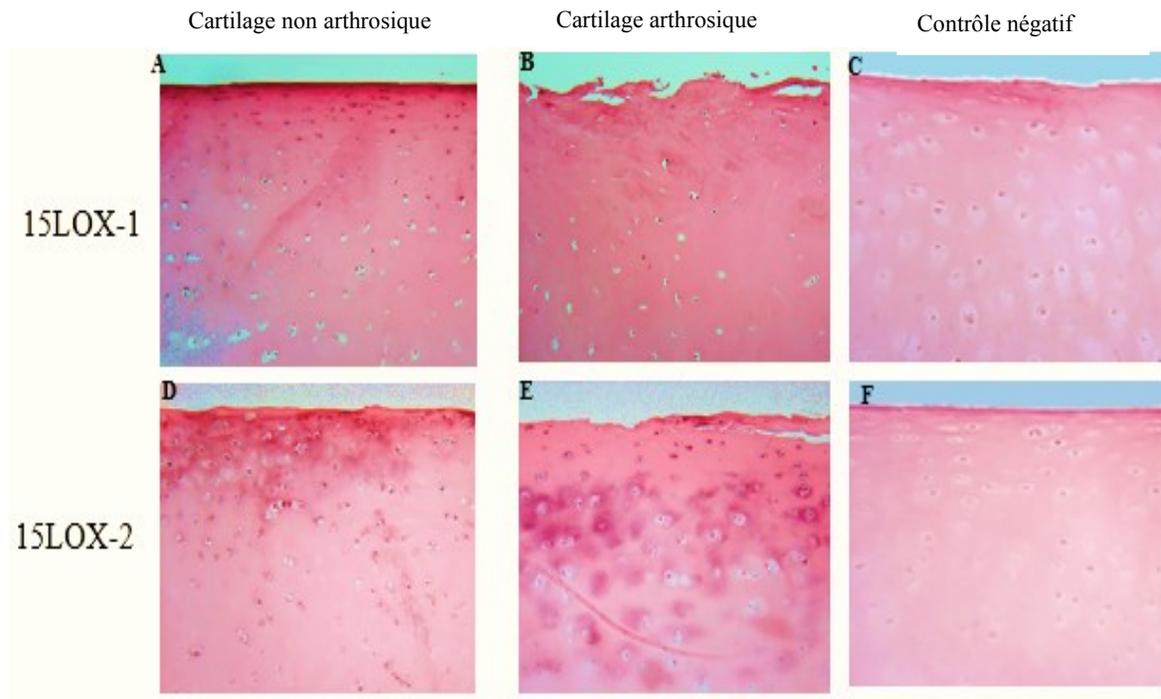


Figure 24: Images montrant l'expression au niveau protéique des gènes 15- LOXs dans les cartilages arthrosiques (B, E) et non arthrosiques (A, D). Les images sont vues avec le grossissement 400X. L'anticorps anti-15-LOX-1 a été utilisé pour les lames A et B. L'anticorps anti-15-LOX-2 a été utilisé pour les lames D et E. les images E et F sont les contrôles négatifs. Les diagrammes G et H représentent les moyennes des pourcentages des cellules marquées dans les cartilages arthrosiques (N=4) et non arthrosiques (N=4). Le comptage se fait au microscope sur des régions contenant presque le même nombre de cellules, situées d'abord, dans la zone superficielle et puis dans la zone profonde. Dans les deux zones, j'ai constaté une différence significative de marquage entre cartilage arthrosique et non arthrosique.

II. L'effet du 5-aza-2'-deoxycytidine (5 AZA DC) sur l'expression des gènes 15-LOX-1 et 15-LOX-2 dans les chondrocytes

Pour analyser l'effet de la déméthylation sur l'expression des gènes 15-LOXs, des chondrocytes et des cellules C28 (chondrocytes immatures) ont été traités avec la 5-AZA-DC. L'expression, au niveau de l'ARN, de ces gènes a été quantifiée par la RT-PCR en temps réel. La méthode de la quantification relative des ARNm des 15-LOXs, utilisant le $\Delta\Delta C_t$, a été choisie. Le niveau relatif des ARNm dans les cellules traitées par rapport aux cellules non traitées a été calculé. Les résultats ont montré une augmentation significative des taux d'ARNm des gènes 15-LOXs sous l'effet de l'AZA-DC dans les cellules C28 et dans les chondrocytes (Figure 25). Dans les chondrocytes, le traitement à l'AZA-DC a induit une augmentation significative de l'expression des gènes 15-LOX-1 et 15-LOX-2, 5 fois plus et 40 fois plus respectivement. Dans les cellules C28, le niveau d'ARNm des 15-LOXs augmente 3 à 4 fois plus après 24 heures de traitement. Cette augmentation est significative selon le test bilatéral de Student.

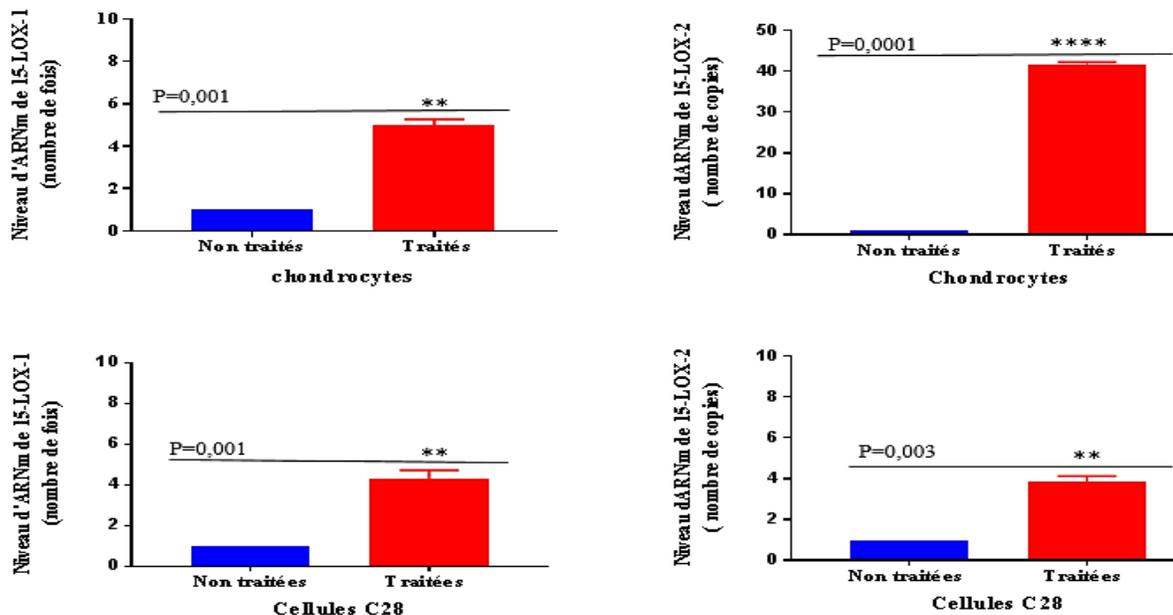


Figure 25: Les niveaux d'expression des gènes 15-LOXs des chondrocytes et cellules C28, traités ou non avec l'agent déméthylant (5-AZA-DC). Les chondrocytes ont été traités avec $1 \mu\text{M}$ de 5-AZA-DC pendant 5 semaines, alors que les cellules C28 ont été traitées avec la même quantité de 5-AZA-DC pendant 24 heures. La valeur de P est inférieure à 0.05.

III. L'étude *in silico* des promoteurs des gènes 15-LOXs

Afin de quantifier les taux de méthylations des sites CpG, une étude *in silico* a permis localiser les ilots CpG, les sites de fixations des facteurs de transcription et les amorces de PCR et de séquençage.

III.1 L'étude *in silico* du promoteur de 15-LOX-1

L'étude *in silico* a montré que le gène 15- LOX-1 est formé 11 Kbp de nucléotides et comprend 14 exons et 13 introns. Grâce au programme de détection des ilots CpG, *MethPrimer*, nous avons trouvé que le promoteur comporte 3 ilots CpG. Ces trois ilots CpG se trouvent dans la région comprise entre -478 et +88 par rapport au site de démarrage de la traduction (Figure 26). Les sites de fixation des facteurs de transcriptions potentiels dans cette région ont été déterminés grâce aux logiciels de prédiction *TFBING*, *AliBaba2.1*, *Biosciences* (Figure 26). Les facteurs de transcription SP1, qui jouent un rôle déterminant dans la régulation de la transcription de ce gène, et les facteurs GATA-6, CEBP, AP2, TATA se fixent sur cette région du promoteur proximal (figure 26 et 27). Trois couples amorces de PCR et cinq amorces de séquençages ont été conçus grâce au logiciel *PyroMark Assay design 2.0* et sont représentés dans la figure 26 et dans les tableaux III et VI.

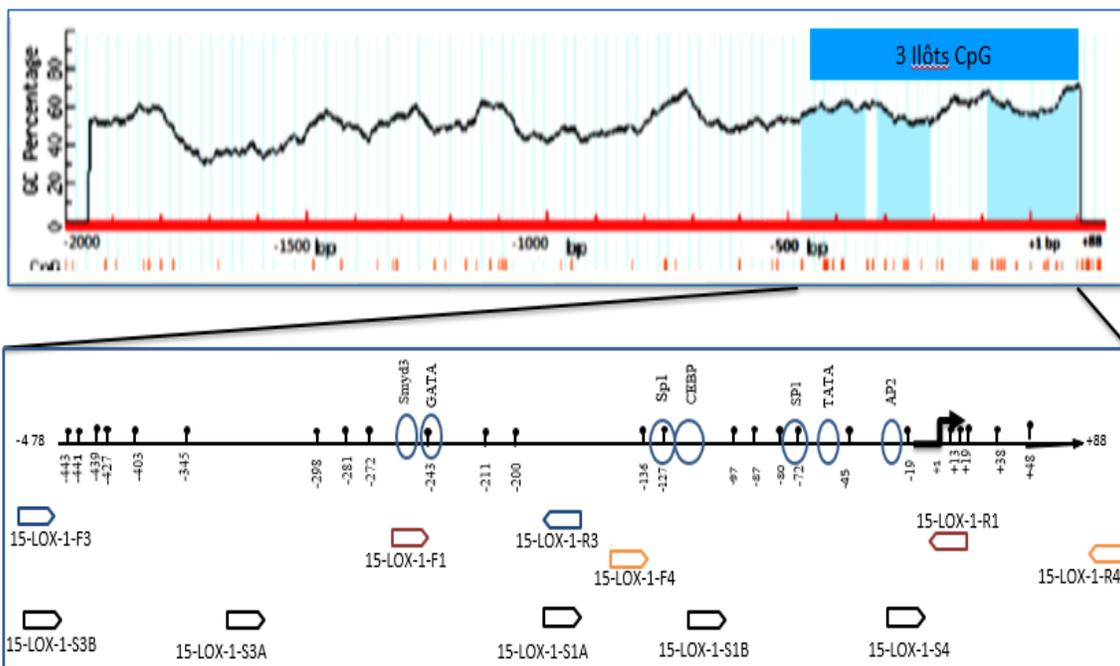


Figure 26: Localisation des îlots CpG et représentation schématique des sites de fixation des facteurs de transcription, des sites CpG et des amorces de PCR et de séquençage dans le promoteur proximal du gène 15- LOX-1. Cette région comporte trois îlots CpG et compte 28 sites CpG. Ces données ont été obtenues grâce aux logiciels MethPrimer et PyroMark Assay design 2.0, aux logiciels de prédictions par TFBIND, AliBaba 2.1.

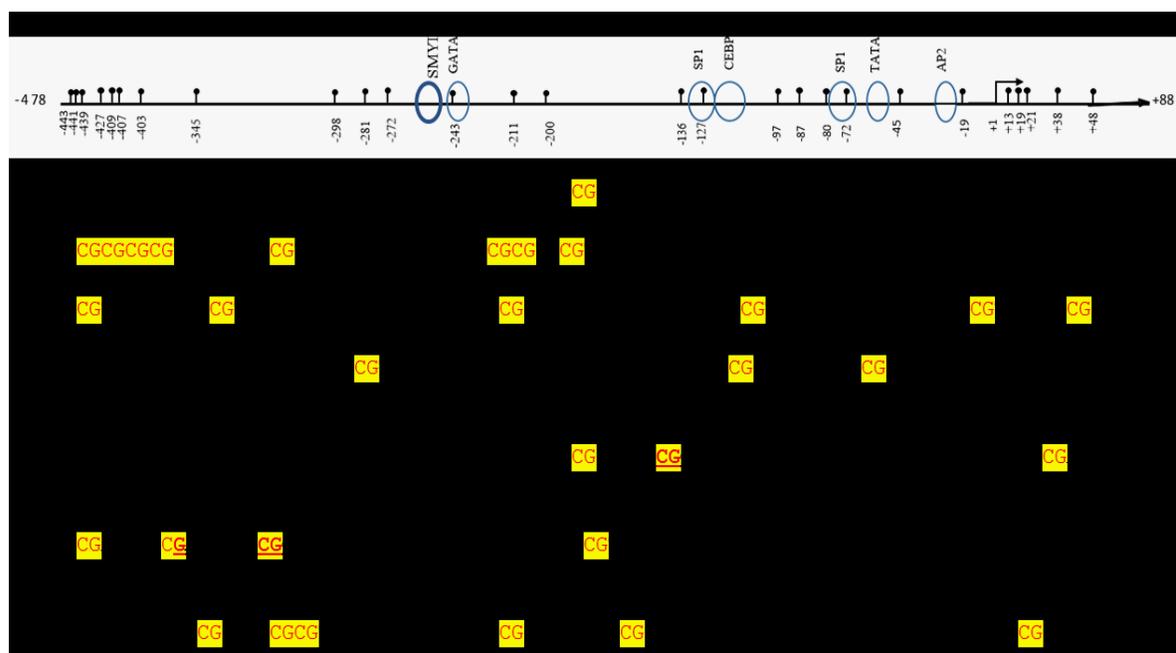


Figure 27: La séquence de la région d'intérêt du promoteur du gène 15-LOX-1 et le schéma de la localisation des sites CpG et des sites de fixation des facteurs de transcription.

III.2 L'étude *in silico* de promoteur de 15-LOX-2

Le gène 15- LOX-2 est situé dans un groupe de gènes apparentés et un pseudogène sur le bras court du chromosome 17. L'étude *in silico* a montré que ce gène comporte 14 exons et 13 introns et que les 2000 premiers nucléotides de son promoteur comportent un seul îlot CpG (Figure 28). Cet îlot de 12 sites CpG se trouve entre -1 et -250 Pb par rapport au site d'initiation de la traduction. Cette région joue un rôle clé dans la régulation de la transcription de ce gène. Grâce aux logiciels de prédiction de facteur de transcription, nous avons déterminé, les facteurs de transcription du gène 15-LOX-2 se fixant sur cette région (Figure 28 et 29). Les facteurs de transcription SP1 et SP3 se fixent sur cette région et jouent un rôle important dans la régulation du gène 15-LOX-2. Les facteurs de transcription SP1 sont des stimulateurs alors que les SP3 sont des inhibiteurs (104). Le promoteur proximal est riche en boîtes GC, site de fixation de SP1 et SP3. Ce promoteur ne possède pas la boîte TATA (TATAAA) ou TATA-like (TATTT), suggérant que l'initiation de la transcription de ce gène utilise des éléments initiateurs comme une séquence Inr et DPE (*downstream promoter element*) présente dans le promoteur et en aval de celui-ci (104). Nous avons déterminé un couple d'amorces de PCR qui amplifie l'ADN converti par le traitement bisulfite de la région grâce au logiciel *PyroMark Assay design 2.0* et deux amorces de séquençage (Figure 28, Tableaux III et IV).

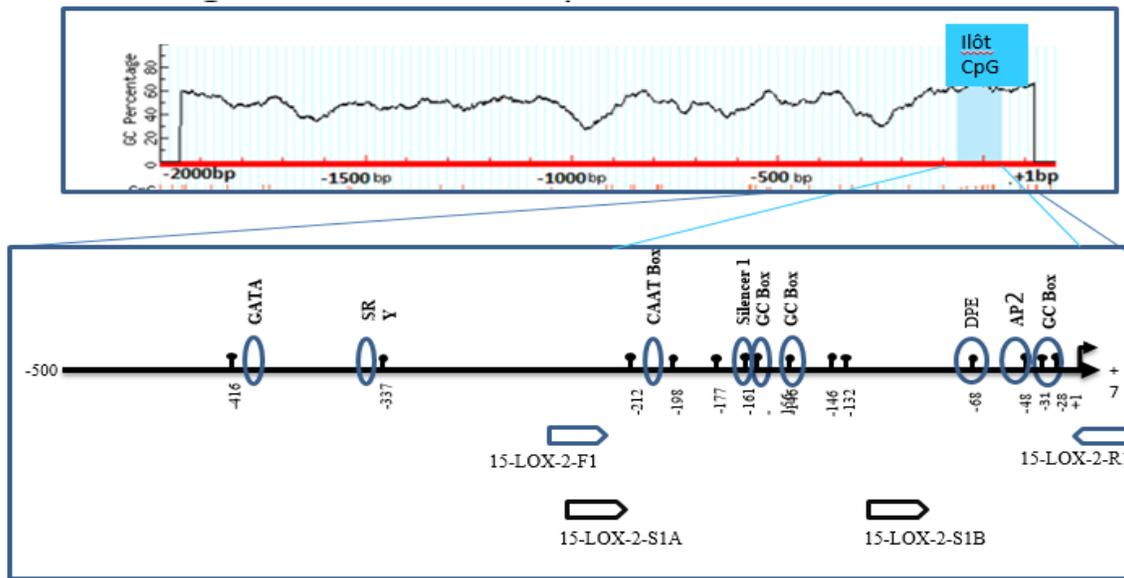


Figure 28: Localisation des îlots CpG et représentation schématique des sites de fixation des facteurs de transcription, des sites CpG et des amorces de PCR et de séquençage dans le promoteur proximal du gène 15-LOX-2. Cette région comporte un seul îlot CpG et compte 12 sites CpG. Ces données ont été obtenues grâce aux logiciels *MethPrimer* et *PyroMark Assay design 2.0*, aux logiciels de prédictions par *TFBIND*, *AliBaba 2.1*.

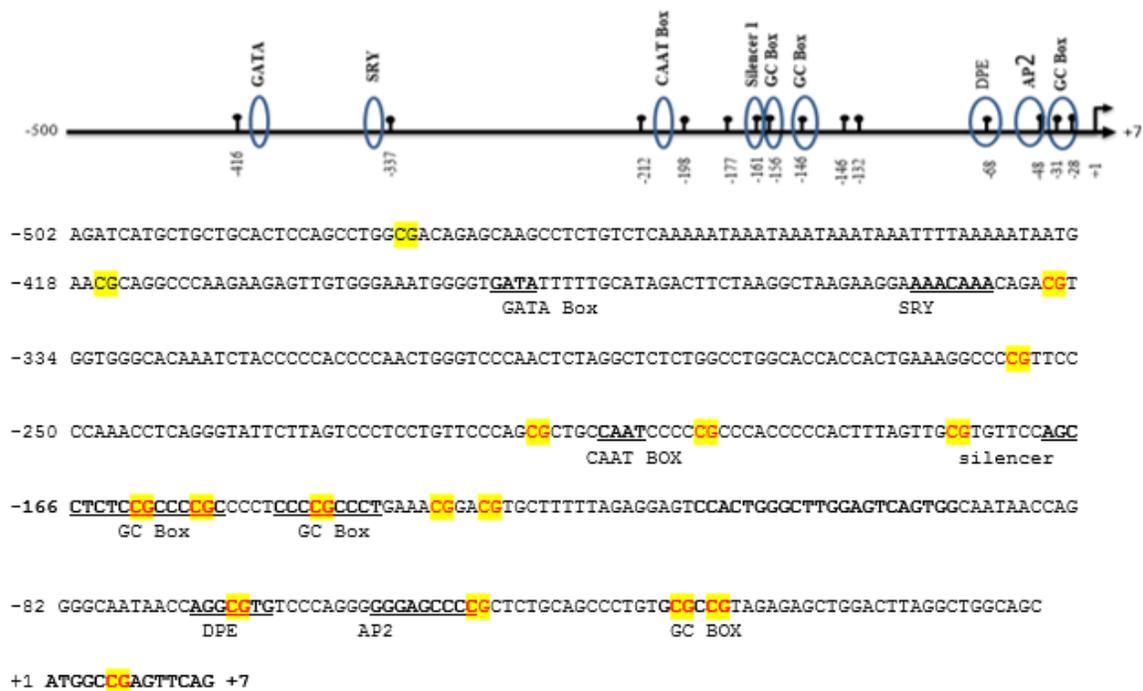


Figure 29: La séquence de la région d'intérêt du promoteur du gène 15-LOX-2 et le schéma de la localisation des sites CpG et des sites de fixation des facteurs de transcription.

IV. La quantification des taux de méthylation des sites CpG du promoteur proximal des gènes 15-LOXs du cartilage arthrosique dégradé ou non dégradé

IV. 1. La quantification des taux de méthylation du promoteur proximal du gène 15-LOX-1

La quantification du taux de méthylation des sites CpG de la région d'intérêt du gène nécessite d'abord son amplification par PCR. Cette région d'intérêt du promoteur du gène 15-LOX-1 est comprise entre -478 et +88 Pb par rapport au site d'initiation de la traduction.

IV.1.1 L'amplification par PCR du promoteur proximal du gène 15-LOX-1

Nous avons amplifié par PCR la région d'intérêt grâce à trois couples d'amorces (voir tableau3). Ensuite, nous avons vérifié l'importance de l'amplification et de la spécificité des produits PCR par migration électrophorétique. Les amplifications ont été importantes et spécifiques (Figures 30 à 32).

Nous avons d'abord amplifié la région comprise entre -127 et +88, par rapport au site d'initiation de la traduction, par le couple d'amorces 15- LOX-1-F4 et - R4.

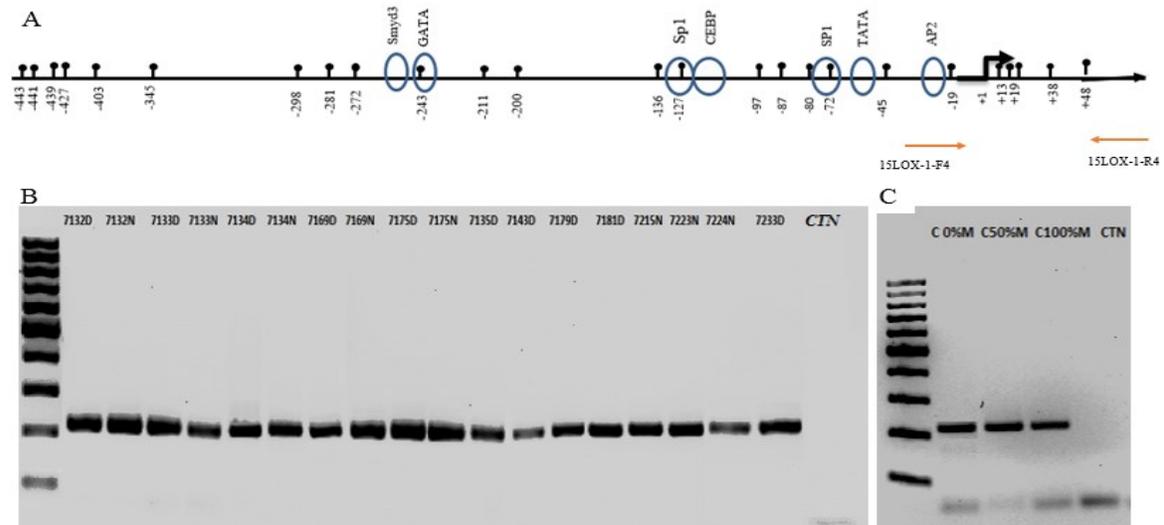


Figure 30: Image du gel obtenue après migration électrophorétique de 4 μ l d'ADN de chaque produit PCR dans un gel d'agarose de 2 % (B). La taille du produit PCR est de 217 bp. Les fragments ont été amplifiés grâce au couple d'amorces 15- LOX-1-F4 et -R4 avec le kit Takara. Les numéros 7132N à 7233D correspondent aux échantillons arthrosiques dégradés (D) et non dégradés (N). CTN correspond au contrôle négatif (en absence d'ADN). Les échantillons contrôles (C) : C0%M : ADN contrôle 0 % méthylé. C100%M : ADN contrôle 100 % méthylé.

Un gel d'agarose de 2 % a permis de voir une bonne amplification spécifique (Figure 30). Pour éviter les biais PCR, nous avons amplifié de l'ADN contrôle 0 % méthylé, 50 % et 100 % méthylé.

Nous avons ensuite amplifié la région comprise entre -237 et +7 grâce au couple d'amorces 15-LOX-1-F1 et -R1. Les amplifications ont été importantes et spécifiques (Figure 31).

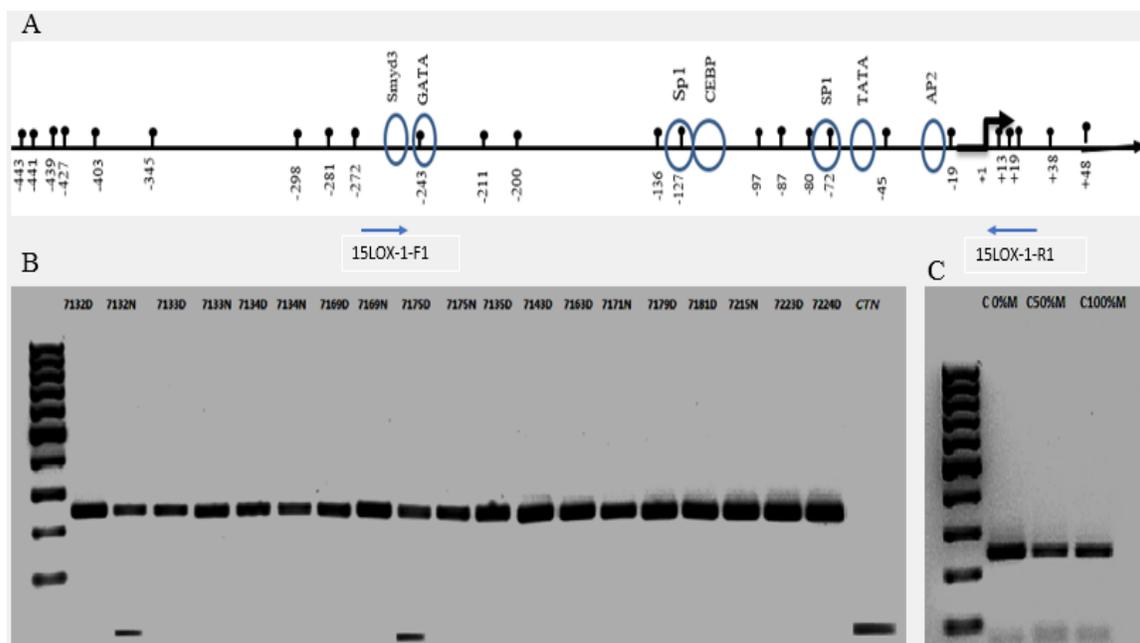


Figure 31: Image du gel des produits PCR obtenue après migration électrophorétique de 4 µl d'ADN de chaque produit PCR dans un gel d'agarose de 2 %. La taille des produits PCR est de 244 Pb. Les fragments ont été amplifiés grâce au couple d'amorces 15-LOX-1-F1 et -R1 avec le kit Takara. Les numéros 7132 à 7233 correspondent des échantillons arthrosiques dégradés (D) et non dégradés (N).

Enfin, nous avons amplifié la région comprise entre -478 et -171 Pb grâce au couple d'amorces 15-LOX-1-F3 et 15-LOX-R3. Les amplifications ont été importantes et spécifiques (Figure 32).

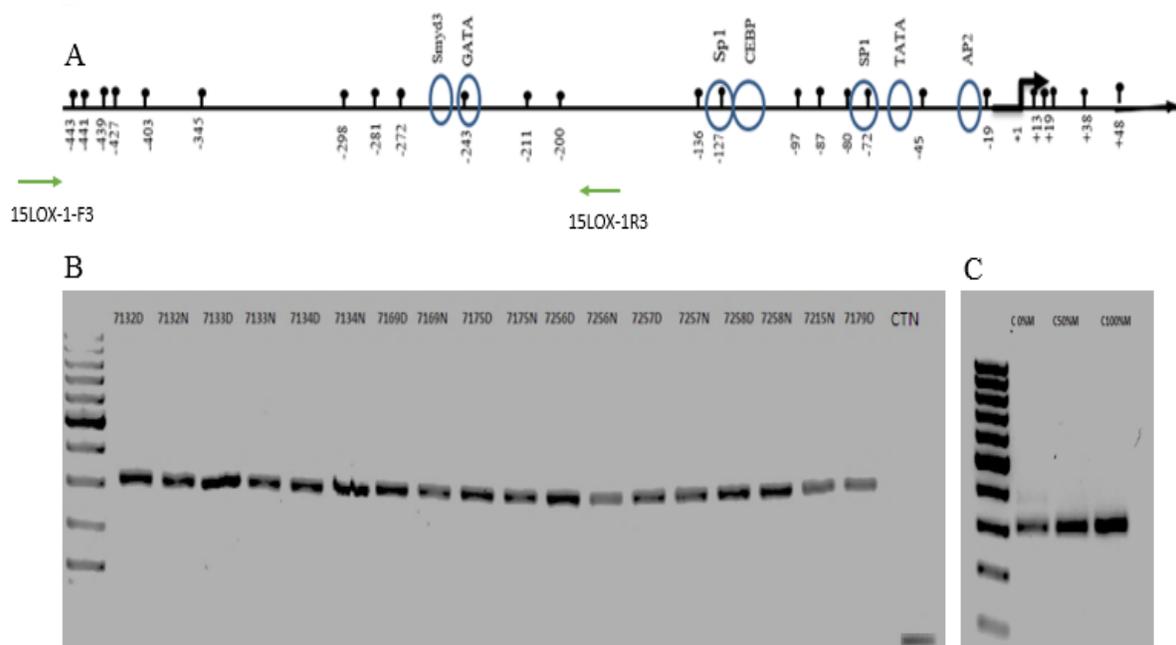


Figure 32: Image du gel des produits PCR obtenue après migration électrophorétique de 4 µl d'ADN de chaque produit PCR dans un gel d'agarose de 2 %. La taille des produits PCR est de 308 Pb. Les fragments ont été amplifiés grâce au couple d'amorces 15-LOX-1-F3 et R3 avec le kit Takara. Les numéros 7132 à 7256 correspondent aux échantillons arthrosiques dégradés (D) et non dégradés (N).

IV.1.2 L'évaluation des taux de méthylation des sites CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-1 par pyroséquençage.

Nous avons évalué les taux des méthylations des sites CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-1, dans les cartilages arthrosiques dégradés et intacts par pyroséquençage. Les pyrogrammes obtenus affichent ces taux calculés par la comparaison des hauteurs des pics de C et de T au niveau de chaque site CpG

IV. 2.1.1. Les taux de méthylation de la région comprise entre +88 et +1.

Les résultats du pyroséquençage de cette région montrent que les taux de méthylation sont relativement faibles et varient entre 5 à 40 %. Il n'y a pas de différence significative de méthylation des sites CpG entre cartilage arthrosique et non arthrosique (Figure 33, Tableau de l'Annexe 1). Cette région a été séquençée grâce à l'amorce de séquençage 15-LOX-1-S4 et comporte 5 sites CpG.

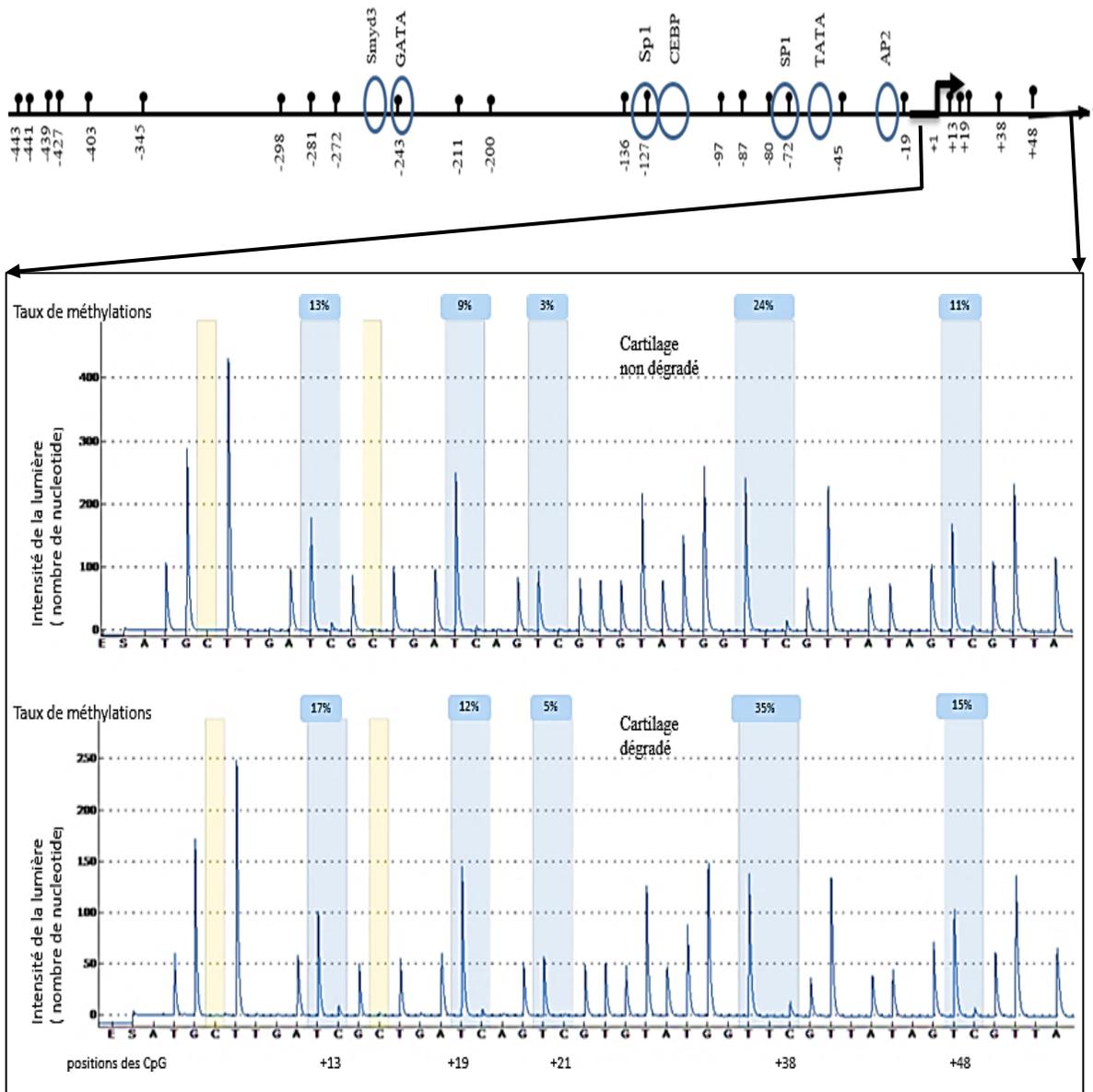


Figure 33: Pyrogrammes de la région comprise entre +88 et +1. Cette région est séquencée par l'amorce de séquençage 15-LOX-1-S4. Ces deux pyrogrammes montrent les pourcentages des méthylation des sites CpG dans les cartilages arthrosiques dégradés et non dégradés. La hauteur des pics est en fonction du nombre de nucléotides intégrés.

IV. 2.1.2. Les taux de méthylation de la région comprise entre -1 et -160.

Les taux de méthylation des sites CpG de cette région du promoteur de 15-LOX-1 sont très faibles (inférieurs à 33%). Il n'y a pas une différence significative des taux de méthylation de chaque site CpG entre cartilages arthrosiques dégradés et non dégradés.

Cette région du promoteur est séquencée en utilisant deux amorces de séquençage, 15-LOX-1-S1A et 15-LOX-1-S1B, et comporte 8 sites CpG. (Figure 34).

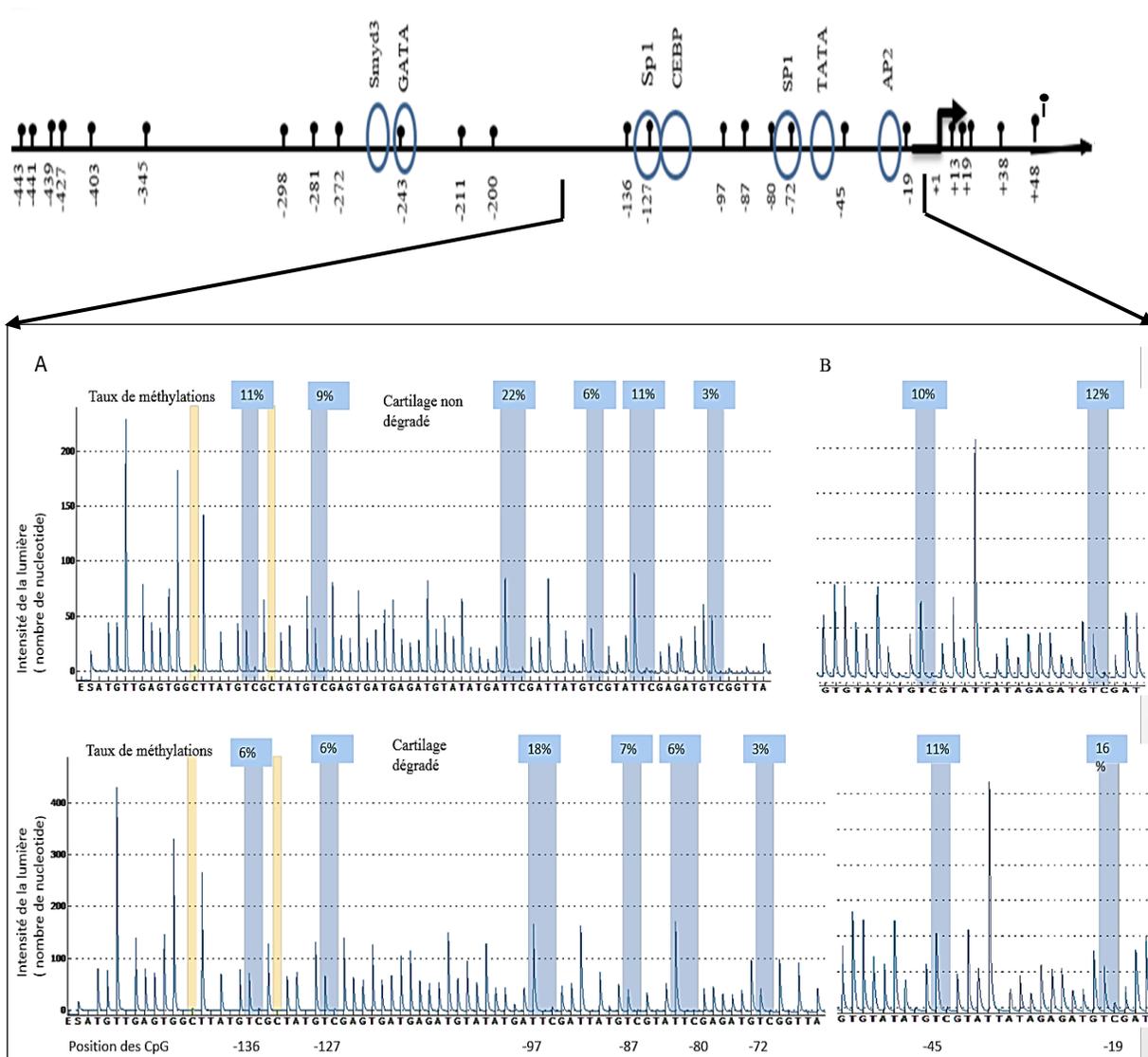


Figure 34: Pyrogrammes de la région comprise entre -1 et -160, séquencée par les amorces 15- LOX-1-S1A (A) et 15-LOX-1-S1B (B). Ce sont des pyrogrammes des échantillons d'ADN issus des cartilages arthrosiques dégradés et non dégradés.

IV. 2.1.3. Les taux de méthylation de la région comprise entre -160 et -443.

Cette région est séquencée par les amorces 15-LOX-1-S3A (A) et 15-LOX-1-S3B (B). Elle comporte 16 sites CpG. Les sites CpG compris entre -354 et -443 sont plus méthylés ou hémiméthylés, alors que ceux qui se trouvent entre -200 et -343 sont

faiblement méthylés. Il n'y a pas de différence significative les taux des méthylations des sites CpG (Figures 35 et 36). Les sites de fixations des facteurs de transcription se situent entre -1 et -343 Pb par rapport au site d'initiation de la traduction.

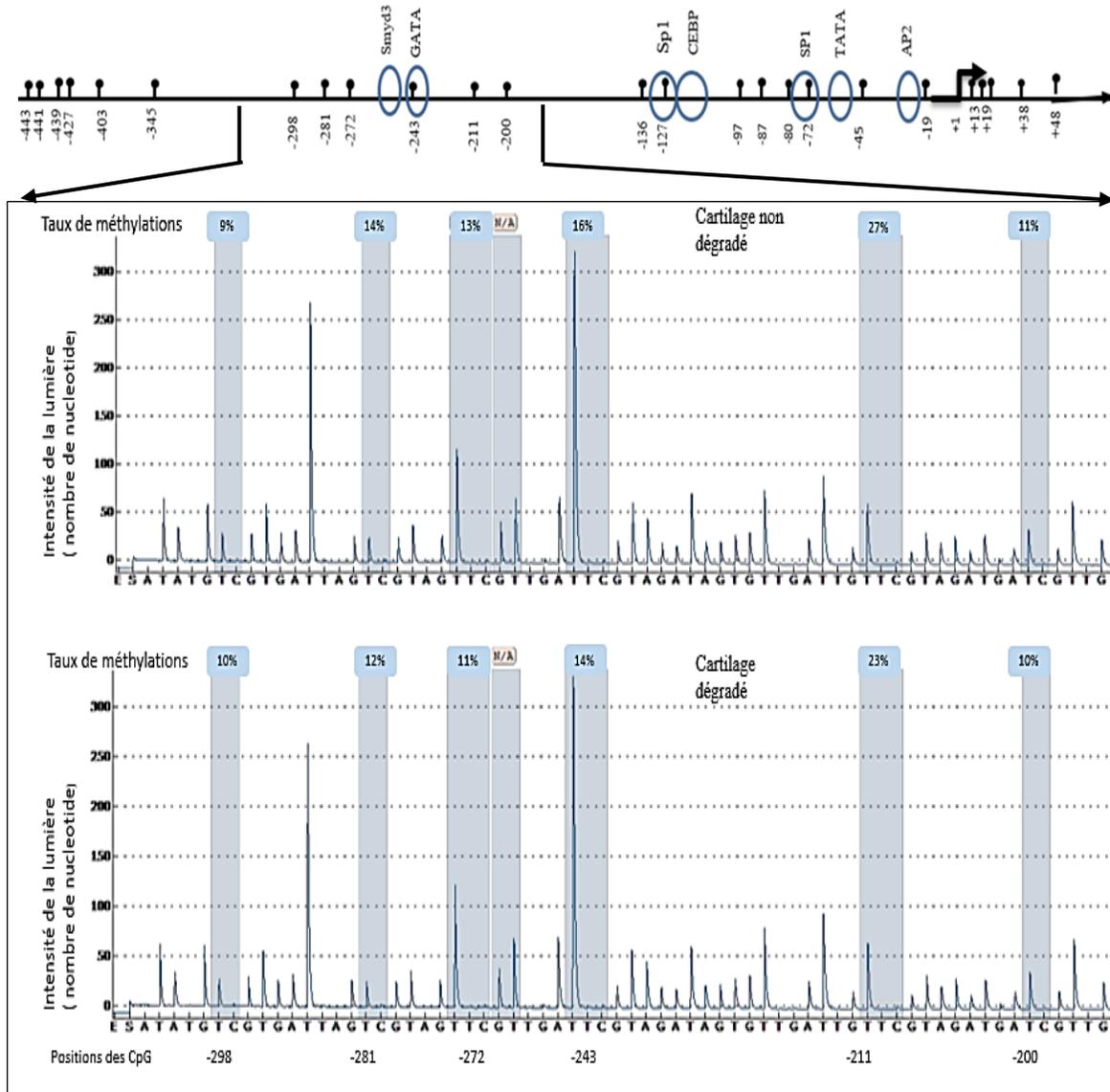


Figure 35: Pyrogramme de la région du promoteur de 15-LOX-1 comprise entre -160 et -443, séquencée par les amorces 15-LOX-1-S3B

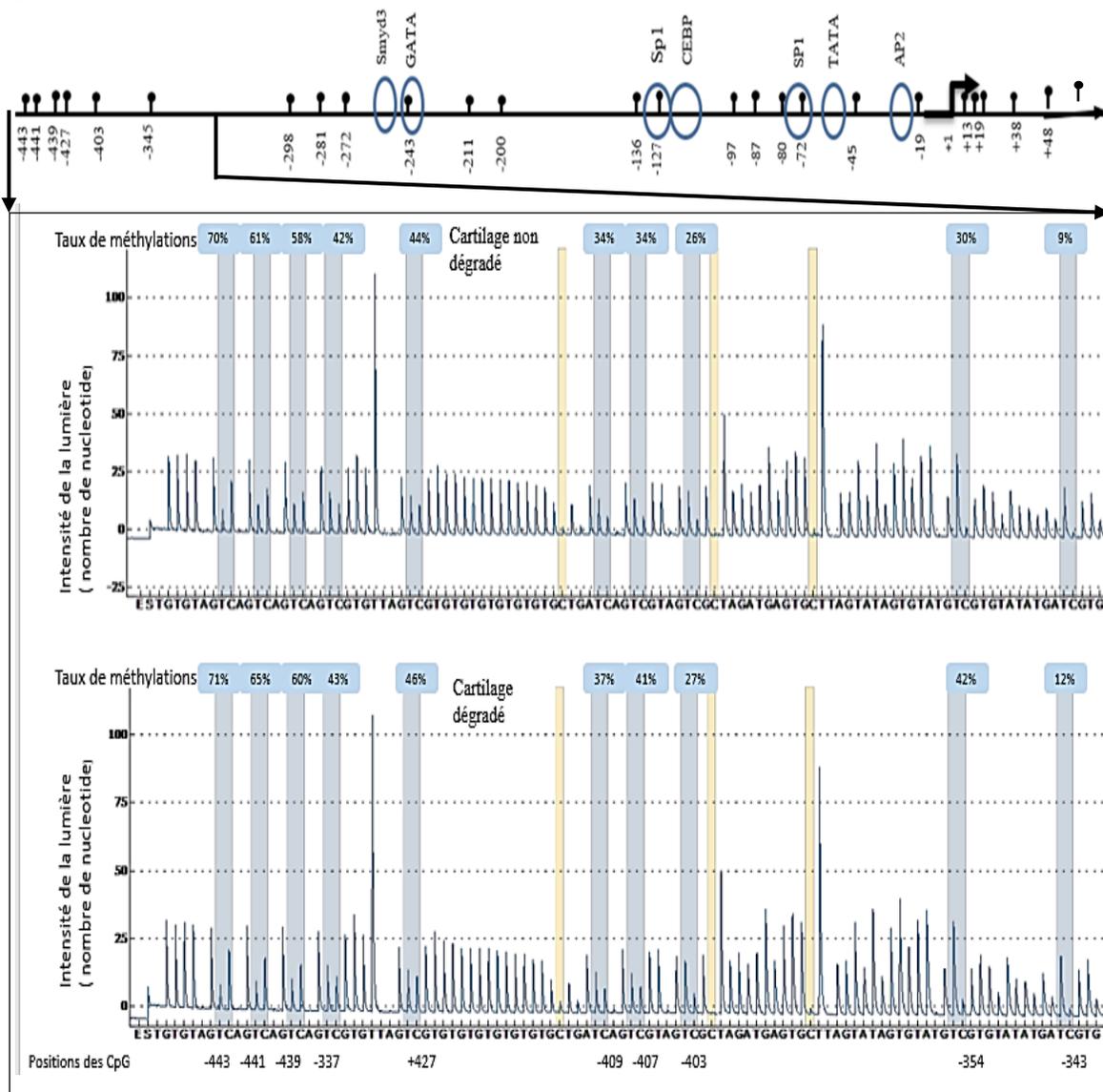


Figure 36: Pyrogramme de la région du promoteur de 15-LOX-1 comprise entre -160 et -443, séquencée par les amorces 15-LOX-1-S3A.

IV. 2.1.4. Taux de méthylation des sites CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-1

Les taux de méthylation de l'ensemble des sites CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-1, des échantillons, ont été regroupés dans le tableau de l'annexe 1. Nous n'avons observé aucune différence significative des taux de méthylation

de chaque site CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-1, entre cartilages arthrosiques dégradés et non dégradés (Figure 37). Le test bilatéral de Student ou le test t multiple indique que les différences de taux de méthylation ne sont pas significatives entre cartilage arthrosique et non arthrosique ($p > 0.05$). Les taux de méthylations de deux flots CpG dans la région comprise entre +1 et -343 Pb par rapport au site d'initiation de la traduction sont relativement faibles (inférieur à 33 %). Les sites de fixations des facteurs de transcription se situent entre -1 et -343 Pb par rapport au site d'initiation de la traduction. Les sites CpG de la région comprise entre -354 et -443 sont plus méthylés.

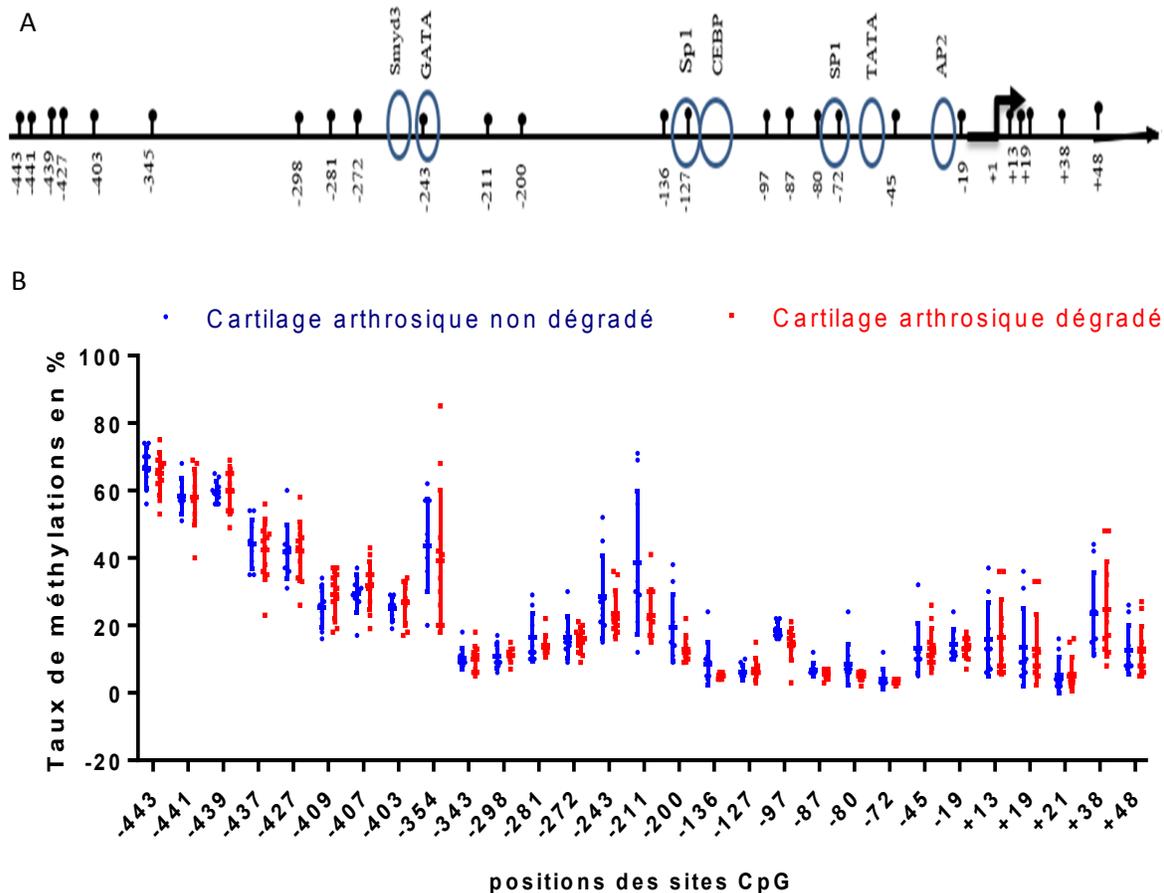


Figure 37: Taux de méthylations des sites CpG du promoteur proximal de 15-LOX-1 dans les cartilages arthrosiques dégradés (N=11) et dans les cartilages arthrosiques intacts (N=9). A: localisation des sites CpG et des facteurs de transcriptions. B: Taux de méthylations des sites CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-1. Les valeurs de p sont supérieures ou égales 0.05.

IV.2 L'évaluation des taux de méthylation des sites CpG du promoteur proximal du gène 1- LOX-2

IV.2.1 Amplification par PCR du promoteur proximal du gène 15-LOX-2

Nous avons amplifié la région d'intérêt du promoteur proximal du gène 15-LOX-2 à l'aide du couple d'amorces 15-LOX-2-F1 et -R1. Ensuite, nous avons vérifié la quantité des produits PCR et la spécificité de chaque réaction PCR par une migration électrophorétique dans un gel d'agarose de 2 % (Figure 38). L'amplification de cette région est très importante et spécifique.

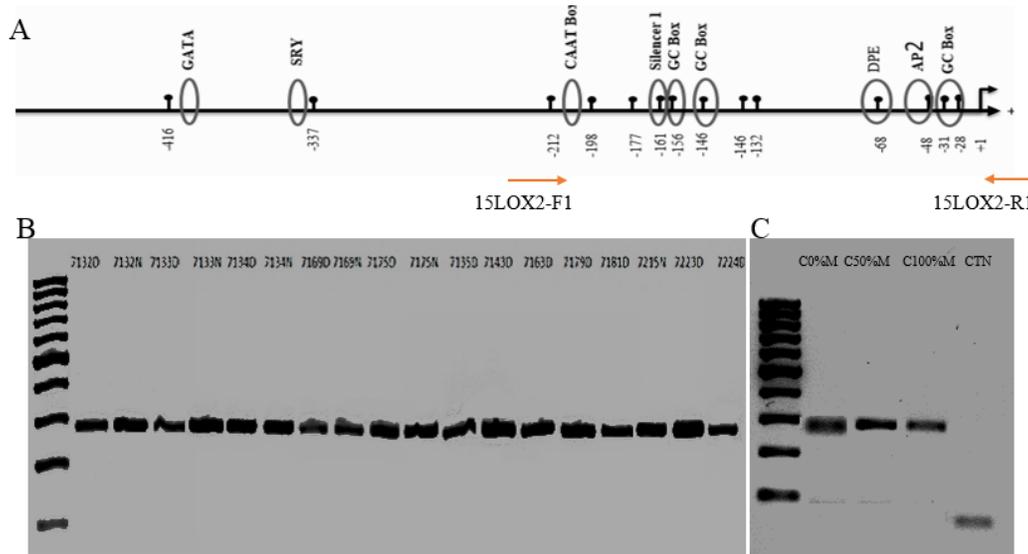


Figure 37: Image du gel des produits PCR obtenue après migration électrophorétique de 4 μ l d'ADN de chaque produit PCR dans un gel d'agarose de 2 %. La taille des produits PCR est de 280 Pb. Les fragments ont été amplifiés grâce aux couples d'amorces 15-LOX-2-F1 et R1 avec le kit Takara. Les numéros 7132 à 7256 correspondent à des échantillons arthrosiques dégradés (D) et non dégradés (N).

IV. 2.2 Les taux de méthylation des sites CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-2

Nous avons quantifié les taux de méthylation des sites CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-2 par pyroséquençage en utilisant deux amorces de séquençage 15-LOX-2- S1A et -S1B. Cette région d'intérêt contient 12 sites CpG. Les résultats montrent que

les taux de méthylation de ces sites CpG sont faibles (ils ne dépassent pas globalement 33 %) et ne sont pas différents significativement entre cartilages arthrosiques dégradés et non dégradés (Figure 39 et 40).

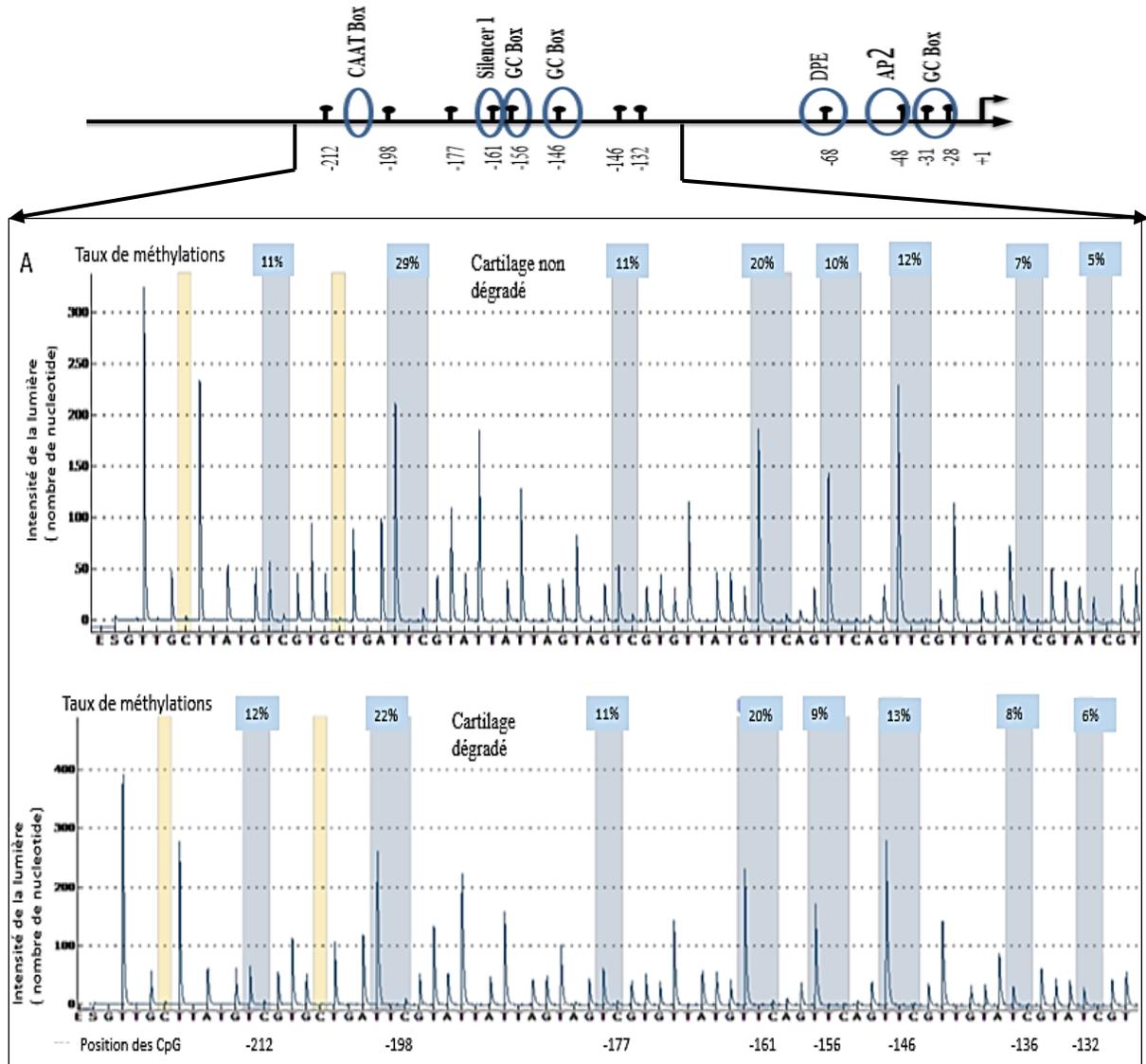


Figure 38: Pyrogrammes obtenus par pyroséquençage d'ADN bisulfite, issus d'échantillons arthrosiques dégradés et non dégradés en utilisant l'amorce de séquençage 15-LOX-2-S1A (A)

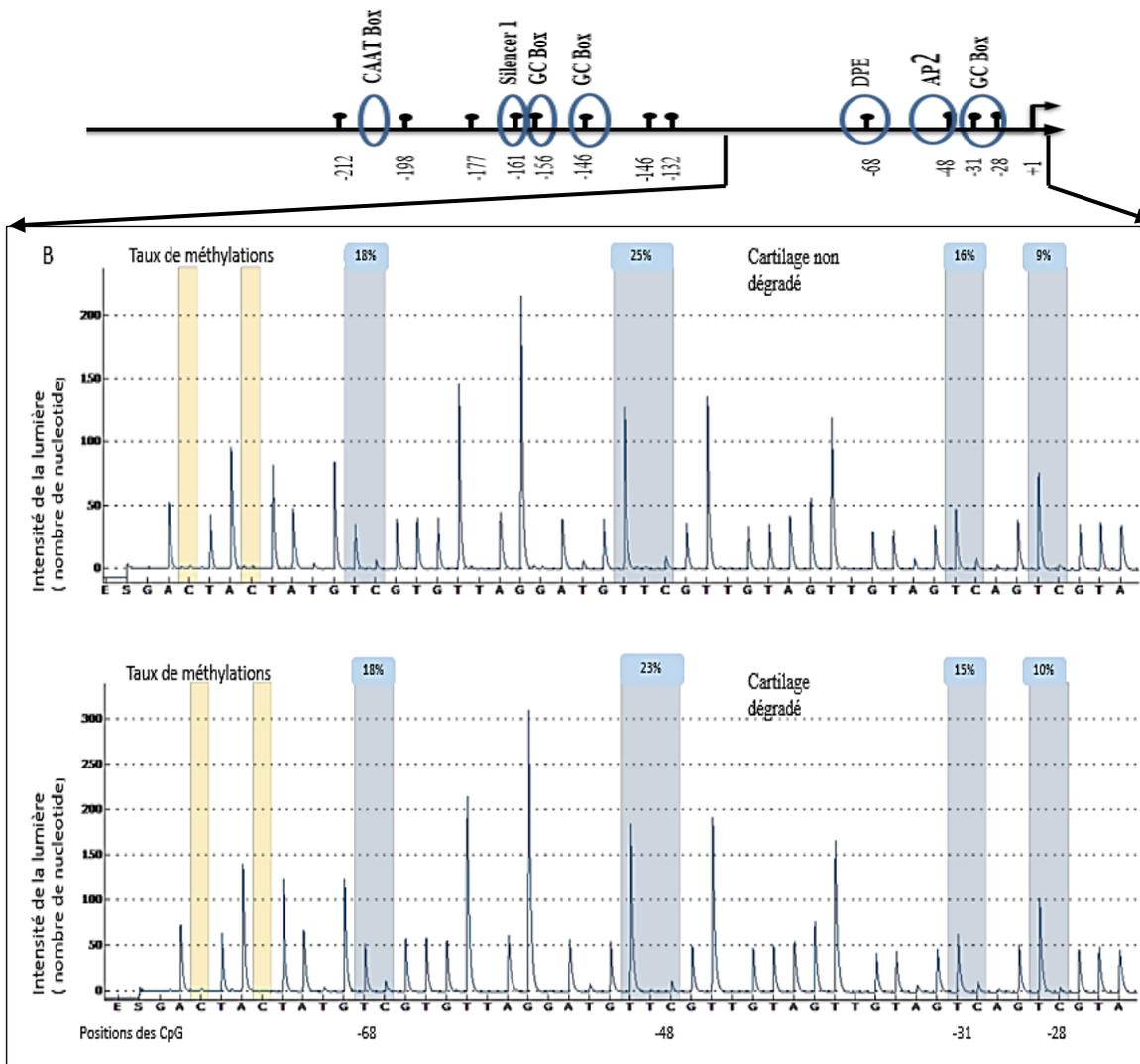


Figure 39: Pyrogrammes obtenus par pyroséquence d'ADN bisulfite, issus d'échantillons arthrosiques dégradés et non dégradés en utilisant l'amorce 15-LOX-2-S1B (B).

Nous avons regroupé les taux de méthylation des sites CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-2 dans le tableau de l'annexe 2. Il n'y a pas de différence significative des taux de méthylation de chaque sites CpG entre cartilages arthrosiques dégradés et non dégradés (figure 41). Le test bilatéral de Student ou le test t multiple montre que les différences de taux de méthylation ne sont pas significatives entre cartilage arthrosique et non arthrosique ($p > 0.05$). Les taux de méthylation de chaque site CpG sont globalement faibles et ne dépassent pas globalement 35%.

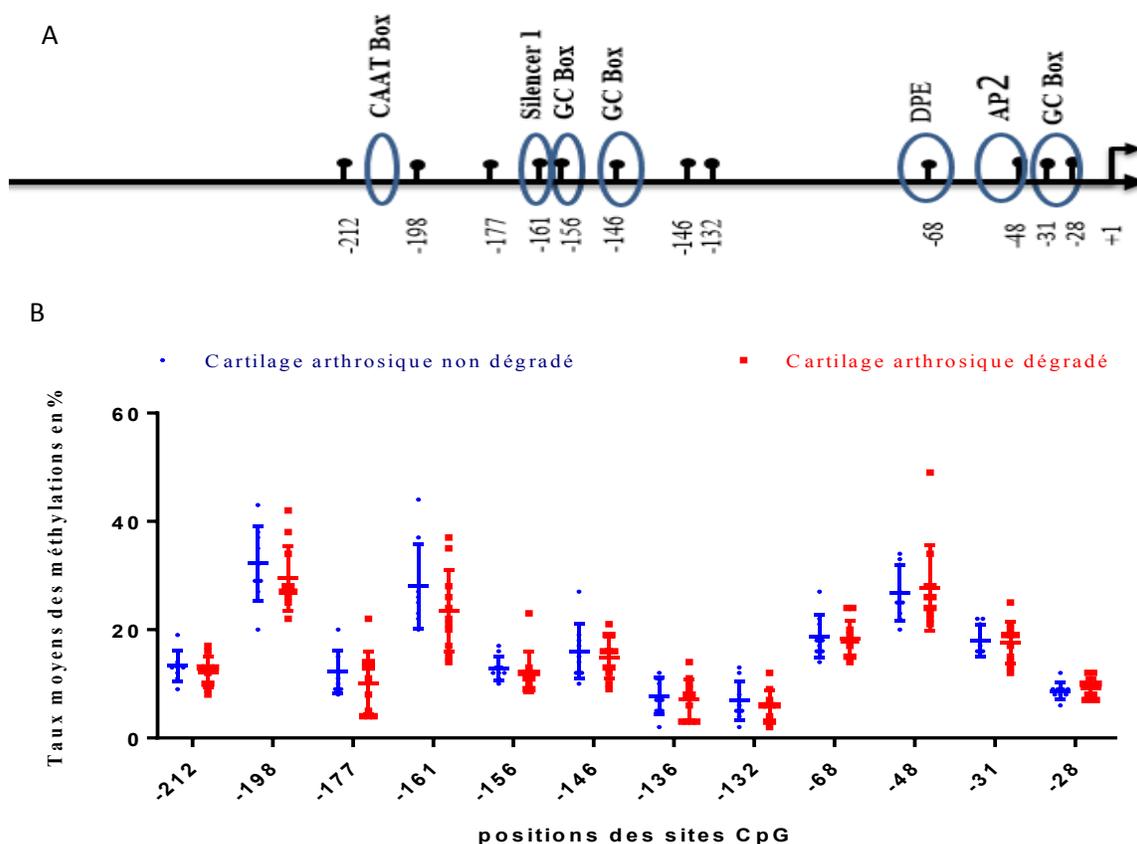


Figure 40: Taux des méthylations des sites CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-2, obtenus par pyroséquençage à partir d'ADN extraits des cartilages arthrosiques dégradés (N=11) et intacts (N=9). A: localisation des sites CpG et des facteurs de transcription. B: Taux de méthylations des sites CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-2. Les valeurs de p sont supérieures à 0.2.

Chapitre IV : Discussion

Au Canada et dans le monde, l'arthrose est la maladie des articulations la plus répandue. Elle constitue un fardeau sur le plan économique et social en progression. Elle se caractérise par la dégradation du cartilage, l'inflammation de la synoviale et le remodelage de l'os sous-chondral. C'est une maladie multifactorielle, incapacitante, qui est due à un déséquilibre entre le catabolisme et l'anabolisme. L'augmentation de la synthèse des facteurs pro-inflammatoires et cataboliques aux dépens des facteurs anaboliques et anti-inflammatoires est associée à la pathogenèse de l'arthrose. Les mécanismes moléculaires, par lesquels, les facteurs de risques entraînent ce déséquilibre de l'expression des gènes, ne sont pas bien connus. Les traitements actuels ne permettent pas de rétablir le fonctionnement normal des chondrocytes ou l'équilibre entre le catabolisme et l'anabolisme et de guérir complètement les patients.

Selon des travaux de notre laboratoire, les métabolites des enzymes 15-LOX-1 et -2 ont un rôle anti-catabolique et anti-inflammatoire. Les enzymes 15-LOXs catalysent la biosynthèse des médiateurs lipidiques comme les lipoxines, 15-HETE, 13-HODE, resolvines et protectines. Ces métabolites induisent une diminution de la synthèse des protéases comme les métalloprotéines MMP-1 et MMP-13 induites par IL-1 β (84, 143). Ils stimulent la synthèse des inhibiteurs des protéases (TIMPS) et inhibent la dégradation du collagène II, principal constituant de la matrice extracellulaire (84, 143). En outre, les métabolites des enzymes 15-LOXs inhibent la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires comme IL-6, IL-8, COX-2, iNOS en inhibant les voies de signalisation MAP Kinase, P38, PI3K/ATK, JAK/STAT (94-96, 143). D'autres travaux plus récents, réalisés dans notre laboratoire, ont montré que la délétion des gènes 15-LOXs et 12-LOXs entraîne l'accélération du développement de l'arthrose induite par le vieillissement et la déstabilisation du ménisque chez les souris (87). L'expression des gènes 15-LOXs est diminuée dans le cartilage arthrosique selon une étude non publiée de notre laboratoire.

L'objectif principal de notre étude est de déterminer s'il existe une corrélation entre les niveaux d'expression des gènes 15-LOXs et les taux de méthylation de leur promoteur

proximal. Nous avons analysé, d'abord, l'expression des gènes 15-LOXs dans le cartilage arthrosique et non arthrosique.

La diminution de l'expression des gènes 15-LOXs dans le cartilage arthrosique

Les résultats de l'analyse de l'expression des gènes 15-LOXs confirment la diminution significative de leur expression dans le cartilage arthrosique par rapport au cartilage non arthrosique. Nous avons montré que les niveaux d'ARNm des gènes 15-LOX-1 et 15-LOX-2 sont plus faibles d'environ 42 et 38 % respectivement dans les cartilages arthrosiques par rapport à celui sain. Nous en déduisons que l'expression des gènes 15-LOX-1 et -2 est diminuée ou qu'il y a une dégradation plus importante des ARNm formés dans le cartilage arthrosique. Les résultats de l'immunohistochimie montrent une réduction significative des marquages dans le cartilage arthrosique par rapport à celui normal. Nous pouvons déduire que la synthèse des enzymes 15-LOX-1 et -2 sont réduites de façon significative dans le cartilage arthrosique. Ce qui contribuerait à la pathogenèse de l'arthrose.

Les mécanismes à l'origine de cette diminution ne sont pas entièrement connus. Nous cherchons si les méthylations de l'ADN contribuent à cette diminution. Des études précédentes suggèrent que des modifications épigénétiques comme la méthylation d'ADN seraient impliquées dans la pathogenèse de l'OA.

La méthylation d'ADN et l'OA.

L'accumulation des facteurs de risque pourrait entraîner des modifications épigénétiques, telles que la méthylation d'ADN, les modifications des histones et micro-ARN dans les chondrocytes (Figure 41). Ces modifications épigénétiques pourraient entraîner un déséquilibre entre la synthèse des facteurs cataboliques et celles des facteurs anaboliques à l'origine des caractéristiques de l'OA (144). En effet, la méthylation d'ADN joue un rôle important dans la pathogenèse de l'arthrose. Une modification du profil de méthylations de certains gènes explique le changement de leur expression impliqué dans la pathogenèse de la maladie. Le déséquilibre de l'expression des gènes cataboliques et

anaboliques peut résulter aussi bien de l'hyperméthylation des gènes anaboliques (associées à la synthèse du cartilage) que de l'hypométhylation des gènes cataboliques (impliqués dans la dégradation du cartilage). Les promoteurs des gènes cataboliques codant pour les cytokines, comme IL-1 β ou IL-8, ainsi ceux codant pour des protéinases, comme MMP-13 ou ADAMTS, sont hypométhylés dans le cartilage arthrosique par rapport au cartilage sain (145, 146). Cette hypométhylation est corrélée à une forte expression de ces gènes qui seraient à l'origine de la dégradation du cartilage et de l'inflammation synoviale. La déméthylation pourrait être due par une déméthylation passive ou par la fixation des facteurs inhibant DNMT1. D'autres études ont démontré une hyperméthylation des promoteurs des gènes anaboliques comme les gènes codant pour le collagène COL11A2, COL18A1, COL6A2 et COL9A2 dans le cartilage arthrosique (144, 147).

Pour déterminer le rôle de la méthylation dans cette inhibition, nous avons d'abord traité à l'AZA-DC, un agent déméthylant des lignées cellulaires C28 et des chondrocytes humains, issus du cartilage arthrosique. Le traitement avec l'AZA-DC a entraîné une augmentation significative de l'expression des gènes 15-LOX. Ces résultats confortent notre hypothèse sur la diminution de l'expression des gènes par hyperméthylation d'ADN. De plus, d'autres travaux ont montré que la modification du profil de méthylation du promoteur du gène 15-LOX-1 est impliquée dans le cancer de la prostate (148, 149).

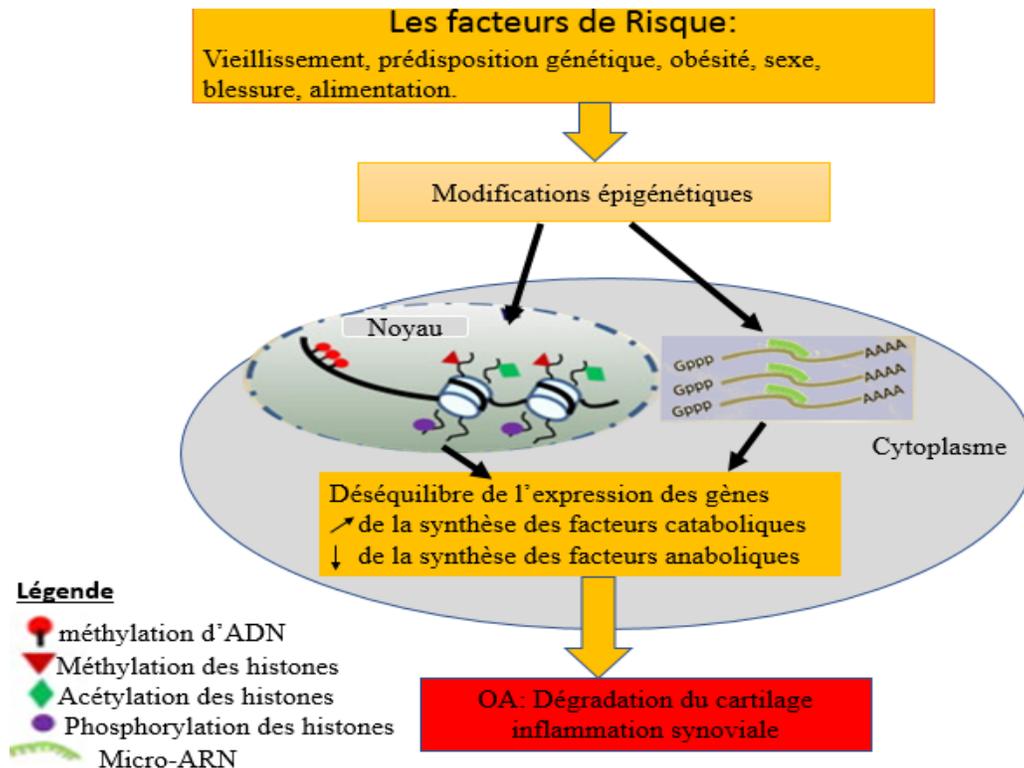


Figure 41: Schéma montrant les rôles possibles des modifications épigénétiques dans la pathogenèse de l'arthrose. L'accumulation des facteurs de risque entraînerait des modifications épigénétiques qui conduiraient à l'expression anormale des facteurs de transcriptions (TFs), des cytokines, des prostaglandines, collagène, protéoglycanes et protéinases. Modifié de Zhang et Wang (144).

Pour déterminer l'existence de relation entre la méthylation des promoteurs proximaux des gènes 15-LOXs et la diminution de l'expression des gènes 15-LOXs dans les cartilages arthrosiques, nous avons quantifié les taux de méthylations de l'ADN des promoteurs proximaux de ces gènes provenant des cartilages arthrosiques dégradés et non dégradés par pyroséquençage. Nous analyserons et discuterons séparément les taux de méthylations des promoteurs des deux gènes 15LOXs.

Les taux de méthylations du promoteur proximal du gène 15-LOX-1

Pour le gène 15-LOX-1, les taux de méthylations des sites CpG sont globalement faibles (inférieurs à 33 %) pour la région comprise entre +1 et -354 Pb, et importants pour la région comprise entre -354 et -445 Pb par rapport au site d'initiation de la traduction. La

région comprise entre +1 et -343 contient les sites de fixations des principaux facteurs de transcription comme Sp1, CEBP, AP1, jouant un rôle clé dans l'expression de ce gène. Il n'y a pas de différences significatives des méthylations de chaque sites CpG du promoteur proximal entre les cartilages arthrosiques dégradés et non dégradés. Ces résultats sont les mêmes que ceux observés précédemment dans les cellules normales et cancéreuses de la prostate (148), à l'exception du site CpG-298 qui est faiblement méthylé dans notre cas. Nos résultats montrent que l'inhibition de l'expression du gène 15-LOX-1 dans le cartilage arthrosique n'est pas due à une hyperméthylation de son promoteur proximal. Ces résultats sont en accord avec ceux de Zuo et al., (77) qui ont montré que la méthylation de l'ADN du promoteur proximal de 15-LOX-1 n'est pas associée à l'inhibition de l'expression de 15-LOX-1 dans les cellules cancéreuses colorectales.

L'inhibition de l'expression du gène 15-LOX-1 pourrait être due à des modifications des histones et de l'expression des micro-ARNs.

Les modifications des histones et inhibition du gène 15-LOX-1

L'inhibition du gène 15-LOX-1 pourrait être due à la désacétylation des histones, à la suppression de la di- et triméthylation des histones H3 au niveau de la lysine 4 (99, 150). L'inhibition de l'expression du gène 15-LOX-1 dans les cellules cancéreuses serait due à l'action directe de la méthyltransférase DNMT1, qui possède des sites de fixation des répresseurs transcriptionnels comme les histones désacétylases (HDAC) (77). Le traitement avec l'AZA-DC et avec l'inhibiteur de l'histone désacétylase (TSA) des lignées cellulaires cancéreuses L428 (qui n'exprimaient pas le gène 15-LOX-1) a entraîné une transcription robuste de ce gène (151). La transcription de 15-LOX-1 a été activée par l'inhibition de la désacétylase des histones, uniquement après la dissociation de DNMT1 du promoteur de ce gène, sans diminution de la méthylation des sites CpG (77). L'augmentation de l'expression de ce gène, après le traitement des chondrocytes par 5-AZA-DC, pourrait s'expliquer par l'inhibition de la DNMT1. Cette inhibition pourrait activer des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'activation du gène 15-LOX-1. La région promotrice de ce gène est activée par les inhibiteurs des désacétylases des

histones (HDAC) dans les lignées cellulaires cancéreuses CACO-2 et SW-480 (150). Plus précisément, des inhibiteurs des HDAC1 et 2 entraînent l'expression du gène 15-LOX-1 dans les cellules cancéreuses du colon (77). En effet, l'inhibition de la transcription du gène 15-LOX-1 est due aux désacétylations d'histones par les désacétylases des histones HDAC1 et 2 du complexe NuRD (*Nucleosome Remodeling Deacetylase*). Ce complexe répresseur de la transcription est recruté dans la région du promoteur de 15-LOX-1 comprise entre -120 et -391 (152). La triméthylation et diméthylation des histones 3, au niveau de la lysine 4 (H3-K4), sont associées à l'expression du gène 15-LOX-1 dans les cellules cancéreuses L1236. L'inhibition de la méthyltransférase des histones SMYD3 (qui est responsable de la diméthylation et de la triméthylation de H3K4) par siRNA entraîne une répression de l'activité du promoteur 15-LOX-1 (99) alors que son injection dans les cellules cancéreuses L428 entraîne la transcription de ce gène. Cette méthyltransférase possède un site de fixation dans le promoteur 15-LOX-1. L'inhibition de la déméthylase des histones (SMCX) induit l'expression du gène (150). Cette déméthylase, qui entraîne la disparition des diméthylations et triméthylations des lysines 4 des histones 3, possède aussi une activité histone désacétylase. Voici un schéma récapitulatif comment les modifications des histones pourraient réguler l'expression du gène 15-LOX-1 (Figure 42).

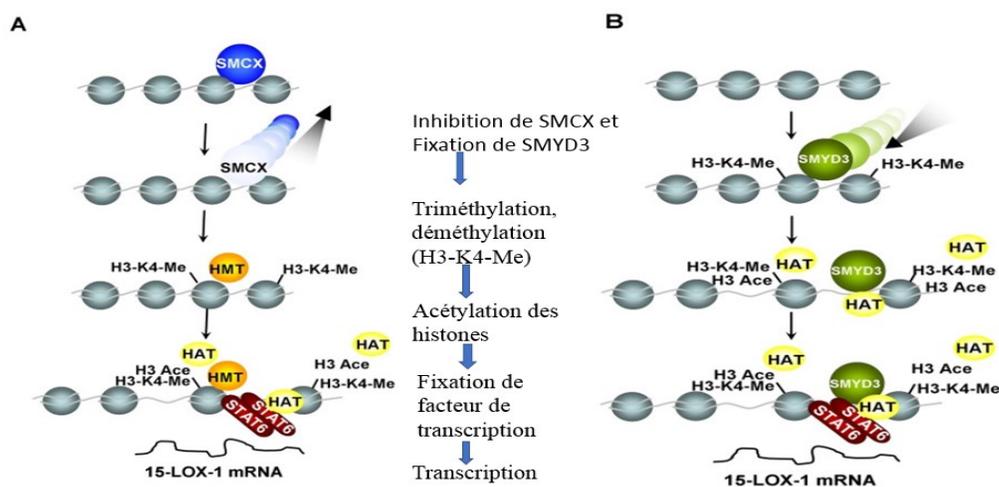


Figure 42: Modèle de l'activation transcriptionnelle 15-LOX-1 médiée par SMYD3 et de l'inhibition du gène médiée par SMCX pour le remodelage de la chromatine. L'inhibition de la déméthylase des histones SMCX entraîne la triméthylation des H3-K4-Me3, conduisant au recrutement des histones acétylases (HAT) qui permettent l'acétylation des histones. L'acétylation des histones entraîne une modification chromatiniennne permettant la fixation des facteurs de transcription comme STAT6. Modifié de Liu, C. and al.,(99).

Les micro-ARNs et inhibition de l'expression du gène 15-LOX-1

La diminution de l'expression du gène 15-LOX-1 pourrait être due, en partie, à l'action des micro-ARNs. Des études récentes ont montré que les micro-ARNs sont impliqués dans la pathogenèse de l'OA (153). Une expression anormale des micro-ARNs a été rapportée dans l'OA (154). Dans les articulations arthrosiques, 30 gènes codant pour les micro-ARNs sont anormalement exprimés et ont des gènes cibles impliqués dans la synthèse ou dans la dégradation de la MEC, dans l'inflammation ou dans le remodelage de l'Os sous-chondrale (155). Le micro-ARN, miR-140, très abondant dans le cartilage sain, inhibiteur de la synthèse de la protéase ADAMTS, diminue dans le cartilage arthrosique (156). Les micro-ARN miR-27a, miR-27b, miR-127-5p et miR-320, qui inhibent la protéase MMP-13, principale responsable de la dégradation de la MEC, diminuent durant l'OA (157-160). Le miR-146a inhibe l'activation de l'inflammation en ciblant les récepteurs de IL-1 et de TNF(161). Le miR-199a inhibe la synthèse de COX-2 et son expression diminue dans le cartilage arthrosique (162). Le miR-210, qui diminue l'inflammation articulaire, diminue durant l'OA (163). Dans le cartilage arthrosique, l'expression de miR-145, qui supprime la synthèse du récepteur de TNF- α (TNFRSF11B), diminue (153, 164). Ils pourraient agir directement sur les molécules d'ARNm du gène 15-LOX-1 en entraînant leur dégradation et une diminution de la synthèse des enzymes 15-LOX-1 dans le cartilage arthrosique. Des études récentes, ont montrés que l'ARNm de 15-LOX-1 possède dans la région 3'UTR un site de fixation du miR-125b qui est surexprimé dans les cellules neuronales stressées (165). Ce micro-ARN est anormalement exprimé dans le cartilage arthrosique (155).

En outre, les micro-ARNs pourraient agir indirectement, en amont de l'expression du gène 15-LOX-1, en régulant les gènes des facteurs de transcription ou des protéines des voies de signalisations impliquées dans l'expression de ce gène. Ils régulent l'expression des gènes des enzymes intervenant dans les modifications des histones comme les désacétylases des histones. Leur expression anormale pourrait modifier les acétylations et

méthylations des histones, entre autres, et pourrait conduire à l'inhibition du gène 15-LOX-1.

Taux de méthylation du promoteur proximal du gène 15-LOX-2

Pour 15-LOX-2, les taux de méthylation des sites CpG sont faibles (inférieurs à 35 % en moyenne) et ne présentent pas de différence entre cartilages arthrosiques dégradés et non dégradés. Ces résultats démontrent qu'une hyperméthylation des sites CpG du promoteur proximal ne sont pas à l'origine de l'inhibition de l'expression de 15-LOX-2 dans les cartilages arthrosiques, ce qui est en accord avec les conclusions de Tang et al (103). Ils avaient constaté que les traitements d'AZA-DC ou de TSA des cellules cancéreuses de la prostate n'ont pas entraîné une expression du gène 15-LOX-2. Les cellules cancéreuses de la prostate n'expriment pas ce gène. Ils avaient conclu que la perte d'expression du gène 15-LOX-2 n'est pas due à une hyperméthylation du promoteur ou une condensation de la chromatine induite par une désacétylation des histones au niveau du promoteur.

Les facteurs de transcription et inhibition du gène 15-LOX-2

Une modification de l'expression des gènes codant pour les facteurs de transcription pourrait expliquer, en partie, l'inhibition du gène 15-LOX-2. Des travaux antérieurs ont montré que les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 régulent l'expression du gène 15-LOX-2 dans les cellules de la prostate (104). En effet, le facteur de transcription Sp1 stimule l'expression de ce gène en se fixant sur les boîtes GC. Le facteur de transcription Sp3 inhibe l'expression de ce gène en se fixant sur les mêmes sites que Sp1. Les boîtes GC sont situées dans la région entre -163 et +80 par rapport au site d'initiation de la traduction. Ces travaux ont montré que la surexpression de SP3 et l'inhibition de Sp1 ont inhibé l'expression du gène 15-LOX-2 dans cellules cancéreuses de la prostate. D'autres travaux ont montré que le gène 15-LOX-2 peut être inhibé par ses métabolites (15-HETE), en association avec PPAR γ , par rétrocontrôle négatif en se fixant sur le promoteur de ce gène (166). Des travaux plus récents, ont montré que l'inhibition de 15-LOX-2 dans les cellules cancéreuses de la prostate, sensibles aux androgènes (cellules

LNCaP) est due à la surexpression des récepteurs du glucocorticoïde. Ce récepteur se fixe sur la région promotrice, entre -157 et -33 par rapport au site d'initiation de la traduction, et inhibe l'expression du gène 15-LOX-2.

Les micro-ARNs et inhibition du gène 15-LOX-2

La répression du gène 15-LOX-2 pourrait s'expliquer, en partie, par l'altération de l'expression des gènes codants pour les micro-ARNs. Ces derniers pourraient agir directement et expliquer, en partie, la diminution de l'expression de ce gène dans le cartilage arthrosique. Ils pourraient aussi agir indirectement, en amont de l'expression du ce gène, en régulant l'expression des gènes des facteurs de transcriptions ou des protéines de voies de signalisation impliqués dans l'expression du gène 15-LOX-2. Le micro-ARN miR-124, inhibant la synthèse du facteur Sp1, est surexprimé dans les cellules nerveuses (167). D'autres micro-ARNs comme miR-200, miR-335, miR-22 et miR-149 inactivent l'expression du facteur Sp1 qui est faible dans les cellules cancéreuses (168). Dans le cartilage arthrosique, l'expression de miR-22 est augmentée (169).

Perspectives

Les mécanismes moléculaires induisant l'inhibition des gènes 15-LOX-1 et -2 dans le cartilage arthrosique restent donc à clarifier. Cette inhibition est impliquée dans la pathogenèse de l'arthrose. La confirmation de nos résultats est nécessaire. Les résultats de l'analyse de l'expression de deux gènes dans les cartilages arthrosiques et non arthrosiques ont été faits avec un petit échantillon (n=8). Il faut plus d'échantillons pour conclure. En effet, la récolte de cartilages non arthrosiques est difficile et nécessite beaucoup de temps, car ils proviennent des personnes décédées. L'accord des parents ou tuteurs est nécessaire. En outre, nous voulions utiliser des échantillons de cartilages non arthrosiques comme contrôle lors de la quantification des taux de méthylation des sites CpG des promoteurs des gènes 15-LOXs, cependant en raison de ces contraintes liées à leur récolte, nous avons préféré des cartilages arthrosiques non dégradés ou intacts. Nous sommes en train de récolter les cartilages non arthrosiques. La quantification par pyroséquençage des taux de méthylation des sites CpG isolés, situés en dehors des promoteurs proximaux, entre cartilage arthrosique et non arthrosique, permettrait de conclure définitivement sur le rôle de la méthylation d'ADN sur l'expression des gènes 15-LOXs.

L'inhibition des gènes 15-LOXs dans le cartilage arthrosique pourrait être due aux modifications de l'expression des micro-ARNs, des facteurs de transcriptions et aux changements post-traductionnelles des histones (pour le gène 15-LOX-1).

Dans le futur, des expériences supplémentaires permettront de déterminer le rôle de la modification de la synthèse des facteurs de transcriptions dans l'inhibition de l'expression des gènes 15-LOXs. En effet, l'inhibition des gènes 15-LOXs dans le cartilage arthrosique pourrait résulter d'une modification de l'expression des gènes des facteurs de transcription. Nous avons déterminé par des études *in silico* les principaux facteurs de transcriptions importants dans la transcription de chaque gène 15-LOX. Les niveaux d'expressions des différents facteurs clés dans la transcription de chaque gène, dans les cartilages arthrosiques et non arthrosiques, pourraient être évalués par immunohistochimie. Une expérience de transfection des cellules n'exprimant pas le gène 15-LOX-1 ou -2 avec

un vecteur d'expression de chaque facteur de transcription permettrait de connaître son rôle dans l'expression du gène. L'expression du gène des cellules ayant reçu le gène du facteur de transcription et celles non transfectées pourrait être évaluée par RT-PCR en temps réel. Les expériences de CHIP ou retard sur gel, à partir d'extraits nucléaires des cellules transfectées ou non, permettraient de connaître l'action directe des facteurs de transcription sur l'expression des gènes 15-LOXs. Une expérience d'inhibition de chaque facteur de transcription par siRNA spécifique dans les cellules exprimant le gène 15-LOX, régulé par ce facteur, permettrait de confirmer ce rôle.

D'autres expériences permettront de déterminer le rôle de la modification des histones sur l'inhibition du gène 15-LOX-1 dans le cartilage arthrosique. La désacétylation des histones pourrait contribuer à cette inhibition. L'effet de la désacétylation serait évalué après traitement des chondrocytes, issus du cartilage arthrosique, avec des inhibiteurs des désacétylases des histones (HDAC) comme la trichostatine A (TSA), l'acide butyrique et l'acide valproïque. La quantification de l'expression du gène 15-LOX-1 dans les chondrocytes traitées ou non par une RT-PCR en temps réel et par un western blot permettra de faire une comparaison et de déterminer le rôle de la désacétylation des histones sur l'inhibition de ce gène dans le cartilage arthrosique. Ces expériences ont été réalisées dans notre laboratoire pour démontrer le rôle des HDACs dans l'expression du gène mPEGS-1 (170). Une expérience de transfection avec un plasmide recombinant portant un gène rapporteur associé au promoteur de 15-LOX-1 et de co-transfections avec un vecteur d'expression du gène de HDAC1 ou 2 permettrait de confirmer le rôle possible de ces désacétylases d'histones dans l'inhibition de l'expression du gène 15-LOX-1. Dans cette expérience, l'inhibition des HDACs par des siRNAs spécifiques permettrait de préciser encore leur rôle de chaque HDAC dans l'inhibition du gène 15-LOX-1 dans le cartilage arthrosique. Ces expériences ont été aussi réalisées dans notre laboratoire pour évaluer le rôle des HDACS dans l'expression du gène mPGES-1 (170). La comparaison de l'activité du gène rapporteur dans les cellules cotransfectées par le vecteur d'expression et du vecteur portant ou non du gène du siRNA permettra de conclure sur le rôle de la

désacétylation des histones dans l'inhibition du gène 15-LOX-1 dans le cartilage arthrosique. Le recrutement des HDACs et le niveau d'acétylation des histones au niveau du promoteur du gène 15-LOX-1, dans le cartilage arthrosique et dans celui non arthrosique, pourraient être évalués par le test d'immunoprécipitation de la chromatine ou CHIP. Cette technique est décrite précédemment (170).

En outre, la déméthylation des lysines 4 di- ou triméthylées histones 3 (H3-K4) pourrait contribuer à l'inhibition de l'expression du gène 15-LOX-1 (99). La technique de CHIP permettrait de déterminer les niveaux de triméthylation des H3-K4 dans les chondrocytes issues du cartilage arthrosique et de celui non arthrosique. Les résultats permettraient de faire le lien entre les niveaux de triméthylation des H3-K4 et l'expression du gène 15-LOX-1. L'inhibition de la méthyltransférase des histones SMCX, responsable de la di- et triméthylation des lysines des histones 3, par siRNA permettrait de connaître le rôle de la déméthylation des H3-K4 sur l'expression du gène 15-LOX-1 dans les chondrocytes, issus des cartilages arthrosiques. Les niveaux d'expression de ce gène dans les chondrocytes transfectés ou non pourront être évalués par RT-PCR en temps réel. Ces expériences ont été réalisées sur des lignées cellulaires L1236, exprimant abondamment le gène 15-LOX-1 et L428, n'exprimant pas ce gène et non sur les chondrocytes (99).

Enfin, d'autres expériences permettraient de déterminer le rôle des micro-ARNs dans l'inhibition des gènes 15-LOXs dans le cartilage arthrosique. En effet, les micro-ARN peuvent agir directement sur l'expression de ces deux gènes en entraînant la destruction des ARNm ou en inhibant la traduction. Une étude *in silico* permettra d'abord de déterminer les micro-ARNs susceptibles de cibler les ARNm des 15-LOXs. Des logiciels de prédiction comme TargetScan version 5.1 permettront de déterminer les micro-ARNs ciblant les ARNm des 15-LOXs. Les micro-ARNs déterminés, et qui ont une expression modifiée dans le cartilage arthrosique, joueraient un rôle dans l'inhibition des gènes 15-LOXs. Des études récentes ont montré que le miR-125b cible le gène 15-LOX-1 et a une expression modifiée dans le cartilage arthrosique (155, 165). Ensuite les expériences de Microarray ou de RT-PCR en temps réel permettront de déterminer leur présence ou de quantifier leur abondance dans le cartilage arthrosique par rapport au cartilage non

arthrosique (171-173). L'effet de chaque micro-ARN pourrait être évalué par transfection avec des plasmides d'expression, portant le gène du micro-ARN, des chondrocytes extraites de cartilage, traités pendant plusieurs semaines avec IL-4 afin de stimuler l'expression des gènes 15-LOXs. Les chondrocytes seraient réparties en plusieurs groupes. Un groupe des chondrocytes seraient transfectés des plasmides portant le gène d'un micro-ARN différemment exprimés dans le cartilage arthrosique. D'autres groupes de chondrocytes ne seraient pas transfectés et seraient considérés comme des témoins. Une diminution de l'expression d'un gène 15-LOX, dans les chondrocytes transfectés, signifierait que la surexpression du micro-ARN aurait contribué à l'inhibition de façon directement ou indirectement. Les techniques de Western blot et de RT-PCR en temps réel permettront de l'évaluer en comparant la quantité d'ARN et des protéines 15-LOXs des chondrocytes transfectés par rapport aux chondrocytes non transfectés. L'expérience de western blot a été décrite précédemment (170). Des expériences de clonage, de transfection avec un plasmide recombinant portant un gène rapporteur associé au promoteur d'un gène 15-LOX et de cotransfection avec des plasmides d'expression du gène de ce micro-ARN permettront de confirmer le rôle de chaque micro-ARN sur l'inhibition des gènes 15-LOXs dans le cartilage arthrosique. Ces expériences ont été décrites précédemment pour déterminer l'effet des micro-ARNs sur l'expression d'autres gènes (171, 174). Le promoteur du gène 15-LOX pourrait être muté ou non au niveau du site de fixation de ce micro-ARN dans la région 3'UTR. Les cellules transfectées seront des cellules n'exprimant pas le gène 15-LOX comme les cellules cancéreuses CACO-2. La comparaison des niveaux d'expression du gène rapporteur des cellules transfectées par le vecteur d'expression du gène du micro-ARN et de celles, ne l'ayant pas reçues, permettra de conclure sur de l'effet du micro-ARN. L'étude des niveaux d'expression du gène rapporteur dans les cellules transfectés avec le vecteur d'expression et ayant la mutation ou non, au niveau du site de fixation du micro-ARN, permettra de déterminer si le micro-ARN agit directement sur l'ARNm de 15-LOX.

L'effet indirect ou en amont des micro-ARNs sur l'expression des gènes 15-LOXs pourraient être étudié par la recherche par une étude *in silico* des micro-ARNs ciblant les ARNm des IL-4, IL-13, des facteurs de transcription comme Sp1 ou Sp3 impliqués dans

l'expression des gènes 15LOXs. L'effet indirect sera évalué par des expériences de transfections des chondrocytes, traités ou non avec IL4, avec un plasmide recombinant portant le gène du micro-ARN. Les techniques de RT-PCR et de westerns blot permettront d'analyser les niveaux d'expression pour conclure sur l'effet indirect des micro-ARNs sur l'expression des gènes 15-LOXs.

Conclusion

Les gènes 15-LOXs codent pour des enzymes permettant la biosynthèse des médiateurs anti-inflammatoires et anti-cataboliques. Nos résultats démontrent que leur expression, au niveau de l'ARN et des protéines, diminue dans le cartilage arthrosique par rapport à celui sain. Cette diminution de l'expression de ces gènes protecteurs est associée à la dégradation du cartilage et à l'inflammation. Le traitement avec un agent déméthylant, AZA-DC, a entraîné une augmentation significative de l'expression de ces deux gènes dans les chondrocytes humains, issus du cartilage arthrosique et dans les cellules C28. Cependant nos résultats ont démontré que la diminution de l'expression des gènes 15-LOXs n'est pas due à une hyperméthylation de leurs promoteurs proximaux. Les sites CpG de ces promoteurs sont faiblement méthylés en général dans les cartilages arthrosiques et ne présentent pas de différence de méthylation entre les cartilages arthrosiques dégradés et non dégradés.

La diminution de l'expression du gène 15-LOX-1 pourrait s'expliquer par la modification post-traductionnelles des histones et le changement de l'expression des gènes des micro-ARNs. La désacétylation des histones et la déméthylation des lysines 4 des histones 3 (H3K4) inhiberaient l'expression des gènes 15-LOX-1 dans le cartilage arthrosique. Les modifications de l'expression des gènes micro-ARNs pourraient inhiber directement ou indirectement l'expression de ce gène.

La diminution de l'expression du gène 15-LOX-2 pourrait s'expliquer par une modification de l'expression des gènes des facteurs de transcription et des protéines des voies de signalisations régulant son expression. La diminution de la synthèse du facteur de transcription SP1, un activateur et l'augmentation de celle de SP3, un inhibiteur, pour expliquer, en partie, cette diminution. Le changement de l'expression des gènes des micro-ARNs pourrait inhiber directement ou indirectement l'expression du gène 15-LOX-2.

Références

1. Neogi T. The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2013;21(9):1145-53.
2. Bombardier C, Hawker G, Mosher D. The impact of arthritis in Canada: today and over the next 30 years. Toronto: Arthritis Alliance of Canada; 2011: 1–52.
3. Birtwhistle R, Morkem R, Peat G, Williamson T, Green ME, Khan S, et al. Prevalence and management of osteoarthritis in primary care: an epidemiologic cohort study from the Canadian Primary Care Sentinel Surveillance Network. *CMAJ open*. 2015;3(3):E270.
4. Plotnikoff R, Karunamuni N, Lytvyak E, Penfold C, Schopflocher D, Imayama I, et al. Osteoarthritis prevalence and modifiable factors: a population study. *BMC public health*. 2015;15(1):1.
5. Busija L, Bridgett L, Williams SR, Osborne RH, Buchbinder R, March L, et al. Osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24(6):757-68.
6. Michael JW-P, Schlüter-Brust KU, Eysel P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Deutsches Arzteblatt International*. 2010;107(9):152.
7. Johnson VL, Hunter DJ. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2014;28(1):5-15.
8. Harbo M, Bendix L, Bay-Jensen AC, Graakjaer J, Soe K, Andersen TL, et al. The distribution pattern of critically short telomeres in human osteoarthritic knees. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(1):R12.
9. Kuszel L, Trzeciak T, Richter M, Czarny-Ratajczak M. Osteoarthritis and telomere shortening. *J Appl Genet*. 2015;56(2):169-76.
10. Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(9):769-81.
11. Spector TD, MacGregor AJ. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12 Suppl A:S39-44.

12. Fernandez-Moreno M, Rego I, Carreira-Garcia V, Blanco FJ. Genetics in osteoarthritis. *Curr Genomics*. 2008;9(8):542-7.
13. Grazio S, Balen D. [Obesity: risk factor and predictor of osteoarthritis]. *Lijec Vjesn*. 2009;131(1-2):22-6.
14. Bao JP, Chen WP, Feng J, Hu PF, Shi ZL, Wu LD. Leptin plays a catabolic role on articular cartilage. *Mol Biol Rep*. 2010;37(7):3265-72.
15. Poonpet T, Honsawek S. Adipokines: Biomarkers for osteoarthritis? *World J Orthop*. 2014;5(3):319-27.
16. Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med*. 2010;26(3):355-69.
17. Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, Jordan KP. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(1):24-33.
18. Lohmander LS, Ostenberg A, Englund M, Roos H. High prevalence of knee osteoarthritis, pain, and functional limitations in female soccer players twelve years after anterior cruciate ligament injury. *Arthritis Rheum*. 2004;50(10):3145-52.
19. Brouwer G, Van Tol A, Bergink A, Belo J, Bernsen R, Reijman M, et al. Association between valgus and varus alignment and the development and progression of radiographic osteoarthritis of the knee. *Arthritis & Rheumatology*. 2007;56(4):1204-11.
20. McAlindon TE, Bannuru RR, Sullivan M, Arden N, Berenbaum F, Bierma-Zeinstra S, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*. 2014;22(3):363-88.
21. Mushtaq S, Choudhary R, Scanzello CR. Non-surgical treatment of osteoarthritis-related pain in the elderly. *Current reviews in musculoskeletal medicine*. 2011;4(3):113-22.
22. Howes LG. Selective COX-2 inhibitors, NSAIDs and cardiovascular events - is celecoxib the safest choice? *Ther Clin Risk Manag*. 2007;3(5):831-45.

23. Van Den Bekerom M, Rys B, Mulier M. Viscosupplementation in the hip: evaluation of hyaluronic acid formulations. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2008;128(3):275-80.
24. Haghshenas A, Anand P, Frieri M. Knee Osteoarthritis and Viscosupplementation: The Evolving Treatment Trend. *Journal of Nature and Science (JNSCI)*. 2016;2(4):190-192.
25. Katz JN, Earp BE, Gomoll AH. Surgical management of osteoarthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62(9):1220-8.
26. Burke J, Hunter M, Kolhe R, Isales C, Hamrick M, Fulzele S. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell based therapy for osteoarthritis. *Clinical and Translational Medicine*. 2016;5(1):27.
27. Drake R, Vogl AW, Mitchell AW, Tibbitts R, Richardson P. *Gray's Atlas of Anatomy E-Book*: Elsevier Health Sciences; 2014.
28. Fox AJS, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health: A Multidisciplinary Approach*. 2009;1(6):461-8.
29. Buckwalter JA, Mow VC, Ratcliffe A. Restoration of injured or degenerated articular cartilage. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 1994;2(4):192-201.
30. Janska A, Hodek J, Svoboda P, Zamecnik J, Prasil IT, Vlasakova E, et al. The choice of reference gene set for assessing gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) under low temperature and drought stress. *Mol Genet Genomics*. 2013;288(11):639-49.
31. Dudhia J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2005;62(19-20):2241-56.
32. Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instructional Course Lectures-American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2005;54:465.
33. Chevalier X, Richette P. Cartilage articulaire normale: anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement. *EMC-Rhumatologie-Orthopedie*. 2005;2(1):41-58.

34. Goldring S, Goldring M. Biology of the normal joint. Kelley's Textbook of Rheumatology, ED Harris Jr, RC Budd, MC Genovese et al, eds Philadelphia: Elsevier. 2005:1-34.
35. Edwards JC. Fibroblast biology Development and differentiation of synovial fibroblasts in arthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2000;2(5):1.
36. Nozawa-Inoue K, Amizuka N, Ikeda N, Suzuki A, Kawano Y, Maeda T. Synovial membrane in the temporomandibular joint-Its morphology, function and development. *Archives of histology and cytology*. 2003;66(4):289-306.
37. Schneider N, Lejeune J-P, Deby-Dupont G, Serteyn D, editors. Le rôle des synoviocytes dans l'articulation diarthrodiale enflammée. *Annales de Médecine Vétérinaire*; 2007: Université de Liège.
38. IWANAGA T, Shikichi M, KITAMURA H, YANASE H, NOZAWA-INOUE K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Archives of histology and cytology*. 2000;63(1):17-31.
39. Fam H, Bryant J, Kontopoulou M. Rheological properties of synovial fluids. *Biorheology*. 2007;44(2):59-74.
40. Li G, Yin J, Gao J, Cheng TS, Pavlos NJ, Zhang C, et al. Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis research & therapy*. 2013;15(6):1.
41. van der Kraan PM, van den Berg WB. Osteophytes: relevance and biology. *Osteoarthritis and cartilage*. 2007;15(3):237-44.
42. Mueller MB, Tuan RS. Anabolic/catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets. *PM&R*. 2011;3(6):S3-S11.
43. Martel-Pelletier J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2004;12 suppl A:31-3.
44. Heidari B. Knee osteoarthritis prevalence, risk factors, pathogenesis and features: Part I. *Caspian journal of internal medicine*. 2011;2(2):205.
45. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis & Rheumatism*. 2012;64(6):1697-707.

46. Aigner T, McKenna L. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2002;59(1):5-18.
47. Martel-Pelletier J, Welsch DJ, Pelletier J-P. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2001;15(5):805-29.
48. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier J-P, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2011;7(1):33-42.
49. Goldring MB, Berenbaum F. The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide. *Clinical orthopaedics and related research*. 2004;427:S37-S46.
50. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(3):1.
51. Gabay O, Hall DJ, Berenbaum F, Henrotin Y, Sanchez C. Osteoarthritis and obesity: experimental models. *Joint Bone Spine*. 2008;75(6):675-9.
52. Neuhold LA, Killar L, Zhao W, Sung M-LA, Warner L, Kulik J, et al. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(1):35-44.
53. Song RH, Tortorella M, Malfait AM, Alston JT, Yang Z, Arner EC, et al. Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis & Rheumatism*. 2007;56(2):575-85.
54. Verma P, Dalal K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: Key enzymes in osteoarthritis. *Journal of cellular biochemistry*. 2011;112(12):3507-14.
55. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma H-L, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature*. 2005;434(7033):644-8.
56. Goldring M, Otero M, Tsuchimochi K, Ijiri K, Li Y. Defining the roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008;67(Suppl 3):iii75-iii82.

57. Lepetsos P, Papavassiliou AG. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2016;1862(4):576-91.
58. Henrotin Y, Kurz B, Aigner T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis and Cartilage*. 2005;13(8):643-54.
59. Abramson SB. Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2008;16:S15-S20.
60. Alquezar-Planas DE, Mourier T, Bruhn CA, Hansen AJ, Vitcetz SN, Mork S, et al. Discovery of a divergent HPIV4 from respiratory secretions using second and third generation metagenomic sequencing. *Scientific reports*. 2013;3:2468. doi: 10.1038/srep02468.
61. Pelletier JP, Jovanovic DV, Lascau-Coman V, Fernandes JC, Manning PT, Connor JR, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis & Rheumatology*. 2000;43(6):1290-9.
62. Vuolteenaho K, Moilanen T, Knowles R, Moilanen E. The role of nitric oxide in osteoarthritis. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2007;36(4):247-58.
63. Greene ER, Huang S, Serhan CN, Panigrahy D. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2011;96(1):27-36.
64. Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem*. 2011;12(2):206-22.
65. Brock TG, Peters-Golden M. Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis. *The Scientific World Journal*. 2007;7:1273-84.
66. Chandrasekharan NV, Simmons DL. The cyclooxygenases. *Genome Biol*. 2004;5(9):241.
67. Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Reboul P, Pelletier J. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Annals of the rheumatic diseases*. 2003;62(6):501-9.
68. Bartels AL, Leenders KL. Cyclooxygenase and neuroinflammation in Parkinson's disease neurodegeneration. *Current neuropharmacology*. 2010;8(1):62-8.

69. Rizzo MT. Cyclooxygenase-2 in oncogenesis. *Clinica Chimica Acta*. 2011;412(9):671-87.
70. Cathcart MC, Gray SG, Baird AM, Boyle E, Gately K, Kay E, et al. Prostacyclin synthase expression and epigenetic regulation in nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2011;117(22):5121-32.
71. FitzGerald GA. COX-2 and beyond: approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003;2(11):879-90.
72. Alfranca A, Iñiguez MA, Fresno M, Redondo JM. Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: role in cardiovascular diseases. *Cardiovascular research*. 2006;70(3):446-56.
73. Laufer S. Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2003;15(5):623-7.
74. Hara S, Kamei D, Sasaki Y, Tanemoto A, Nakatani Y, Murakami M. Prostaglandin E synthases: understanding their pathophysiological roles through mouse genetic models. *Biochimie*. 2010;92(6):651-9.
75. Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson P-J. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacological reviews*. 2007;59(3):207-24.
76. Nakatani Y, Kudo I. Prostaglandin E2 synthases. *Nihon yakurigaku zasshi Folia pharmacologica Japonica*. 2002;120(6):373-8.
77. Zuo X, Shen L, Issa J-P, Moy O, Morris JS, Lippman SM, et al. 15-Lipoxygenase-1 transcriptional silencing by DNA methyltransferase-1 independently of DNA methylation. *The FASEB Journal*. 2008;22(6):1981-92.
78. Jakobsson P-J, Thorén S, Morgenstern R, Samuelsson B. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(13):7220-5.
79. Ouellet M, Falgoutyret J-P, Ear PH, Pen A, Mancini JA, Riendeau D, et al. Purification and characterization of recombinant microsomal prostaglandin E synthase-1. Protein expression and purification. 2002;26(3):489-95.

80. Egg D. Concentrations of prostaglandins D2, E2, F2 alpha, 6-keto-F1 alpha and thromboxane B2 in synovial fluid from patients with inflammatory joint disorders and osteoarthritis. *Zeitschrift fur Rheumatologie*. 1983;43(2):89-96.
81. Pulichino A-M, Rowland S, Wu T, Clark P, Xu D, Mathieu M-C, et al. Prostacyclin antagonism reduces pain and inflammation in rodent models of hyperalgesia and chronic arthritis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006;319(3):1043-50.
82. Caughey GE, Pouliot M, Cleland LG, James MJ. Regulation of tumor necrosis factor-alpha and IL-1 beta synthesis by thromboxane A2 in nonadherent human monocytes. *The journal of Immunology*. 1997;158(1):351-8.
83. Kühn H, Römisch I, Belkner J. The role of lipoxygenase-isoforms in atherogenesis. *Molecular nutrition & food research*. 2005;49(11):1014-29.
84. Chabane N, Zayed N, Benderdour M, Martel-Pelletier J, Pelletier J-P, Duval N, et al. Human articular chondrocytes express 15-lipoxygenase-1 and-2: potential role in osteoarthritis. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(2):1.
85. Chawengsub Y, Gauthier KM, Campbell WB. Role of arachidonic acid lipoxygenase metabolites in the regulation of vascular tone. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2009;297(2):H495-H507.
86. Yoshimoto T, Takahashi Y. Arachidonate 12-lipoxygenases. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2002;68:245-62.
87. Habouri L, El Mansouri FE, Ouhaddi Y, Lussier B, Pelletier J-P, Martel-Pelletier J, et al. Accelerated development of aging-associated and instability-induced osteoarthritis in 12/15-lipoxygenase deficient mice. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2017.
88. Dobrian AD, Lieb DC, Cole BK, Taylor-Fishwick DA, Chakrabarti SK, Nadler JL. Functional and pathological roles of the 12-and 15-lipoxygenases. *Progress in lipid research*. 2011;50(1):115-31.
89. Ferrante JV, Ferrante A. Cutting edge: novel role of lipoxygenases in the inflammatory response: promotion of TNF mRNA decay by 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid in a monocytic cell line. *The Journal of Immunology*. 2005;174(6):3169-72.

90. Ferrante JV, Huang ZH, Nandoskar M, Hii C, Robinson BS, Rathjen DA, et al. Altered responses of human macrophages to lipopolysaccharide by hydroperoxy eicosatetraenoic acid, hydroxy eicosatetraenoic acid, and arachidonic acid. Inhibition of tumor necrosis factor production. *Journal of Clinical Investigation*. 1997;99(6):1445.
91. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell*. 1998;93(2):229-40.
92. Shappell SB, Gupta RA, Manning S, Whitehead R, Boeglin WE, Schneider C, et al. 15S-hydroxyeicosatetraenoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor γ and inhibits proliferation in PC3 prostate carcinoma cells. *Cancer research*. 2001;61(2):497-503.
93. Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. Anti-inflammatory and pro-resolving lipid mediators. *Annual review of pathology*. 2008;3:279.
94. Keinan D, Leigh NJ, Nelson JW, De Oleo L, Baker OJ. Understanding resolvin signaling pathways to improve oral health. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(3):5501-18.
95. Hsi LC, Wilson LC, Eling TE. Opposing Effects of 15-Lipoxygenase-1 and-2 Metabolites on MAPK Signaling in Prostate ALTERATION IN PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR γ . *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(43):40549-56.
96. Chandrasekharan JA, Sharma-Walia N. Lipoxins: nature's way to resolve inflammation. *Journal of inflammation research*. 2015;8:181.
97. Visser AW, Ioan-Facsinay A, de Mutsert R, Widya RL, Loef M, de Roos A, et al. Adiposity and hand osteoarthritis: the Netherlands Epidemiology of Obesity study. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(1):R19.
98. Kelavkar UP, Cohen C, Kamitani H, Eling TE, Badr KF. Concordant induction of 15-lipoxygenase-1 and mutant p53 expression in human prostate adenocarcinoma: correlation with Gleason staging. *Carcinogenesis*. 2000;21(10):1777-87.

99. Liu C, Xu D, Han H, Fan Y, Schain F, Xu Z, et al. Transcriptional regulation of 15-lipoxygenase expression by histone h3 lysine 4 methylation/demethylation. *PLoS One*. 2012;7(12):e52703.
100. Krieg P, Marks F, Fürstenberger G. A gene cluster encoding human epidermis-type lipoxygenases at chromosome 17p13. 1: cloning, physical mapping, and expression. *Genomics*. 2001;73(3):323-30.
101. Brash AR, Boeglin WE, Chang MS. Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(12):6148-52.
102. Kilty I, Logan A, Vickers PJ. Differential characteristics of human 15-lipoxygenase isozymes and a novel splice variant of 15S-lipoxygenase. *European journal of biochemistry*. 1999;266(1):83-93.
103. Tang S, Bhatia B, Maldonado CJ, Yang P, Newman RA, Liu J, et al. Evidence that arachidonate 15-lipoxygenase 2 is a negative cell cycle regulator in normal prostate epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(18):16189-201.
104. Tang S, Bhatia B, Zhou J, Maldonado CJ, Chandra D, Kim E, et al. Evidence that Sp1 positively and Sp3 negatively regulate and androgen does not directly regulate functional tumor suppressor 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) gene expression in normal human prostate epithelial cells. *Oncogene*. 2004;23(41):6942-53.
105. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhatar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes & development*. 2009;23(7):781-3.
106. Smallwood SA, Kelsey G. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends in Genetics*. 2012;28(1):33-42.
107. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology*. 2010;28(10):1057-68.
108. Luger K, Hansen JC. Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Current opinion in structural biology*. 2005;15(2):188-96.
109. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997;389(6648):251-60.

110. Marks PA, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nature Reviews Cancer*. 2001;1(3):194-202.
111. Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature*. 2003;421(6921):448-53.
112. Loyola A, Almouzni G. Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*. 2004;1677(1):3-11.
113. Lusser A, Kadonaga JT. Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays*. 2003;25(12):1192-200.
114. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature reviews Genetics*. 2009;10(5):295.
115. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*. 2011;21(3):381.
116. Lacoste N, Côté J. Le code épigénétique des histones. *médecine/sciences*. 2003;19(10):955-9.
117. Eberharter A, Becker PB. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO reports*. 2002;3(3):224-9.
118. Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:75-100.
119. Bedford MT, Clarke SG. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Molecular cell*. 2009;33(1):1-13.
120. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. 2009;19(1):92-105.
121. Bohnsack MT, Czaplinski K, GÖRLICH D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna*. 2004;10(2):185-91.
122. Suh M-R, Lee Y, Kim JY, Kim S-K, Moon S-H, Lee JY, et al. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Developmental biology*. 2004;270(2):488-98.

123. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews cancer*. 2015;15(6):321-33.
124. Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *Journal of cellular physiology*. 2007;213(2):384-90.
125. Rottach A, Leonhardt H, Spada F. DNA methylation-mediated epigenetic control. *Journal of cellular biochemistry*. 2009;108(1):43-51.
126. Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh C-L, Zhang X, et al. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*. 2006;311(5759):395-8.
127. Zakhari S. Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol research: current reviews*. 2013;35(1):6.
128. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *nature*. 2009;462(7271):315-22.
129. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921.
130. Antequera F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2003;60(8):1647-58.
131. Roach H, Aigner T. DNA methylation in osteoarthritic chondrocytes: a new molecular target. *Osteoarthritis and cartilage*. 2007;15(2):128-37.
132. Fernandez AF, Assenov Y, Martin-Subero JI, Balint B, Siebert R, Taniguchi H, et al. A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome research*. 2012;22(2):407-19.
133. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature genetics*. 2007;39(4):457-66.
134. Laurent L, Wong E, Li G, Huynh T, Tsirigos A, Ong CT, et al. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome research*. 2010;20(3):320-31.
135. Fuks F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Current opinion in genetics & development*. 2005;15(5):490-5.

136. Esteller M, Parry L, Clarke AR. The roles of the methyl-CpG binding proteins in cancer. *Genes & cancer*. 2011;2(6):618-30.
137. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood*. 1999;93(12):4059-70.
138. Reynard LN, editor Analysis of genetics and DNA methylation in osteoarthritis: What have we learnt about the disease? *Seminars in cell & developmental biology*; 2017: Elsevier.
139. Bhutani N, Burns DM, Blau HM. DNA demethylation dynamics. *Cell*. 2011;146(6):866-72.
140. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis & Rheumatology*. 1986;29(8):1039-49.
141. Lopez JA, Bohuski E. Total RNA extraction with TRIZOL reagent and purification with QIAGEN RNeasy mini kit. DGC, Indiana University, Indiana USA. 2007.
142. Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet*. 2013;54(4):391-406.
143. Sodin-Semrl S, Taddeo B, Tseng D, Varga J, Fiore S. Lipoxin A4 inhibits IL-1 β -induced IL-6, IL-8, and matrix metalloproteinase-3 production in human synovial fibroblasts and enhances synthesis of tissue inhibitors of metalloproteinases. *The Journal of Immunology*. 2000;164(5):2660-6.
144. Zhang M, Wang J. Epigenetic regulation of gene expression in osteoarthritis. *Genes & Diseases*. 2015;2(1):69-75.
145. Hashimoto K, Otero M, Imagawa K, de Andrés MC, Coico JM, Roach HI, et al. Regulated transcription of human matrix metalloproteinase 13 (MMP13) and interleukin-1 β (IL1B) genes in chondrocytes depends on methylation of specific proximal promoter CpG sites. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(14):10061-72.
146. Takahashi A, de Andrés M, Hashimoto K, Itoi E, Oreffo R. Epigenetic regulation of interleukin-8, an inflammatory chemokine, in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2015;23(11):1946-54.

147. Jeffries MA, Donica M, Baker LW, Stevenson ME, Annan AC, Humphrey MB, et al. Genome-Wide DNA Methylation Study Identifies Significant Epigenomic Changes in Osteoarthritic Cartilage. *Arthritis & rheumatology*. 2014;66(10):2804-15.
148. Kelavkar U, Harya N, Hutzley J, Bacich D, Monzon F, Chandran U, et al. DNA methylation paradigm shift: 15-lipoxygenase-1 upregulation in prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer by atypical promoter hypermethylation. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2007;82(1):185-97.
149. O'Flaherty JT, Hu Y, Wooten RE, Horita DA, Samuel MP, Thomas MJ, et al. 15-lipoxygenase metabolites of docosahexaenoic acid inhibit prostate cancer cell proliferation and survival. *PloS one*. 2012;7(9):e45480.
150. Kamitani H, Taniura S, Ikawa H, Watanabe T, Kelavkar UP, Eling TE. Expression of 15-lipoxygenase-1 is regulated by histone acetylation in human colorectal carcinoma. *Carcinogenesis*. 2001;22(1):187-91.
151. Liu C, Xu D, Sjöberg J, Forsell P, Björkholm M, Claesson H-E. Transcriptional regulation of 15-lipoxygenase expression by promoter methylation. *Experimental cell research*. 2004;297(1):61-7.
152. Zuo X, Morris JS, Broaddus R, Shureiqi I. 15-LOX-1 transcription suppression through the NuRD complex in colon cancer cells. *Oncogene*. 2009;28(12):1496-505.
153. Yu X-M, Meng H-Y, Yuan X-L, Wang Y, Guo Q-Y, Peng J, et al. MicroRNAs' involvement in osteoarthritis and the prospects for treatments. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015;2015.
154. Yu C, Chen W, Wang X. MicroRNA in osteoarthritis. *Journal of International Medical Research*. 2011;39(1):1-9.
155. Zhang M, Lygrisse K, Wang J. Role of MicroRNA in Osteoarthritis. *Journal of arthritis*. 2017;6(2):1-12.
156. Miyaki S, Nakasa T, Otsuki S, Grogan SP, Higashiyama R, Inoue A, et al. MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. *Arthritis & Rheumatology*. 2009;60(9):2723-30.

157. Meng F, Zhang Z, Chen W, Huang G, He A, Hou C, et al. MicroRNA-320 regulates matrix metalloproteinase-13 expression in chondrogenesis and interleukin-1 β -induced chondrocyte responses. *Osteoarthritis and cartilage*. 2016;24(5):932-41.
158. Xu J, Liu Y, Deng M, Li J, Cai H, Meng Q, et al. MicroRNA221-3p modulates Ets-1 expression in synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis of temporomandibular joint. *Osteoarthritis and cartilage*. 2016;24(11):2003-11.
159. Akhtar N, Rasheed Z, Ramamurthy S, Anbazhagan AN, Voss FR, Haqqi TM. MicroRNA-27b regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis & Rheumatology*. 2010;62(5):1361-71.
160. Park SJ, Cheon EJ, Lee MH, Kim HA. MicroRNA-127-5p Regulates Matrix Metalloproteinase 13 Expression and Interleukin-1 β -Induced Catabolic Effects in Human Chondrocytes. *Arthritis & Rheumatology*. 2013;65(12):3141-52.
161. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(33):12481-6.
162. Akhtar N, Haqqi TM. MicroRNA-199a* regulates the expression of cyclooxygenase-2 in human chondrocytes. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012; 71(6):1073-80.
163. Zhang D, Cao X, Li J, Zhao G. MiR-210 inhibits NF- κ B signaling pathway by targeting DR6 in osteoarthritis. *Scientific reports*. 2015;5:12775.
164. Wang GD, Zhao XW, Zhang YG, Kong Y, Niu SS, Ma LF, et al. Effects of miR-145 on the inhibition of chondrocyte proliferation and fibrosis by targeting TNFRSF11B in human osteoarthritis. *Molecular medicine reports*. 2017;15(1):75-80.
165. Zhao Y, Bhattacharjee S, Jones BM, Hill J, Dua P, Lukiw WJ. Regulation of neurotropic signaling by the inducible, NF- κ B-sensitive miRNA-125b in Alzheimer's disease (AD) and in primary human neuronal-glia (HNG) cells. *Molecular neurobiology*. 2014;50(1):97-106.
166. Subbarayan V, Krieg P, Hsi L, Kim J, Yang P, Sabichi A, et al. 15-lipoxygenase-2 gene regulation by its product 15-(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid through a negative

- feedback mechanism that involves peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Oncogene*. 2006;25(44):6015-25.
167. Mondanizadeh M, Arefian E, Mosayebi G, Saidijam M, Khansarinejad B, Hashemi SM. MicroRNA-124 regulates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells by targeting Sp1 mRNA. *Journal of cellular biochemistry*. 2015;116(6):943-53.
 168. Safe S. MicroRNA-specificity protein (Sp) transcription factor interactions and significance in carcinogenesis. *Current pharmacology reports*. 2015;1(2):73-8.
 169. Mirzamohammadi F, Papaioannou G, Kobayashi T. MicroRNAs in cartilage development, homeostasis, and disease. *Current osteoporosis reports*. 2014;12(4):410-9.
 170. Chabane N, Li X, Fahmi H. HDAC4 contributes to IL-1-induced mPGES-1 expression in human synovial fibroblasts through up-regulation of Egr-1 transcriptional activity. *Journal of cellular biochemistry*. 2009;106(3):453-63.
 171. Swingler TE, Wheeler G, Carmont V, Elliott HR, Barter MJ, Abu-Elmagd M, et al. The expression and function of microRNAs in chondrogenesis and osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 2012;64(6):1909-19.
 172. Debernardi S, Dixon-McIver A. MicroRNA detection in bone marrow cells by LNA-FISH. *MicroRNAs and the Immune System: Methods and Protocols*. 2010:33-45.
 173. Kopańska M, Szala D, Czech J, Gabło N, Gargas K, Trzeciak M, et al. MiRNA expression in the cartilage of patients with osteoarthritis. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 2017;12(1):51.
 174. Matsukawa T, Sakai T, Yonezawa T, Hiraiwa H, Hamada T, Nakashima M, et al. MicroRNA-125b regulates the expression of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis research & therapy*. 2013;15(1):R28.

Annexe 1: Tableau VII: Taux de méthylation des sites CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-1

positions des sites CpG	-443	-441	-439	-437	-427	-409	-407	-403	-354	-343	-298	-281	-272	-243	-211	-200	-136	-127	-97	-87	-80	-72	-45	-19	+13	+19	+21	+38	+48	
Echantillons																														
ADNg 7133D	71	65	60	43	46	37	41	27	42	12	10	14	18	22	22	11	6	10	14	6	6	2	9	7	36	33	16	48	27	
ADNg 7133ND	70	61	58	42	44	34	34	26	30	9	9	12	15	27	30	14	9	6	19	6	7	4	13	12	13	10	4	24	14	
ADNg 7134D	64	68	65	46	43	32	35	33	46	12	10	12	11	22	23	10	4	6	3	5	2	2	11	16	10	8	4	16	8	
ADNg 7134ND	56	59	61	39	41	27	29	26	57	8	9	14	13	25	27	11	5	5	17	6	5	3	10	12	6	5	2	13	7	
ADNg 7175D	62	57	54	35	39	31	33	26	34	7	12	11	14	29	30	12	6	6	21	6	6	4	14	11	8	7	3	17	8	
ADNg 7175ND	74	63	64	44	36	24	31	29	40	8	6	10	14	28	29	9	5	4	17	6	5	3	12	12	8	6	2	15	8	
ADNg 7132D	66	53	62	45	47	28	31	27	85	18	11	12	16	20	17	12	6	6	18	7	6	3	15	13	17	12	5	35	15	
ADNg 7132ND	70	56	56	54	43	30	37	29	57	11	17	20	18	23	33	21	11	9	22	6	11	3	32	18	13	9	3	24	11	
ADNg 7169D	69	59	60	47	45	27	32	28	41	10	11	12	21	20	17	11	6	7	17	6	6	3	22	18	8	5	2	13	6	
ADNg 7169ND	67	53	59	35	42	32	28	19	45	9	15	29	22	38	48	38	24	6	16	12	24	12	12	14	30	31	13	42	24	
ADNg 7135D	67	69	69	50	49	35	35	33	68	13	15	22	20	35	41	22	6	8	15	5	5	3	26	16	20	13	5	32	13	
ADNg 7143D	68	58	65	48	42	34	31	34	30	11	11	17	12	36	30	14	6	15	13	5	6	3	11	13	36	33	15	48	25	
ADNg 7171ND	64	51	60	45	31	18	17	21	20	9	8	10	15	20	12	15	5	5	18	7	6	3	12	16	37	36	16	44	26	
ADNg 7163D	63	57	53	38	33	19	23	18	20	6	11	12	18	19	17	12	6	5	16	4	4	2	11	10	6	6	2	12	7	
ADNg 7179D	53	40	49	23	26	18	19	17	18	6	11	12	15	16	17	9	4	6	14	6	5	3	12	14	22	11	4	23	13	
ADNg 7181D	57	51	54	36	34	21	27	20	26	5	7	12	9	18	16	12	5	3	17	7	6	4	9	15	13	8	3	21	10	
ADNg 7215ND	66	68	56	54	60	16	27	25	62	18	13	26	30	52	56	33	4	10	22	6	7	4	13	24	7	7	3	16	8	
ADNg 7223ND	60	57	56	35	37	22	30	23	36	9	11	12	9	15	69	14	5	4	21	7	5	3	5	11	19	9	1	23	9	
ADNg 7224ND	74	57	65	49	42	26	32	28	47	10	9	16	13	21	21	19	10	5	16	6	6	2	10	10	10	9	4	11	8	
ADNg 7233D	75	61	67	56	58	37	43	31	20	11	13	14	17	21	21	17	4	5	10	3	4	2	6	13	6	5	2	8	5	

**Annexe 2 : Tableau VIII : Taux de méthylation des sites
CpG du promoteur proximal du gène 15-LOX-2**

Positions du site CpG	-212	-198	-177	-161	-156	-146	-136	-132	-68	-48	-31	-28
Échantillons												
7132D	13	27	13	24	10	16	9	6	18	24	21	10
7132N	14	38	20	44	16	27	12	13	27	32	22	12
7133D	13	28	14	26	12	16	10	6	19	26	19	12
7133N	12	27	12	26	12	15	11	4	16	23	15	9
7175D	13	27	14	28	11	19	11	7	24	28	19	10
7175N	13	29	15	27	13	19	11	6	21	25	18	9
7134D	12	22	11	20	9	13	8	6	18	23	15	10
7134N	11	29	11	20	10	12	7	5	18	25	16	9
7169D	13	34	13	22	12	16	8	6	20	26	20	10
7169N	13	37	16	37	12	18	10	8	18	33	22	8
7143D	16	38	22	35	13	19	14	12	18	34	19	7
7163D	9	28	4	17	12	12	3	3	14	24	13	7
7215N	9	35	10	25	11	14	7	12	22	27	17	6
7135D	17	42	8	37	23	21	6	9	24	49	25	12
7171N	16	43	8	28	17	17	5	7	16	34	21	8
7179D	8	26	4	14	9	10	3	3	15	22	14	8
7181D	10	27	5	21	12	13	3	4	17	28	17	7
7223N	13	32	9	22	13	12	5	5	14	22	16	8
7224N	19	20	9	23	12	10	2	2	17	20	15	9
7233D	10	25	4	15	11	9	3	2	15	21	12	8