

Université de Montréal

Le rôle de la leptine dans le métabolisme anormal des ostéoblastes de patients atteints d'ostéoarthrose

PAR:

**Marie Solange Mutabaruka
Département de Biochimie
Centre de Recherche CHUM Notre-Dame
Faculté de Médecine**

**Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de M.Sc en Biochimie**

Décembre 2008

**© Marie Solange Mutabaruka, 2008. Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales**

**Ce mémoire intitulé:
Le rôle de la leptine dans le métabolisme anormal des ostéoblastes de
patients atteints d'ostéoarthrose**

**Présenté par:
Marie Solange Mutabaruka**

A été évalué par le jury composé des personnes suivantes

**Dr Alain Moreau
Président-rapporteur**

**Dr Daniel Lajeunesse
Directeur de recherche**

**Dr Nikolaus Heveker
Membre du jury**

RÉSUMÉ

L'ostéoarthrose (OA) est une pathologie qui touche les articulations principalement chez les personnes âgées. Il devient capital de mieux cerner cette pathologie à cause des coûts économiques qu'elle engendre mais surtout à cause du vieillissement de la population. Cette maladie se caractérise par une dégradation du cartilage articulaire, une sclérose osseuse, une inflammation de la membrane synoviale ainsi que la présence d'ostéophytes. L'étiologie de cette pathologie est restée nébuleuse car la recherche sur la maladie touchait principalement le cartilage articulaire. Toutefois, le rôle clé de l'os sous-chondral dans l'OA est maintenant reconnu. L'obésité étant un facteur de risque de l'OA, nous avons émis l'hypothèse que la leptine, une adipocytokine clé dans l'obésité, joue un rôle important dans l'OA. En effet, la leptine modifie le phénotype des ostéoblastes (Ob) normaux humain et puisque les Ob OA humains ont un phénotype altéré, notre objectif était de déterminer le rôle potentiel de la leptine dans ces cellules.

Pour ce faire, nous avons préparé des cultures primaires d'Ob issus de la plaque sous-chondral du plateau tibial de patients OA et d'individus normaux (N). L'expression de la leptine et de son récepteur actif (OB-Rb) ont été mesurées par RT-PCR en temps réel, et leur production a été mesurée par ELISA et immunobuvardage (IB). La prolifération des Ob OA a été déterminée par incorporation de BrdU. La phosphorylation de p42/44 MAPK dans les Ob OA a été déterminée par IB. Le phénotype des Ob fut déterminé par la mesure de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) et la sécrétion d'ostéocalcine (OC), en présence ou non de leptine. De plus, les effets des ARNs d'interférences (SiRNA) anti-leptine et anti OB-Rb sur le phénotype des Ob OA furent déterminés via leur impact sur l'activité de l'ALP et sur la sécrétion d'OC. L'effet dose-réponse de la leptine sur les expressions d'OB-Rb, du facteur de croissance TGF- β 1 ou encore sur sa propre expression furent déterminées par RT-PCR en temps réel. Pour terminer, la signalisation de la leptine a été étudiée en évaluant l'effet dose réponse de celle-ci sur la production des protéines JAK2 et STAT3 phosphorylées par IB.

Les résultats obtenus ont montrés que les Ob OA expriment et produisent plus de leptine que les Ob N. Au niveau phénotypique, ces Ob OA possèdent une activité de l'ALP ainsi qu'une sécrétion d'OC plus importante que celles observées chez les Ob N. L'ajout d'anticorps inactivant l'interaction leptine et OB-Rb ou d'inhibiteurs chimiques comme tyrphostin ou piceatannol diminuèrent l'activité de l'ALP ainsi que la sécrétion d'OC dans les Ob OA. Par contre, l'ajout de leptine exogène aux Ob OA augmenta l'activité de l'ALP sans pour autant faire varier la sécrétion d'OC. La leptine à des doses de 1ng/ml à 10mg/ml stimula la prolifération des Ob OA ainsi que la phosphorylation de p42/44 MAPK. La leptine exogène diminua l'expression de TGF- β 1 tandis qu'elle stimula la phosphorylation de JAK2 et STAT3 ou encore sa propre expression de manière dose-dépendante. Cependant, l'expression d'OB-Rb diminua de manière dose-dépendante. Enfin, le traitement des Ob OA avec des Si leptine ou Si OB-Rb diminua l'activité d'ALP, la sécrétion d'OC, l'expression de la leptine, l'expression d'OB-RB ainsi que l'expression du facteur TGF- β 1.

L'ensemble de ces données démontre que la leptine endogène des Ob OA est sous contrôle des facteurs de croissance et qu'elle contribue à maintenir le phénotype anormal de l'os sous-chondral OA. De plus, ceci suggère que la leptine serait un acteur important dans la régulation du remodelage osseux.

Mots clés :

Ostéoarthrose, arthrose, leptine, ostéoblaste, phosphatase alcaline, ostéocalcine, siRNA, os sous-chondral, prolifération cellulaire, signalisation.

SUMMARY

Osteoarthritis (OA) is a disease which mainly affects the joints in the elderly. It becomes essential to better understand this disease because of the economic costs it brings, but mainly because of population aging. This disease is characterized by a deterioration of cartilage, bone sclerosis, inflammation of the synovial membrane and the presence of osteophytes. The knowledge of its etiology has remained incomplete because research on this disease focused mainly on the articular cartilage. However, the key role of subchondral bone in OA is now recognized. Obesity is a risk factor for OA, then we hypothesized that leptin, a key adipocytokine in obesity plays an important role in OA. Indeed, leptin alters the phenotype of osteoblasts (Ob) and human Ob has altered phenotype in OA patients, our objective was to determine the potential role of leptin in OA Ob.

To do this, we prepared primary cultures of Ob from the sub-chondral plate of the tibial plateaus of OA patients and normal individuals (N). The expression of leptin and its receptor active (OB-Rb) were measured by RT-PCR in real time, and their production was measured by ELISA and western blot (WB). The proliferation of Ob OA was determined by BrdU incorporation. The phosphorylation of p42/44 MAPK was evaluated by WB. The phenotype of Ob was determined by measuring the activity of alkaline phosphatase (ALP) and the secretion of osteocalcin (OC), in the presence or absence of leptin. Moreover, the effects of small interference RNAs (siRNAs) anti-leptin and anti OB-Rb on the phenotype of OA Ob were determined through their impact on the activity of the ALP and the secretion of OC. The dose-response effect of leptin on its own expression or the expressions of OB-Rb, the growth factor TGF- β 1 were determined by RT-PCR in real time. Finally, signalisation of leptin in OA Ob was studied by evaluating the dose-response effect of this on the production of JAK2 and STAT3 protein phosphorylated by WB.

The results showed that the OA Ob express and produce more leptin than N. Moreover, these Ob OA have an activity of the ALP and a secretion OC higher than those observed in N Ob. The addition of antibodies inactivating interaction leptin and OB-Rb or chemical inhibitors such as tyrphostin or piceatannol diminished the activity of the ALP and

the secretion of OC in OA Ob against by the addition of exogenous leptin to Ob OA increased the activity of the ALP without influencing the secretion of OC.

Leptin at doses of 1ng/ml to 10mg/mL stimulated the proliferation of OA Ob and the phosphorylation of p42/44 MAPK. Exogenous leptin decreased the expression of TGF- β 1 while it stimulated the phosphorylation of JAK2 and STAT3 and expression of its own in dose-dependent manner. However, the expression of OB-Rb decreased in dose-dependent. Finally, the treatment of OA Ob with Si leptin or Si OB-Rb decreased activity of ALP, the secretion of OC, the leptin expression, expression of OB-Rb and the expression of TGF- β 1 factor.

All these data show that endogenous leptin Ob OA controls the growth factors and contributes to maintaining the abnormal phenotype of the subchondral bone OA. Moreover, this suggests that leptin is an important player in the regulation of bone remodelling

Tags:

Osteoarthritis, arthritis, leptin, osteoblasts, alkaline phosphatase, osteocalcin, siRNA, subchondral bone, cell proliferation, leptin signalisation

TABLE DES MATIÈRES

PAGES TITRES.....	1
RÉSUMÉ.....	3
SUMMARY.....	5
TABLE DES MATIÈRES	7
DÉDICACE.....	10
REMERCIEMENTS	11
LISTE DES FIGURES.....	12
A. INTRODUCTION.....	16
1. L'ostéoarthrose.....	18
1.1. La pathologie.....	20
1.2. L'épidémiologie.....	24
1.3. Les facteurs de risque.....	24
1.3.1. L'âge.....	24
1.3.2. L'obésité.....	25
1.3.3. L'activité professionnelle et physique.....	26
1.3.4. Les facteurs génétiques.....	27
2. Le cartilage normal.....	29
2.1. La matrice extracellulaire.....	29
2.2. Le cartilage ostéoarthrosique.....	32
3. Le tissu osseux.....	33
3.1. L'os cortical ou compact.....	34

	8
3.2. L'os trabéculaire	35
3.3. La matrice osseuse.....	38
3.3.1. L'ostéoblaste.....	38
3.3.2. L'ostéoclaste	40
3.4. Le remodelage osseux.....	43
3.5. La régulation du remodelage osseux.....	47
3.5.1. La phosphatase alcaline.....	47
3.5.2. L'ostéocalcine.....	48
3.5.3. La Vitamine D.....	49
3.5.4. La parathormone (PTH)	53
3.6. Les facteurs de croissance.....	54
3.6.1. Le TGF- β 1.....	54
3.6.2. L'IGF-1	57
4. Le tissu osseux arthrosique	59
4.1. L'os sous-chondral ostéoarthrosique	59
4.2. La biochimie de l'os sous-chondral	60
5. La leptine.....	62
5.1. La leptine et sa signalisation	62
5.2. La leptine systémique vs la leptine locale dans l'os	67
5.3. La leptine dans l'OA.....	69
6. Les approches thérapeutiques de l'OA	70
7. L'hypothèse de recherche	72

B. MANUSCRIT :

**LOCAL LEPTIN PRODUCTION IN OSTEOARTHRITIS SUBCHONDRAL
OSTEOBLASTS MAY BE RESPONSIBLE FOR THEIR ABNORMAL
PHENOTYPIC EXPRESSION.....72**

C. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES115

D. DISCUSSION..... 120

E. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....137

F. RÉFÉRENCES.....140

DÉDICACE

« Nos désirs sont les
pressentiments des
possibilités qui nous
habitent » **Goethe**

« Ce mémoire est dédié à toute la
famille Mutabaruka du Zimbabwe
en passant par le Congo, Guelph et
Montréal. Je vous aime et merci
pour votre support ainsi que vos
encouragements. Je le dédie
également à Dominique, Valérie et
Charlotte »

REMERCIEMENTS

Je remercie le bon Dieu pour sa protection, guidance et surtout sans qui je ne serais pas présente en ce moment.

Maman, Papa, Clarissa, Éric et Diane, je vous remercie pour votre amour inconditionnel, votre écoute, support moral et financier, ainsi que vos nombreux encouragements malgré la distance qui nous sépare.

Je suis très reconnaissante envers le Dr Lajeunesse pour m'avoir initié à la recherche durant mon stage et de m'avoir donné la piqûre des sciences fondamentales ainsi que de m'avoir permis de poursuivre mes études supérieures au sein de son laboratoire. Daniel, merci pour votre grande patience et disponibilité malgré un agenda chargé, votre compréhension, et d'avoir partagé votre passion de la recherche avec moi et surtout de m'avoir accordé votre confiance. Durant ce voyage de 2 ans qui était parfois parsemé de moments de doutes et d'incertitudes, vous avez su toujours me ramener dans le droit chemin et vos enseignements ont été et restent très utiles autant dans mon cheminement académique que personnel. J'espère bénéficier de votre mentorat pour la suite de ma carrière.

Un merci particulier au Dr Reboul Pascal pour sa disponibilité, son objectivité, ses nombreux conseils, ses nombreuses corrections et son humour des plus corrosifs que je connaisse mais qui m'a fait tant sourire.

Aux membres du laboratoire, un grand merci à Mme Aline Delalandre pour sa gentillesse, son accueil au sein du labo, sa disponibilité pour la réalisation de certaines expériences, ainsi que ses nombreux conseils techniques et personnels.

Merci au Dr Couchourel Denis pour les nombreux conseils et discussions scientifiques, pour sa complicité, son humour ainsi que pour sa grande disponibilité.

Merci à Thomas pour les matchs de foot, les discussions en culture générale et scientifiques.

Merci à Mohamed Aissa pour sa participation à certains résultats de l'article.

Je tiens à remercier le personnel de l'Unité de Recherche en Arthrose pour de nombreux services rendus, que ce soit pour la résolution des problèmes techniques, théoriques ou personnels. Aussi pour de nombreux moments privilégiés passés avec eux. Un merci particulier à David Ham, Changshan, François Mineau, Judith, Dr Tardif Ginette et Nathalie.

Merci beaucoup aux secrétaires Santa et Virginia pour avoir été tout le temps serviables, à l'écoute et surtout pour ces excellentes conversations à propos du quotidien et les fous rires. Merci à Serge qui a su égayer mes longues soirées au labo ainsi qu'à Christine pour les fous rires, sa complicité et ses conseils esthétiques.

Je remercie Dr Johanne Martel-Pelletier et Dr Jean-Pierre Pelletier pour leur accueil au sein de leur unité de recherche en arthrose et sans qui tout ceci n'aurait pu se réaliser. Un merci particulier à Dr Jean-Pierre pour sa disponibilité.

Les derniers mais non les moindres, je remercie énormément mes sœurs en amitié Dom, Valou et Lolotte pour leur soutien sans limite, leur amitié, leur écoute, leur présence dans ma vie dans les moments drôles et moins faciles mais surtout pour leurs nombreux conseils dans toutes les sphères de ma vie.

LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

Figure 1 : Le genou arthrosique	22
Figure 2 : La structure du cartilage.....	29
Figure 3 : L'os compact vs l'os trabéculaire.....	35
Figure 4 : Les différents types des cellules osseuses.....	40
Figure 5 : Le remodelage osseux.....	44
Figure 6 : Le métabolisme de la vitamine D ₃	50
Figure 7 : La structure de la leptine et de ses récepteurs.....	62
Figure 8 : La signalisation de la leptine.....	64
Figure 9 : L'hypothèse de recherché.....	71
Figure 10: Le modèle proposé.....	138

MANUSCRIT :

Figure 1: Expression of leptin mRNA in OA osteoblasts and chondrocytes by real-time RT-PCR.....	102
Figure 2: Modulation of the expression of leptin mRNA in OA osteoblasts by real-time RT-PCR.....	103
Figure 3: Release of leptin by normal and OA osteoblasts.....	104
Figure 4: Production of leptin receptors (OB-Rb) mRNA in normal and OA osteoblasts.....	105
Figure 5: Cellular proliferation of OA osteoblasts in response to leptin.....	106

Figure 6: Modulation of alkaline phosphatase, osteocalcin and collagen type 1 in OA Ob by inactivating leptin signalling.....108

Figure 7: Modulation of TGF- β 1 production in OA Ob by blocking leptin signalling..... 114

Résultats supplémentaires:

Figure S1: L'effet d'une courbe dose réponse leptine sur l'expression du facteur TGF- β 1 dans des cellules Ob OA..... 116

Figure S2: L'effet d'une courbe dose réponse leptine sur la production des protéines Stat 3 et Jak 2 dans des cellules Ob OA..... 117

TABLEAU I : L'ÉPIDÉMIOLOGIE GÉNÉTIQUE DE L'OA..... 29

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACLT	Section du ligament antérieur croisé
AGRP	Agouti related peptide
ALP	Phosphatase alcaline
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	Adénosine triphosphate
BMPs	Bone morphogenetic proteins
BMU	Unité multicellulaire de base
CART	Transcrit régulé par la cocaïne et les amphétamines
CFU-GM	Granulocyte and macrophages colony forming cells
Coll-1	Collagène de type I
Cry	Cryptochrome
DBP	vitamin D binding protein
ER α	Récepteurs d'oestrogènes
FGFs	Fibroblasts growth factors
FN	Fibronectine
HGF	Hepatocyte growth factor
IGF-1	Insuline like growth factor 1
IGFB-P	Insulin like growth factor binding protein
IL-1	Interleukine -1
IL-6	Interleukine -6
IMC	Indice de masse corporelle
IP3	Inositol triphosphate
JAK	Janus Kinase
Lep	Leptine
M-CSF-1	Macrophage Colony Stimulating Factor-1
ME	Matrice extracellulaire
MEC	Matrice extracellulaire du cartilage
MMPs	Métalloprotéinases

MNX	Meniscetomie
NMU	Neuromedin U
NO	Oxide d'azote
NPY	Neuropeptide Y
OA	Ostéoarthrose
Ob	Ostéoblastes
OB-Ra	Isoforme court du récepteur de la leptine
OB-Rb	Isoforme long du récepteur de la leptine
OC	Ostéocalcine
OPG	Ostéoprogérine
Per	Period
POMC	Pro-opiomélanocortine
PNP	p-Nitrophénol
PNPP	p-Nitrophényle phosphate
PTH	Hormone parathyroïdienne
PTHrP	Parathyroïd hormone related peptide)
PTN	Pléiotrophine
PTP1B	Protein tyrosine phosphatasase 1B
RANKL	Ligand of receptor activator of nuclear factor–kappa
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
SARA	SMAD-anchored for receptor activation
SCN	Système nerveux central
SF	Liquide synovial
SMADs	Mothers againsts decapentaplegic homolog
SOCS	Suppressors of cytokine signalling
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TGF- β 1	Transforming growth factor bêta 1
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
VDR	Récepteur de la vitamine D
Wnt	Wingless integration site

A. Introduction

L'arthrite (du grec « arth » qui signifie articulation et « itis » qui signifie inflammation) est une maladie qui englobe une centaine d'affections différentes, allant des formes peu sévères, comme la tendinite et la bursite, aux formes systémiques invalidantes, comme l'arthrite rhumatoïde. Elle comprend aussi des syndromes douloureux comme la fibromyalgie et certaines affections associées à l'arthrite, comme le lupus érythémateux disséminé qui s'attaque à tout l'organisme. Il en existe également des formes rarement associées à l'arthrite comme la goutte et on retrouve d'autres formes plus connues comme l'ostéoarthrose (OA). L'arthrite implique l'inflammation des articulations. Quant à l'OA, elle fait souvent référence à une affection des personnes âgées puisque son incidence augmente fortement avec l'âge. En effet, sa prévalence augmente avant l'âge de 50 ans chez les sujets mâles tandis que chez les sujets femmes, elle augmente au-delà de cet âge. En Amérique du Nord, des millions de personnes souffrent de ces affections et quasiment 80% des personnes de plus de 50 ans en sont atteintes sous une forme ou une autre (Société d'arthrite Canada).

Les parties du corps les plus souvent atteintes sont les mains et les articulations ayant à supporter le poids corporel, tels que les genoux, les hanches et la colonne vertébrale. Le corps humain compte 206 os reliés par plus de 100 articulations. Les articulations du corps humain ont pour rôle de permettre la mobilité de ce dernier. Il existe plusieurs types d'articulations qui sont classifiés selon leur fonction respectives: l'énarthrose (hanches et épaules), l'articulation en selle (qui joint le pouce à la main), l'articulation à charnière (doigts et genoux) ou l'articulation trochoïde (poignets). Ces derniers sont maintenus en place par les ligaments, tandis que les os constituant l'articulation sont recouverts à leurs extrémités par le cartilage. Cette substance élastique et résistante joue le rôle d'amortisseur contre les chocs et permet d'optimiser le glissement des extrémités osseuses l'une sur l'autre. Lors de l'ostéoarthrose, le rôle du cartilage en tant qu'amortisseur est amoindri par sa dégradation ainsi donc les os peuvent frotter les uns contre les autres dans les cas les plus sévères. Par conséquent, ce mauvais fonctionnement du cartilage articulaire entraîne l'apparition de douleurs, la déformation et le dysfonctionnement articulaire jusqu'à la perte de mobilité (Société d'arthrite du Canada).

La cavité articulaire sépare les os de l'articulation afin de leur permettre de se mouvoir. Cette cavité articulaire est retenue dans une cloison à la fois souple et suffisamment solide pour empêcher l'articulation de se disloquer. Dans la quasi-totalité des formes d'arthrite, on remarque de l'inflammation, l'épaississement de la membrane synoviale ainsi qu'une sécrétion excessive de liquide synovial contenant des cellules inflammatoires. Cette inflammation de la membrane synoviale et du liquide synovial serait à l'origine de la détérioration du cartilage articulaire et de l'os dans l'arthrite rhumatoïde (Société d'arthrite du Canada).

1. L'ostéoarthrose

L'ostéoarthrose est une maladie qui affecte l'articulation entière. Celle-ci comprend le cartilage articulaire, l'os sous-chondral, les structures intraarticulaires, le liquide synovial, la membrane synoviale, les tendons, les ligaments, les muscles et fascia ainsi que le tissu nerveux. (Radin E.L. et al, 1991; Altman R.D. et al, 2004). La définition de cette pathologie telle qu'on la connaît de nos jours est née en 1910 grâce à Archibard E. Garrod et Edward Merins. Ces pionniers définissent l'ostéoarthrose comme :« un ensemble de changements morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques au niveau des cellules et de la matrice constituant l'articulation, menant ainsi à l'affaiblissement, la fibrillation, l'ulcération, la perte du cartilage, la sclérose et l'éburnation de l'os sous-chondral, l'apparition d'ostéophytes et de cyste de l'os sous-chondral ». Cette pathologie est donc étroitement liée à la surcharge mécanique autant qu'aux changements biochimiques subis par l'articulation.

La surcharge pondérale résultant de l'obésité entraîne un stress mécanique que subit le cartilage articulaire ainsi que l'os sous-chondral. Il existe plusieurs types de stress affectant ces tissus, parmi lesquels on retrouve le stress mécanique de compression, la pression hydrostatique, le stress d'étirement et la torsion tissulaire. Ce stress biomécanique est perçu par le cartilage sous forme de magnitude, de fréquence et en fonction du temps. La surcharge pondérale semble inhiber la synthèse de la matrice extracellulaire du cartilage tout en activant les gènes pro-inflammatoires. Ainsi, cette surcharge a un effet dégénératif sur le cartilage articulaire. Quant aux forces de torsion, elles semblent agir en tant que signal

protecteur en diminuant l'expression des médiateurs cataboliques. Il faut noter que le comportement du cartilage face aux contraintes biomécaniques dépend essentiellement de la qualité de l'os sous-chondral (Gabay O. et al, 2008).

Or, le bon fonctionnement des ostéoblastes de cet os dépend de plusieurs molécules dont la production est contrôlée mécaniquement. En effet, il semble que les ostéoblastes possèdent des senseurs mécaniques qui activent les signaux intracellulaires. Ainsi, les tensions cycliques sont des activateurs d'une cascade de signalisation formée par Erk/c-Fos/NF- κ B. De plus, les forces d'étirement augmentent la production de plusieurs facteurs de croissance (VEGF, TGF- β) ou encore de molécules comme la phosphatase alcaline (ALP), l'ostéocalcine, ostéoprotégénin (OPG) et plusieurs métalloprotéinases (MMPs). Pour terminer, les expériences mimant les forces de compression lors de locomotion, ont montré que de grandes forces de compression entraînent une hausse de la sécrétion des prostaglandines par les ostéoblastes (Gabay O. et al, 2008). Une légère douleur articulaire le matin au lever ou douleurs et raideurs après avoir adopté une position assise ou couchée pendant un long moment sont des signes de l'ostéoarthrose (Martin J.A. et al, 2004; Buckwalter J.A. et al, 1997; Patwari P. et al, 2001; Martel-Pelletier J. et al, 1999) (Figure 1).

L'OA se classe en deux groupes : primaire (type I) et secondaire (type II), dépendamment si son apparition est attribuée à des facteurs biomécaniques et/ou biologiques. Dans la catégorie primaire, la dégénérescence de l'articulation est étroitement reliée à l'âge des patients, toutefois ces malades ne présentent aucune prédisposition héréditaires apparentes. Dans ce premier cas de figure, c'est l'accumulation de pressions et de mobilisations des articulations au cours des décades qui a mené de manière progressive et lente à un processus dégénératif de la matrice de collagène servant de support au cartilage. Par ailleurs, la destruction de la matrice extracellulaire du cartilage résulte de l'action de plusieurs protéinases (Société d'arthrite du Canada).

Dans la deuxième catégorie de malades OA, la douleur résulte d'un traumatisme de l'articulation dans certains cas suite à un ligament déchiré ou encore d'autres types de

blessures accidentelles ou sportives. De plus, ces douleurs augmentent avec l'activité physique et diminuent au repos de l'articulation douloureuse selon le type d'articulation touchée (genoux et/ou hanche). La mobilité du sujet est pénible ou quasiment compromise. L'atteinte des articulations de la colonne vertébrale, qui est très commune, produit une compression des nerfs et des vaisseaux sanguins, provoquant de la douleur mais également une vascularisation insuffisante (Société d'arthrite du Canada).

1.1. La pathologie

L'OA est une maladie invalidante, très douloureuse et qui limite la mobilité des patients qui en sont atteints, tout en affectant leur système musculo-squelettique (Creamer P. 2000). Les analyses anatomiques, les applications histopathologiques ainsi que les techniques émergentes d'imagerie médicales ont permis de définir l'OA comme une maladie étroitement associée aux changements structuraux au niveau du cartilage. Or, il a été clairement démontré que cette pathologie n'est pas exclusivement relié au cartilage puisque d'autres composantes de l'articulation sont touchées (Brandt et al, 2006). Parmi ces composantes, on retrouve la membrane synoviale ainsi que l'os sous-chondral. Il y a 30 ans, Radin et al, ont suggéré que les changements au niveau de l'os peuvent expliquer l'apparition de l'OA. Cette hypothèse est depuis supportée par de nombreuses études démontrant plusieurs changements du métabolisme osseux en particulier celui de l'os sous-chondral, mince plaque osseuse située juste en dessous du cartilage. Ainsi, ces données ont suscité une interrogation quant au rôle de ces altérations de l'os sous-chondral, à savoir si ces dernières sont des précurseurs et/ou des conséquences de la dégradation cartilagineuse.

Durant sa phase progressive, cette maladie entraîne un épaissement de l'os sous-chondral, provoque une éburnation de l'os causant une exposition des nerfs et des dommages aux vaisseaux sanguins situés à la frontière entre le cartilage et l'os sous-chondral. L'augmentation de la densité osseuse expliquerait l'apparition d'œdème dans la moelle osseuse ainsi que de la douleur articulaire (Felson D.T. et al, 2001). Par ailleurs, cet œdème serait responsable de la compression des capillaires sanguins et de là, la privation en oxygène des tissus environnants (Bonnet C.S. et al, 2005). Cette maladie cause également

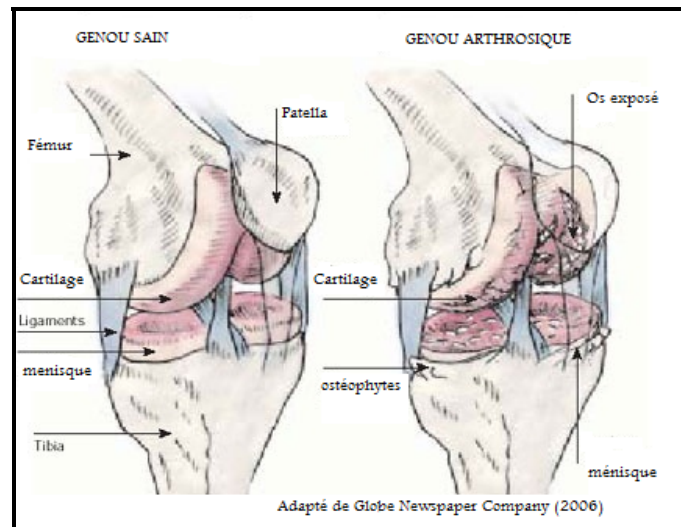
une inflammation et/ou irritation des tissus mous périarticulaire et des nerfs provoquant ainsi la douleur ressentie par les patients (Creamer P. 2000; Radin E.L. et al, 1991; Bonnet C.S. et al, 2005).

Durant la phase précoce d'OA, la surface cartilagineuse reste quasi intacte quoiqu'on puisse y remarquer quelques œdèmes focalisés ou encore des fibrillations mineures. Par la suite, on note une prolifération anormale des chondrocytes ainsi qu'une hypertrophie de ce type cellulaire. Les premières fibrillations surviennent au niveau de la zone superficielle avant de progresser en tant que fissures au niveau de la zone médiale, ce qui donne naissance à l'érosion du cartilage. L'os sous-chondral est quant à lui dénudé et finalement l'articulation est déformée (Pritzker K.P. et al, 2006). L'amincissement ainsi que l'érosion du cartilage articulaire affectent son rôle principal d'absorber les chocs. En conséquence, la sclérose de l'os sous-chondral pourra survenir, ce qui est une réaction normale de l'os pour compenser la diminution de la capacité à absorber des chocs induite par la disparition du cartilage (Radin E.L. et al, 1991; Martel-Pelletier J. et al, 1999). Au fur et à mesure que l'OA progresse, la surface du cartilage articulaire subit une fibrillation, générant ainsi des débris au niveau de l'espace intra articulaire, qui à leur tour créent une inflammation et d'importants changements biochimiques (Figure 1). Plus la fibrillation sera profonde, plus grand sera le nombre de débris générés et plus nombreux les médiateurs de l'inflammation produits dans la membrane synoviale tels que les prostaglandines, l'adénosine triphosphate (ATP), les cytokines, la sérotonine, la substance P, la norépinephrine et une multitude d'autres facteurs causant de la douleur (Kidd B.L. et al, 1996; Dhessi et al, 2002; Cohen et al, 2004). Une dégradation du cartilage articulaire d'origine pathologique, telle que l'OA, implique des métalloprotéinases (MMPs) ainsi que d'autres protéinases plus ou moins spécifiques pour le clivage des fibres de collagène ou encore les protéoglycanes.

La présence d'ostéophytes (excroissances osseuses), clairement identifiable sur une radiographie, semble compenser la redistribution des forces biomécaniques afin d'instaurer une meilleure protection du cartilage. In *vitro*, les niveaux de facteur de croissance TGF- β 1 (transforming growth factor β 1), du facteur insulino-mimétique (Insulin growth factor: IGF-1) et le facteur HGF (Hepatocyte growth factor) sont élevés dans l'os sous-chondral OA

comparé à ce même type d'os normal (Massicotte F. et al, 2002; Massicotte F. et al, 2006; Guevremont M. et al, 2003). D'autre part, des données ont montré que les hauts niveaux de facteurs de croissance contribuent à l'apparition d'ostéophytes chez les sujets OA (Van Beuningen H.M. et al, 1994).

A.



B.

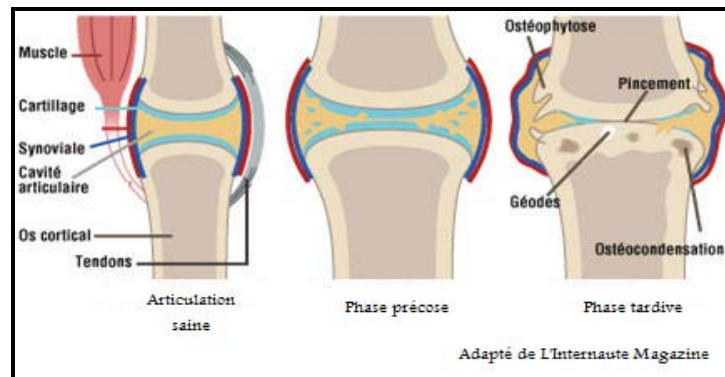


Figure 1 : Comparaison de l'anatomie des genoux sain et arthrosique. Cette figure présente les altérations subies par l'articulation des malades OA. **A)** On peut noter une dégradation du cartilage voire une disparition selon la sévérité de la maladie. Cette disparition qui entraîne l'exposition du tissu osseux. De plus, la présence d'excroissances osseuses nommées ostéophytes. **B)** Ce schéma montre l'apparition de la fibrillation du cartilage en phase précoce tandis que l'apparition de la sclérose de l'os sous-chondral précède l'altération complète du cartilage ainsi que les ostéophytes durant la phase tardive.

1.2. L'épidémiologie

L'ostéoarthrose (OA) est une maladie dégénérative du système musculo-squelettique qui affecte les articulations. En Amérique du nord, elle fait partie des maladies les plus coûteuses, en seconde position juste après les maladies cardiovasculaires. L'arthrose est la plus prévalente des maladies arthritiques. Environ 15% de la population souffre de l'OA et parmi ce nombre 65% sont des personnes âgées de 60 ans et plus. On estime que le nombre de malades atteints de maladies rhumatismales va atteindre 60 millions d'ici 2020 et que parmi ce nombre 21 millions seront atteints d'OA. La prévalence de l'OA dans toutes les articulations est en corrélation avec l'âge. Un tiers des personnes âgées de 65 ans et plus souffre d'OA visible sur radiographie. Avant 50 ans, les hommes sont plus à risque que les femmes. Les études chez les femmes en phase post-ménopause, ont montré qu'un ou plusieurs facteurs hormonaux seraient impliqués dans l'OA. En effet, il semble que les chondrocytes contiennent des récepteurs aux œstrogènes, qui à leur tour contrôlent la synthèse des facteurs de croissance. Or, lors de la ménopause, il y a une chute d'œstrogènes, ce qui serait à l'origine de la baisse de synthèse des facteurs de croissance que l'on observe chez les femmes OA (Felson D.T. et al, 1998). Toutefois, les femmes obèses maintiennent mieux et plus longtemps leur niveau d'œstrogènes mais sont plus affectées par l'OA. Ainsi, chez les sujets obèses, il semble qu'il existe d'autres hormones, facteurs de croissance et/ou cytokines qui contribuent à la progression de la maladie.

1.3. Les facteurs de risque

L'initiation de l'ostéoarthrose est un processus qui implique des facteurs locaux, systémiques, génétiques et environnementaux. Nombreux sont les facteurs biomécaniques qui peuvent fragiliser le cartilage de façon directe ou indirecte. L'ensemble de ces facteurs sont généralement associés à l'âge des patients, l'augmentation du poids corporel, à leur activité professionnelle/physique ou encore à l'hérédité.

1.3.1. L'âge

L'OA a été longtemps considéré comme une maladie inévitable qui est due au processus de vieillissement. Une étude de Harrison et al a démontré que l'usage quotidien de l'articulation préserve ce tissu plutôt que d'altérer le cartilage articulaire tel qu'on le constate lors d'un usage inadéquat. Toutefois, il a été ensuite remarqué qu'avec l'âge les

ligaments stabilisant l'articulation se relâchent. Ainsi, l'articulation devient instable et propice aux blessures. Par ailleurs, il y a une diminution des forces musculaires et des réponses neurologiques périphériques, ce qui fragilise encore plus l'articulation. L'ensemble de ces changements modifie la distribution des pressions subies par le cartilage. Plus le cartilage est âgé, plus les fonctions des chondrocytes, ses propriétés intrinsèques ainsi que son comportement en réponse à des cytokines et aux facteurs de croissance seront modifiés (Sharma L. et al, 2007). Le développement d'ostéophytes au niveau du genou augmente de 20% pour chaque 5 ans d'âge supplémentaire, mais ce pourcentage se stabilise au-delà de 80 ans (Felson D.T. et al, 1997). Pour finir, chez les femmes en phase pré ou ménopausale, l'âge est fortement relié à l'arthrose des mains plutôt que celle des genoux (Sowers M. et al, 1996).

1.3.2. L'obésité

Les études de populations ont montré que les personnes ayant une surcharge pondérale ont un plus grand risque de développer l'OA du genou que les personnes ayant un poids moyen. En plus, chez ces personnes obèses, la progression de la maladie est plus fréquente et plus dévastatrice que pour les sujets minces. Par ailleurs, les femmes obèses ont un risque de 4 à 5 fois plus important de souffrir d'OA de genou comparativement aux personnes ayant un poids moyens. En réduisant la masse pondérale, on estompe les symptômes d'OA de genou. Aussi, une augmentation du poids corporel est étroitement associée à l'OA du genou plutôt qu'à l'OA de la hanche (Reijman M. et al, 2005). Toutefois, le surpoids semble représenter un important facteur de risque d'OA surtout au niveau des articulations portantes incluant la hanche. Étonnamment, l'obésité est associée à l'OA des mains, ce qui sous-entend que ce facteur de risque peut agir de manière systémique aussi bien que locale dans l'OA (Carman W.J. et al, 1994).

Des expériences ont montré qu'une augmentation de pressions au niveau du cartilage altère l'architecture de la matrice cartilagineuse, ce qui pourrait expliquer la hausse de l'incidence de gonarthrose chez les sujets obèses. En effet, une étude chez les animaux a montré qu'en changeant la pression supportée par le cartilage, il y a activation des chondrocytes ainsi qu'une augmentation de protéinases et cytokines (Urban P. et al, 1994).

Il est important de noter que la plupart des mécano-récepteurs des chondrocytes sont très sensibles aux changements de pression et surtout quand ces pressions sont maintenues sur une longue période. L'étude provenant de la cohorte Framingham a confirmé que plus grand est l'indice de masse corporelle (IMC), ce qui est le cas chez les sujets obèses, plus grand sera le risque de développer l'OA. De plus, ce grand risque de développer l'OA est directement relié aux changements de masse corporelle (Felson D.T. et al, 1997). L'obésité semble être à l'origine de l'OA des deux genoux (bilatéral) plutôt que celui d'un seul genou (unilatéral). L'OA bilatéral est plus commun que l'OA unilatéral chez les personnes de 45 à 75 ans et aussi, l'OA d'un genou augmente les chances d'apparition d'OA au genou opposé (Davis M.A. et al, 1989; Felson D.T. et al, 1995 et Cooper C. et al, 1996).

1.3.3. L'activité professionnelle et physique

Le cartilage sain ainsi que la plupart des articulations, ont besoin de subir des forces de compressions pour leur bon fonctionnement. Toutefois, dans le cas où ces forces de compressions sont extrêmes en termes de fréquence et d'intensité, alors l'articulation ne peut les supporter longtemps et ces contraintes contribuent énormément à l'apparition de l'OA. L'activité professionnelle en tant que facteur de risque de l'OA est mieux comprise chez les hommes plutôt que chez les femmes à cause de la disponibilité d'un plus grand nombre d'études faites chez l'homme. Selon l'étude longitudinale de la cohorte de Framingham, les hommes occupant un emploi exigeant une activité physique continue (ex : s'agenouiller) encourrent un plus grand risque de développer une gonarthrose que les hommes sédentaires ou ceux ayant une activité dans un bureau sans implication physique (Felson D.T. et al, 1991). En 1997, Maetzer et al ont aussi démontré que le travail des fermiers augmentait l'incidence de l'OA de la hanche chez ces sujets.

Parmi les métiers manuels, ceux impliquant des tâches de précision prédisposent à l'OA des mains. En effet, on note un taux élevé d'OA sévère au niveau du pouce et de l'index chez les dentistes en comparaisons aux enseignants (Solovieva S. et al, 2004). De plus, il semble que les travailleurs dans des champs de coton souffrent d'OA de mains de façon plus fréquente que leurs pairs ayant le même âge mais ne travaillant pas dans le même domaine (Lawrence J.S. 1961). Le rôle de l'activité physique dans l'apparition de

l'OA a été prouvé par de nombreuses études sur la prévalence de cette pathologie chez des anciens athlètes d'élite. Il a été montré que 26% de footballeurs professionnels ont une grande prévalence pour l'OA du tibia tandis que 28% des athlètes pratiquant le décathlon ont un grand risque de développer l'OA de la rotule (Kujala et al, 1995). Par ailleurs, il a été prouvé qu'une association entre d'anciens blessures répétitives aux genoux, un indice de masse corporelle (IMC) élevé à l'âge de 20 ans ainsi qu'une participation accrue aux activités sportives en équipe, augmente la prévalence de l'OA du tibia chez ces sujets (Felson D.T. et al, 1992). La pratique d'une activité sportive surtout en tant que professionnel, multiplie les chances de blessures chez ces athlètes. Or, les blessures articulaires augmentent la prévalence de l'OA. En effet, dans le cas d'une blessure directe, ce sont des dommages au cartilage articulaire qui en sont la cause. Quant à une blessure indirecte, la hausse de la prévalence à l'OA résulte du stress subit par le cartilage à cause des dommages aux tissus environnant qui ont pour rôle d'atténuer les forces de compression.

1.3.4. Les facteurs génétiques

Plusieurs données ont démontrés que des anomalies génétiques peuvent causer l'apparition précoce de l'OA (Valdes et al, 2006). Les gènes manifestent diverses modes opératoires en fonction du site de localisation mais aussi dépendamment du sexe de l'individu (Bukulmez et al, 2006). Les résultats provenant d'études épidémiologiques des désordres génétiques rares et des études chez des jumeaux, démontrent que la prédisposition héréditaire est un grand facteur de risque de l'OA. En effet, une étude chez les jumeaux a montré que les facteurs génétiques ont une influence pouvant atteindre plus de 70% dans l'arthrose touchant certaines articulations. Par ailleurs, les études de gènes candidats ainsi que des analyses génomiques ont révélés que des polymorphismes ou des mutations de gènes qui codent pour la matrice extracellulaire du cartilage et ceux codant pour les molécules signalétiques déterminent la susceptibilité à l'OA (Loughlin et al, 2005; Valdes et al, 2007). Il existe un aspect génétique dans la relation entre l'OA et les facteurs de croissance tel que TGF- β . En effet, un polymorphisme en position 29 de la séquence

codante de ce facteur, serait responsable d'une augmentation de la prévalence d'ostéophytes de la colonne vertébrale ainsi que la fréquence d'ossification du ligament longitudinal postérieur de la colonne vertébrale (Yamada Y. et al, 2000; Kamiya M. et al, 2001). Il semble également que le polymorphisme du gène du récepteur de la vitamine D soit responsable de la différence de la densité de masse osseuse qui a été observé chez les patients arthrosiques. Plusieurs polymorphismes ont été également démontrés, notamment ceux des gènes codant pour la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type I, de l'interleukin-6 (IL-6). Enfin, des analyse de liaisons ont identifié un défaut génétique de l'interleukin-1(IL-1) au niveau du chromosome 2q13 qui serait étroitement associé à la gonarthrose (Morrison N.A. et al, 1994; Murray R.E. et al, 1997; Grant S.F. et al, 1996; Kobayashi S. et al, 1996; Loughlin J. et al, 2002). Il existe d'autres nombreux gènes qui sont impliqués dans la pathophysiologie de l'OA (Tableau I).

Tableau I : L'épidémiologie génétique de l'OA

GÈNE MUTÉ	LA CHROMOSOME	TISSU TOUCHÉ
Matrilin 3 (<i>MATN3</i>)	2p24.1	Cartilage, Genou
Interleukine 1 (IL-1)	2q11.2-q13	Genou
La protéine frizzled 3 secrétée (<i>FRZB</i>).	2q32.1	Cartilage
Le gene metalloproteinase (<i>ADAM12</i>).	10q26.2	Cartilage
L' asporin (<i>ASPN</i>)	9q22.31	Cartilage
Mutation de C282Y ou H63D du gène HFE	6p21.3	Mains
Growth differentiation factor (GDF5)	20q33.48 - q33.51	Cartilage
Procollgène de type II (Col2A1)	12 q12-q13.2	Cartilage
Récepteur aux Œstrogènes alpha (ER- α)		Genou

2. Le cartilage normal

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif qui recouvre les surfaces articulaires qui ont pour rôle de supporter le poids corporel. Le cartilage articulaire est blanc, translucide et non innervé. C'est un tissu avasculaire qui se nourrit par diffusion : 50% provient du liquide synovial dans lequel baigne ce tissu et les autres 50% de l'os sous-chondral situé juste en dessous. Chez les êtres humains, le cartilage est constitué de trois zones ayant une composition spécifique. La zone superficielle comprend des chondrocytes et les fibres de collagène qui sont alignées tout au long de la surface. La zone médiale est riche en protéoglycanes, chondrocytes sphériques et en fibres de collagène orientées de manière isotropique. En ce qui concerne la zone profonde, elle contient des cellules sphériques et les fibres de collagène avec une orientation perpendiculaire (Kuettner K.E. et al, 2005). Le tissu cartilagineux permet de supporter une charge pondérale qui peut atteindre 7 fois le poids corporel et ce grâce à une multitude de macromolécules situées dans la matrice extracellulaire, qui lui confère l'élasticité ainsi que la résistance nécessaire (Heinegard D. et al, 1987).

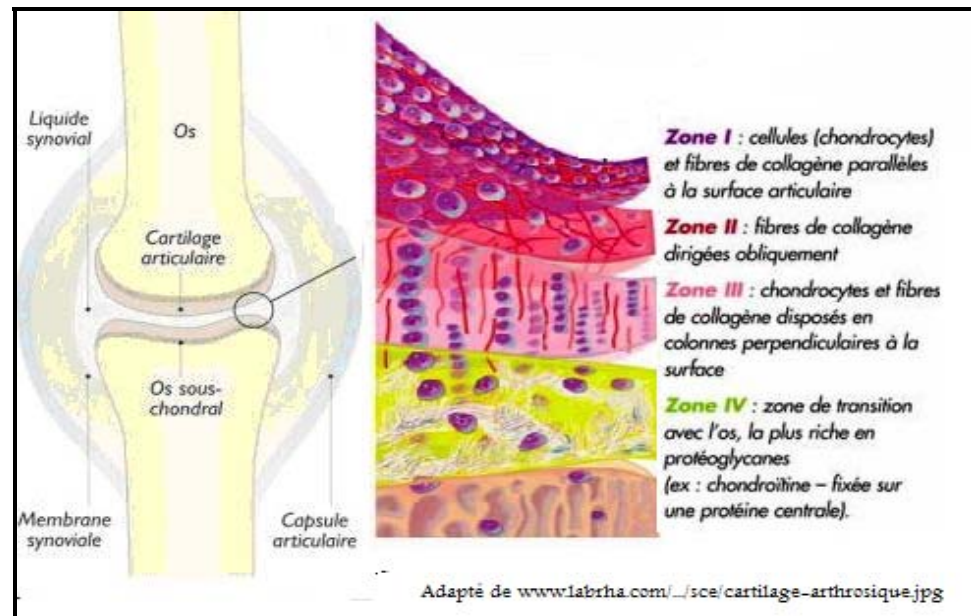
2.1. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire du cartilage (MEC) est essentiellement constituée d'un réseau de fibres de collagène, qui lui confère son caractère élastique. La principale fibre de collagène est de type II mais on y retrouve d'autres variantes de fibres selon l'état de différenciation des chondrocytes : soit les formes IX, XI, VI, X, XII et XIV (Burgeson et al, 1992; Poole, 2001). On note également la présence de protéoglycanes qui lui confèrent sa rigidité et ce grâce à leur capacité d'absorber ainsi que d'extraire les molécules d'eau. Il est connu que 70% du tissu cartilagineux est constitué d'eau tandis que 30% soit solide puisque ses principaux composants sont le collagène de type II ou encore un très grand nombre de protéoglycanes dont l'aggrécane (Mayne R. 1997; Sandy J.D. et al, 1997). Le rôle principal du cartilage est de réduire la friction des os de l'articulation les uns par rapport aux autres, tout en réduisant les chocs induits par la locomotion. Les chondrocytes, cellules qui

occupent 1 à 2 % du volume cartilagineux, se nourrissent à partir du liquide synovial, liquide dans lequel baigne ce tissu (Stockwell R.A. et al, 1979).

Les chondrocytes modulent la synthèse, le remodelage ainsi que le turnover de la MEC. Ces fibres de collagène ainsi que ces protéoglycanes semblent jouer un rôle dans l'organisation de la MEC. En effet, les aggrecanes confèrent la résistance aux compressions grâce à leur liaison covalente aux glycosaminoglycanes qui ont des propriétés hydrophiles et électronégatives. Ainsi, la MEC lie étroitement des molécules d'eau via ces chaînes de glycosaminoglycanes, ce qui lui confère sa capacité à endurer les forces de compressions. Cette résistance dépend de sa capacité à pouvoir exclure l'eau durant la compression car, une fois relâché, il est important que les protéoglycanes contiennent des charges nécessaires afin de re-absorber par osmose ces molécules d'eau et d'autres petits solutés afin que le cartilage retrouve sa conformation initiale. Par ailleurs, les chondrocytes possèdent des récepteurs répondant aux stimulations mécaniques et ces derniers font partie des composants de la MEC (Milward-Sadler et Salter. 2004). Parmi ces récepteurs, on retrouve des intégrines, qui sont des récepteurs de fibronectine (FN) et de fragments de collagène de type II. En activant ces récepteurs, il y a stimulation de la production des protéinases dégradant la MEC, des cytokines pro-inflammatoires mais aussi des chimiokines (Pulai et al, 2005).

A.



B.

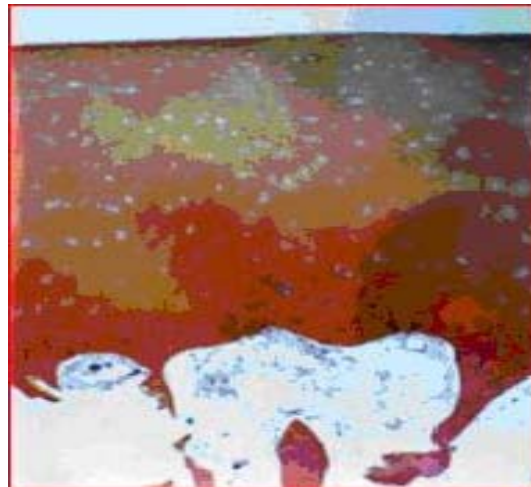


Figure 2: La structure du cartilage humain.

Schéma qui situe le cartilage dans l'articulation. **A)** Identification et description des différentes couches de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire ainsi que de leurs composantes. **B)** Visualisation par microscopie de cartilage humain fixé sur une lame.

2.2. Le cartilage ostéoarthrosique

Lors de la phase précoce d'OA, on note une augmentation de la synthèse des molécules constituant la matrice cartilagineuse. Cependant avec le temps, il semble que la dégradation de la MEC surpasse la déposition matricielle. L'OA résulte de l'échec du cartilage à synthétiser une matrice extracellulaire de bonne qualité en termes de résistance et d'élasticité et l'apparition d'un déséquilibre entre le niveau des métalloprotéases (MMPs) actives et celui de leurs inhibiteurs naturels, par exemple, TIMP1, 2 et 3 (Goldring M.B. et al, 2000). La mauvaise qualité de la matrice synthétisée résulte d'une dédifférenciation des chondrocytes, ce qui entraîne une baisse de production des fibres de collagène I et III ainsi qu'une synthèse de protéoglycanes plus courts (Goldring M.B. et al, 2000).

Cette baisse de macromolécules composant la MEC tel que le collagène, favorise la perte d'intégrité structurale du cartilage. Les travaux de Martel-Pelletier et al, ont montré que l'altération des aggrécanes ainsi que du réseau de collagène favorise une augmentation des enzymes protéolytiques synthétisées par les chondrocytes. La famille des métalloprotéinases (MMPs) semble jouer un rôle clé dans cette dégradation. Dans cette famille, il y a les collagénases qui sont des enzymes responsables de la dégradation du collagène ainsi que des aggrécánases qui eux favorisent le clivage des aggrécanes dans le liquide synovial. Des études ont montré une augmentation des collagénases-1, 2 et 3 (MMP-1,8 et 13) dans le cartilage de patients atteints d'OA. La MMP-13 joue un rôle important dans la dégradation des couches intermédiaires et profondes du cartilage à cause de son haut niveau d'activité protéasique vis-à-vis des fibres de collagène de type II (Martel-Pelletier J. et al, 1998; Otterness I.G. et al, 2000; Reboul P. et al, 1996, Billingham R.C. et al, 2000; Moldovan F. et al, 1997).

Par ailleurs, les chondrocytes semblent répondre aux perturbations biomécaniques en régulant la synthèse ou encore en augmentant la production locale ou périphérique des cytokines pro-inflammatoires. Suite à une charge mécanique, il y a augmentation des forces de compression, qui à leur tour diminuent la synthèse des protéoglycanes, endommagent le réseau des fibres de collagène et enfin, diminuent la synthèse des protéines de la matrice cartilagineuse (Guilak et al, 2004). L'activation des chondrocytes OA par des cytokines, des prostaglandines, des radicaux libres (NO, H₂O₂) ainsi que par les constituants de la MEC

comme les fragments de fibronectine, compromet leur fonction cellulaire. De plus, la grande majorité de ces éléments biochimiques proviennent de la membrane synoviale. Les cytokines pro-inflammatoires sont produites par des chondrocytes et des synoviocytes, avant de se lier au niveau de leur récepteur spécifique, entraînant ainsi l'activation de la transcription des gènes MMP. L'interleukine-1 bêta (IL-1 β) est la principale de ces cytokines. Elle affecte la qualité de la MEC puisqu'elle augmente la synthèse du collagène de type I et III tout en diminuant celle de type II et IX, via la production de l'oxide d'azote (NO). Le tumor necrosis factor α (TNF- α) est l'autre principale cytokine inflammatoire qui collabore étroitement avec IL-1 afin de médier les effets de ce dernier. (Martel-Pelletier J. et al, 1999 ; Goldring M.B. 1999).

Il est important de noter qu'en début de maladie, le cartilage effectue une tentative de sauvetage des dommages causés à l'articulation, en faisant appel aux facteurs de croissance impliqués dans la synthèse de la matrice physiologique (Van der Kraan et al, 2003). En effet, il a été montré que les facteurs comme le facteur insulino-mimétique-1 (insulin like growth factor-1: IGF-1) ainsi que le facteur transformant-1 (transforming growth factor β -1: TGF- β 1), étaient augmentés dans les chondrocytes OA ainsi que dans les synoviocytes. Or, ces facteurs ont des effets anaboliques sur la synthèse de la MEC et ils peuvent atténuer les effets des cytokines pro-inflammatoires. En résumé, ces facteurs ayant une grande affinité pour la MEC seront relâchés puis capturés par le cartilage afin de faciliter la réparation des fissures au niveau de la matrice cartilagineuse (Klippel J.H. et al, 2001).

Pour finir, on observe un phénomène d'angiogenèse qui survient au niveau de la jonction ostéochondrale. En effet, les vaisseaux sanguins envahissent la couche profonde du tissu cartilagineux et ils sont associés à des senseurs nerveux (Bonnet C.S. et al, 2005).

3. Le tissu osseux

L'os est un tissu dur constitué essentiellement de minéraux, d'une matrice, de cellules spécialisées ainsi que d'eau. Le type de minéraux qu'on y trouve est un cristal de phosphate de calcium nommé hydroxyapatite (Ca₅(PO₄)₃(OH)). Ces minéraux physiologiques ont une petite taille, sont imparfaits, impurs et contiennent peu de groupes hydroxyles comparés aux

autres minéraux. Leur petite taille leur permet entre autre une dissolution plus rapide, facilitant ainsi le maintien de l'homéostasie des ions. Ce cristal d'hydroxyapatite est donc une source d'ions de calcium et de phosphate, en plus d'assurer la rigidité ainsi que la force de la matrice osseuse sur laquelle il forme un dépôt.

L'os a des fonctions mécaniques bien connues. Il assure la rigidité, la forme, la protection et le support pour le squelette du corps ainsi que de faciliter la locomotion. Étonnamment, l'os est une structure hautement dynamique qui subit un remodelage constant. Ce turnover osseux permet à ce tissu de se réparer par exemple en cas de fracture ou encore de s'adapter aux forces subies par ce dernier. Durant l'enfance, le taux de formation osseuse dépasse le taux de résorption, par contre chez les jeunes adultes la formation de l'os est en équilibre avec sa résorption de l'os. Chez les sujets âgés, cet équilibre sera en faveur de la perte osseuse. L'ensemble des propriétés mécaniques de l'os dépendent du taux de turnover de l'os, de la matrice de collagène, de la taille, de la structure, de la géométrie ainsi que de la densité de ce tissu. Afin de maintenir la force osseuse, le processus de turnover doit être régulé de manière spécifique.

Le squelette humain est constitué des os longs tels que l'humérus, le fémur et le tibia ainsi que des os plats tels que le crâne, le scapula et l'intestin. Il existe deux types histologiques d'os matures : l'os cortical ou l'os trabéculaire. Ces deux types se retrouvent dans l'échafaudage des os longs ou encore à la surface des os plats. Les différents os du corps prennent forme de différente manière soit par la formation intramembraneuse ou endochondrale. De plus, ils proviennent de plusieurs tissus embryonnaires tels que la crête neurale, l'ectoderme ou encore le mésoderme (Aubin et Liu, 1996; Erlebacher et al, 1995).

3.1. L'os cortical ou compact

L'os cortical ou compact, qui compose 80 à 85 % du squelette, recouvre tous les os; c'est le principal constituant de la diaphyse des os longs et l'enveloppe des os plats et courts. Cet os se nomme ainsi car 95% de son volume est fait de matrice extracellulaire et que sa teneur en minéraux est de 70% (Vernejoul, 1993). Ce genre de tissu osseux est plus dense que l'os spongieux. Il contient des espaces médullaires de taille réduite et des travées plus

épaisses avec une disposition plus organisée. En effet, les lamelles de l'os compact sont organisées en quatre systèmes lamellaires : lamelles circonférentielles externes et internes, lamelles interstitielle et ostéons. De plus, il semble que 80 à 90% du volume de l'os compact soit calcifié.

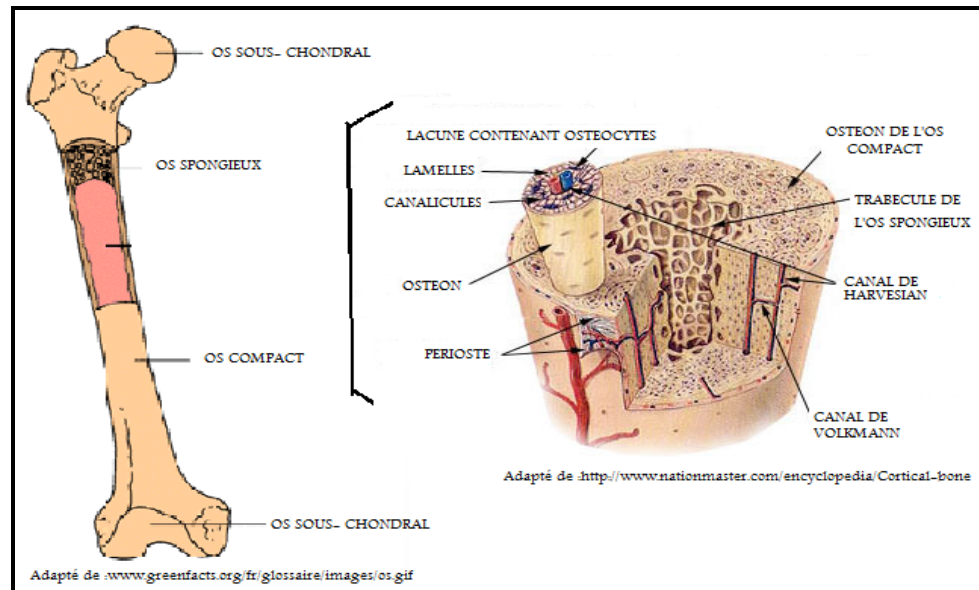
C'est une enveloppe résistante qui est principalement composée de juxtaposition d'ostéons ou systèmes de Havers fait de 4 à 20 lamelles osseuses cylindriques disposées concentriquement autour du canal de Havers d'environ 50 μm de diamètre. Les ostéons sont des structures de 200 à 300 μm de diamètre alignés parallèlement à la diaphyse. L'os cortical contient également des capillaires sanguins et des filets nerveux amyéliniques enrobés d'un peu de tissu conjonctif lâche. Les canaux de Havers sont reliés entre eux, avec la cavité médullaire et avec la surface de l'os par des canaux transversaux ou obliques : les canaux de Volkmann. Chaque canal est centré sur un vaisseau innervé qui communique à la fois avec la vascularisation périostée et les vaisseaux de la moelle. Ainsi, cette disposition confère à l'os compact un maximum de résistance. Entre les ostéons se trouvent des lamelles osseuses, vestiges d'anciens ostéons partiellement résorbés et constituant les systèmes interstitiels (Greene W.B. 2006). Pour finir, la perte osseuse associée au vieillissement entraîne une réduction de 35 % de la masse osseuse corticale (Figure 3).

3.2. L'os trabéculaire

L'os trabéculaire, dit aussi os spongieux, est formé de grands espaces ouverts entourés de fines plaques d'os délimitant un labyrinthe d'espaces inter communicants occupés par de la moëlle osseuse et des vaisseaux. Ces grands espaces sont des espaces médullaires et les plaques de l'os sont des travées, formées de plusieurs couches de lamelles et de cylindres anastomosés. Chaque plaque a la forme globale d'un parallélépipède (Figure 3). L'organisation en trois dimensions de ces plaques osseuses entre elles constitue l'architecture trabéculaire qui confère la résistance mécanique propre à ce type d'os. L'os trabéculaire occupe les épiphyses et les métaphyses des os longs et l'intérieur des os plats et des os courts. Il faut noter que 15 à 25 % du volume de l'os spongieux est calcifié alors que le reste est fait de tissu hématopoïétique et il constitue 20 % du squelette (Vernejoul, 1993). Aussi, il présente une grande surface de contact et est sensible aux variations métaboliques.

En effet, l'orientation des travées dépend des lignes de forces mécaniques auxquelles est soumis l'os trabéculaire, car les ostéoblastes (Ob) qui le constituent ont la capacité de percevoir ces forces mécaniques. Les Ob de ce type d'os possèdent une activité métabolique 8 fois plus importante que celle des Ob de l'os compact (Netter, 1987). De plus, il semble qu'une plus grande surface de contact entre le tissu hématopoïétique de cet os et ses cellules osseuses favorisent le remodelage osseux de ce tissu (Vernejoul, 1993). La perte osseuse associée au vieillissement est d'environ 50 % de la masse osseuse trabéculaire, et elle varie de 25 % à 35 %, respectivement, chez la femme et l'homme. Avec l'âge, les travées sont plutôt constituées de cylindres (Greene W.B. 2006).

A.



B.

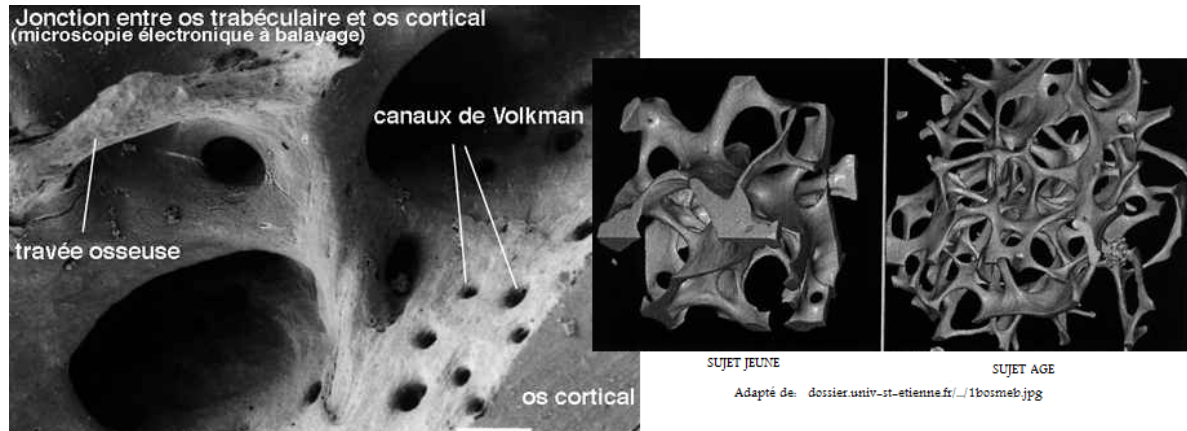


Figure 3: La structure de l'oc compact vs la structure de l'os spongieux. A) Anatomie du tissu osseux ainsi que l'identification des différents compartiments des os spongieux et cortical. **B)** Visualisation de la jonction entre os spongieux et os cortical par microscopie électronique à balayage. Identification de certains compartiments de ces deux tissus osseux. Comparaison de la forme des travées de l'os trabéculaire de sujets humains jeunes et âgés par la technique d'imagerie par synchrotron avec reconstitution tridimensionnelle.

3.3. La matrice osseuse

La matrice osseuse se doit d'être rigide et forte afin d'assurer sa fonction mécanique en facilitant la locomotion ou encore en protégeant les organes internes. On y retrouve essentiellement des fibres de collagène de type I et leur arrangement dépend de la fonction du tissu dans lequel elles se trouvent (Lees S. et al, 1994). Le dépôt de minéraux sur ces fibres de collagène renforce leur rigidité. Quant à la stabilité de ces fibres, elle dépend des liaisons interfibrillaires formées de manière post-traductionnelle au niveau de la matrice osseuse. La structure en triple hélice de ces fibres de collagène confère la force et la flexibilité à ce tissu conjonctif (Knott L. et al, 1998). Les protéines non collagéniques (ex: ostéocalcine, phosphatase alcaline, sialoprotéine, ostéopontine, ostéonectine) représentent 5% de la matrice osseuse et elles ont pour rôle de maintenir l'homéostasie minérale, le métabolisme osseux, la formation ainsi que le renouvellement du tissu osseux (Robey P.G. et al, 1996; Sodek K.L. et al, 2000; Cowles E.A. et al, 1998). Les cellules constituant le tissu osseux contrôlent son métabolisme, sa formation ainsi que son turnover. On y retrouve deux types cellulaires, soit les ostéoblastes et les ostéoclastes.

3.3.1. L'ostéoblaste

Les ostéoblastes (Ob) sont responsables de la production des constituants de la matrice osseuse. Ce type cellulaire provient des cellules souches mésenchymateuses sous l'influence de plusieurs facteurs de croissance tels que les FGFs (fibroblasts growth factors), les BMPs (Bone morphogenetic proteins), les Hedgehogs, PTHrP (Parathyroid hormone related peptide), les protéines Wnt (Wingless integration site) (Logan C.Y. 2004; Day T.F. et al, 2005). Leur différenciation requiert les facteurs de transcription Ostérix et Runx2 dont l'expression est BMP2/Wnt dépendante (Nakashima K. et al, 2002; Celil A.B. et al, 2005; Ducy P. et al, 1997). C'est au cours de la phase d'ossification intramembraneuse que les cellules souches mésenchymateuses subissent une prolifération puis une différenciation en pré-ostéoblaste avant de devenir des Ob matures. Des critères morphologiques, histochimiques ainsi que des analyses de prolifération cellulaire par incorporation de ³H-thymidine ou de BrdU ont permis d'identifier quatre étapes de

maturation lors du développement des Ob dans l'os. On retrouve le pré-ostéoblaste, l'ostéoblaste mature et l'ostéocyte.

Au cours du développement du squelette, la différenciation des ostéoblastes ainsi que le dépôt de la matrice osseuse requièrent plusieurs facteurs présentant une action endocrine, autocrine et/ou paracrine. Ces différents facteurs interviennent à différents stades de la différenciation des ostéoblastes. En effet, on retrouve parmi ce nombre, le facteur stimulant les Ob (OSF) connu aussi sous le nom de pleiotrophin (PTN) qui semble jouer un rôle important dans le renouvellement des cellules souches mésenchymateuses. Ce facteur semble être chimiotactique pour les cellules ostéoprogénitrices, mais également important en tant que stimulateur de l'activité des Ob matures (Yang X.B. et al, 2001; Tare R.S. et al, 2002).

Le préostéoblaste (pré-Ob) est considéré comme un précurseur immédiat de l'ostéoblaste d'une part à cause de sa localisation dans une couche ou deux précédant la couche contenant les Ob formant le tissu osseux. Sur le plan structural, histologique et quant à l'activité de la phosphatase alcaline, ces pré-Ob ressemblent beaucoup aux Ob. Toutefois, ce type cellulaire n'a pas encore acquis des caractéristiques de différenciation des cellules matures et il a une capacité de division amoindrie. Il existe aussi un autre type de cellules nommé ostéoprogéniteur qui se trouve dans une couche à proximité de la couche des pré-Ob. Ce sont des cellules mésenchymateuses non différenciées qui résident dans le tissu stromal (Aubin et al, 1993; Brudel et al, 1997). Environ 10 à 20% des ostéoblastes (Ob) matures s'incorporent à la nouvelle matrice extracellulaire et ces cellules qui ont atteint le plus haut niveau de maturité se nomment ostéocytes. Les ostéocytes ainsi que la matrice organique produite par ceux-ci se trouvent dans des petites cavités nommées ostéoplastes qui communiquent entre elles par de fins canaux, ce qui leur donne un aspect étoilé (Figure 4).

Un ostéocyte est une cellule cuboïde qui agit en groupe (environ 100 à 400 cellules) au niveau du site de formation de la surface osseuse. Ce type de cellules contient un complexe de Golgi immense, ce qui reflète l'importance de son activité biosynthétique et sécrétrice (Baron R. 2003). Aussi, l'Ob se caractérise par son habileté à synthétiser des

molécules membranaires telles que la phosphatase alcaline ou encore des molécules constituant la matrice osseuse telles que le collagène de type I (Coll-1) qui constitue 90% de cette matrice ainsi que des protéines non-collagéniques comme l'ostéocalcine, l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse (BSP), des protéoglycanes, des hormones, des cytokines, ainsi que des facteurs de croissance (Aubin J. et al, 1993). Les Ob expriment des récepteurs aux œstrogènes et à la vitamine D₃ et plusieurs molécules d'adhésion telles que les intégrines ainsi que les récepteurs des cytokines (Baron R. 2003). Pour finir il semble que ces cellules activent la différenciation des ostéoclastes de manière locale et paracrine. En effet, l'ostéoclastogenèse s'active par clivage du ligand RANKL (Ligand of receptor activator of nuclear factor- κ) ainsi que par stimulation du facteur M-CSF1 (Macrophage Colony Stimulating Factor-1) (Takahashi S.T. et al, 1999) (Figure 4).

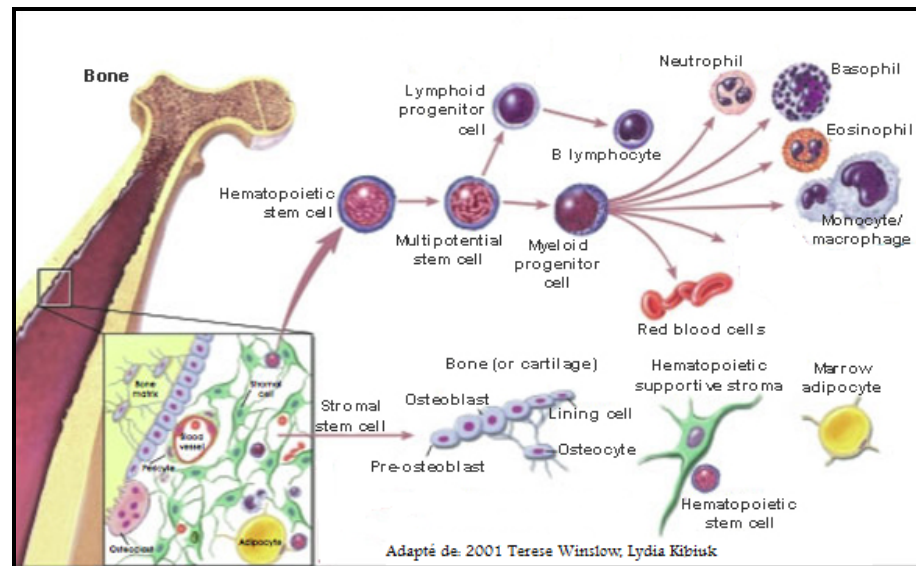
3.3.2. L'ostéoclaste

L'ostéoclaste est la cellule responsable de la résorption osseuse. C'est une cellule géante et multinucléée qui peut contenir entre 4 à 8 noyaux. On retrouve ce type cellulaire en contact avec la surface osseuse calcifiée et il est possible de trouver plusieurs ostéoclastes en un même site de résorption. En 1982, une étude d'E.H. Burger a suggéré que les cellules précurseur des ostéoclastes sont des cellules souches hématopoïétiques de la lignée des monocytes/macrophages avec le CFU-GM (granulocyte and macrophages colony forming cells) comme premier précurseur identifié. Les pré-ostéoblastes sont responsables de l'initiation ainsi que de la régulation de la différenciation des ostéoclastes par des contacts cellules-cellules ainsi qu'en sécrétant des facteurs comme M-CSF-1 et RANKL (Takahashi S.T. et al, 1999). Le précurseur d'ostéoclaste immature lie via son récepteur RANK le ligand RANK-L sur l'ostéoblaste. L'ostéoclaste immature est ainsi transformé en ostéoclaste mature. La maturation des ostéoclastes est terminée lorsque la zone d'ancrage et la bordure plissée sont totalement formées. De plus, il existe d'autres facteurs intervenant dans la différenciation des ostéoclastes tels que des facteurs de croissance, des cytokines ainsi que des hormones (Couret I. 2004) (Figure 4).

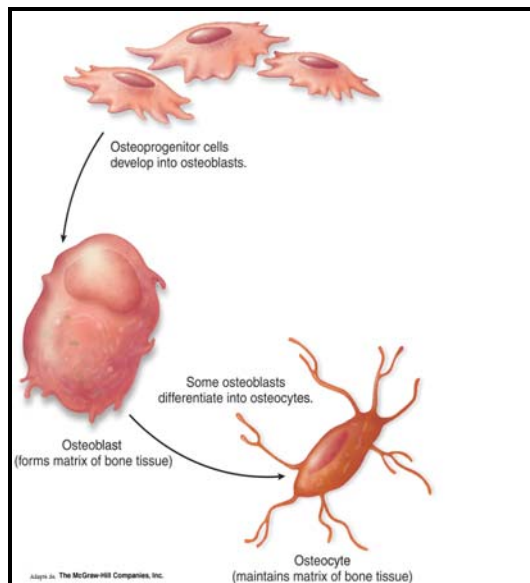
Les ostéoclastes matures sont des cellules de 50 à 100 μ m contenant de nombreux lysosomes ainsi qu'une grande quantité de phosphatase acide résistante au tartrate (Hallen

J.M. et al, 2006). Ces cellules se caractérisent par une bordure plissée formée par des extensions de la membrane cytoplasmique. Cette membrane est responsable de la destruction de l'os. L'ostéoclaste contient une zone dite zone claire qui permet à ce type cellulaire d'adhérer à la matrice osseuse contenant différentes protéines, via les intégrines (Lakkakorpi P.T. et al, 1991). Ainsi, cette zone claire permet de délimiter le microenvironnement nécessaire pour la résorption osseuse (Couret I. 2004). Lors de la résorption, trois domaines membranaires des ostéoclastes sont identifiables, la zone d'ancrage à la matrice extracellulaire (zone claire), la bordure en brosse qui est l'organe de résorption et enfin la membrane basolatérale contenant un domaine sécrétant les différentes enzymes pour la dégradation de la matrice osseuse (Salo J. et al, 1996).

A.



B.



C.

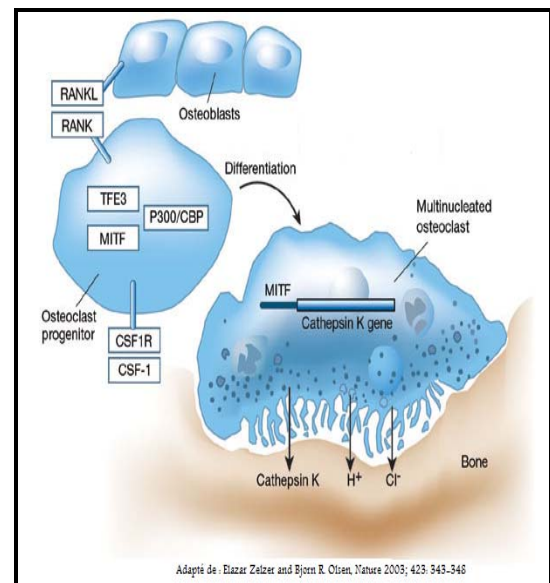


FIGURE 4 : Les différents types de cellules osseuses. A) Représentation de l'origine des cellules osseuses, les ostéoblastes qui originent des cellules stromales et les ostéoclastes des cellules hématopoïétiques. **B)** Schéma des différentes étapes de différenciation des ostéoblastes. **C)** Représentation de l'intervention moléculaire des ostéoblastes dans la différenciation des ostéoclastes favorisant ainsi la résorption osseuse.

3.4. Le remodelage osseux

Le remodelage osseux est le processus durant lequel les os sont continuellement renouvelés au cours de la vie via une coordination cyclique entre la résorption osseuse ainsi que la formation osseuse (Figure 5). Il y a nécessité d'un tel processus afin que le tissu osseux puisse permettre une formation adaptée lors de la croissance, conserver ses propriétés mécaniques, favoriser une adaptation aux contraintes mécaniques, maintenir une homéostasie du calcium ainsi que faciliter la réparation des fractures. Au cours du remodelage osseux, Il y a d'abord une phase de résorption durant laquelle l'ancien os est détruit par les ostéoclastes, suivi par une phase de formation osseuse durant laquelle un os nouveau est formé par les ostéoblastes. Il faut noter que 10% des os du squelette humain sont renouvelés chaque année. Le remodelage osseux a lieu dans une structure que l'on nomme unité multicellulaire de base (BMU) qui a une dimension de 1 à 2 mm de long et 0.2 à 0.4 mm de large. Dans l'os cortical, les BMU progressent comme des tunnels en creusant l'os en front durant la phase de résorption puis en resynthétisant l'os neuf en arrière durant la phase de formation (Manolagas S.C. et al, 2000).

Lors de l'initiation du remodelage osseux, il y a une phase d'activation qui implique l'apparition des précurseurs des ostéoclastes et elle précède la phase proprement dite de résorption. Quant à la phase finale de résorption, elle est marquée par l'attachement des ostéoclastes matures à la surface osseuse. Plusieurs études ont montré que les ostéoclastes n'exprimaient pas les récepteurs d'agents pro-résorptifs tels que la parathormone (PTH) ou encore la vitamine D. Aussi, d'autres chercheurs ont montré qu'en stimulant les ostéoblastes par ces mêmes agents pro-résorptifs, les Ob favorisaient la phase de résorption osseuse. L'ensemble de ces études a donc suggéré que la phase de résorption nécessitait une activation des ostéoclastes par les Ob. En effet, il semble que les Ob sécrètent le facteur RANKL dont le promoteur sous la régulation transcriptionnelle du facteur Runx2, puis la liaison de ce facteur à son récepteur RANK mène à l'activation des ostéoclastes. Il semble également que les Ob soient responsables de la différenciation ainsi que de la prolifération des ostéoclastes en sécrétant le facteur M-CSF-1 (Baron R. 2003; Mundy G.R. et al, 2003; Couret I. 2004; Väänänen H.K. et al, 2008 et Castoldi M. et al, 1997).

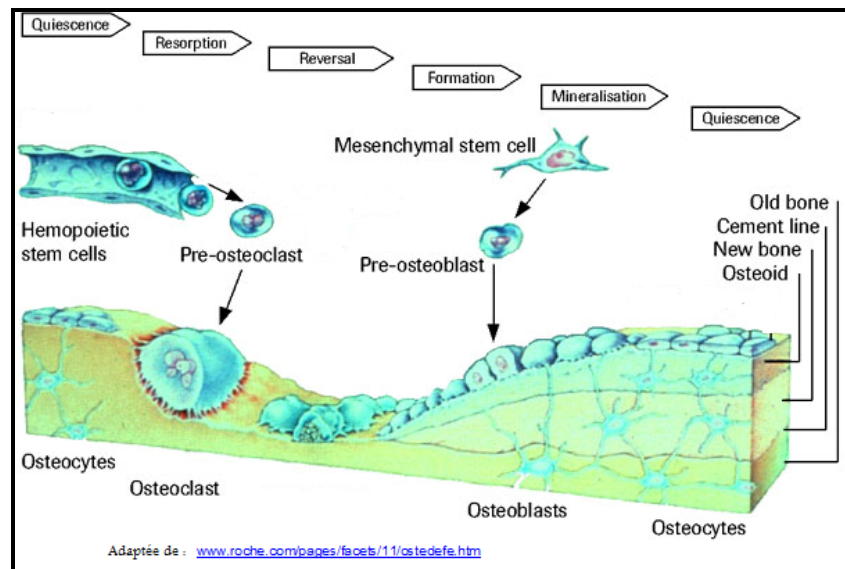
La phase de résorption débute par l'adhésion des ostéoclastes à la surface osseuse au niveau de la zone claire avec constitution d'une zone de scellement conduisant à la polarisation de la cellule et constitution de la membrane en bordure en brosse. Une fois activé, l'ostéoclaste induit une dissolution de la phase minérale (cristaux d'hydroxyapatite) par des ions H^+ sécrétés par des pompes H^+ -ATPase situées au niveau de la bordure en brosse (Fallon M.D. et al, 1984). Quant à la partie organique de la matrice extracellulaire, elle sera dégradée par des métalloprotéinases, les cathepsines (cathepsine K) et les phosphatases acides (Bossard M.J. 1996). La cathepsine K est sécrétée par les ostéoclastes au niveau de la lacune de résorption et elle permet de défaire les fibres de collagène de type I (Troen B.R. et al, 2006). Les métalloprotéinases (MMPs) 9 et 13 sont produites par les ostéoclastes. Une étude chez des animaux a montré qu'une déficience en MMPs 9 et 13 serait responsable d'un important ralentissement de la migration des ostéoclastes (Engzing M.T. et al, 2000). En effet, ces MMPs contrôlent la durée de vie des podosomes qui favorisent l'ancrage des ostéoclastes et ainsi inhibent leur migration (Goto T. et al, 2002). La régulation de la phase de résorption osseuse passe par la production d'ostéoprogérine (OPG) par les Ob via un mécanisme dépendant des récepteurs d'oestrogènes ($ER\alpha$). Cette production d'OPG refreine l'expression génique du ligand RANKL, empêchant ainsi la liaison RANK/RANKL et par conséquent la différenciation ainsi que la prolifération des ostéoclastes (Chen X.W. et al, 2002; Chen X.W. et al, 2003; Viereck V. et al, 2002; Yamagishi T. et al, 2001). À la fin de chaque cycle de résorption, il y a diminution de la résorption osseuse via la diminution du nombre d'ostéoclastes par apoptose. Les œstrogènes sont responsables de l'apoptose ostéoclastique par induction de la production du facteur de croissance transformant ($TGF-\beta$) (Hughes D.E. et al, 1996; Baron R. 2001).

Une fois que cette phase résorptive est finie, il y a remplacement des ostéoclastes par des cellules de type macrophagique qui ont le rôle de lisser la lacune. Après cette phase de conversion, il y a intervention des ostéoblastes pour synthétiser une nouvelle matrice osseuse mais également d'en contrôler la minéralisation. Pour ce faire, il y a d'abord recrutement des ostéoblastes au fond de la lacune appelée ligne cémentante. Ensuite, les Ob comblent la lacune en apposant une nouvelle matrice constituée principalement de collagène de type I. Le collagène de type I est d'abord sécrété sous forme de précurseur, le

procollagène, qui est un peptide possédant des extrémités C et N terminales clivées par protéolyse dans le milieu extracellulaire. Les molécules de collagène de type I forment des triples hélices qui se lient entre elles par des ponts pyridinolines avant de s'assembler en fibrilles. Ces fibrilles s'agencent ensuite en faisceaux. Les Ob synthétisent aussi d'autres molécules non-collagéniques qui doivent venir s'imbriquer à la matrice collagénique nouvellement formée. Parmi ces protéines non-collagéniques, on retrouve l'ostéocalcine et l'ostéopontine qui représentent 50% des protéines non collagéniques, des molécules d'adhésion (cadhérines, intégrines), des protéoglycanes ainsi que des facteurs de croissance (Couret I. 2004).

Cette matrice non minéralisée ou ostéoïde sera secondairement minéralisée ce qui lui confèrera sa solidité. La minéralisation se fait au niveau du front de minéralisation, c'est-à-dire à la jonction entre tissu ostéoïde et tissu minéralisé qui est distant de la surface du tissu ostéoïde de 5 à 30 μm . Les Ob procèdent à la minéralisation en régulant les concentrations de calcium et de phosphate locales et il faut noter que le calcium et le phosphate du milieu extracellulaire sont transférés dans les Ob par transport actif ou passif (Marie R. 2001). Il existe d'autres régulateurs de la minéralisation osseuse tels que l'ostéocalcine, l'ostéopontine, la sialoprotéine ainsi que l'ostéonectine qui semblent posséder des sites de liaison au calcium (Manolagas S.C. et al, 2000). La phosphatase alcaline est l'enzyme synthétisée par les ostéoblastes qui favorise la minéralisation osseuse en hydrolysant les esters phosphoriques qui sont des inhibiteurs de la minéralisation (Khosla S. et al, 2003). Enfin les ostéoblastes synthétisent des facteurs de croissance (TGF- β 1, IGF-1) régulant leur propre métabolisme, des facteurs paracrines qui vont influencer le métabolisme des cellules voisines (Interleukine-1, RANKL, M-CSF1 : facteurs stimulant la formation ou l'activité des ostéoclastes). Certains de ces facteurs sont inclus dans la matrice ostéoïde et seront ultérieurement libérés quand l'os débutera sa phase de résorption (Hartman C. et al, 2006; Gori F. et al, 2000) (Figure 5).

A.



B.

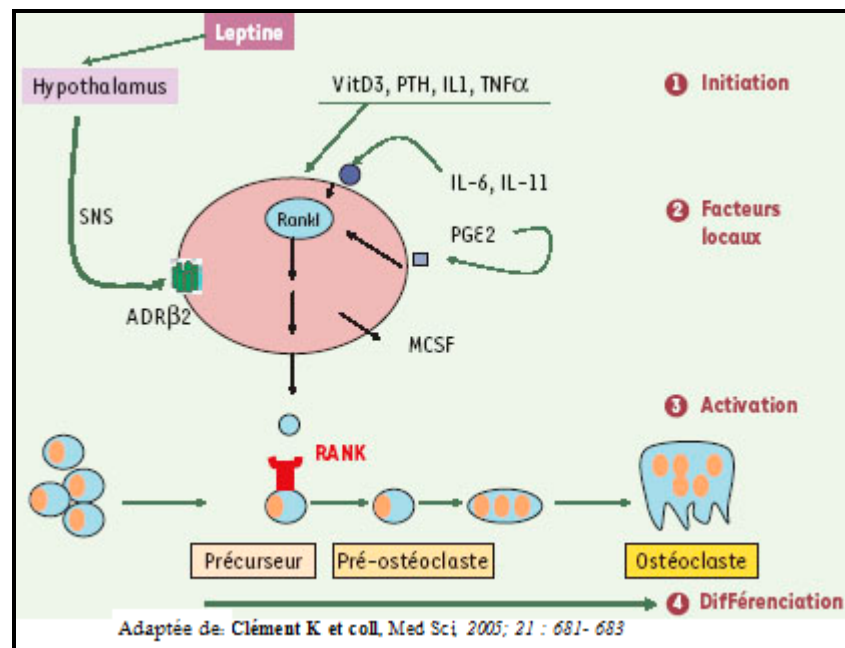


Figure 5: Le remodelage osseux. A) L'homéostasie du squelette est maintenue par les ostéoclastes qui résorbent la veille matrice osseuse suivie par la synthèse et maturation d'une nouvelle matrice osseuse médiée par les ostéoblastes. B) Les ostéoblastes sécrètent plusieurs facteurs dont M-CSF et RANKL qui influencent l'ostéoclastogénèse. Cette intercommunication cellulaire illustre bien le couplage entre la formation et la résorption osseuse.

3.5. La régulation du remodelage osseux

Le processus de remodelage osseux implique la collaboration d'une multitude de facteurs qui orchestrent son bon déroulement. Parmi ces facteurs, on retrouve un marqueur de la formation osseuse, soit la phosphatase alcaline ainsi qu'un marqueur du remodelage osseux soit l'ostéocalcine. Les cellules osseuses secrètent également la vitamine D qui à son tour va réguler la parathormonone qui intervient lors de la différenciation des cellules osseuses.

3.5.1. La phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline (ALP) spécifique à l'os est un produit des ostéoblastes qui est essentiel pour la minéralisation osseuse. En effet, les humains déficients en ALP souffrent de la maladie d'hypophosphatasie qui entraîne une minéralisation anormale des os et des dents (Whyte M.P. et al, 1994). L'ALP circulant provient de plusieurs tissus incluant les intestins, les reins, le placenta en cas de grossesse, le foie, l'os ainsi que plusieurs tumeurs. Ainsi, la mesure de la phosphatase alcaline n'est pas un indice spécifique à la formation osseuse car les deux principales sources d'ALP sont le foie et l'os bien qu'il existe plusieurs techniques (gel électrophorèse, anticorps monoclonal, kit ELISA) pouvant discriminer l'isoforme osseuse versus celle du foie. Le rôle précis de la phosphatase alcaline dans la minéralisation osseuse n'est pas très clair. Toutefois, cette enzyme augmenterait la concentration locale du phosphate inorganique, elle détruirait les inhibiteurs de la formation des cristaux d'hydroxyapatite ou encore elle lierait le calcium et/ou le calcium-ATPase (Khosla S. et al, 2003). C'est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de phosphates d'une variété d'esters, c'est donc une phosphomonoestérase non- spécifique. La détection de son activité se fait par spectrophotométrie en utilisant le p-nitrophényle phosphate (PNPP) comme substrat et en mesurant la libération de p-nitrophénol (PNP) à 405nm.

Pour ce qui est du mécanisme cinétique de la phosphatase alcaline, la sérine 102 située dans le site actif agit en tant que nucléophile lors des réactions d'hydrolyse /transphosphorylation des mono-esters phosphorylés. Lors de cette attaque nucléophile, la sérine devient phosphorylée produisant ainsi un intermédiaire covalent phosphoséryl (E-P). Cet intermédiaire est ensuite hydrolysé avec la formation d'un intermédiaire non-covalent

(E-Pi). Ainsi, l'expulsion du phosphate rend l'enzyme libre et compétente pour un autre cycle catalytique (Notes de cours BCM 2501).

3.5.2. L'ostéocalcine

L'ostéocalcine (OC) est dite (Gla)-protéine car elle contient 3 résidus acides Gamma-carboxyglutamique. Elle constitue 25% des protéines non collagénique de la matrice extracellulaire osseuse (Price P.A. et al, 1976). Cette protéine extracellulaire est composée de 49 à 51 acides aminés avec un poids moléculaire variant entre 5200 à 5900 dépendamment des espèces (Price P.A. et al, 1976; Otawara Y. et al, 1981 et Hauschka P.V. et al, 1983). L'OC est dépendante de la vitamine K et cette protéine régule le dépôt calcique en liant le calcium (Hauschka P.V. et al, 1978). En effet, cette protéine contient 3 résidus d'acides aminés (17, 21 et 24) dits dépendant de la vitamine K que l'on nomme acide gamma carboxyglutamique (Gla). Ces résidus sont formés de manière post-traductionnelle par un complexe enzymatique carboxylase dépendant de la vitamine K et de CO₂. En présence de calcium, les résidus Gla induisent un changement de conformation spécifique de manière à promouvoir la liaison de l'ostéocalcine aux cristaux hydroxyapatite, mais également son accumulation dans la matrice osseuse (Hauschka P.V. et al, 1982; Lian J.B. et al, 1988). Les études de localisation immunocytochimique ont permis la détection de l'OC dans les os et les dents, plus spécifiquement dans les organelles d'ostéoblastes et d'odontoblastes (Camarda A.J. et al, 1987). La synthèse de cette protéine est augmentée par des hauts niveaux physiologiques de la vitamine D, mais cette hormone n'est pas le seul régulateur du métabolisme de l'ostéocalcine (Beresford J.N. et al, 1984; Price A. et al, 1980 et Verhaeghe J. et al, 1989).

La concentration sérique de l'ostéocalcine reflète la portion nouvellement synthétisée qui ne s'est pas encore reliée à la phase minérale osseuse mais qui est directement relâchée dans la circulation. Le surplus d'OC est rapidement éliminé du sang suite à son élimination au niveau des reins, et de plus sa clearance est constante (Price P.A. et al, 1981; Melick R.A. et al, 1988). Il faut mentionner qu'en plus de cette portion circulante, on retrouve une portion d'OC relâchée lors du processus de résorption osseuse,

une fois que l'OC se dissocie de la matrice osseuse (Gundberg C.M. et al, 1986; Ivaska K.K. et al, 2004). Dans la circulation, l'ostéocalcine est présente sous la forme intacte, en fragments de la molécule intacte ou encore la forme sous-carboxylée. Il n'est pas clair si la fragmentation de la molécule intacte survient dans le sang, ou durant le processus de résorption ou encore dans ces deux cas. Toutefois, des études d'essais immunologiques portant sur la mesure des différentes formes d'OC circulantes ont montré que les formes majoritaires étaient la molécule intacte et un large fragment N-terminal contenant les résidus 1 à 43. Ces études suggèrent fortement que la fragmentation d'OC résulte essentiellement de la résorption osseuse et que donc l'OC est un marqueur général du remodelage osseux et non de la formation osseuse (Deftos L.J. et al, 1992; Khosla S. et al, 2003).

Chez l'être humain, la mesure de la concentration sérique d'ostéocalcine est un indice de remodelage osseux, du bon statut métabolique de la vitamine D ainsi que du bon fonctionnement de l'appareil rénal (Kruse K. et al, 1986, Khosla S. et al, 2003). Toutefois, il est très important de considérer les variations dues à l'âge, le sexe ainsi que l'heure de la prise des échantillons sanguins lors de l'interprétation des mesures de la concentration sérique de l'ostéocalcine (Epstein S. et al, 1984; Gundberg C.M. et al, 1985). Des études *in vitro* ont suggérés que l'OC avait le rôle de limiter le processus de minéralisation et des études *in vivo* effectuées chez des souris dépourvues d'ostéocalcine ont montré une augmentation de la masse osseuse (Zhou H. et al, 1994; Ducy P. et al, 1996).

3.5.3. La Vitamine D

Suite à l'exposition au soleil, les végétaux ainsi que les animaux sont capables de synthétiser la vitamine D. Ainsi, la vitamine D₂ sera produite par les levures et les végétaux tandis que les poissons et les mammifères génèrent de la vitamine D₃ (Vit D₃). Il est important de mentionner que la différence structurale et chimique entre ces deux composés n'affecte aucunement leur fonction ainsi que leur métabolisme. Cette vitamine D₃ produite suite à l'exposition au soleil ou ingérée via l'alimentation doit être métabolisée deux fois avant de pouvoir agir en tant que régulateur de l'homéostasie des ions minéraux (Deluca H.F. 2004) (Figure 6).

La vit D₃ s'associe à sa protéine de liaison, la vitamin D binding protein (DBP) avant d'être transportée dans le foie au niveau du cytochrome p450 où l'enzyme 25-hydroxylase (CYP27A1 ou CYP2R1) ajoute un groupement hydroxyl sur le carbone 25 afin de générer la 25-hydroxyvitamine D₃ [25-(OH)D₃] (Haddad J.G. 1995; Cheng J.B. et al, 2003; Ohyama Y. et al, 2004). La 25-(OH) D₃ est un métabolite inactif qui circule dans le système sanguin lié à la protéine DBP et pour atteindre sa bio-réactivité hormonale, ce métabolite doit être hydroxylé de manière appropriée et à des sites spécifiques dans les tubules rénaux. Ainsi, l'hydroxylation du 25-(OH) D₃ en position 1 α par l'enzyme 25-hydroxyvitamine D-1 α -hydroxylase (CYP27B1) permet sa conversion en 1 α , 25-dihydroxyvitamine D₃ [1,25-(OH)₂ D₃] qui est la forme active de la vitamine D₃ appelée également 1,25-dihydroxycholécalférol et qui joue un rôle essentiel dans l'homéostasie des minéraux comme le calcium (Deluca H.F. 2004; Ohyama Y. et al, 2004).

Afin d'exercer son action tissu-spécifique, la forme active de la vitamine D₃ se lie à son récepteur (VDR) ce qui entraîne l'expression de certains gènes responsables de médier l'action physiologique de la 1,25-(OH)₂ D₃ (Haussler M.R. et al, 1998; Norman A.W. et al, 2006). Parmi les gènes induits par cette molécule, on retrouve les gènes codant pour l'hydroxyvitamine D-24-hydroxylase (CYP24A1), une enzyme ayant un effet catabolique sur celle-ci. Ceci permet d'atténuer les effets biologiques de l'hormone 1,25-(OH)₂D₃ dans les cellules cibles mais surtout de réguler l'homéostasie de la vitamine D₃ (Makin G. et al, 1989; Omdahl J.L. et al, 2001). Afin de maintenir le calcium à des niveaux physiologiques le 1,25-(OH)₂ D₃ lié au VDR induit l'expression du canal calcique épithélial TRPV6 dans le petit intestin (Song Y. et al, 2003; Van Cromphaut S.J. et al, 2001). En parallèle, la 1,25-(OH)₂ D₃ induit la transcription de certains gènes responsables de faciliter le mouvement du calcium dans le cytoplasme des entérocytes via les calbindin D9K ainsi que de le transférer à travers la membrane basolatérale via les pompes PMCA1b avant d'atteindre la circulation sanguine (Christakos S. et al, 2003; Raval-Pandya M. et al, 1998; Wasserman R.H. et al, 1992).

La diminution des niveaux de phosphate circulants stimule la synthèse de 1,25-(OH)₂ D₃, qui à son tour augmente le taux d'absorption du phosphate ingéré par la diète (Portale A.A. et al, 1989). De plus, comme les chondrocytes ainsi que les ostéoblastes

expriment le récepteur VDR alors cela suggère fortement que la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ joue un rôle dans la formation osseuse endochondrale (Boivin G. et al, 1987; Johnson J.A. et al, 1996; Narbaitz R. et al, 1983). L'étude d'Owel et al a évalué les effets de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ sur l'expression génique dans les ostéoblastes en culture et surtout son rôle en tant qu'indicateur de l'état de différenciation de ces cellules. Cette étude a démontré que la vitamine D3 module de façon positive et négative l'expression génique de certains marqueurs phénotypiques des Ob et ce dépendamment du stage de différenciation de ces cellules. En effet, il semble que pour les pré-Ob, la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ inhibe l'expression du collagène de type I ainsi que de la phosphatase alcaline tandis qu'à un stade plus tardif de la différenciation, la vitamine D3 stimule l'expression de ces deux gènes. Ces résultats suggèrent donc que les effets pléiotropiques de la vitamine D sur les ostéoblastes dépendent du stade de croissance et de maturation de ce type cellulaire. Cette hypothèse est supportée par des expériences récentes qui ont utilisé des souris déficientes en récepteur de la vitamine D3 (VDR). Au cours de ces expériences, des os provenant des ces souris déficientes en VDR ont été transplantés dans les souris sauvages et il a été observé par radiographie que la densité ainsi que la minéralisation osseuse des ces os déficients en VDR était augmentées si on les compare aux os de type sauvage (Tanaka H. et al, 2004). La $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ est aussi régulée par la parathormone, les niveaux de calcium, le pH environnant, les ions phosphores et par elle-même (St-Arnaud R. 2008).

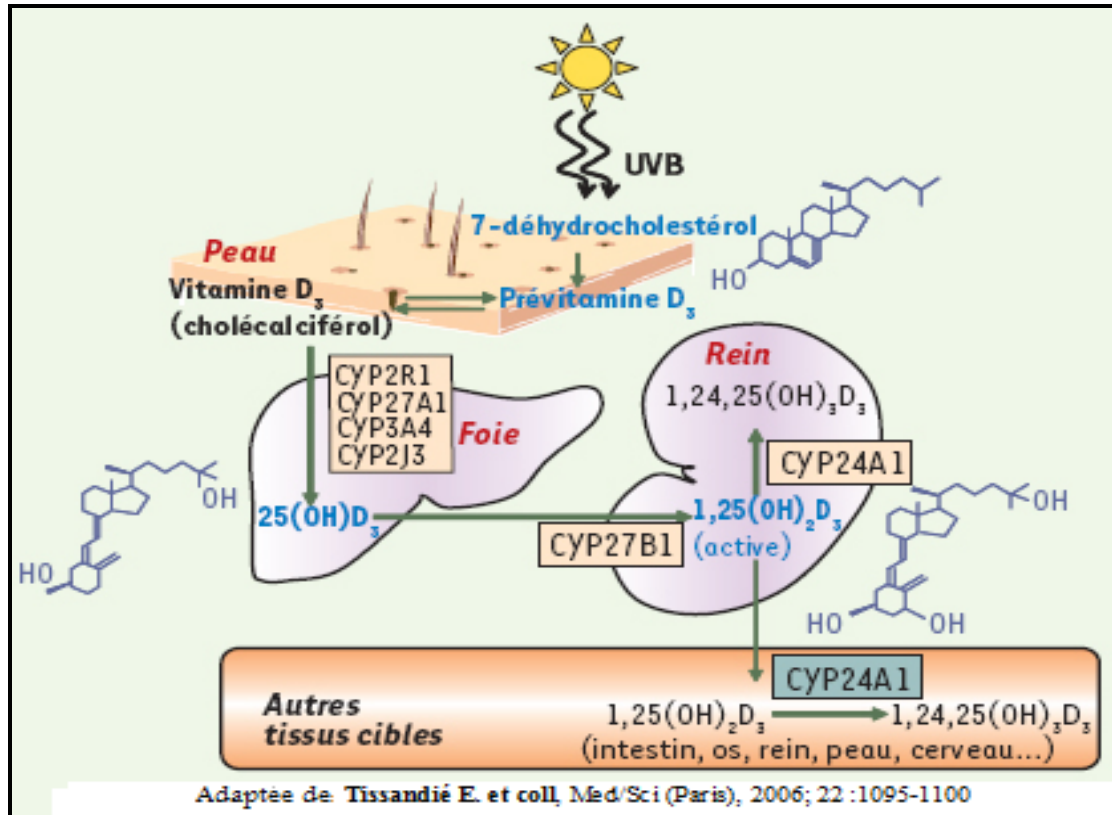


FIGURE 6: Le métabolisme de la vitamine D. Absorption des rayons du soleil par la peau. Conversion de la pré-vitamine D en pro-vitamine D. Cette vitamine va être métabolisée 2 fois au niveau du foie et des reins par plusieurs enzymes de type cytochrome. Une fois active, elle va intervenir dans l'homéostasie des minéraux tel que le calcium dans différents tissus.

3.5.4. La parathormone (PTH)

La PTH est une hormone constituée de 84 acides aminés et qui est synthétisée par les cellules principales de la glande parathyroïde. Cette hormone est stockée sous sa forme finale dans des granules sécrétoires des cellules des glandes parathyroïdes. Elle est initialement produite sous forme de précurseur inactif qui est connu sous le nom de prépro-PTH (115 acides aminés) qui donne naissance à la pro-PTH puis la PTH active par clivages enzymatiques successifs de séquences d'acides aminés. En effet, la PTH circulante résulte d'un mélange complexe constitué de PTH intacte (1–84) [PTH–I], de fragments N-terminaux (1–34) et de différents types de fragments C-terminaux (36–84,44–84,49–84) inactifs. La clairance rénale de tels fragments est variable; elle peut augmenter considérablement en cas d'insuffisance rénale chronique, ou encore ceux-ci peuvent interférer sur la mesure de la PTH. De plus, parmi les six premiers acides aminés de la forme mature, les deux premiers résidus sont indispensables à l'activité biologique de la PTH (Marie P. 2001). Après, un dernier clivage se fait dans la circulation périphérique permettant la libération de la PTH à proprement parler ainsi que d'un fragment biologiquement inactif. La PTH joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme phospho-calcique, de concert avec le 1,25-dihydroxycholécalférol (forme active de la vitamine D). Elle entraîne plusieurs effets au niveau de l'os, du duodénum et du rein.

Dans le tissu osseux, la PTH favorise la résorption osseuse, ce qui entraîne la libération de calcium (Ca^{2+}) dans le sang. Les cellules cibles de la PTH dans l'os sont les ostéoblastes ainsi que leurs précurseurs. Ainsi, la PTH se fixe sur un récepteur membranaire des ostéoblastes et de leurs précurseurs et induit la libération de facteurs solubles comme MCSF-1 qui à son tour va faciliter la transformation d'une cellule souche en pré-ostéoclaste. Par la suite, le facteur RANKL permet la fusion des pré-ostéoclastes entre eux pour former un ostéoclaste. De plus, il y a intervention de l'interleukine-6 (IL-6) afin de permettre la maturation de cet ostéoclaste et de le rendre actif. L'activation des ostéoclastes entraîne donc une augmentation de la résorption osseuse, induisant une libération de calcium et de phosphate. La concentration de PTH est régulée directement par la fraction ionisée de

calcium (Ca^{2+}) plasmatique. Une diminution de cette dernière entraîne une augmentation de la sécrétion de la PTH, alors qu'une augmentation induit l'effet contraire. Une chute plus rapide de la calcémie entraîne une augmentation plus marquée de la PTH. Au niveau moléculaire, la fraction ionisée du calcium plasmatique s'associe à un récepteur membranaire au calcium, qui, via des protéines G va diminuer la concentration intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et va augmenter celle d'inositol triphosphate (IP3), entraînant une inhibition de l'exocytose des granules, et donc de la sécrétion de PTH. Le contraire a lieu lors d'une diminution de la fraction ionisée de calcium plasmatique. Le 1,25-dihydroxycholécalférol inhibe la sécrétion de PTH par effet de rétroaction négatif. Par ailleurs, le magnésium diminue la réponse de l'organisme à la PTH. Toutefois, il faut noter qu'une hypomagnésémie peut entraîner une hypercalcémie. Par ailleurs, la PTH se lie au niveau des cellules cibles à un récepteur transmembranaire couplé à une protéine G, entraînant une augmentation de l'AMPc. Celle-ci entraîne une cascade au niveau de protéines kinases, induisant l'activation par phosphorylation de protéines nécessaires au transport du calcium et d'autres ions.

3.6. Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme des cellules responsables de la formation ainsi que de la résorption osseuse. Parmi ces facteurs, on retrouve le TGF- β 1 ainsi que le facteur mimétique de l'IGF-1.

3.6.1. Le TGF- β 1

Le TGF- β 1 est une protéine faisant partie d'une famille de 35 membres incluant les TGF-bêta ainsi que les « bone morphogenetic proteins » (BMPs) (De caestecker M, 2004). Cette famille de protéines joue un rôle important dans le développement ainsi que dans le maintien de l'homéostasie de plusieurs tissus incluant le tissu osseux. En effet, elles régulent la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, la migration ainsi que la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire. Par ailleurs, ces facteurs contrôlent la réponse cellulaire en cas de blessure ainsi que la fonction immunitaire (Javelaud D et al, 2004). Il existe trois isoformes de TGF- β , respectivement appelés β 1, β 2 et β 3. Toutes ces

isoformes ont un haut taux d'homologie variant entre 84-92%. L'expression de ces trois isoformes est régulée principalement au niveau transcriptionnel et ce, grâce à la différence des séquences promotrices (Roberts A.B. et al, 1998; Jobling A.L. et al, 2004; Govinden R. et al, 2003).

Le TGF- β est sécrété sous forme d'un complexe inactif qui comprend un dimère de TGF- β , son propeptide LAP (latency associated peptide) ainsi que la protéine LTBP (latent TGF- β binding protein) (Lawrence D.A. et al, 2001; Todorovic V. et al, 2005). La liaison du TGF- β à son récepteur requiert une activation de ce facteur. Une fois activée, cette protéine va donc lier le récepteur de TGF- β de type II et ainsi former un complexe qui à son tour va recruter le récepteur de TGF- β de type I qui sera ensuite activé par phosphorylation des résidus sérine/thréonine. Il existe également un récepteur de TGF- β de type III connu sous le nom de bétaglycan qui a le rôle de permettre une haute affinité de liaison de TGF- β 2 à son récepteur de type II (Javelaud D. et al, 2004).

Au delà de la phosphorylation des récepteurs de TGF- β , les protéines de type R-SMADs (mothers against decapentaplegic homolog 2, 3 : SMAD2 ou 3) sont présentées à ce type de récepteur par SARA (SMAD-anchored for receptor activation) pour ensuite y être phosphorylées. Une fois, phosphorylées, les protéines R-SMADs forment un complexe avec une co-SMAD (SMAD4) avant de transloquer dans le noyau pour agir de concert avec ou en tant que facteurs de transcription (Javelaud D. et al, 2004; Roberts A.B. et al, 1999; Verrecchia F. et al, 2002). Aussi, il y a inhibition de la signalisation de TGF- β en présence des I-SMADs (SMAD 6 et 7) qui empêchent la phosphorylation des R-SMADS, ce qui provoque une rétroaction négative sur l'ensemble du système (Davidson E.N.B. et al, 2007).

Le TGF- β induit une cascade de signalisation impliquant l'activation des voies ERK, Jun N-terminal kinase (JNK) et p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Drynck R et al, 2003). Un cross-talk existe entre la voie de signalisation SMAD et les voies induites par TGF- β (Verrecchia F. et al, 2002; Drynck R. et al, 2003). En effet, cette interaction passe via la phosphorylation de SMAD par ERK et JNK, tout en contrôlant l'expression de SMAD7 ainsi qu'une interaction nucléaire entre le complexe SMAD et les facteurs de transcription activés par la voie MAPK. Il faut noter que l'activation de la voie

MAPK n'est pas spécifique à la signalisation de TGF- β et elle peut résulter de plusieurs autres stimuli extérieurs. De plus, la collaboration SMAD/MAPK dépend aussi de l'intervention de cytokines telles que l'interleukine-1 (IL-1) et le tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (Javelaud D. et al, 2005).

Le remodelage du cartilage articulaire normal implique une constante dégradation de la matrice extracellulaire contrôlée par les chondrocytes, qui est compensée par une synthèse d'une nouvelle matrice cartilagineuse. Ainsi, pour le bon déroulement du remodelage cartilagineux, les chondrocytes expriment des facteurs cataboliques ainsi que des facteurs anaboliques tels que le facteur de croissance IGF-1 (insulin-like growth factor) ainsi que le facteur TGF- β qui stimule la production de la matrice extracellulaire (Pujol J.P. et al, 1991; Redini F. et al, 1988; Redini F. et al, 1991; Tyler JA et al, 1989). Il semble que lors de la phase précoce de l'ostéoarthrose (OA), il y ait une augmentation de l'anabolisme des chondrocytes accompagnée d'une surexpression de TGF- β (Goldring S.R. et al, 2004; Van der Kraan P.M. et al, 1997). Ainsi, cette observation démontre que l'OA ne se caractérise pas uniquement par une accélération de la destruction du cartilage. Toutefois, cette augmentation de l'anabolisme du cartilage reste temporaire, ce qui explique l'absence de compensation du catabolisme excessif du cartilage lors de la phase tardive d'OA. L'étude de Blaney D. et al (2006) a démontré que l'inhibition de TGF- β entraîne une plus grande susceptibilité du cartilage aux blessures. Une diminution de ce facteur dans le cartilage pourrait expliquer la réduction de synthèse et de dépôt de la matrice extracellulaire cartilagineuse ainsi que du déséquilibre en faveur du catabolisme lors du remodelage du cartilage chez les sujets OA. Le TGF- β semble également contrecarrer l'effet destructeur induit par l'interleukine-1 (IL-1) au niveau du cartilage et donc en absence de ce facteur, IL-1 peut médier la destruction du tissu cartilagineux (Redini F. et al 1993; Chandrasekhar S. et al, 1988).

Par ailleurs, une expérience de stimulation d'explants de cartilage normal par des mimétiques de TGF- β a induit une augmentation de production de MMP-13 au niveau de la zone profonde du cartilage de patients OA (Moldovan F. et al, 1997). Il semble également que le niveau de TGF- β et de son récepteur soit élevé dans les couches intermédiaires et

profondes du cartilage OA (Moldovan F. et al, 2000). Cette distribution particulière des niveaux de TGF- β et de son récepteur suggère que le TGF- β provenant de l'os sous-chondral puisse être responsable de la surproduction de MMP-13 dans le cartilage OA.

3.6.2. L'IGF-1

En 1957, les facteurs IGF-1 et IGF-2 furent identifiés par Salmon et Daughaday et furent désigné comme des facteurs de sulfatation à cause de leur capacité de stimuler l'incorporation de sulfate dans le cartilage de rat. C'est en 1976 que Rindelknecht et Humbel ont isolé deux substances dans le sérum ayant une structure semblable à la proinsuline, qui furent nommé les facteurs mimétiques de l'insuline (insuline like growth factor -1 et -2 : IGF-1 et IGF-2). Parmi ces facteurs, IGF-1 est le médiateur de l'activité anabolique et mitogène de l'hormone de croissance (Laron Z. et al, 1999). Les IGFs font partis de la famille des peptides relatifs à l'insuline (Blundell T.L. et al, 1980). Le facteur IGF-1 est un petit peptide de 70 acides amines avec un poids moléculaire de 7649 daltons (Rindelknecht E. et al, 1978). Tel que l'insuline, IGF-1 possède une chaîne A et B interconnectées par des ponts disulfures tandis que la région C de ce peptide est faite de 12 acides amines. La similarité structurale entre ce facteur et l'insuline explique sa capacité à lier le récepteur de l'insuline bien qu'avec une faible affinité.

Le gène d'IGF-1 se trouve sur le chromosome 12q23-33. Le gène humain contient 6 exons incluant 2 exons leaders et 2 promoteurs (Brissenden J.E. et al, 1984; Mullis P.E. et al, 1991; Rotwein P. et al, 1991). Ces facteurs sont présents dans la circulation sanguine et sont synthétisés dans multiples tissus incluant le tissu osseux où ils agissent en tant que régulateurs du métabolisme cellulaire. Les facteurs IGF-1 et IGF-2 ont des activités biologiques similaires mais IGF-1 est plus efficace que son homologue. Dans le tissu osseux, le niveau d'expression ainsi que la synthèse locale des protéines spécifiques liant l'IGF-1 (IGF binding proteins : IGFBPs) contrôlent la disponibilité de ce facteur pour lier son récepteur spécifique (Martel-Pelletier J. et al, 1998). Parmi ces IGFBPs, trois semblent important pour la modulation d'IGF-1 dans le tissu osseux, il y a donc IGFBP-3 et IGFBP-4 qui exercent un effet inhibiteur tandis IGFBP-5 stimule la formation osseuse (Martel-Pelletier J. et al, 1998)

Les facteurs IGFs ont une forte activité mitogénique dans les ostéoblastes et ils augmentent la fonction des Ob matures ainsi que la synthèse de la matrice osseuse (Hock J.M. et al, 1998). Ces facteurs préviennent l'apoptose des Ob et ainsi maintiennent une grande proportion des cellules matures (Hill P.A. et al, 1997). Ils favorisent la transcription du collagène de type I mais diminuent celles des MMP-13, une protéase responsable de la dégradation du collagène (Canalis E. et al, 1995). En conséquence à la dégradation du collagène de type I, IGF-1 va augmenter la synthèse de collagène ainsi qu'inhiber sa dégradation, ce qui démontre que ce facteur joue un rôle central dans le maintien de la matrice ainsi que de la masse osseuse. Les expériences chez des souris déficientes en IGF-1 ont montrés une baisse de la formation osseuse. De plus, une surexpression de ce facteur sous le contrôle du promoteur de l'ostéocalcine a provoqué une augmentation de la formation osseuse (Bikle D.D. et al, 2002; Zhao G. et al, 2000). En général, ce facteur a des effets anaboliques et augmente le remodelage osseux chez l'être humain (Grinspoon S. et al, 2002). Le facteur IGF-1 est régulé au niveau de sa synthèse, de la disponibilité des récepteurs ainsi que des IGFbps. En effet, la synthèse de l'IGF-1 est sous le contrôle des hormones et facteurs de croissance. La PTH ainsi que les prostaglandines E_2 sont d'important inducteurs de la synthèse d'IGF-1 dans les ostéoblastes en augmentant les niveaux d'ARN messenger de ce facteur ainsi donc que de l'AMP cyclique (AMPc) en tant que second messenger (Bichell D.P. et al, 1993; Canalis E. et al, 1985; Linkhart T.A. et al, 1989; McCarthy T.L. et al, 1991; Pash J.M. et al, 1995).

IGF-1 est un important régulateur de la formation osseuse mais également un important acteur dans les changements observés dans les tissus osseux et cartilagineux de patients OA (Lajeunesse D. et Reboul P. 2003; Hock J.M. et al, 1988). Il a été démontré que les Ob de l'os sous-chondral de patients atteints d'OA produisent plus d'IGF-1 et moins d'IGFBPs que les Ob de patients normaux. Ainsi, chez les patients OA, l'augmentation de la forme libre d'IGF-1 augmenterait le remodelage osseux et possiblement la rigidité osseuse, situation favorisant la dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage. Toutes ces données suggèrent que ce facteur soit l'un des responsables de la sclérose osseuse observée chez les patients OA (Hilal G. et al, 1998, Massicotte F. et al, 2000; Martel-Pelletier J. et al, 1998).

4. Le tissu osseux arthrosique

Les sections précédentes ont résumé la composition ainsi que la biochimie du tissu osseux normal ainsi que le processus de son remodelage. Le cartilage articulaire a été longtemps désigné comme le tissu principalement ciblé par l'OA. Toutefois, il y a maintenant une décennie que plusieurs études ont suggéré la participation clé et/ou l'intervention de l'os sous-chondral dans la progression de la maladie de l'OA (Burr D.B. et al, 1997, Burr D.B. et al, 1998; Imhof H. et al, 1999).

4.1. L'os sous-chondral ostéoarthrosique

Chez les patients OA ainsi que dans les modèles animaux OA, le métabolisme des Os de l'os sous-chondral ainsi que sa structure sont modifiés. Un examen de l'os péri-articulaire de genou de patients OA a confirmé que l'os sous-chondral est anormal dans les articulations OA notamment avec une structure des trabécules altérée ainsi qu'une sclérose de l'os sous-chondral (Hunter D.J et al, 2003; Hunter D.J. et al, 2003). Les études scintigraphiques de l'os sous-chondral ont permis de localiser les sites où il y avait une augmentation du turnover osseux (Dieppe P. et al, 1993). En effet, il a été montré que l'os sous-chondral de patients OA avait un turnover augmenté de 20 fois si on le compare à celui de l'os normal (Bailey A.J. et al, 2004). Les changements subis par l'os sous-chondral dans l'OA ont aussi été montrés grâce aux études utilisant la section du ligament antérieur croisé (ACL) chez le chien et le rat ou encore les études de menisctomie (MNX) (Wohl G.R. et al, 2001; Hayam T. et al, 2005; Boyd S.K. et al, 2000) (Figure 1).

Au fur et à mesure que l'OA progresse, l'os sous-chondral devient sclérotique suite à une augmentation de la formation osseuse au niveau de la région en périphérie avec le cartilage articulaire, que ce soit du côté latéral et médial, ce qui peut mener à la formation d'ostéophytes (Felson D.T. et al, 2005). La dégénérescence du cartilage articulaire observée chez les malades OA est associée à un remodelage intensif de l'os sous-chondral qui mène à l'épaississement de ce dernier, propriété qui a longtemps suggéré un durcissement de cet os. Une plus grande rigidité de l'os sous-chondral OA en comparaison à l'os normal diminuerait sa qualité en tant qu'absorbeur de choc en plus d'augmenter les tensions dans l'os trabéculaire proche du plateau tibial (Radin E.L. et al, 1970, Radin E.L. et al, 1980; Mc

Kinley T.O. et al, 2003; Brown A.N. et al, 2002). Cependant, des travaux plus récents ont montré que l'os sous-chondral OA était en réalité moins rigide qu'on ne le pensait car il était hypominéralisé par rapport à l'os normal (Bailey A. J. et al, 2002; Burr D.B. et al, 1998). Pour finir, il faut noter que l'os sous-chondral est séparé du cartilage articulaire par une mince couche calcifiée, ce qui peut sous entendre une possible communication entre ces deux tissus (Burr D.B. et al, 2003).

4.2. La biochimie de l'os sous-chondral

Le tissu osseux produit des cytokines pro-inflammatoires ainsi que plusieurs facteurs de croissance qui sont impliqués dans le remodelage osseux et dans le catabolisme du cartilage articulaire (Lajeunesse D. et Reboul P; 2003). Certains chercheurs ont démontrés la présence de micro-fractures et canaux qui apparaissent au niveau de la région de démarcation entre l'os sous-chondral et la région calcifiée du cartilage articulaire durant la phase précoce de l'OA (Sokoloff L. et al, 1993; Clark J.M. 1990; Milz S. et al, 1994). Ces observations indiquent une possible communication entre l'os sous-chondral et le cartilage permettant un trafic de cytokines et facteurs de croissance entre ces deux tissus (Sokoloff L. et al, 1993; Mital M.A. et al, 1970). Ainsi, les produits métaboliques de l'os sous-chondral peuvent participer au catabolisme du cartilage articulaire (Westacott C.L. et al, 1997; Guévremont M. et al, 2003).

Dans le cas de la maladie d'OA, il est fort probable que les cytokines, IGF-1, TGF β 1 et les prostaglandines produits par l'os sous-chondral traversent la ligne de démarcation entre cartilage et os pour aller stimuler la dégénérescence du cartilage. Cette hypothèse est supportée *in vitro* par Westacott et al, qui démontra que la présence d'un facteur dans le milieu conditionné des ostéoblastes de patients OA entraîne des dommages au cartilage normal. En parallèle, il a été montré que le facteur HGF (Hepatocyte growth factor) serait produit par les Ob de l'os sous-chondral et non par les chondrocytes, avant de pouvoir traverser la ligne de démarcation et se retrouver dans le cartilage (Guévremont M. et al, 2003; Grano M. et al, 1996; Skrtic S. et al, 2000; Blanquaert F. et al, 2000). En effet, les Ob de l'os sous-chondral de patients OA produisent plus de HGF que les Ob normaux et ce facteur se trouve dans la couche profonde du cartilage articulaire OA où il peut y induire

la collagénase-3, enzyme responsable de la dégradation de ce tissu cartilagineux (Reboul P. et al, 2001; Moldovan F. et al, 1997).

Plusieurs études ont montrés que les Ob de l'os sous-chondral de patient OA présentent un phénotype altéré et qu'ils sont beaucoup plus métaboliquement actifs si on les compare aux Ob normaux (Bailey A.J. et al, 2002). De plus, la sclérose de l'os sous-chondral OA qui en résulte, serait liée à une régulation anormale du système urokinase plasmin (uPA/plasmin system), du ratio IGF/IGFBP, du niveau de TGF- β 1, d'IL-6 ainsi que de prostaglandine E₂(PGE₂) (Massicotte F. et al, 2002; Paredes Y. et al, 2002; Hilal G. et al, 1998). Les Ob OA ont montré une augmentation des niveaux d'ostéocalcine et de phosphatase alcaline *in vitro* et *in situ* (Hilal G. et al, 1998, Hilal G. et al, 1999, Hilal G. et al, 2001; Gevers G. et al, 1987). La détermination des niveaux d'ostéocalcine (marqueur de la formation osseuse) dans le liquide synovial ainsi que d'ostéopontine (protéine de la matrice osseuse) a montré que la synthèse surpasse la dégradation osseuse (Sharif M. et al, 1995).

Il faut rappeler que la minéralisation osseuse nécessite des fibres de collagène de type I, or une étude a démontré que le taux de collagène de type I était élevé dans l'os trabéculaire des têtes de fémur de patients OA, mais que ce collagène avait des propriétés différentes en comparaison au collagènes de personnes saines (Mansell J.P. et al, 1998). Le collagène est un hétérotrimère constitué de chaînes α 1 et α 2 avec un ratio de 2:4:1 dans l'os normal et ce ratio peut varier de 4:1 à 17:1 dans le tissu de patients OA (Bailey A.J. et al, 2002). Une augmentation du niveau des chaînes α 1 par rapport à α 2 entraîne une compaction des fibres de collagène, une réduction des liaisons dans l'ensemble du réseau de collagène et enfin une exagération d'hydroxylation des lysines des fibres de collagène ce qui peut être à l'origine d'une minéralisation anormale de l'os sous-chondral de patients OA (Bailey A.J et al, 2002; Martel-Pelletier J. et al, 2003). De plus, les Ob OA ont une diminution de l'expression des récepteurs de PTH, ce qui les rend partiellement résistant à la PTH (Hilal G. et al, 1998, Hilal G. et al, 2001. Ces données peuvent ainsi expliquer l'augmentation de la synthèse de collagène de type I puisque la PTH est responsable de l'inhibition de la synthèse de ce type de collagène (Beresford J.N. et al, 1984; Dietrich J.W. et al, 1976). C'est ainsi que ce déséquilibre entre les protéines collagéniques et non-

collagéniques pourrait expliquer l'augmentation du volume osseux mais sans un pareil changement de la minéralisation osseuse. Pour finir, l'activité de deux métalloprotéinases (MMP-2 et-9) est élevée dans le tissu osseux des têtes fémorales de patients OA, ce qui serait responsable du dépôt anormal des fibres de collagène au niveau de la matrice osseuse (Mansell J.P. et al, 1998; Martel-Pelletier J et al, 2003).

5. La leptine

La détection de la leptine dans le liquide synovial de patients OA a fortement suggéré le rôle de cette adipocytokine dans l'étiologie de l'OA notamment au niveau de l'os sous-chondral (Dummond H. et al, 2003). Ceci constitue le sujet abordé dans les prochaines sections. La leptine est une hormone qui exerce plusieurs effets notamment en contrôlant la satiété via une modulation de neurotransmetteurs au niveau de l'hypothalamus ou encore en modulant le métabolisme des cellules du tissu osseux. Il faut noter que ses effets pléiotropiques dépendent de son lieu d'action qui peut être systémique ou locale.

5.1. La leptine et sa signalisation

La leptine est une hormone ressemblant à une cytokine, qui est dérivée des adipocytes et qui fût découverte en 1994 par Friedman et al. Cette hormone est une protéine non-glycosylée de 16 kDa (167 acides aminés) encodée par le gène OB et qui est principalement exprimée dans le tissu adipeux blanc (Zhang F. et al, 2005). La structure tridimensionnelle de la molécule de leptine est constituée de 4 hélices alpha antiparallèles connectées par deux long liens ainsi qu'une boucle arrangée telle une hélice de tour gauche de façon à ce que les hélices forment deux rangées (Figure 7). De plus, il y a un pont disulfure entre deux résidus cystéines (Cys₉₆ and Cys₁₄₆) du côté C-terminal de la leptine et le début d'une boucle importante pour le repliement de la structure et la liaison de la leptine à son récepteur. Ainsi, une mutation de ces résidus rend cette protéine biologiquement inactive. La séquence protéique de la leptine est conservée dans différentes espèces et une grande homologie de séquence a été identifiée entre les molécules humaines et celles de chimpanzés (Fruhbeck G. et al, 1998; Madej T. et al, 1995 ; Zhang F. et al, 1997; Kline A. et al, 1997; Prolo P. et al, 1998).

Le récepteur de la leptine fait partie de la famille des interleukine-6 (IL-6) récepteurs puisqu'il contient un domaine de liaison extracellulaire, un domaine membranaire ainsi qu'un domaine cytosolique (Tartaglia L.A. et al, 1995). L'épissage alternatif du gène codant pour le récepteur à la leptine a donné naissance à cinq isoformes de ce type de récepteur (Figure 7). Ces isoformes ont en commun un domaine extracellulaire de 800 acides aminés, un domaine transmembranaire de 34 acides aminés ainsi qu'un domaine intracellulaire variable. Le long isoforme du récepteur à la leptine (OB-Rb) est le seul capable de transduction du signal car, seul son domaine intracellulaire d'environ 300 résidus possède les motifs requis afin d'interagir avec les protéines nécessaires et transmettre le signal (Tartaglia L.A. et al, 1995). Quant au domaine extracellulaire d'OB-Rb, il a deux motifs similaires aux récepteurs des cytokines ainsi que quatre domaines fibronectine de type III (Tartaglia L.A, 1997). L'isoforme le plus court du récepteur à la leptine (OB-Ra) et OB-Rb ont en commun le domaine transmembranaire et extracellulaire ainsi que les 29 premiers résidus du domaine intracellulaire mais cet isoforme ne participe qu'à la clearance de la leptine et/ou au transport de celle-ci à travers la barrière hémato-encéphalique (Zhang F. et al, 2005). La leptine se retrouve dans la circulation sous forme libre ou encore liée. La signalisation intracellulaire de la leptine est médiée via son association non covalente avec une tyrosine kinase de la famille Janus Kinase (JAK), acteur principal de la voie de signalisation JAK/STAT. Toutefois, il faut noter que le récepteur OB-Rb peut médier son signal via plusieurs voies de signalisation tel que SHC/GRB2, IRS-2, PI-3 Kinase, MAPK, la voie AMPK ainsi que l'activation ERK1/2 qui est dépendante de SHP-2 (Otero M. et al, 2006).

Le récepteur OB-Rb signale principalement via la voie de signalisation JAK/STAT qui comprend une famille de quatre protéines tyrosines kinases (JAK) et des facteurs de transcriptions d'environ 85 à 90 kDa qui sont régulés par phosphorylation sur des résidus sérine et tyrosine spécifiques (Fruhbeck G, 2007).

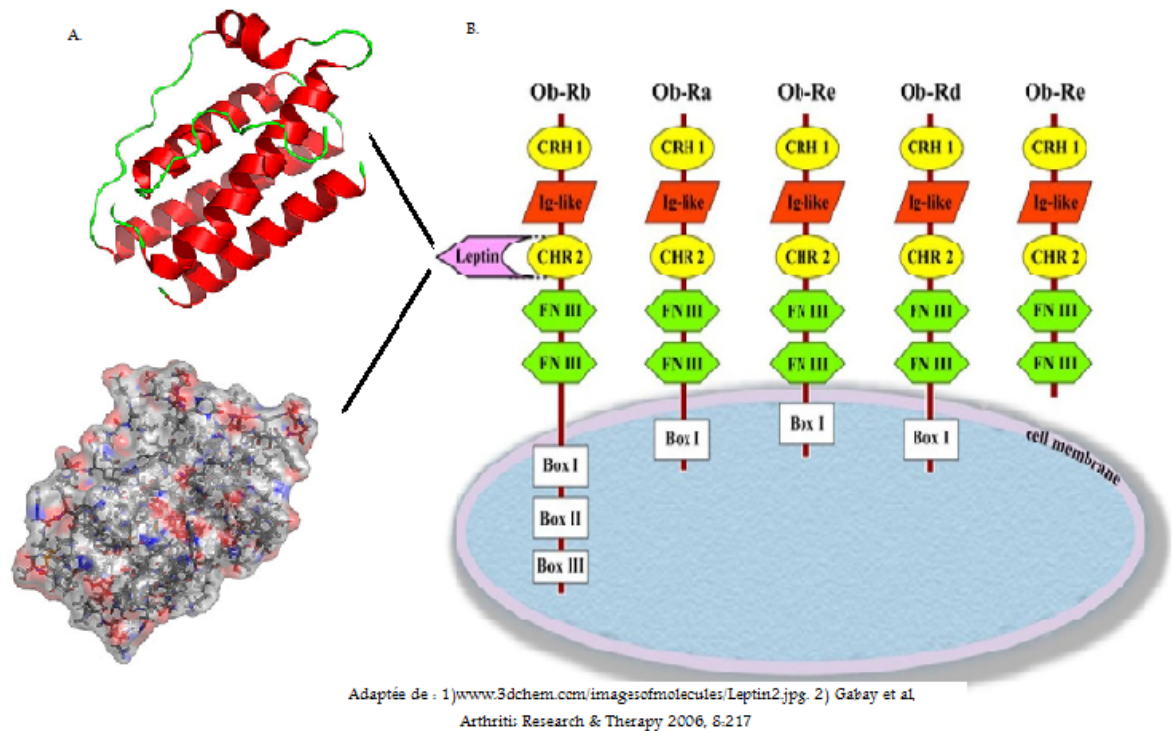
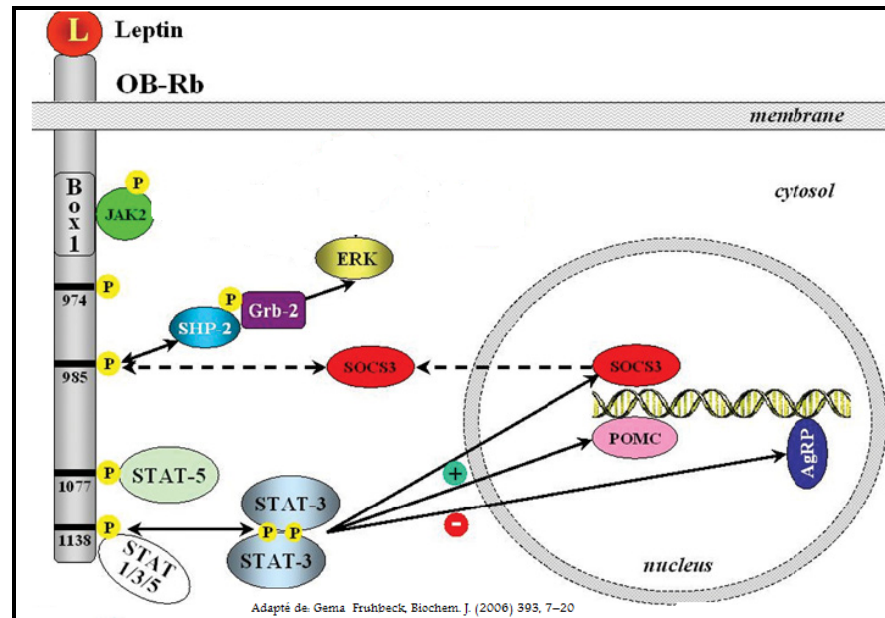


FIGURE 7: La structure de la leptine et de ses récepteurs. A) Structure de la leptine en 3D, avec une représentation des 4 hélices alpha parallèles reliées par des boucles ainsi qu'une représentation par cristallographie. B) Représentation structurale des six isoformes de récepteurs de leptine résultants de l'épissage alternatif. Identification des différents motifs qui les constitue. Ob-Rb est le seul récepteur actif pouvant transmettre le signal et la leptine y lie le motif CHR2.

Parmi les quatre membres de la famille JAK, trois sont les plus répandus soit JAK1, JAK 2 et TYK2 (Ihle I. N. 1995). OB-Rb ne possède pas de domaine intrinsèque tyrosine kinase mais peut lier les kinases cytoplasmiques, principalement JAK2 (Ghiraldi N. et al, 1997). En effet, ce récepteur possède deux domaines de liaison à JAK que l'on nomme Box 1 et 2 ainsi que plusieurs sites de liaison des protéines STAT. La liaison de la leptine à OB-Rb dans un ratio stœchiométrique (1 :1) mène à la formation d'un complexe tétramérique récepteur-ligand. La formation de ce complexe engendre un changement de conformation dans la structure du récepteur qui semble être critique pour l'activation de la signalisation de la leptine (Hegyí K. et al, 2004). La présence de la leptine est nécessaire pour l'hétérodimérisation des récepteurs de la leptine (White D. et al, 1999; Devos R. et al, 1997). OB-Rb ne possède pas d'activité enzymatique mais peut signaler suite à une association non covalente de JAK2 au niveau de son site Box2 qui est proximal à la membrane, ce qui entraîne une phosphorylation des tyrosines (Tyr⁹⁸⁵, Tyr¹⁰⁷⁷, Tyr¹¹³⁸) de l'OB-Rb fonctionnel. Les sites phosphorylés deviennent alors des sites de liaison des protéines STAT (ex: phosphorylation de Tyr¹¹³⁸ active la STAT3), qui à leur tour sont activées avant de transloquer au noyau afin d'y stimuler la transcription de certains gènes cibles (Fruhbeck G. 2006). (Voir Figure 8)

Cette voie de signalisation JAK/STAT est régulée via une rétroaction négative exercée par les protéines SOCS (suppressors of cytokine signalling). La famille des protéines SOCS possède un domaine SH2 qui est induit par plusieurs cytokines dont la leptine, et agissent en tant qu'inhibiteurs de leur signalisation. La leptine induit l'expression de SOCS3 et des études ont montré que le résidu Tyr985 de Ob-Rb représente un site de liaison de haute affinité pour SOCS3. L'expression endogène de SOCS3 empêche la phosphorylation des tyrosines d'OB-Rb, ce qui bloque la signalisation de ce dernier (Sahu A. et al, 2004; Bjorbaeck C. et al, 2000). L'autre inhibiteur de la signalisation de la leptine est le PTP1B (proteín tyrosine phosphatasase 1B) qui empêche la transmission du signal *in vivo* et *in vitro* en déphosphorylant JAK2 (Bjorbaeck C. et al, 2004; Sahu A. et al, 2004). (Figure 8).

A.



B.

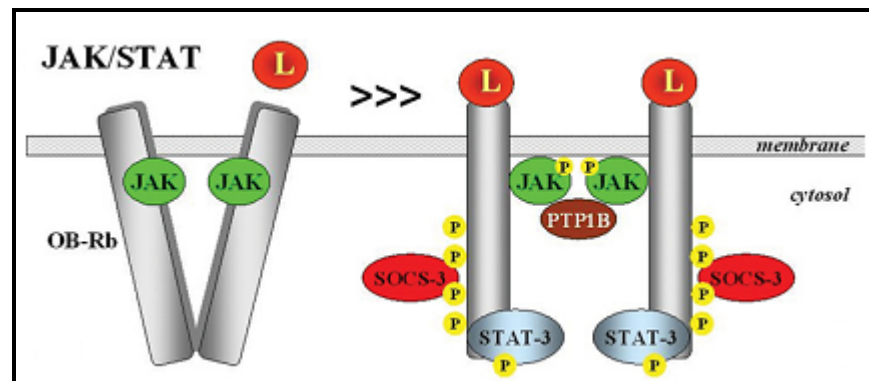


Figure 8: La signalisation de la leptine. A) La liaison de la leptine sur son récepteur OB-Rb induit la phosphorylation de Jak situé au niveau du motif Box 1. Ensuite, il y a transphosphorylation des résidus tyrosine qui mène à l'activation ainsi que la translocation des facteurs Stat 3. La translocation de Stat3 au noyau permet d'activer plusieurs gènes dont SOCS3 qui régule négativement la signalisation de la leptine. La leptine induit également une cascade impliquant plusieurs voies dont ERK. **B)** Ce schéma résume la régulation de la signalisation de la leptine, soit par rétroaction négative médié par STAT-3 via SOCS-3 ou encore la dimérisation des récepteurs OB-Rb médié par la liaison de PTP1B au niveau de JAK.

Le rôle principale de la leptine est de contrôler la prise alimentaire ainsi que la dépense énergétique via son interaction avec différents neuropeptides tels que la Neuropeptide Y (NPY) ou encore l'agouti related peptide (AGRP). L'expression de ces deux neuropeptides est inhibée en présence de leptine tandis que l'expression du pro-opiomélanocortine (POMC) est stimulée lors d'une augmentation de la prise alimentaire (Wardlaw S.L. et al, 2001; Patel M.S. et al, 2007). Aussi, la leptine interagit avec un nouveau neuropeptide hypothalamique nommé neuromedin U (NMU) qui est également impliqué dans la régulation de l'appétit ainsi que dans l'activité locomotrice (Sato M. et al, 2007). En dehors du métabolisme énergétique, la leptine a démontrée des effets pléiotropiques notamment dans la régulation de l'hématopoïèse, la pression sanguine, la fonction des lymphocytes T, la reproduction ainsi que la régulation de la masse osseuse (Zhang F. et al, 2005; Sirotkin A.V. et al, 2007). L'expression de la leptine est régulée par la prise alimentaire, les hormones ainsi que des cytokines. En effet, la synthèse de la leptine est stimulée en présence de certains médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1 et le TNF- α . De plus, la leptine est régulée par les hormones sexuelles car son expression est inhibée en présence des stéroïdes testiculaires tandis qu'elle est stimulée en présence des stéroïdes ovariennes. Les niveaux de leptine corrént positivement avec ceux de l'insuline et négativement avec les glucocorticoïdes (Gomez R. et al, 2007).

5.2. La leptine systémique vs la leptine locale dans l'os

La leptine module le métabolisme osseux de manière systémique via la modulation de certains neurotransmetteurs et/ou de molécules gérant le cycle cellulaire, ou encore de manière locale à partir du microenvironnement entourant le tissu osseux. En 2004, Hanada et ses collègues ont identifié un peptide hypothalamique qui ferait un lien entre la prise alimentaire et le métabolisme osseux. Cette neuropeptide Neuromedin U (NMU) est un régulateur potentiel de la formation osseuse. En effet, il semble que les souris déficientes (NMU $^{-/-}$) démontrent une augmentation de 30% au niveau de la formation osseuse ainsi que de la masse osseuse des os trabéculaire et compact si on les compare aux souris sauvages (Sato S. et al, 2007). Il semble également que dans ces mêmes souris déficientes, les molécules gérant le cycle cellulaire (Per1/Per2) soient régulées à la baisse. Cela suggère donc que le NMU régule les molécules responsables du cycle cellulaire via le système

nerveux central par un mécanisme encore méconnue. Ainsi, ces études ont donc suggérées que le NMU soit le médiateur systémique qui gouverne la régulation de la formation de la masse osseuse dépendante de la leptine (Sato S. et al, 2007).

Dans les ostéoblastes, le signal nerveux par voie sympathique est régulé par les molécules contrôlant le cycle cellulaire (Per ou Cry) qui contribuent à la variation quotidienne de la prolifération de la moelle osseuse. De plus, les souris déficientes en Per2 ont une augmentation de la masse osseuse qui est due à une formation osseuse augmentée (Patel et Elefteriou. 2007; Fu et al, 2005). La leptine stimule également un autre neuropeptide hypothalamique qui se nomme le transcrite régulé par la cocaïne et les amphétamines (CART) (Kristensen P. et al, 1998). Les souris déficientes en CART avaient une baisse de la masse osseuse due à une augmentation de la résorption osseuse stimulée par RANKL (Elefteriou F. et al, 2005). La leptine semble donc réguler la résorption osseuse de deux manières, soit par le système nerveux sympathique et la voie RANKL ou encore en inhibant la résorption via une surexpression de CART (Karsenty G. 2006).

Les souris déficientes en leptine (Ob/Ob) et déficientes en récepteur de la leptine (db/db) sont obèses et peu fertiles (Ducy P. et al, 2000). Ces souris mutantes avaient une hausse de la masse osseuse qui serait due à une augmentation de la formation osseuse. De plus, une expérience d'injection intracerebroventriculaire de la leptine a entraîné une baisse de la masse osseuse autant chez les souris déficientes en leptine que chez les souris sauvages. Il apparaît clair que la leptine agit en tant qu'inhibiteur de la formation osseuse lorsqu'elle agit via le système nerveux central (SNC). Toutefois, ces effets de la leptine sur l'os ne sont pas uniformes sur tout le squelette dépendamment si celle-ci agit au niveau des régions axiales ou appendiculaires (Hamrick M.W. 2004). Ainsi, dans les souris Ob/Ob, on observe un raccourcissement du fémur, une diminution du volume des os trabéculaire et cortical si on les compare à des souris sauvages (Hamrick M.W. 2005; Baldock et al, 2006). L'ensemble de ces résultats suggère que la leptine agit différemment au niveau local dans l'os. Toutefois, cette observation reste mitigé comme l'a montré une étude récente de Martin A. et al (2008) qui traite de ce même phénomène mais en administrant la leptine dans des rats par infusion intracerebroventriculaire.

Un lien entre le tissu adipeux ainsi que le tissu osseux peut se faire localement dans le microenvironnement de l'os. En effet, les cellules stromales peuvent se différencier en ostéoblastes ou adipocytes et ce, en présence de certains facteurs de transcription tel que Runx2 dans le cas des Ob (Nuttall M.E. et al, 2000). La leptine inhibe la différenciation des cellules stromales en adipocytes tout en stimulant leur différenciation en ostéoblastes (Thomas T. et al, 2001). Les traitements avec de la leptine favorisent une augmentation du ratio d'expression OPG/RANKL (Holloway W.R. et al, 2001). Ce résultat s'accorde avec l'étude qui a démontré qu'une administration locale de la leptine réduit la perte de masse osseuse résultant d'une ovariectomie et pour ce faire, cette hormone induit une augmentation des ARN messagers d'OPG (Burguera B. et al, 2001). Localement, la leptine a une action anabolique alors que de manière systémique, elle a un effet antiostéogénique.

Pour terminer, l'effet bimodal de la leptine sur l'os est dose dépendante. En effet, l'administration d'une faible dose de leptine compense la baisse de leptine dans le sérum et prévient une perte osseuse tant au niveau de l'os trabéculaire que l'os compact. Cependant, l'administration d'une dose élevée de leptine va inhiber la croissance du fémur, réduire la masse osseuse en inhibant la formation osseuse ainsi qu'en augmentant les niveaux d'IGF-1 (Cirmanová V. et al, 2008). L'action de la leptine a été préservée au cours de l'évolution de manière à synchroniser son effet bimodal durant les différentes périodes de croissance de l'os. En effet, la leptine contribue à l'accessibilité des minéraux et favorise la fertilité en période d'abondance de nourritures. Cependant, elle restreint la croissance osseuse ainsi que la reproduction en cas de stress nutritionnel (Hamrick M.W. 2004)

5.3. La leptine dans l'OA

La leptine est en corrélation avec l'indice de masse corporel (IMC). L'IMC est aussi un indice de grand risque de développer l'OA. Ainsi, cela sous-entend que la leptine puisse jouer un rôle dans le développement de l'OA (Marks R. et al, 2002). Plusieurs études ont montré que la leptine module l'homéostasie du cartilage articulaire. La leptine ainsi que son récepteur OB-Rb ont été identifiés dans les chondrocytes humains et ils induisent un signal intracellulaire via l'activation de STAT1 et STAT5 mais non de STAT3 (Figenschau Y. et al, 2001). L'expression de la leptine est régulée à la hausse dans plusieurs tissus articulaires tels que le cartilage, les ostéophytes et l'os sous-chondral or, ces tissus subissent des

changements structuraux et biochimiques entraînés par l'OA en comparaison aux tissus normaux (Dummond H. et al, 2003; Lajeunesse D. et al, 2005). Le patron d'expression ainsi que le niveau de leptine sont le reflet du niveau de dégradation du cartilage articulaire et celui des facteurs de croissances comme TGF- β 1 et IGF-1. En effet, des expériences d'injection de leptine intraarticulaire dans le genou de rat ont provoqué une augmentation de l'expression de TGF- β et IGF-1 (Pottie P. et al, 2006). De plus, dans les chondrocytes humains mis en culture, la leptine stimule la prolifération cellulaire, la synthèse de la matrice extracellulaire mais de manière biphasique puisque à de très hautes concentrations, elle a un effet inhibiteur. Ainsi, un excès de leptine entraînerait des lésions semblables à celles observées dans l'OA (Van Beuningen H.M. et al, 2000). La leptine en collaboration avec plusieurs cytokines pro inflammatoire va médier la destruction du cartilage articulaire. En effet, la leptine en synergie avec IL-1 va augmenter la production d'oxyde nitrique (NO), cette dernière va faciliter la destruction du cartilage en induisant l'apoptose des chondrocytes, en activant les métalloprotéinases (MMP-13) et enfin en inhibant la synthèse de protéoglycanes et de collagène de type II (Otero M. et al, 2005; Iliopoulos D. et al, 2008). La leptine a été détectée dans le liquide synovial (SF) de patients OA, et une corrélation significative entre les niveaux de leptine du SF et l'IMC des patients a suggéré fortement que cette hormone s'est retrouvée dans le SF suite à une diffusion à travers la membrane synoviale (Dumond H. et al, 2003).

L'implication de la leptine au niveau des Ob de l'os sous-chondral de patients OA reste encore mal comprise et constitue donc le sujet du présent travail.

6. Les approches thérapeutiques de l'OA

La recherche fondamentale et clinique sur la pathologie d'OA visent un but commun, soit mieux comprendre l'origine ainsi que la progression de cette pathologie afin d'en concevoir le traitement le plus efficace. Le traitement idéal permettrait donc d'améliorer et/ou de préserver la structure et l'ensemble des propriétés biochimiques de l'articulation de patients OA. Durant la dernière décennie, les données ont fortement suggéré qu'en plus du cartilage articulaire l'os sous-chondral serait une cible clé pour les futures approches thérapeutiques de l'OA. Cette section résume les traitements les plus utilisés à l'heure

actuelle. En se basant sur l'hypothèse selon laquelle l'os sous-chondral serait sclérotique en phase précoce d'OA, des études dans des modèles de chiens ACL ont été réalisées. Elles ont montré qu'un traitement à la calcitonine chez ce modèle de chiens OA a diminué les marqueurs de la résorption osseuse dans l'urine, la sévérité des lésions du cartilage ainsi que la taille des ostéophytes (Manicourt D.H. et al, 1999). De plus, dans ce même modèle, il semble que le traitement avec le biphosphonate etidronate, il y a atténuation des lésions du cartilage ainsi que des ostéophytes (Howell D.S. et al, 1995). L'utilisation du biphosphonate (NE-10055) a réduit le remodelage de l'os sous-chondral OA tout en améliorant la biochimie du cartilage OA mais cependant ce traitement n'a aucun effet sur les altérations du cartilage ni sur la formation d'ostéophytes (Myers S.L. et al, 1999).

L'utilisation d'alendronate chez le modèle de rats ACL a permis de réduire les lésions du cartilage, la formation des ostéophytes en réduisant le niveau de MMP-13 ainsi que le relâchement de TGF β -1 active par l'os. Il atténue également la résorption de l'os sous-chondral en inhibant l'expression de MMP-9 (Hayami T. et al, 2004). De plus, l'étude de la licofélone dans le modèle de chiens ACL a empêché le développement des lésions du cartilage et la résorption de l'os sous-chondral via l'inhibition de la MMP-13 et de la cathepsine K (Pelletier J.P. et al, 2004). L'utilisation des inhibiteurs de l'activité des cyclooxygénases (NSAID) tel que le carprofen a diminué le remodelage et la résorption de l'os sous-chondral (Pelletier J.P. et al, 2000). Il y a eu également l'utilisation de différents antagonistes aux cytokines et facteurs de croissance tels que IL-1, IL-6, TNF- α et TGF- β , et ce afin de contrôler l'inflammation de l'articulation de patients OA. En effet, le mécanisme d'action de ces antagonistes consistait à une atténuation de la dégradation du cartilage par une diminution des métalloprotéinases et autres protéines régulant la MEC (Goldring M.B. 2001; Malesud C.J. 2004).

L'ensemble des traitements permet d'atténuer et/ou de modifier le caractère OA des articulations, notamment le caractère sclérotique de l'os sous-chondral. Toutefois, aucune de ces thérapies ne permet de prévenir ou bien d'éradiquer la pathologie de l'OA. Il serait donc évident que les futurs traitements ciblent l'ensemble du remodelage osseux, plus particulièrement la sclérose de l'os sous-chondral.

7. L'hypothèse de recherche

L'ostéoarthrose (OA) est une maladie dégénérative, très incapacitante et qui génère d'importants coûts économiques. Elle est caractérisée par une dégradation du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral, une inflammation de la membrane synoviale et une formation d'ostéophytes. Le rôle clé de l'os sous-chondral dans l'OA est maintenant reconnu. De plus, l'obésité est un facteur de risque de l'OA et sachant que l'OA est aggravée par les cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- α et IL-6, nous avons émis l'hypothèse que la leptine, une adipocytokine clé dans l'obésité et pro-inflammatoire, joue un rôle important dans l'OA. Cette protéine est exprimée dans les ostéoblastes (Ob) mais très peu dans les chondrocytes. Puisque les Ob OA ont un phénotype altéré, notre objectif ici fut de déterminer le rôle potentiel de la leptine dans les Ob OA. Pour ce faire, nous avons préparé des cultures primaires d'Ob issus de la plaque sous-chondral du plateau tibial de patients OA et d'individus normaux (N). Les buts de cette étude étaient de :

- 1) Déterminer l'expression et la production de la leptine et de son récepteur (OB-Rb) dans les ostéoblastes normaux et OA.
- 2) Déterminer l'effet de la leptine sur le phénotype des Ob OA.
- 3) Déterminer l'impact de l'inhibition de l'effet de la leptine par les SiRNA (Si leptine et Si OB-Rb) sur le phénotype des Ob OA.
- 4) Déterminer l'effet dose-réponse de la leptine sur la prolifération des Ob OA ainsi que la voie de signalisation responsable.
- 5) Déterminer l'effet de la leptine sur sa propre expression et sur l'expression de TGF- β 1.
- 6) Déterminer la signalétique de la leptine dans les Ob OA et N.

Cette approche a permis de mieux cerner le rôle joué par la leptine dans le phénotype anormal et dans le métabolisme anormal des ostéoblastes OA. Ainsi, ces données nous aideront à mieux comprendre l'origine de la sclérose osseuse observée dans l'os sous-chondral des patients OA. Cette sclérose serait responsable de la dégradation du cartilage articulaire de ces mêmes patients.

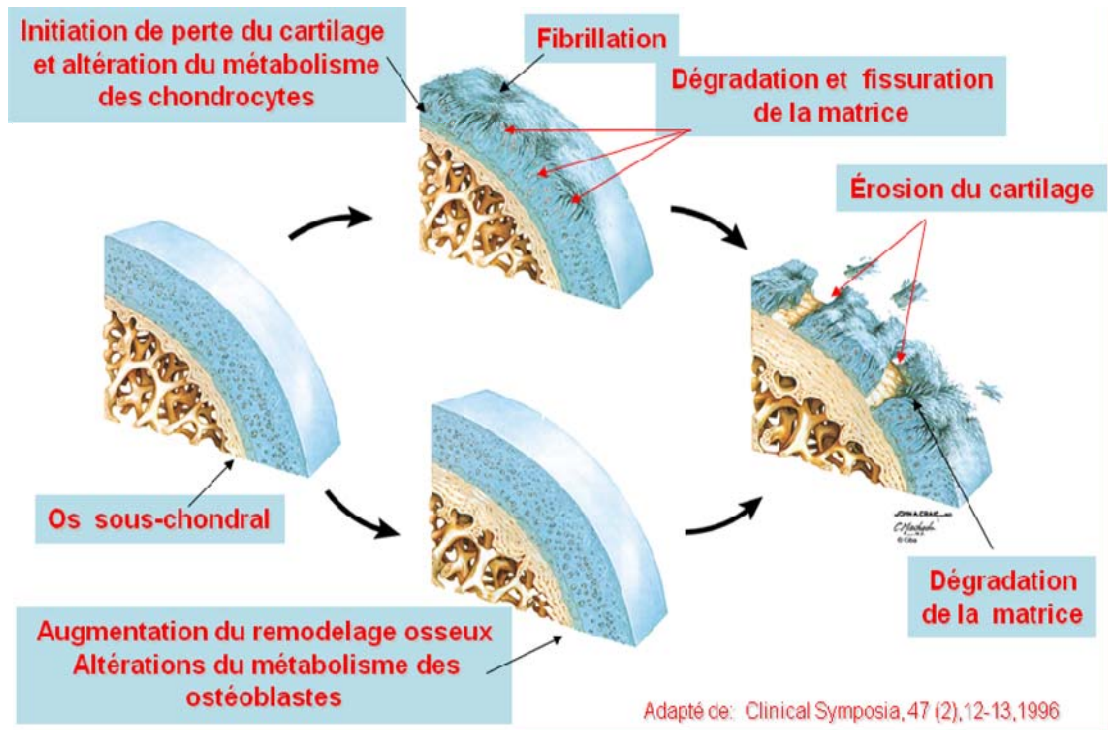


Figure 9: L'hypothèse de recherche. En se basant sur les études dans des modèles animaux, on suggère que de même chez les sujets humains, la stimulation anormale du métabolisme de l'os sous-chondral précède et contribue à la dégénérescence du cartilage articulaire des patients OA. L'objectif de cette étude est donc de démontrer le rôle clé de la leptine dans ce métabolisme anormal de l'os sous-chondral.

B. MANUSCRIT

Local Leptin Production in Osteoarthritis Subchondral Osteoblasts May Be Responsible for Their Abnormal Phenotypic Expression

Marie Solange Mutabaruka¹, Mohamed Aoulab Aissa¹, Aline Delalandre¹, Martin Lavigne² & Daniel Lajeunesse¹

¹Unité de recherche en Arthrose, CHUM-Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame and ²Chirurgie Orthopédique, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Canada.

Running title: Role of local leptin in abnormal phenotypic expression of osteoarthritis osteoblasts

Supported by: The Arthritis Society of Canada and the Canadian Institutes of Health Research

Correspondance: Daniel Lajeunesse, Ph.D.

CRCHUM – Hôpital Notre-Dame

1560, rue Sherbrooke Est

Montréal (Québec) Canada

H2L 4M1

Phone: 514-890-8000 ext 28914

FAX: 514-412-7583

ABSTRACT

Leptin is a peptide hormone with a role in bone metabolism and rheumatic diseases. The subchondral bone tissue plays a prominent role in the pathophysiology of osteoarthritis (OA), related to abnormal osteoblast (Ob) differentiation. Although leptin promotes the differentiation of Ob under normal condition, a role for leptin in OA Ob has not been demonstrated. Here we determined if endogenous leptin produced by OA Ob could be responsible for the expression of the abnormal phenotypic biomarkers observed in OA Ob. We prepared primary normal and OA Ob from subchondral bone of tibial plateaus removed for knee surgery of OA patients or at autopsy. We determined the production of leptin and of the long, biologically active, leptin receptors (OB-Rb) using RT-PCR, ELISA and Western blot analysis. We determined the effect of leptin on cell proliferation by BrdU incorporation and Western blot analysis of phospho 42/44 MAPK (p42/44 Erk1/2) levels. We then determined the effect of the addition of exogenous leptin, leptin receptor antagonists, inhibitors of leptin signaling or siRNA techniques on the phenotypic features of OA Ob. Phenotypic features of Ob were determined by measuring alkaline phosphatase activity (ALP), osteocalcin release (OC), collagen type 1 production (CICP) and of Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). Leptin expression was increased ~5-fold and protein levels ~2-fold in OA Ob compared to normal. Leptin expression was stimulated by 1,25(OH) $_2$ D $_3$ and inhibited by TGF- β 1 in OA Ob. Leptin dose-dependently stimulated cell proliferation of OA Ob and this was due to an increase in p42/44 Erk1/2 levels. Inactivating antibodies against leptin reduced ALP, OC, CICP and TGF- β 1 levels in OA Ob. Tyrphostin (AG490) and piceatannol (Pce), inhibitors of leptin signaling, reproduced this effect. Inhibition of endogenous leptin levels using siRNA for leptin or inhibiting leptin signaling

using siRNA for OB-Rb expression both reduced ALP and OC about 60%. Exogenous leptin addition stimulated ALP, yet this failed to further increase OC or CICP. Moreover, exogenous leptin addition stimulated its own expression dose-dependently while it had a limited effect on OB-Rb expression. In conclusion, these results suggest that abnormal production of leptin by OA Ob could be responsible, in part, for the elevated levels of ALP, OC, collagen type 1 and TGF- β 1 observed in these cells compared to normal. Leptin also stimulated cell proliferation and Erk 1/2 signaling. Taken together, these data suggest leptin could contribute to abnormal bone function in OA.

INTRODUCTION

Osteoarthritis is characterized by progressive articular cartilage loss, appositional new bone formation and sclerosis of the subchondral trabeculae and growth plate, formation of osteophytes, and an imbalance between loss of cartilage, due to matrix degradation, and an attempt to repair this matrix [21, 39]. Synovitis is often observed and is considered to be secondary to the changes in hard tissues within the joint. Despite major progress in the last few years, we still have a lot to learn about the etiology, pathogenesis and progression of this disease [8]. The slowly progressive and multifactorial nature of the disease, its cyclical course, where a period of active disease is followed by a period of remission, have limited our comprehension of OA. Risks factors for this disease in human include age, gender, genetic predisposition, mechanical stress and/or joint trauma, and obesity [8, 13].

A relationship exist between obesity/fat mass and bone mass, while the mechanisms responsible for this are still not fully understood, and OA patients have a better preserved bone mass [14, 44], independently of body weight [36], than healthy individuals. High body mass index (BMI) and increased bone mineral density (BMD) suggest new bone synthesis exceeds degradation in OA. In support of this hypothesis, osteocalcin (a marker of bone formation) in synovial fluid and serum osteopontin (a bone specific matrix protein) were significantly higher in patients with knee scan abnormalities [45]. Gevers and Dequeker showed elevated serum osteocalcin levels in women with hand osteoarthritis, and elevated osteocalcin in cortical bone explants [16]. This group also reported that IGF-I and II, and TGF- β levels are higher in samples of iliac crest bone of patients with OA [9], hence at a site distant from weight bearing joints, suggesting a generalized bone metabolic

dysfunction. Our group showed that *in vitro* OA Ob produced higher IGF-1 and TGF- β levels compared to normal [23, 33].

Leptin, the product of the obese (*ob*) gene, is a 16-kDa secreted protein that is produced by white adipocytes and placenta and functions as an afferent signal to influence energy homeostasis through effects on energy intake and expenditure [4, 34, 56]. When mutated leptin results in obesity in the *ob/ob* mouse [56]. It is now evident that leptin is also expressed in osteoblasts [42]. Moreover, in addition to its effects on the central nervous system (CNS), leptin acts through high affinity leptin receptors on cells in peripheral tissues [15, 27, 47]. Leptin suppresses specific biochemical processes contributing to lipid accumulation and adipocyte differentiation [46]. The long, signaling-competent isoform of the leptin receptor (OB-Rb) shows high expression peaks in the feeding centers of the hypothalamus [52], consistent with leptin being the afferent signal informing the CNS of the body fat status. However, obese people often have elevated leptin levels with limited effects of leptin administration. This is likely due to desensitization, via the saturable transport of leptin across the blood-brain barrier and abnormalities at the level of OB-Rb activation and/or signal transduction [12].

The primary role of leptin in metabolic homeostasis is to provide to the hypothalamus the information on the amount of body fat, thereby modulating central nervous system functions that regulate food intake and energy balance [10, 51]. Solely via this neuroendocrine loop, leptin was believed to control bone mass. For example, in obese children, an increase in height velocity is concomitant with acceleration of bone epiphyseal maturation of the growth plate [54] and leptin levels are increased and correlate positively

with fat mass [7]. Hence, leptin was believed to be the neuroendocrine link between fat and bone mass [29, 41, 53]. In contrast, recent data indicate that locally produced leptin may be more important than circulating leptin in regulation of bone metabolism [27, 41, 42]. Leptin administration to natural leptin knockout mouse model (ob/ob) increases BMD as well as limb length [50]. This positive effect on bone turnover may be linked to its effect on both IL-6 and the osteoprotegerin (OPG)/RANKL system [17, 18]. Leptin enhances metabolic markers in osteoblasts namely alkaline phosphatase activity, osteocalcin, Coll 1 α 1 chains, Insulin-like Growth factor-1 and Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) levels by ~40% [17], parameters which we previously showed to be all increased in OA Ob compared to normal [23, 33]. Moreover, leptin was found by immunohistochemistry in OA cartilage and in osteophytes, while few staining could be found in normal tissues [11], and leptin levels correlated with cartilage destruction.

Hence, this study was aimed at : i) identifying the source of leptin in OA bone tissue by measuring leptin expression and release by normal and OA Ob; ii) determining if exogenous leptin could alter cell proliferation of OA Ob; and iii) evaluating if local leptin production is responsible for abnormal production of phenotypic markers in OA Ob.

MATERIAL AND METHODS

Patients and clinical parameters

Tibial plateaus were dissected away from the remaining cartilage and trabecular bone under sterile conditions from OA patients who had undergone total knee replacement surgery as previously described [23, 24, 33]. A total of 64 patients (aged 71.5 ± 9.9 years) classified as having OA according to the recognized clinical criteria of the American College of Rheumatology were included in this study [1]. None of the patients had received medication that would interfere with bone metabolism, including corticosteroids, for six months before surgery. A total of 16 subchondral bone specimens of tibial plateaus from normal individuals (aged 62.2 ± 18.9 years) were collected at autopsy within 12 h of death. These were used following the establishment that they had not been on any medication that could interfere with bone metabolism or had any bone metabolic disease. Individuals showing abnormal cartilage macroscopic changes and/or subchondral bone plate sclerosis were not included in the normal group. All human material were acquired following a signed agreement by patients undergoing knee surgery or their relatives for the specimens collected at autopsy following the CHUM ethical committee guidelines.

Preparation of primary subchondral bone cell culture

Isolation of subchondral bone plate and the cell cultures were prepared as previously described [22, 23]. At confluence, cells were passaged once at $25,000 \text{ cells/cm}^2$ and grown for 5 days in HamF12/DMEM media (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) containing 10% FBS before specific assays. These cells were incubated with the same media containing 0.5 % FBS. After 24 hours of preconditioning, conditioning was

performed for an additional 48 hours in HamF12/DMEM media containing 0.5% FBS and the indicated treatments as per individual protocol. Cells were either treated with 1 µg/ml recombinant human leptin (rhleptin, Calbiochem, San Diego, California), 10 µg/ml recombinant human leptin R/Fc chimera (R&D Systems, Minneapolis, MN) that neutralizes the activity of rhleptin, 100 µM Tyrphostin (AG490, Sigma-Aldrich), 75 µM piceatannol (Pce, Sigma-Aldrich), or the vehicle. Supernatants were collected at the end of the incubation and kept at -80°C prior to assays. Cells were either prepared for SDS-PAGE separation or RT-PCR experiments. Cells prepared for SDS-PAGE separation were lysed with RIPA buffer (50 mM Tris HCl pH 7.4, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl with the following inhibitors: 10 µg/ml aprotinin, 10µg/ml leupeptin, 10µg/ml pepstatin, 10µg/ml O-phenatrolone, 1mM Na-orthovanadate, 1mM DTT), and kept at -80°C prior to assays. Protein determination was performed by the bicinchoninic acid method [48].

Phenotypic characterization of human subchondral Ob cell cultures

Phenotypic features of Ob were determined by evaluating 1,25(OH)₂D₃-dependent (50 nM) alkaline phosphatase activity and osteocalcin release, and by measuring the release of the carboxy-terminal propeptide of collagen type 1 (CICP) in cells treated or not for their last 48 hours of culture with recombinant human leptin R/Fc chimera to neutralize the activity of leptin, 100 µM tyrphostin (AG490) or 75 µM piceatannol (Pce), selective inhibitors respectively of the JAK2/STAT3 and JAK1/STAT3 pathways involved in leptin signaling [26], or with siRNA directed against leptin or OB-Rb (see below). Alkaline phosphatase activity was determined on cell aliquots by substrate hydrolysis using p-

nitrophenylphosphate (PNPP), and osteocalcin release was determined in cell supernatants using an EIA as previously described [23, 33]. CICP was determined using a selective ELISA (Quidel corporation, Cedarlane) in conditioned media from confluent OA Ob incubated in HAMF12/DMEM media containing 0.5% bovine serum albumine (BSA). CICP release was then reported as ng per cellular proteins. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) was measured in supernatants using a highly specific Quantikine ELISA assay from R&D Systems (Minneapolis, MN). The sensitivity of the assay is 7pg/ml and is a very specific assay that does not cross react with related cytokines/growth factors when tested at saturating concentrations. Cellular proliferation was assessed using the BrdU cell proliferation assay as described in the system's manual from Calbiochem (San Diego, California). Cells were plated at 10,000 cells/cm² in 96 well plates in Ham F12/DMEM media containing 10% FBS. After overnight attachment, cells were serum-starved in Ham F12/DMEM media containing 0.5% BSA for 24 hours prior to stimulation with or without increasing doses of recombinant human leptin for another 24 hours of incubation.

RT-PCR assays

For RT-PCR assays, total cellular RNA from normal and OA Ob was extracted with the TRIzolTM reagent (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) according the manufacturer's specifications and treated with the RNA-freeTM Dnase Treatment and Removal kit (Ambion, Austin, TX) to ensure complete removal of chromosomal DNA. The RNA was quantitated using the RiboGreen RNA quantification kit (Molecular Probes, Eugene, OR). The RT reactions were primed with random hexamers with 1 μ g of total RNA in a 100 μ l final reaction volume followed by PCR amplification as previously

described [24] using 20 pmol of each specific PCR primers (see below). The amplification of all mRNA species was performed separately from GAPDH mRNA amplification to avoid substrate depletion. After amplification, DNA was analyzed on an agarose gel and visualized by ultraviolet detection.

Real-time quantification of leptin and GAPDH mRNA was performed in the GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) with the 2X Quantitect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) used according to the manufacturer's specifications. Primers used were: 5'-GGCTTTGGCCCTATCTTTTC-3' (sense) and 5'-GGATAAGGTCAGGATGGGGT-3' (antisense) for Lep1; 5'-CCTCATCAAGACAATTGTCACC-3' (sense) and 5'-CAGCATGTCCTGCAGAGACC-3' (antisense) for Lep2; 5'-GCCAGAGACAACCCTTTGTTAAA-3' (sense) and 5'-TGGAGAACTCTGATGTCCGTGAA-3' (antisense) for OB-Rb; 5'-CAGAACATCATCCCTGCCTCT-3' (sense) and 5'-GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG-3' (antisense) for GAPDH. Amplicons were 197, 376, 417 and 319 bp respectively. In brief, 100 ng of the cDNA obtained from the RT reactions were amplified in a total volume of 50 µl consisting of 1X Master mix, uracil-N-glycosylase (UNG, 0.5 Unit, Epicentre Technologies, Madison, WI) and the gene-specific primers which were added at a final concentration of 200 nM. The tubes were first incubated for 2 minutes at 50°C (UNG reaction), then at 95°C for 15 minutes (UNG inactivation and polymerase activation) followed by 40 cycles consisting each of denaturation (94°C for 15 seconds), annealing (60°C for 30 seconds), extension (72°C for 30 seconds) and data acquisition (77°C for 15 seconds) steps. The data were collected and processed with the GeneAmp 5700 SDS software and given as threshold cycle (Ct), corresponding to the PCR cycle at which an

increase in reporter fluorescence above baseline signal can first be detected. When comparing normal and OA basal expression levels, the Ct were converted to number of molecules and the values for each sample calculated as the ratio of the number of molecules of the target gene/number of molecules of GAPDH.

Inhibition of leptin and OB-Rb expression using siRNA

We used a siRNA technique to transiently inhibit leptin or OB-Rb expression in OA Ob. SiRNA were obtained at Dharmacon (Lafayette, CO) and we followed the manufacturer's indication for their preparation. Briefly, OA Ob were split at 100,000 cells/ml. Leptin or OB-Rb siRNA (a set of 4 different siRNA per gene) or scramble RNA (basal condition) was added to OA Ob at a final concentration of 100 ng/ml with 6 μ l Hi-perfect (Quiagen, Mississauga, ON) per 100 μ l total volume in BGJb media without serum for 1 hour on day 0 and day 3. Cells were then fed BGJb media with 10% FBS containing 50 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ until day 7, with media changes every two days. Cells were harvested in either ALPase buffer to perform ALP and protein determination or in TRIzol to prepare for RT-PCR to detect changes in leptin and OB-Rb levels. Supernatants were kept for the determination of osteocalcin.

Western immunoblotting

The cell extracts were loaded on polyacrylamide gels and separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing condition [31]. Loading of the protein was adjusted according to the cellular protein concentration of each specimen. The proteins were then electrophoretically transferred onto PVDF

membranes (Boehringer Mannheim, Penzberg, Germany), and immunoblotting was performed as described in the ECL Plus Western blotting detection system's manual (Amersham pharmacia biotech, UK, England). Rabbit anti-leptin receptor at a dilution of 1:1,000 (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada), rabbit anti-human actin at a dilution of 1:10,000 (Sigma-Aldrich), rabbit anti-phosphorylated p42/44 (Thr202/Tyr204) at a dilution of 1:5,000 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) as primary antibodies, and goat anti-rabbit IgG as secondary antibodies at a dilution of 1:20,000 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) were used for the assays. Densitometry analysis of western blot films was performed on a Macintosh Mac OS 9.1 computer using the public domain NIH Image program developed at the U.S. National Institutes of Health with the Scion Image 1.63 program [40].

Evaluation of leptin production

Leptin was evaluated in Ob-conditioned media. Confluent Ob were cultured for 48 h in HAMF12/DMEM media containing 0.5% FBS. At the end of the incubation, their conditioned-media were concentrated 5 fold using Amicon Ultra-4 filters (Ultracil-10k, Millipore Corporation, Bedford, MA) with a cutoff of 10 kDa. Samples were centrifuged at 1000g for 15 minutes at 4°C. The concentrated conditioned media were then tested for leptin using a selective high sensitivity ELISA (R&D Systems). The sensitivity of the assay was 7.8 pg/ml and the intra-assay precision is $3.2 \pm 0.2\%$.

Statistical analysis

All quantitative data are expressed as mean \pm SEM. The data were analyzed by Student's t test and p values < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Expression and production of leptin in osteoblasts

We first questioned if human OA osteoblasts (Ob) expressed leptin compared to normal Ob using real-time RT-PCR with two different set of primers, one described by Dumond et al [11] for rat samples and adapted to the human sequence, and the other by Gordeladze et al [42] for primary human osteoblasts. Using both set of primers we detected leptin expression in OA Ob (Figure 1A). We next evaluated if OA Ob produced variable levels compared to normal Ob. Using real-time RT-PCR we observed that OA Ob produced about ~5-fold more leptin mRNA than normal Ob using one set of primers (Figure 1B). Since we previously showed that TGF- β 1 and HGF levels are elevated in OA Ob, we next questioned if these growth factors could modulate the expression of leptin. As shown in Figure 2A, HGF had little effect on leptin expression whereas TGF- β 1 reduced it. Conversely, the addition of 1,25(OH) $_2$ D $_3$ greatly enhanced leptin expression, a situation not modified by HGF. Moreover, leptin dose-dependently stimulated its own expression in OA Ob (Figure 2B, $p < 0.007$ ANOVA). As Ob expressed leptin, we next evaluated the capacity of Ob to synthesize leptin. As shown in Figure 3, OA Ob released about ~2-fold more leptin than normal Ob under basal condition.

Expression and production of leptin receptors in osteoblasts

In order to determine if OA Ob could respond to leptin, we next evaluated the presence of the long, signaling competent, form of the leptin receptor (OB-Rb). As shown in Figure 4A using real-time RT-PCR, OA Ob expressed slightly less OB-Rb than normal Ob although this did not reach significance. Exogenous leptin addition did not significantly

stimulated OB-Rb expression in OA Ob (Figure 4B). Hence, this effect of leptin on Ob-Rb expression was different than for leptin expression. In contrast, OB-Rb mRNA levels were increased by both TGF- β 1 and HGF in OA Ob (data not illustrated), and this increased expression was reflected at the protein level by Western blot analysis (Figure 4C).

Role of leptin in abnormal phenotypic features of osteoarthritic osteoblasts

Since OA Ob showed reduced leptin receptor levels, we tested if these cells could respond to leptin and we first determined the effect of leptin on cell proliferation. Figure 5A shows that leptin (1ng/ml to 10 μ g/ml) dose-dependently stimulated cell proliferation and this effect plateaued at 100 ng/ml leptin. We next evaluated if the effect of leptin on cell proliferation affected the phospho Erk 1/2 MAPK pathway. Indeed, in response to exogenous leptin, p42/44 MAPK levels rose (Figure 5B, top panel). This effect was again dose-dependent and also plateaued around 100 ng/ml (Figure 5B, lower panel). Since leptin influences the synthesis of phenotypic markers and inflammatory mediators in a number of cells and because OA Ob responded to exogenous leptin, we then questioned if the endogenous elevated leptin production observed in OA Ob could be responsible for the abnormal phenotypic markers of these cells. Hence, we measured alkaline phosphatase activity, osteocalcin release and the production of CICP under basal condition and in the presence leptin or of a recombinant human leptin R/Fc chimera that neutralizes the activity of leptin. First, the inhibition of leptin signaling reduced all parameters to values similar to normal Ob (Figure 6A, 6B and 6C). Moreover, we observed an inhibition of alkaline phosphatase activity and CICP production in response to 100 μ M AG490 or 75 μ M Pce, tyrphostin and piceatannol, selective inhibitors respectively of the JAK2/STAT3 and

JAK1/STAT3 pathways involved in leptin signaling [26] (Figure 6A and 6C) whereas the effect of these inhibitors on osteocalcin secretion could not be tested since they interfered with the EIA method. These inhibitors did not promote any significant cell death as assessed by total protein content and cell count by trypan blue exclusion (not illustrated). We then questioned if exogenous leptin could promote these activities. The addition of exogenous leptin to OA Ob enhanced vitamin D₃-dependent alkaline phosphatase activity (Figure 6A) but it failed to further stimulate osteocalcin release (Figure 6B) or collagen type 1 production (Figure 6C) above their already elevated values in OA Ob. Using siRNA techniques, we next evaluated if inhibiting leptin or OB-Rb would abrogate the response of OA Ob to endogenous leptin production. Indeed, as shown in Figure 6D, siRNA against leptin reduced alkaline phosphatase activity about 60%. A similar observation could be made for osteocalcin (Figure 6E). Likewise, inhibiting OB-Rb expression using siRNA techniques also reduced ALP and OC about 60% in OA Ob (Figure 6D and 6E). Figure 6F shows that specific siRNA inhibition reduced leptin and OB-Rb expression 60 and 55% respectively in these cells.

As another key features of OA Ob that distinguishes them from normal Ob is their enhanced production of TGF- β 1 [33], and because leptin has been shown to stimulate TGF- β 1 synthesis in other cells, we evaluated if high levels of TGF- β 1 in OA Ob could be due to a response to endogenous leptin via a paracrine/autocrine stimulation. As shown in Figure 7, TGF- β 1 levels in OA Ob were elevated compared to normal Ob and the presence of AG490 or Pce reduced by ~50 and ~60% the endogenous levels of TGF- β 1 in OA Ob, reducing them to near normal values.

DISCUSSION

In recent years, a key role of leptin in OA has been proposed [11], primarily based on the observation that human articular cartilage from OA patients showed elevated leptin levels using immunohistochemistry [11]. However, whether human chondrocytes produced leptin was not fully examined in this study, yet the authors had shown that cartilage from tibial plateaus of young rats expressed leptin. Leptin is known to be present in chondrocytes of the growth plate in young animals [29] yet this information is lacking in adult cartilage. In the present study, subchondral osteoblasts showed high levels of expression for leptin. This could suggest that the presence of leptin in articular cartilage could be due, at least in part, to its local production in subchondral bone tissue. Indeed, since OA Ob expressed more leptin mRNA and produced more leptin, this could explain the higher protein levels found in OA cartilage compared to normal tissue [11] if leptin can seep to the articular cartilage via either the enhanced micro-circulation present in the subchondral bone plate and the deep layer of the articular cartilage or via microcracks [25, 49].

Our study also provided contrasting data on the regulation of leptin expression by OA Ob. We first tried to demonstrate a possible link between elevated TGF- β 1 and HGF levels produced by OA Ob [20, 33] and the expression of leptin by these cells. As previously showed for a number of tissues [55], TGF- β 1 reduced significantly the expression of leptin mRNA by OA Ob. In contrast, HGF was without any significant effect on leptin expression. Second, 1,25(OH) $_2$ D $_3$ stimulated several fold leptin expression by OA Ob. This is in sharp contrast to available data with adipocytes [35] that show a powerful inhibition of leptin expression in response to 1,25(OH) $_2$ D $_3$. Hence, adipocytes and Ob

behave differently and this could be a crucial step in OA Ob. Indeed, OA Ob show enhanced responses to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulation [23, 24], and this could possibly contribute to the enhanced expression of leptin.

Inasmuch as leptin expression is enhanced and its endogenous production is elevated in OA Ob, this could be explaining the slight reduction in OB-Rb expression in these cells compared to normal. This reduction in OB-Rb expression was also paralleled by a slight but not significant decrease of leptin receptors at the protein level as detected by Western blot analysis (Figure 4C). OB-Rb production was stimulated by TGF- β 1 and HGF in OA Ob, and this would indicate that the receptors could still be regulated normally in these cells. Nonetheless, this reduction in OB-Rb does not lead to a reduction of the response of OA Ob to leptin as was demonstrated here. Indeed, OA Ob responded to exogenous addition of leptin with an increase in cell proliferation, p42/44 MAPK levels, and in alkaline phosphatase activity as was previously reported for primary human osteoblasts [17]. In contrast, leptin could not increase osteocalcin secretion nor CICP or TGF- β 1 levels in OA Ob. This could either be indicating that alkaline phosphatase is more sensitive to leptin stimulation than the other markers or else that osteocalcin, CICP and TGF- β 1 production are less sensitive to leptin in these cells. Conversely, blocking OB-Rb signaling with inactivating antibodies reduced the production of alkaline phosphatase, osteocalcin, and CICP in OA Ob. This is a key observation since OA Ob show abnormal phenotypic features, namely elevated alkaline phosphatase activity, osteocalcin release, collagen type 1, IGF-1 and TGF- β 1 production [23, 24, 28, 33], all features that can be increased in response to leptin [17]. Last, tyrphostin and piceatannol, selective inhibitors respectively of the JAK2/STAT3 and

JAK1/STAT3 pathways involved in leptin signaling [26], reduced the activity of alkaline phosphatase, and the production of collagen type 1 and TGF- β 1 by OA Ob. Thus, these data suggest that the abnormal features of OA Ob could be related to their endogenous elevated production of leptin, and indeed, we showed a reduction in alkaline phosphatase activity and osteocalcin release by silencing leptin with siRNA. Likewise, silencing OB-Rb with siRNA in OA Ob also reduced both activities, again pointing toward a key role of endogenous leptin to regulate these abnormal activities in OA Ob.

Inasmuch as leptin contributes to stimulate the production of IGF-1 and TGF- β 1 by human osteoblasts [17], our data would also indicate that leptin is a key signal in OA pathophysiology. Indeed, both growth factors have been implicated in the initiation and/or progression of OA and we previously showed that both growth factors were elevated in *in vitro* subchondral osteoblasts isolated from OA patients [32, 33]. Moreover, leptin can alter the signaling of IGF-1 in a number of cell systems [6, 30, 38] and we previously reported that IGF-1 signaling is abnormal in OA Ob [31]. Last, leptin and OB-Rb levels are increased in OA chondrocytes [43], however we could not detect basal leptin expression in OA chondrocytes (not illustrated). In contrast, we previously showed that HGF is not produced by chondrocytes but is produced in higher abundance by OA Ob [20] whereas HGF can increase OB-Rb levels in chondrocytes (not illustrated). The presence of elevated levels of leptin [11] and HGF [20] in OA cartilage, possibly derived from osteoblasts of the subchondral bone plate, could therefore promote the response to leptin in OA chondrocytes.

The failure of leptin to stimulate all markers of osteoblasts whereas inhibiting leptin signaling modified all parameters could be explained by the OA Ob desensibilization due to

a long term exposure with endogenous leptin. However, an abnormal response to leptin in OA Ob is likely and resembles what we previously observed for the response to IGF-1. First, an increase in phospho-PTP1B/Syp may be crucial for leptin signaling as PTP1B/Syp controls STAT3 phosphorylation and its interaction with target genes, a key signaling pathway for leptin [2]. Since increased hypothalamic PTP1B levels can contribute to leptin resistance [37], our previous demonstration that PTP1B/Syp levels and phosphorylation are increased in OA Ob [31] suggests that OA Ob could actually be resistant to some, yet not all, leptin signaling since leptin did increase Erk1/2 phosphorylation in OA Ob (our present data) yet failed to alter phospho p38 levels (not illustrated). Second, leptin promotes tyrosine phosphorylation of SHC proteins and the association of SHC with Grb2 in human embryonic cells HEK 293 [19], whereas we previously showed that Grb2 interaction with IRS-1 and SHC is abnormal in OA Ob [31]. Third, leptin can modulate its effects on human Ob via an inhibition of apoptosis [17], and we observed a reduction in Bax- α to Bcl2 expression in OA Ob compared to normal Ob [31] an indication of reduced apoptosis. Indeed, leptin increases the proliferation of human osteoblast-like SaOS-2 cells via Erk1/2 [3], and we also showed that OA Ob have an enhanced proliferation rate and increased phospho Erk 1/2 levels in response to leptin. Last, we showed that leptin stimulates alkaline phosphatase activity in OA Ob yet failed to stimulate any further osteocalcin release, collagen production or TGF- β 1 levels above their already elevated levels compared to normal Ob, whereas inhibiting leptin signaling clearly showed an inhibition of all these parameters. Previous studies have shown that long term exposures to leptin are needed to modify the expression of collagen type 1, TGF- β 1 and osteocalcin [17] whereas the inhibition of collagen synthesis with the JAK inhibitor AG490 (tyrphostin) is rapid [5]

similar to what we observed here. Taken together, these data would suggest that a number of, yet not all, signaling pathways are altered in OA Ob in response to leptin. Conversely, partners of leptin signaling may be abnormal in OA Ob and this may stem from the possible abnormal cross-talk between the IGF-1 signaling, already abnormal in OA Ob [31], and leptin signaling pathways in these cells. These hypotheses remain to be explored.

In conclusion, the present study indicated that leptin is not produced nor expressed by human OA chondrocytes nor synoviocytes while OA Ob expressed and released more leptin than normal. This elevated production of leptin is responsible, at least in part, for the abnormally elevated levels of biomarkers of OA Ob compared to normal, and to elevated production of TGF- β 1. Together, these data indicate the key role of leptin in OA pathophysiology and suggest that leptin found in articular cartilage is derived from Ob.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by grants MOP-49501 from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) and TAS-0089 from the Arthritis Society of Canada/CIHR to DL.

Reprint requests to: Daniel Lajeunesse, PhD, Unité de recherche en arthrose, Hôpital Notre-Dame, CHUM-Centre hospitalier de l'Université de Montréal, 1560 rue Sherbrooke Est, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1.

REFERENCES

1. Altman RD, Asch E, Bloch DA, Bole G, Borenstein D, Brandt KD, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, et al: **Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee.** *Arthritis Rheum* 1986, **29**:1039-1049.
2. Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG: **Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor.** *J Biol Chem* 2000, **275**:14563-14572.
3. Burguera B, Brunetto A, Garcia-Ocana A, Teijeiro R, Esplen J, Thomas T, Couce ME, Zhao A: **Leptin increases proliferation of human steosarcoma cells through activation of PI(3)-K and MAPK pathways.** *Med Sci Monit.* 2006, **12**:BR341-349.
4. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P: **Recombinant mouse OB-protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks.** *Science* 1995, **269**:546-549.
5. Cao Q, Mak KM, Lieber CS: **Leptin enhances alpha 1(I) collagen gene expression in LX-2 human hepatic stellate cells through JAK-mediated H2O2-dependent MAPK pathways.** *Journal Cellular Biochemistry* 2006, **91**:188-197.
6. Cohen B, Novick D, rubinstein M: **Modulation of insulin activities by leptin.** *Science* 1996, **274**:1185-1188.
7. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF: **Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans.** *N Engl J Med* 1996, **334**:292-295.
8. Davis MA: **Epidemiology of osteoarthritis.** *Clin Geriatr Med* 1988, **4**:241-255.
9. Dequeker J, Mohan R, Finkelman RD, Aerssens J, Baylink DJ: **Generalized osteoarthritis associated with increased insulin-like growth factor types I and II and transforming growth factor beta in cortical bone from the iliac crest. Possible mechanism of increased bone density and protection against osteoporosis.** *Arthritis Rheum* 1993, **36**:1702-1708.
10. Ducy P, Amling M, Takeda S, Prieme M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G: **Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: A central control of bone mass.** *Cell* 2000, **100**:197-207.
11. Dumond H, Presle N, Terlain B, Mainard D, Loeuille D, Netter P, Pottie P: **Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**:3118-3129.
12. El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C, Flier JS: **Two defects**

- contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity.** *J Clin Invest* 2000, **105**:1827-1832.
13. Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Walker AM, Meenan RF: **Obesity and knee osteoarthritis.** *Ann Intern Med* 1988, **109**:18-24.
 14. Foss MVL, Byers PD: **Bone density, osteoarthrosis of the hip and fracture of the upper end of the femur.** *Ann Rheum Dis* 1972, **31**:259-264.
 15. Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, Nicola NA, Alexander WS, Hilton DJ: **Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hematopoietic cells.** *proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**:14564-14568.
 16. Gevers G, Dequeker J: **Collagen and non-collagenous protein content (osteocalcin, sialoprotein, proteoglycan) in the iliac crest bone and serum osteocalcin in women with and without hand osteoarthritis.** *Coll Relat Res* 1987, **7**:435-442.
 17. Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE: **Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling.** *J Cell Biochem* 2002, **85**:825-836.
 18. Gordeladze JO, Reseland JE: **A unified model for the action of leptin on bone turnover.** *Journal of Cellular Biochemistry* 2003, **88**:706-712.
 19. Gualillo O, Eiras S, White DW, Dieguez C, Casanueva FF: **Leptin promotes the tyrosine phosphorylation of SHC proteins and SHC association with GRB2.** *Mol Cell Endocrinol* 2002, **190**:83-89.
 20. Guévremont M, Martel-Pelletier J, Massicotte F, Tardif G, Pelletier J-P, Ranger P, Lajeunesse D, Reboul P: **Human adult chondrocytes express hepatocyte growth factor (HGF) isoforms but not HGF. Potential implication of osteoblasts for the HGF presence in cartilage.** *J Bone Miner Res* 2003, **18**:1073-1081.
 21. Hamerman D: **The biology of osteoarthritis.** *N Engl J Med* 1989, **320**:1322-1330.
 22. Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Duval N, Lajeunesse D: **Abnormal regulation of urokinase plasminogen activator by insulin-like growth factor 1 in human osteoarthritic subchondral osteoblasts.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:2112-2122.
 23. Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P, Lajeunesse D: **Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype *in vitro*: Possible role in subchondral bone sclerosis.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**:891-899.

24. Hilal G, Massicotte F, Martel-Pelletier J, Fernandes JC, Pelletier JP, Lajeunesse D: **Endogenous prostaglandin E2 and insulin-like growth factor 1 can modulate the levels of parathyroid hormone receptor in human osteoarthritic osteoblasts.** *J Bone Miner Res* 2001, **16**:713-721.
25. Imhof H, Breitenseher M, Kainberger F, Rand T, Trattnig S: **Importance of subchondral bone to articular cartilage in health and disease.** *Top Magn Reson Imaging* 1999, **10**:180-192.
26. Kloek C, Haq AK, Dunn SL, Lavery HJ, Banks AS, Myers Jr. MG: *J Biol Chem* 2002, **277**:41547-41555.
27. Lee YJ, Park JH, Ju SK, You KH, Ko JS, Kim HM: **Leptin receptor isoform expression in rat osteoblasts and their functional analysis.** *FEBS letter* 2002, **528**:43-47.
28. Lisignoli G, Toneguzzi S, Piacentini A, Cristino S, Grassi F, Cavallo C, Facchini A: **CXCL12 (SDF-1) and CXCL13 (BCA-1) chemokines significantly induce proliferation and collagen type I expression in osteoblasts from osteoarthritis patients.** *J Cell Physiol* 2006, **206**:78-85.
29. Maor G, Rochwerger M, Segev Y, Phillip M: **Leptin acts as a growth factor on the chondrocytes of skeletal growth centers.** *Journal Bone Mineral Research* 2002, **17**:1034-1043.
30. Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA: **Leptin: a review of its peripheral actions and interactions.** *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002, **26**:1407-1433.
31. Massicotte F, Aubry I, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fernandes J, Lajeunesse D: **Abnormal insulin-like growth factor 1 signaling in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts.** *Arthritis Res Ther* 2006, **8**:R177.
32. Massicotte F, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Lajeunesse D: **Modulation of insulin-like growth factor 1 levels in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts.** *Bone* 2006, **38**:333-341.
33. Massicotte F, Lajeunesse D, Benderdour M, Pelletier J-P, Hilal G, Duval N, Martel-Pelletier J: **Can altered production of interleukin 1 β , interleukin-6, transforming growth factor- β and prostaglandin E2 by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients.** *Osteoarthritis Cartilage* 2002, **10**: 491-500.
34. Masuzaki M, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K: **Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans.** *Nature medicine* 1997, **3**:1029-1033.

35. Menendez C, Lage M, Peino R, Baldelli R, Concheiro P, Dieguez C, Casanueva FF: **Retinoic acid and vitamin D(3) powerfully inhibit in vitro leptin secretion by human adipose tissue.** *J Endocrinol* 2001, **170**:425-431.
36. Mokassa Bakumobatane L, Dequeker J, Raymaekers G, Aerssens J: **Effects of osteoarthritis (OA) and body weight on subchondral cancellous bone quality of proximal tibia.** *Osteoarthritis Cart* 1993, **1**:55-56.
37. Morrison CD, White CL, Wang Z, Lee SY, Lawrence DS, Cefalu WT, Zhang ZY, Gettys TW: **Increased hypothalamic protein tyrosine phosphatase 1B contributes to leptin resistance with age.** *Endocrinology*. 2007, **148**:433-440 Epub 2006 Oct 12.
38. Niswender KD, Ballis B, Blevins JE, Corson MA, Schwartz MW, Baskin DG: **Immunocytochemical detection of phosphatidylinositol 3-kinase activation by insulin and leptin.** *Journal Histochemistry & Cytochemistry* 2003, **51**:275-283.
39. Poole AR. **Cartilage in health and disease.** In *Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology*. Edited by Koopman. Baltimore:Williams & Wilkins; 1997:255-308.
40. Research Services Branch (RSB): **Public domain NIH Image program (developed at the U.S. National Institutes of Health).** <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/> .
41. Reseland JE, Gordeladze JO: **Role of leptin in bone growth: central player or peripheral supporter?** *FEBS letters* 2002, **528**:40-42.
42. Reseland JE, Syversen U, Bakke I, Qvigstad G, Eide LG, Hjertner O, Gordeladze JO, Drevon CA: **Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization.** *Journal Bone Mineral Research* 2001, **16**:1426-1433.
43. Riminucci M, Collins MT, Fedarko NS, Cherman N, Corsi A, White KE, Waguespack S, Gupta A, Hannon T, Econs MJ, et al: **FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting.** *J Clin Invest* 2003, **112**:683-692.
44. Roh YS, Dequeker J, Muiler JC: **Bone mass is osteoarthrosis, measured in vivo by photon absorption.** *J Bone Joint Surg Am* 1974, **54A**:587-591.
45. Sharif M, George E, Dieppe PA: **Correlation between synovial fluid markers of cartilage and bone turnover and scintigraphic scan abnormalities in osteoarthritis of the knee.** *Arthritis Rheum* 1995, **38**:78-81.
46. Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wand MY, Trieu F, Lee Y, Newgard CB, Unger RH: **Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**:4637-4641.

47. Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE, Boss O, Pernin A, Chin WW, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Burger AG, Zapf J, Meier CA: **Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue.** *J Clin Invest* 1997, **100**:2858-2864.
48. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: **Measurement of protein using Bicinchoninic Acid.** *Anal Biochem* 1985, **150**:76-85.
49. Sokoloff L: **Microcracks in the calcified layer of articular cartilage.** *Arch Pathol Lab Med* 1993, **117**:191-195.
50. Steppan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke HZ, Swick AG: **Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice.** *Regulatory Peptides* 2000, **92**:73-78.
51. Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G: **Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system.** *Cell* 2002, **111**:305-317.
52. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, et al: **Identification and Expression Cloning of a Leptin Receptor, OB-R.** *Cell* 1995, **83**:1263-1271.
53. Thomas T, Burguera B: **Is leptin the link between fat and bone mass? (mini-review).** *Journal Bone Mineral Research* 2002, **17**:1563-1569.
54. Vignolo M, Naselli A, Di Battista E, Mostert M, Aicardi G: **Growth and development in simple obesity.** *Eur J Pediatr* 1988, **147**:242-244.
55. Zhang F, Chen Y, Heiman M, Dimarchi R: **Leptin: structure, function and biology.** *Vitam Horm* 2005, **71**:345-372.
56. Zhang Y, Procenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.** *Nature* 1994, **372**:425-432.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Expression of leptin mRNA in OA osteoblasts and chondrocytes by real-time RT-PCR. Confluent osteoblasts (Ob) or chondrocytes were lysed in TRIzol and RNA extracted as described in Material and Methods. RNA (1 μ g) was reversed transcribed followed by PCR amplification of 100 ng cDNA using specific primers for leptin and GAPDH. The data were processed with the GeneAmp 5700 SDS software and given as threshold cycle (Ct), corresponding to the PCR cycle at which an increase in reporter fluorescence above baseline signal can first be detected. The Ct was converted to number of molecules and the values for each sample calculated as the ratio of the number of molecules of the target gene/number of molecules of GAPDH. **A)** Quantification of leptin mRNA using Lep1 and Lep2 primers. Results are given as the mean value of markers relative to GAPDH \pm SEM of n=4 OA preparations. **B)** Quantification of leptin mRNA levels in normal and OA Ob using Lep1 primers. Results are the mean \pm SEM of n=5 normal and n=15 OA individual Ob preparations.

Figure 2: Modulation of the expression of leptin mRNA in OA osteoblasts by real-time RT-PCR. Confluent OA osteoblasts (Ob) were treated for 24 hours with either hepatocyte growth factor (HGF, 10ng/ml), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1, 10ng/ml), 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (50nM), 1,25(OH) $_2$ D $_3$ + HGF or the vehicle (**A**) or with increasing concentrations of exogenous leptin in OA Ob (**B**) Cells were then lysed in TRIzol and RNA extracted as described in Material and Methods. RNA (1 μ g) was reversed transcribed

followed by PCR amplification of 100ng cDNA as described in Figure 1 using Lep1 and GAPDH primers. Results are the mean \pm SEM of n=6 individual OA Ob preparations.

Figure 3: Release of leptin by normal and OA osteoblasts. Conditioned-media of confluent normal and OA Ob incubated in HAM's F12/ DMEM media containing 0.5% FBS for their last 48 hours of culture were recuperated and stored at -80°C. Aliquots were taken to measure leptin using a very sensitive ELISA. Results are the mean \pm SEM of n=5 normal and n=6 OA individual Ob preparations.

Figure 4: Production of leptin receptors (OB-Rb) mRNA in normal and OA osteoblasts. **A)** Confluent Ob were lysed in TRIzol and RNA extracted as described in Material and Methods. RNA was reversed transcribed followed by PCR amplification of 100 ng cDNA as described in Figure 1 using OB-Rb and GAPDH primers. Results are the mean \pm SEM of n=7 normal and n=19 OA Ob preparations, $p < 0.004$ vs normal and OA. **B)** OA Ob were incubated for 24 hours with increasing concentrations of exogenous leptin. Cells were then lysed and used for PCR amplification of OB-Rb as in A. Results are the mean \pm SEM of n=6 OA Ob preparations. **C)** Confluent Ob were treated for 48 hours with or without 1,25(OH)₂D₃ (50 nM), leptin (100ng/ml), TGF- β 1 (10ng/ml) or HGF (10 ng/ml). The cells were then lysed in RIPA buffer prior to separation using SDS-PAGE and Western blotting using specific antibodies to OB-Rb.

Figure 5: Cellular proliferation of OA osteoblasts in response to leptin. OA osteoblasts were plated at 10,000 cells/cm² and allowed to attach overnight in HAM's F12/ DMEM media containing 10% FBS. Cells were then treated with the same media with 0.5% BSA for 24 hours prior to receiving increasing doses of leptin (10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 mg/ml or 10 mg/ml) or the vehicle in the same media for another incubation of 24 hours. Cell proliferation was assessed by the incorporation of BrdU. **A)** Proliferation of OA Ob in response to leptin; **B)** Top panel: representative p42/44 Western blot; bottom panel: determination of phospho 42 and phospho 44 levels. Values are the mean \pm SEM of at least 4 separate experiments; *p<0.05, **p<0.01

Figure 6: Modulation of alkaline phosphatase, osteocalcin and collagen type 1 in OA Ob by inactivating leptin signaling. In a first set of experiments, confluent OA Ob were treated for their last two days of culture with either media alone containing 0.5% FBS with or without 1,25(OH)₂D₃ (50nM) as per indicated for the individual markers. Cells were treated with either exogenous leptin, antibodies against leptin, tyrphostin (AG490, 100 μ M) or Piceatannol (Pce, 75 μ M) for 30 minutes prior to the addition of 1,25(OH)₂D₃ except for CICP that was performed in the absence of 1,25(OH)₂D₃. At the end of the 48 h incubation, the supernatant was kept for osteocalcin and for collagen production, and cells were lysed in ALPase buffer prior to measuring alkaline phosphatase activity by substrate hydrolysis. **A)** Results of alkaline phosphatase activity; **B)** Results of osteocalcin release; **C)** Results of CICP production. The results are the mean \pm SEM of n=9 OA Ob preparations. In a second set of experiments, OA Ob were treated with siRNA for either leptin or OB-Rb as described

in Material and Methods. Cells were then used to determine alkaline phosphatase activity and osteocalcin release. **D)** Results of alkaline phosphatase activity in response to leptin or OB-Rb siRNA treatments. **E)** Results of osteocalcin release in response to leptin or OB-Rb siRNA treatments. **F)** Top panel, leptin expression in response to siRNA; bottom panel, OB-Rb expression in response to siRNA. Results of D to F are the mean \pm SEM of n=6 OA Ob preparations.

Figure 7: Modulation of TGF- β 1 production in OA Ob by blocking leptin signaling.

Confluent OA Ob were incubated in Ham's F12/DMEM media without serum and containing 1% ITS. Cells were treated with or without exogenous leptin, tyrphostin (AG490, 100 μ M) or Piceatannol (Pce, 75 μ M) for their last 48 hours of culture. Normal Ob were incubated in the same media as OA Ob and treated with the vehicle only for their last 48 hours of culture. TGF- β 1 was determined in the supernatant using a selective ELISA in normal Ob under basal condition and in OA Ob following the different treatments. Results are the mean \pm SEM of n=5 normal and n=6 OA Ob preparations.

Figure 1

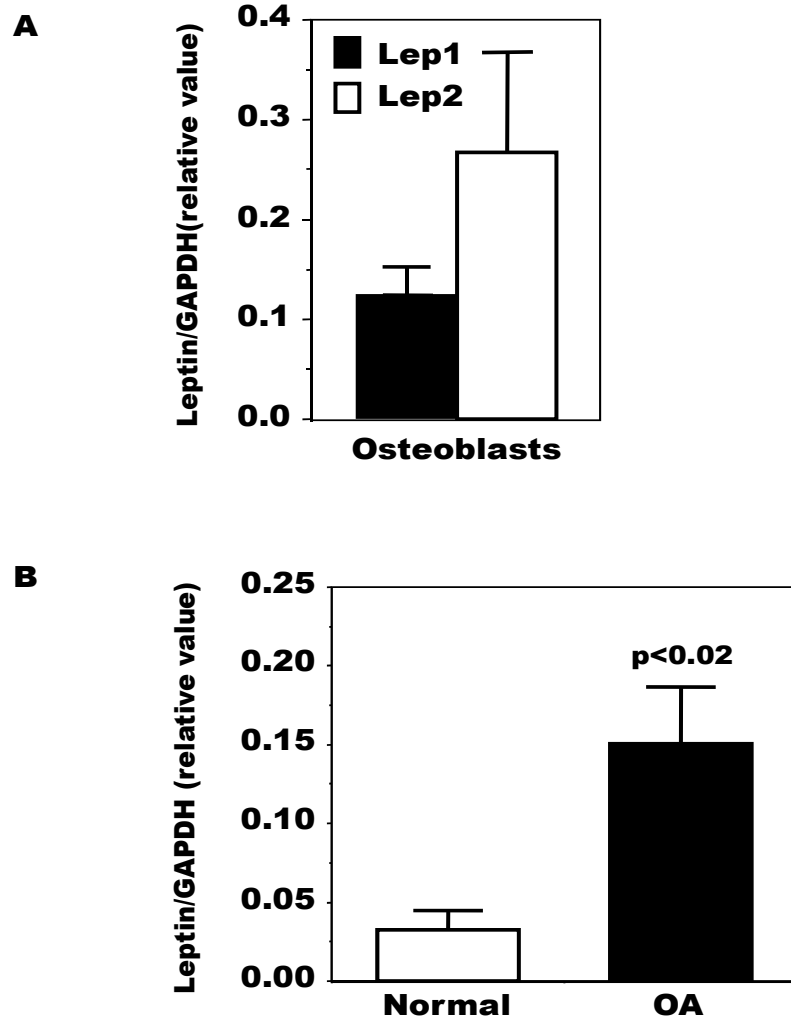


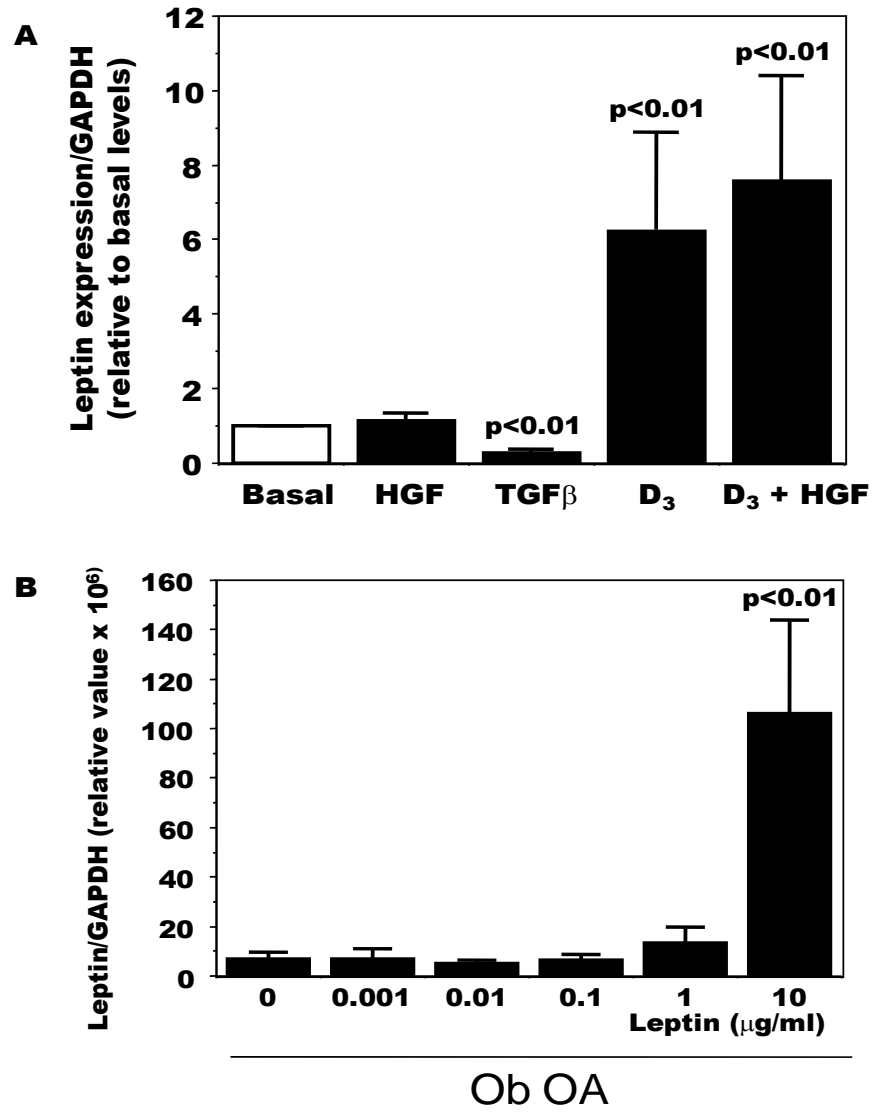
Figure 2

Figure 3

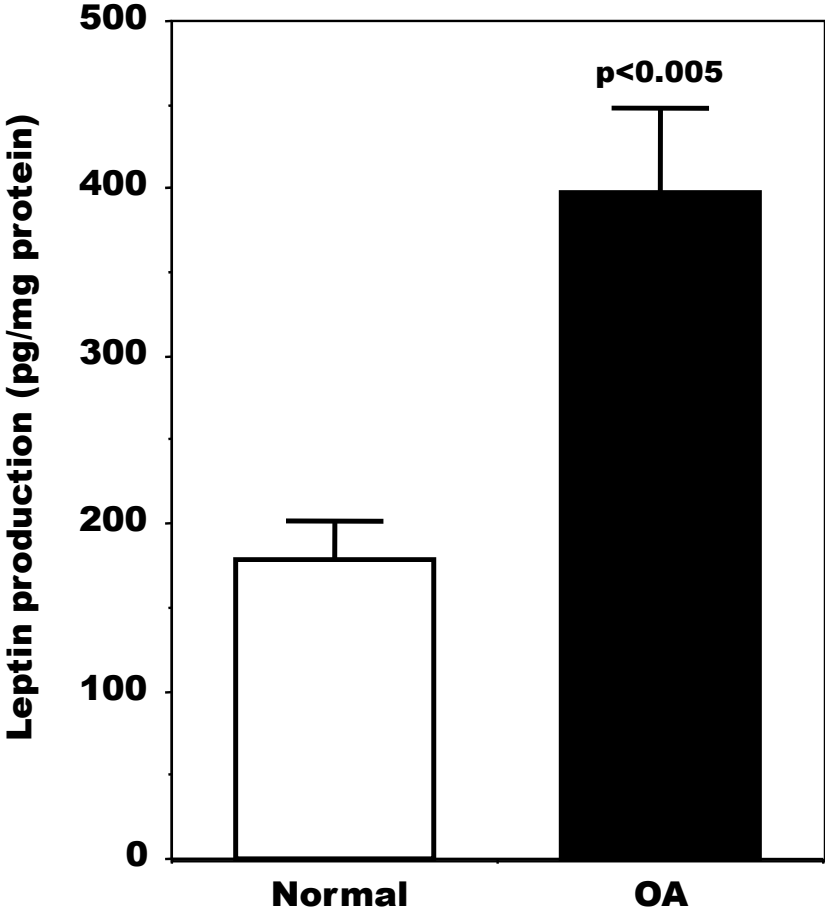


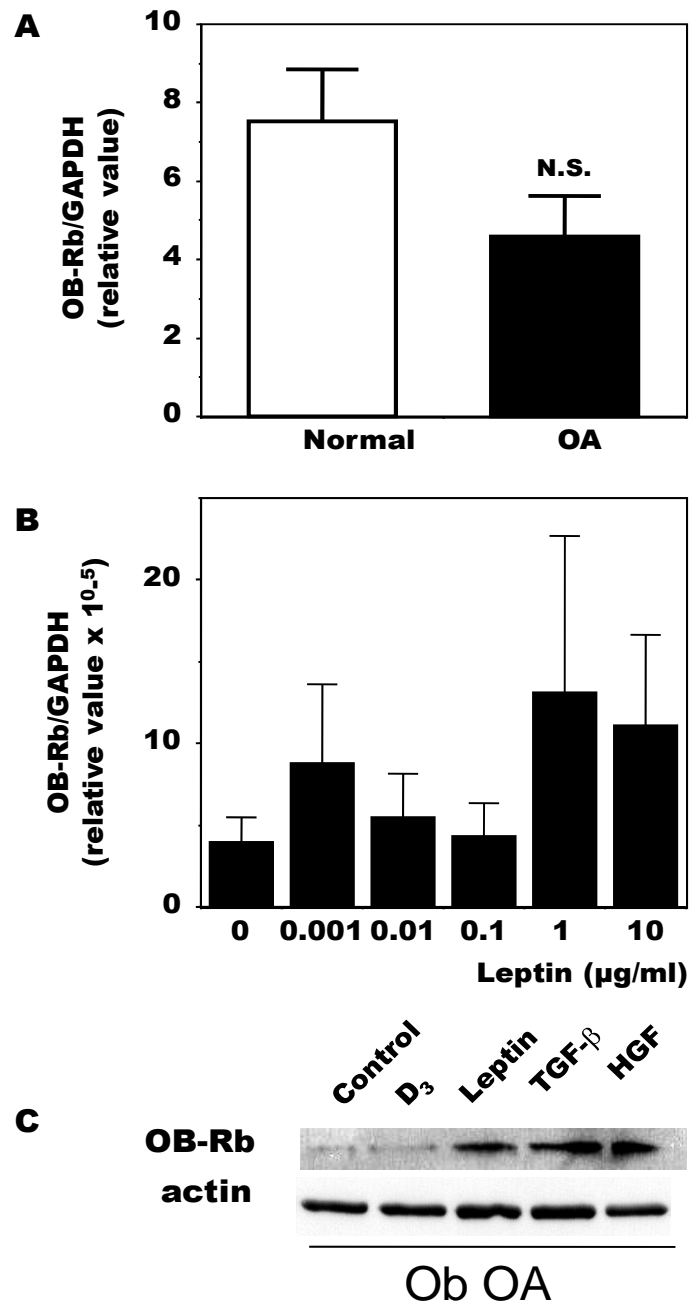
Figure 4

Figure 5A

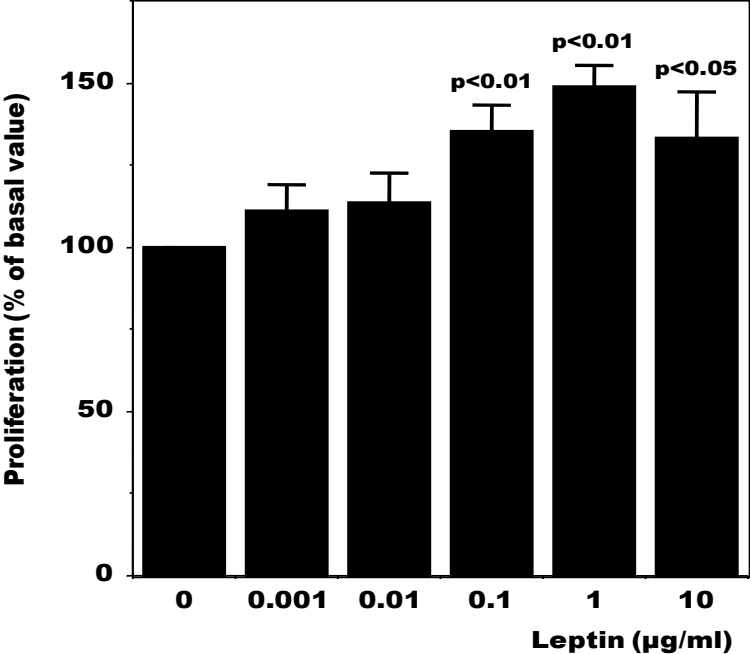


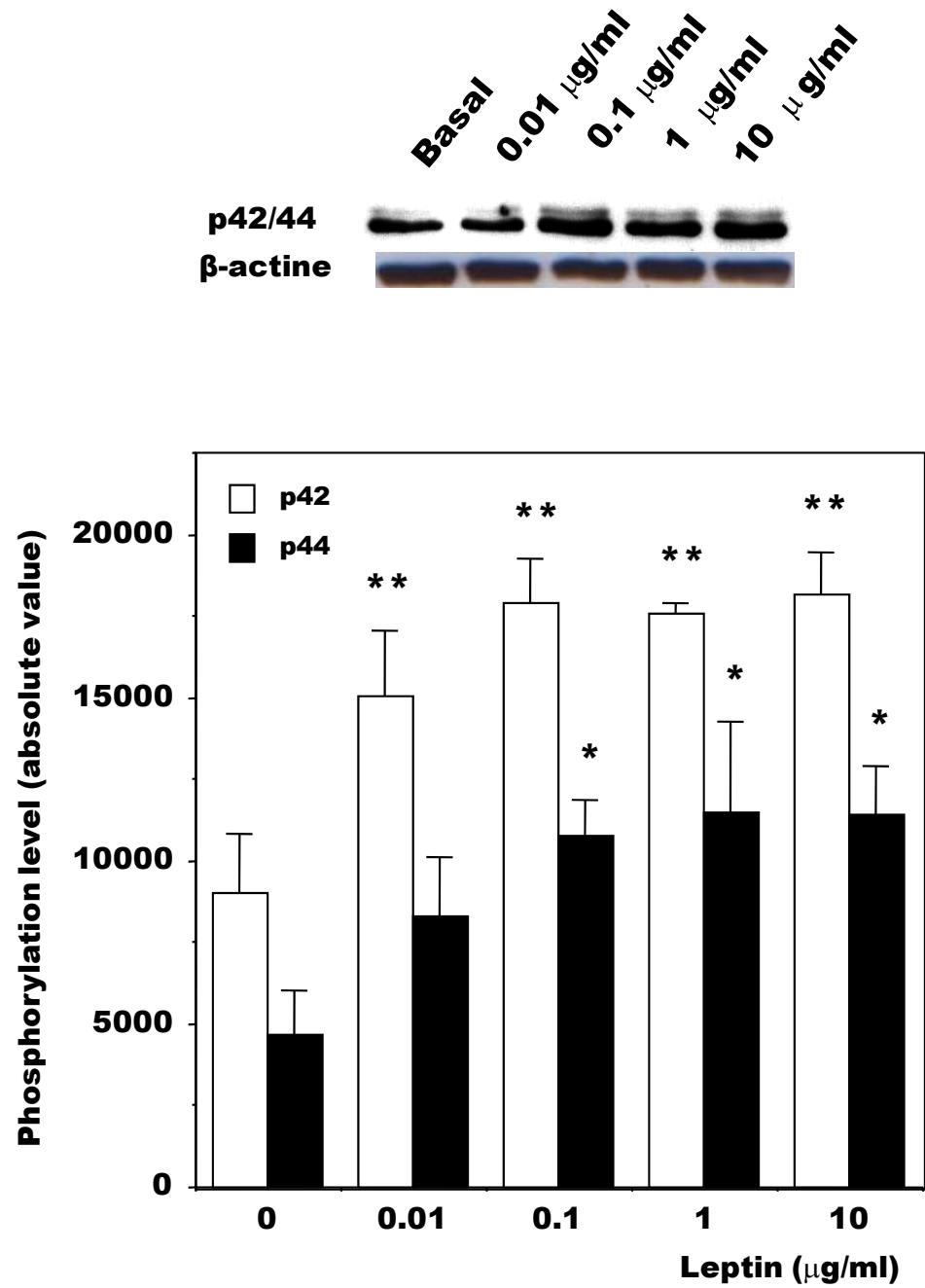
Figure 5B

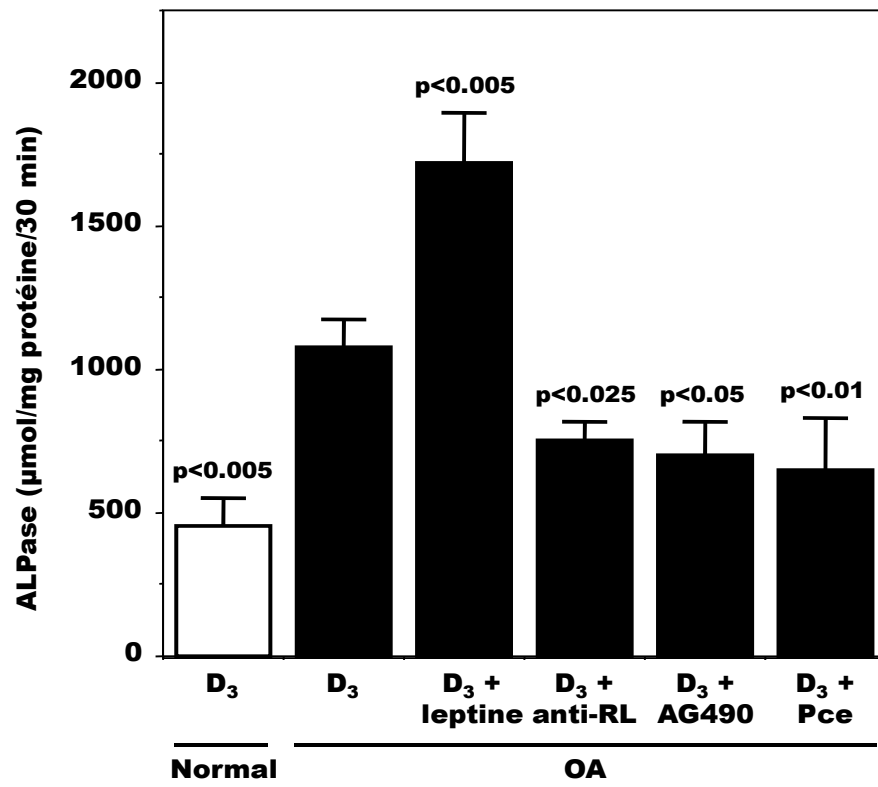
Figure 6A

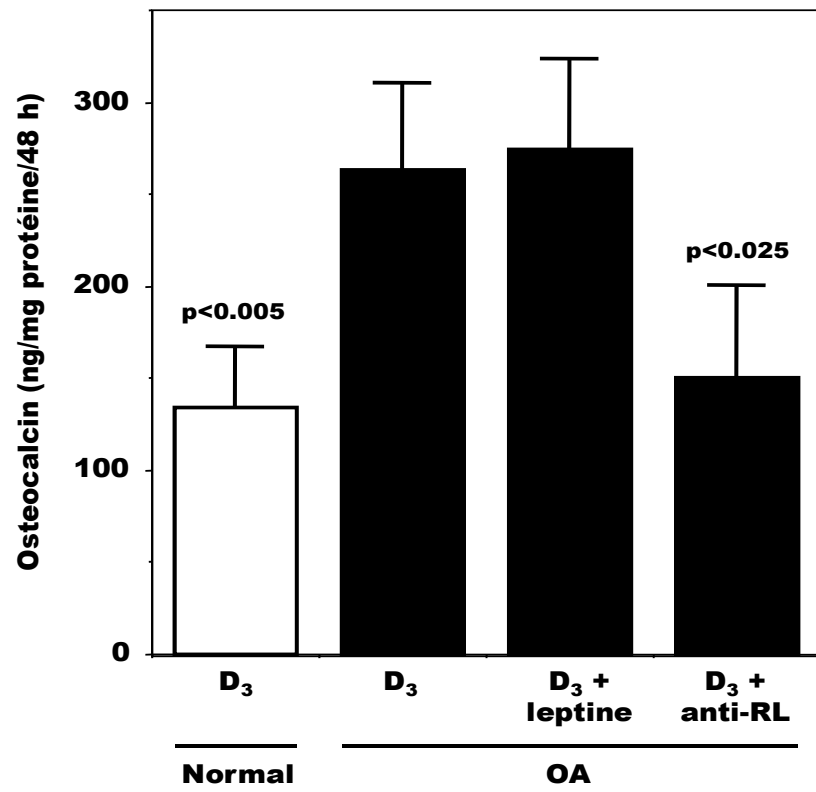
Figure 6B

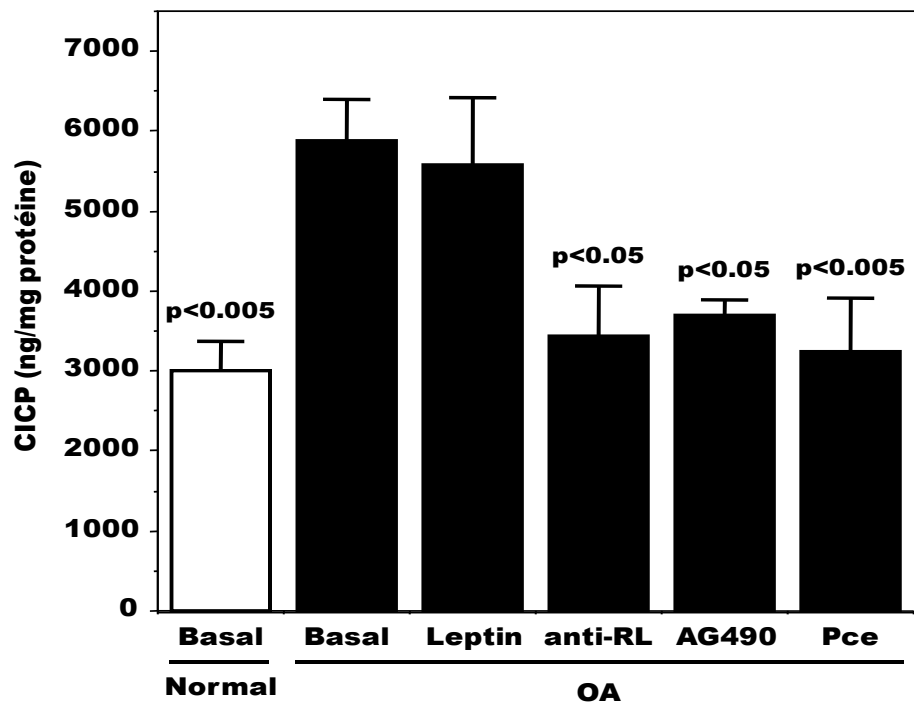
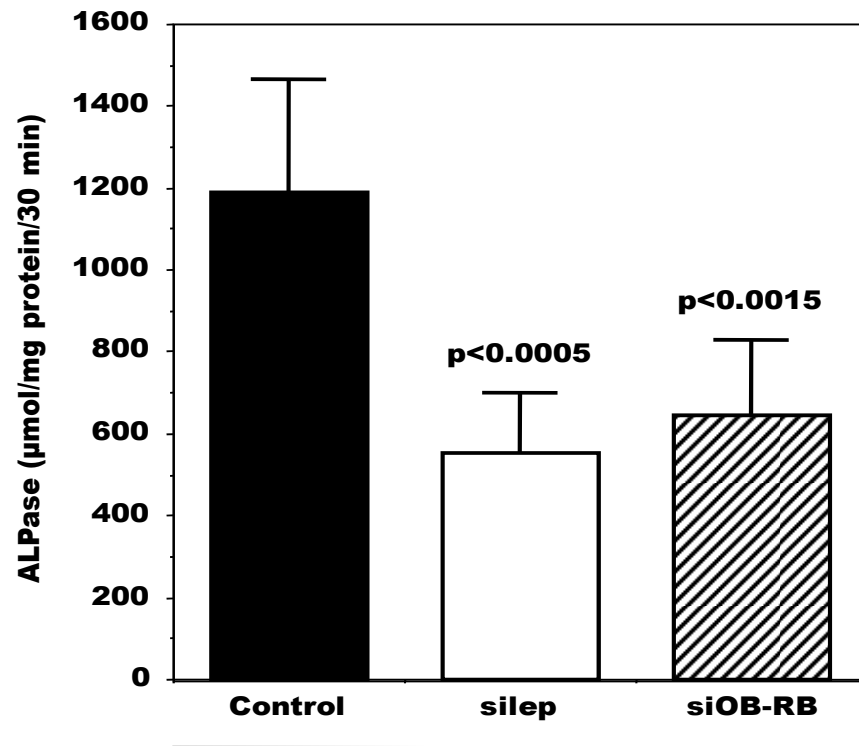
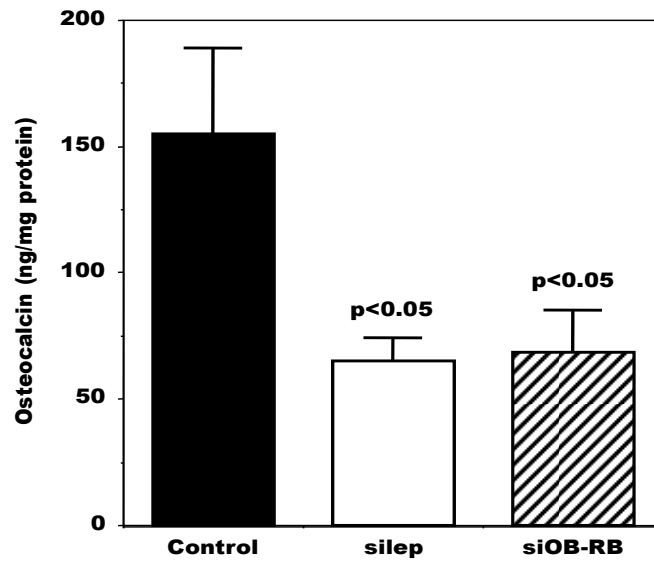
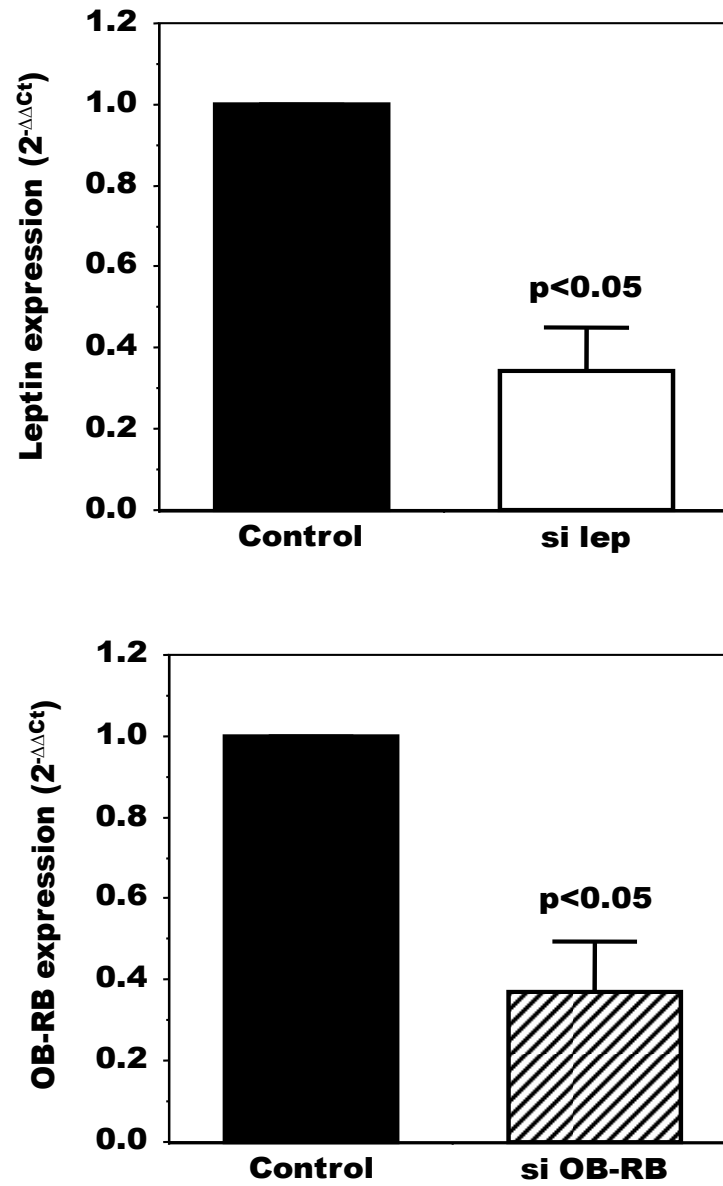
Figure 6C

Figure 6D

Ob OA en absence de leptine exogène

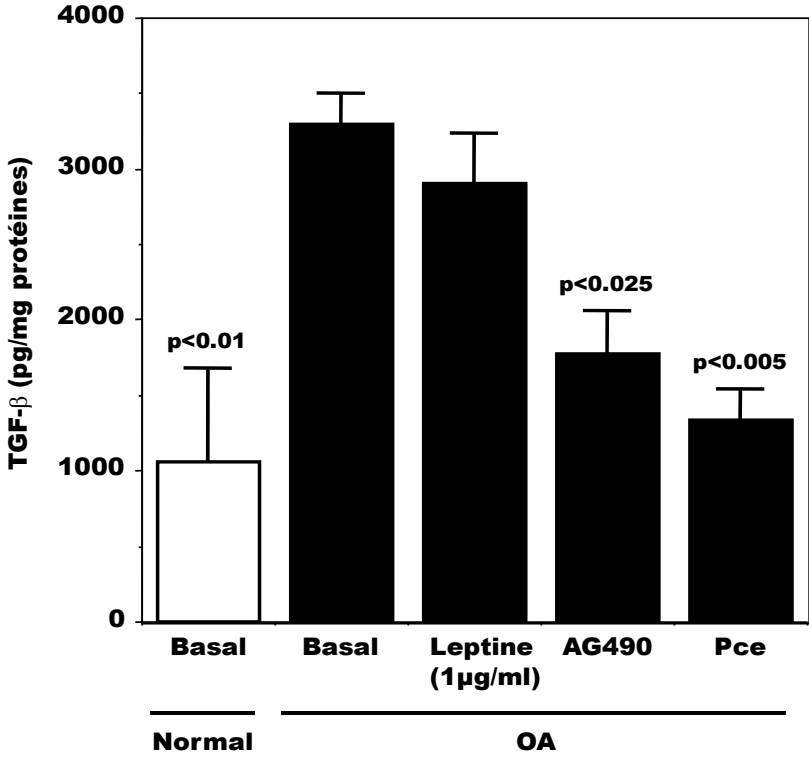
Figure 6E

Ob OA en absence de leptine exogène

Figure 6F

Ob OA en absence de leptine exogene

Figure 7



C. Les résultats supplémentaires

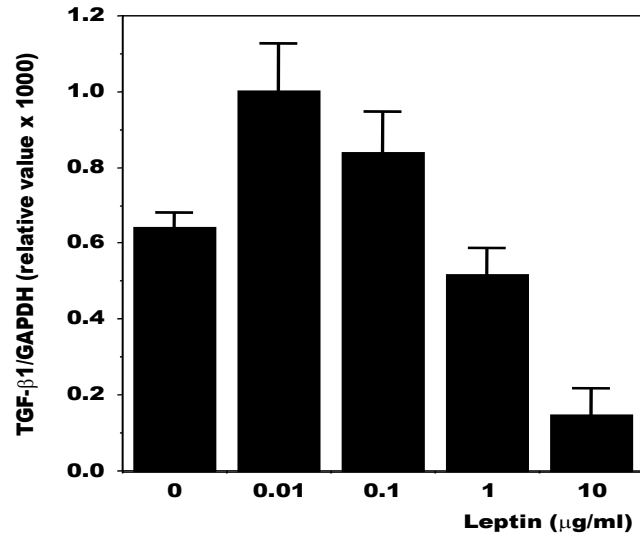
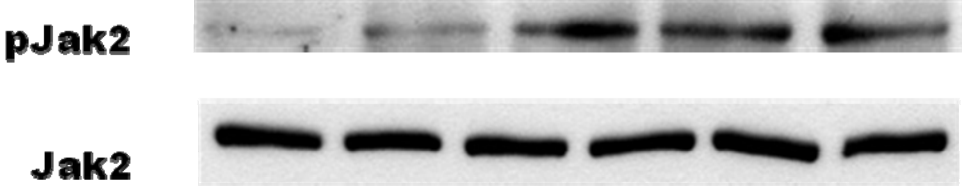
Figure S1

Figure S1: L'effet d'une dose réponse leptine sur l'expression du facteur TGF-β1 dans des cellules Ob OA.

Les cellules Ob OA confluentes ayant été stimulés avec une dose-réponse de leptine ont été prélevées dans du Trizol et leur ARN a été prélevés selon la méthode décrite dans le manuscrit. 1μg d'ARN a été « reverse transcrits » en ADNc puis 100ng d'ADNc a été amplifié par PCR en temps réel en utilisant des amorces spécifiques de GAPDH et TGF-β1. Les données ont été collectées par le logiciel GeneAmp 5700 SDS sous la forme de cycle d'amplification (Ct), ce qui correspond au cycle d'amplification avec une augmentation significative en comparaison au niveau basal. Les Ct ont été converties en nombre de molécules et la valeur de chaque échantillon est un ratio du nombre de molécules du gène cible / nombre de molécules du gène GAPDH.

Figure S2

A)



B)

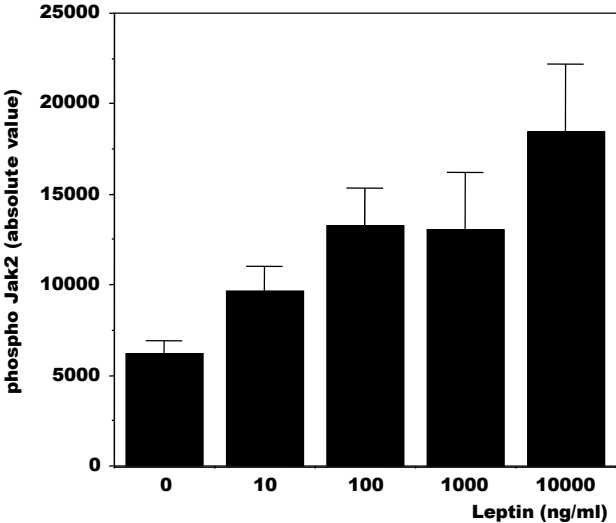
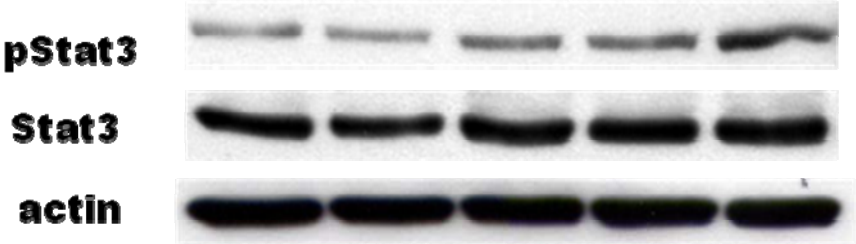


Figure S3

A)



B)

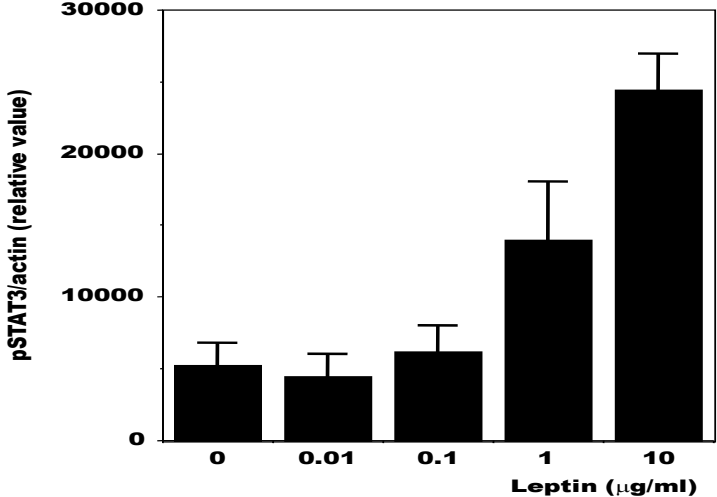


Figure S2: L'effet d'une dose réponse leptine sur la production des protéines Jak 2 dans des cellules Ob OA.

Les cellules Ob OA confluentes ayant été stimulés avec une dose-réponse de leptine ont été prélevées dans du tampon Ripa et la quantité de protéine totale a été dosée par la méthode BCA. A) La détection des protéines Jak 2 et Jak2 phosphorylé a été réalisé par immunobuvardage sur un gel de 10% de polyacrylamide. B) La quantification des phosphorylations de Jak2 a été réalisé par un logiciel du NIH.

Figure S3: L'effet d'une dose réponse leptine sur la production des protéines Stat3 dans des cellules Ob OA.

Les cellules Ob OA confluentes ayant été stimulés avec une dose-réponse de leptine ont été prélevées dans du tampon Ripa et la quantité de protéine totale a été dosée par la méthode BCA. A) La détection des protéines Stat3, Stat3 phosphorylés a été réalisé par immunobuvardage sur un gel de 10% de polyacrylamide. B) La quantification des phosphorylations de Stat 3 a été réalisé par un logiciel du NIH.

D. Discussion

L'ostéoarthrose semble prendre une proportion importante au sein de notre société actuelle, tout d'abord en termes de pourcentage de personnes âgées (65%) qui en souffrent mais également des coûts économiques et en soins de santé (environ 22 milliards) qu'elle engendre. En effet, avec le vieillissement des « baby-boomers » ainsi qu'une augmentation du pourcentage d'obésité en Amérique du nord, un des facteurs de risque d'OA, il semble évident qu'il faut prêter une attention particulière à cette pathologie afin de mieux la contrôler voire l'éradiquer (Société d'arthrite du Canada). De nombreux travaux de recherches sur l'étiologie ont permis de mieux définir les parties de l'articulation (cartilage, membrane synoviale, liquide synovial, ostéophytes et os-sous-chondral) qui sont les cibles de l'OA, toutefois le rôle respectif de chacune de ces composantes dans la maladie reste encore nébuleuse, en particulier la participation de l'os sous-chondral.

L'origine de l'OA a été longtemps et exclusivement attribuée à la dégradation du cartilage articulaire car les lésions et autres changements métaboliques au niveau du tissu cartilagineux étaient plus facilement perceptibles. Toutefois, les études réalisées dans la dernière décade sur le tissu humain ont permis de mieux comprendre l'étiologie de cette pathologie notamment l'important rôle joué par l'os sous-chondral quant à l'apparition et/ou à la progression de l'OA (Radin et al, Burr et al, Lajeunesse et al). D'autres études ont prouvé que les lésions du tissu osseux précèdent la dégénérescence du cartilage articulaire dans des modèles animaux souffrant d'OA spontanée (Quasnicka H.L. et al, 2006; Billingham M.E.J. et al, 1996). Parmi ces lésions, on peut noter un épaississement de l'os sous-chondral qui sous-entend une altération du métabolisme des Ob qui le compose. De plus, il semble que ces mêmes lésions du tissu osseux contribuent fortement à l'initiation et/ou l'aggravation de la dégradation du cartilage.

En effet, la présence de canaux et microfractures au niveau de la zone de démarcation entre la zone calcifiée du cartilage articulaire et l'os sous-chondral a été montrée par plusieurs. Ce phénomène résulte de : 1) La sclérose de l'os, 2) La modification des propriétés mécaniques induisant une perturbation de la répartition des forces à l'interface os-cartilage, 3) La formation de micro fractures à la jonction des deux tissus. Ainsi, la zone calcifiée peut permettre un échange d'innombrables facteurs produits par les Ob de l'os sous-chondral qui peuvent se rendre aux couches profondes et moyennes du tissu

cartilagineux (Sokoloff L. et al, 1993; Clark J.M, 1990; Milz S. et al, 1994). Par conséquent, la surproduction de certains facteurs de croissance comme le TGF- β 1 responsable de la formation d'excroissances osseuses dites ostéophytes ainsi que de l'IGF-1 par les Ob de l'os sous-chondral atteint d'OA voyageraient donc via la zone de démarcation. Ensuite, elle affecterait le métabolisme des chondrocytes en induisant l'expression des métalloprotéinases qui à leur tour dégraderaient la MEC cartilagineuse (Burr et al, Lajeunesse et al, Lajeunesse et Reboul, Martel-pelletier J. et al, Reboul P. et al.). On peut donc supposer que les débris résultants de la dégradation du cartilage articulaire se retrouvent dans le liquide synovial. Suite au mouvement de l'articulation ces débris s'entrechoquent avec la membrane, entraînant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les synoviocytes. Cette inflammation de la membrane synoviale, la formation d'ostéophytes et la sclérose de l'os sous-chondral occasionnent de la douleur et un gonflement au niveau de l'articulation des patients OA (Dieppe et al, 1999), ce qui réduit la mobilité de ces malades jusqu'à les handicaper complètement.

Comme il a été mentionné, l'obésité est un facteur de risque important pour l'OA et cette pathologie est aussi inflammatoire. Parmi les cytokines pro-inflammatoires, on retrouve une adipocytokine nommée leptine. Notre intérêt envers cette cytokine vient du fait que sa concentration varie en fonction de l'IMC, or l'augmentation de l'IMC constitue un grand risque de développer l'OA (Marks R et al, 2002). De plus, la leptine est produite par les adipocytes et ce type cellulaire est issu de la même cellule mésenchymateuse que les Ob (Nuttall M.E. et al, 2000), ce qui sous-entend que les Ob puissent être capable d'exprimer et produire la leptine.

Des travaux antérieurs dans notre laboratoire ont démontré que les Ob de patients OA avaient un phénotype altéré, entre autre une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) (qui est indicateur de la formation osseuse) ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de l'ostéocalcine (OC) (marqueur du remodelage osseux) (Lajeunesse D. et al, 1991; Lajeunesse D. et al, 1996). Ainsi, la variation de ces paramètres phénotypiques serait une des explications de la sclérose de l'os sous-chondral que l'on observe chez les sujets OA. Ces modifications ne sont par contre pas suffisantes pour

expliquer le comportement anormal des Ob OA. Or, des études dans les modèles animaux sur la leptine montrent que l'impact de cette hormone sur le métabolisme osseux est différent selon que les variations de sa sécrétion soient perceptibles localement ou au contraire au niveau systémique. L'augmentation de la concentration locale (articulaire) de leptine est beaucoup plus efficace et stimulerait de façon importante le métabolisme des Ob des os longs (Hamrick M.W et al, 2005). Enfin, la leptine exogène démontre un effet sur la production de phosphatase alcaline, la sécrétion d'ostéocalcine et le collagène de type 1 sur les ostéoblastes normaux en culture in vitro (Gordeladze J.O et al, 2002)

L'ensemble de ces données a donné naissance à l'hypothèse suivante qui suggère que la leptine produite localement puisse jouer un rôle dans le phénotype anormal des Ob de patients OA et ainsi donc puisse être un acteur important dans le mauvais fonctionnement du remodelage de l'os sous-chondral de patients OA. Par ailleurs, Pottie et al ont démontré que la production de leptine dans des modèles animaux OA stimule la synthèse des facteurs de croissance comme TGF- β 1, or ce facteur est surexprimé dans les Ob OA. Ainsi, cela suggère que la leptine peut agir aussi sur la sécrétion des facteurs de croissance et donc favoriser la dégradation du cartilage OA de manière indirecte via le « cross-link » entre le cartilage et l'os sous-chondral, une autre hypothèse qui doit être vérifiée au cours de cette étude.

Le phénotype des ostéoblastes sous-chondraux humains

La détermination du phénotype des Ob sous-chondraux constitue la première étape à réalisée lors de cette étude afin de s'assurer que les cellules avec lesquelles on travaille sont bel et bien des ostéoblastes. La détermination du phénotype reflète la fonctionnalité ainsi que l'état de différenciation des Ob OA utilisées.

Dans la présente étude, les résultats obtenus ont montré qu'en moyenne l'activité de l'ALP ainsi que la sécrétion d'OC des Ob OA étaient augmentés de 2 fois par rapport à ces mêmes paramètres dans les Ob normaux. Ces données démontrent que lors de la culture primaire, nos cellules Ob OA confluentes étaient majoritairement des ostéocytes et que donc la différenciation des Ob de l'os sous-chondral OA (figures 6A et 6B) était plus rapide en comparaison à celle des Ob N.

Des travaux antérieurs au sein de notre laboratoire ont permis d'observer cette même différence significative entre le phénotype des Ob normaux et celui des Ob OA *in vitro* (Hilal G. et al, 1998; Massicotte F. et al, 2002). Ces travaux ont montré de même que le niveau d'activité d'ALP ainsi que la sécrétion d'OC des Ob OA étaient augmentés en comparaison à ceux des Ob normaux. Aussi, les niveaux de ces mêmes paramètres phénotypiques *in vivo* dans le tissu osseux suivent un comportement semblable (Lajeunesse D. et al, 2004).

L'activité de l'ALP est déterminante pour le phénotype des Ob pour plusieurs raisons. En effet, cette enzyme est produite par les Ob et en plus c'est un bon indicateur de l'état de différenciation de ces cellules. Le niveau d'activité de l'ALP reflète le niveau de formation osseuse (Khosla S. et al, 2003). La mesure de la sécrétion d'OC constitue également un bon témoin du phénotype des Ob, car cette protéine représente 25% des protéines non-collagéniques de la matrice osseuse (Price P.A. et al, 1976) et donc son niveau de sécrétion par les Ob nous renseigne sur le remodelage osseux en général. Il faut rappeler que la synthèse d'OC dépend entre autres des niveaux physiologiques de la vitamine D₃ et que cette même vitamine semble inhiber l'activité de l'ALP dans les pré-Ob tandis qu'elle stimule cette activité dans les Ob matures (Owel et al). Ainsi, pour mieux cerner le phénotype des Ob OA, il faut déterminer l'activité de l'ALP ainsi que la sécrétion de l'OC des Ob en condition stimulante avec le 1,25(OH)₂D₃ (Lajeunesse D. et al, 1991; Lajeunesse D. et al, 1996).

L'expression et la production de la leptine par les Ob OA sous-chondraux

De nombreuses études avec des modèles animaux tels que les souris déficientes en leptine (ob/ob) ont démontré qu'une adipocytokine nommée leptine agissait différemment sur le tissu osseux selon qu'elle soit circulante ou produite localement (Walton M. et al, 1977; Young M.F. et al, 2005; Price J.S. et al, 2002). Ainsi, suite à la confirmation que nos cellules avait un phénotype ostéoblastique exagéré en comparaison des ostéoblastes normaux, on s'est demandé si nos Ob OA synthétisent et/ou secrètent de la leptine de manière anormale.

Pour ce faire, deux amorces de leptine (Lep1 et Lep 2) ont été conçues et ensuite utilisées pour mesurer le taux d'expression de la leptine endogène des Ob OA par rapport au taux d'expression du gène rapporteur GAPDH en utilisant la technique de RT-PCR en temps réel. Les résultats obtenus ont confirmé que les Ob OA synthétisent de la leptine et que l'amorce Lep2 avait une meilleure efficacité. Avec ces amorces, nous avons détecté une augmentation de l'expression de la leptine endogène des Ob OA de 3 fois par rapport à celle des Ob N. De même, au niveau protéique, la production de leptine était deux fois plus importante chez les Ob OA vs les Ob N (détection par kit ELISA).

La leptine est une cytokine principalement produite par le tissu adipeux blanc (Friedman et al, 1994, Zhang et al, 1994). Son niveau est en corrélation avec l'indice de masse corporelle (IMC), or l'augmentation de l'IMC observée chez les sujets obèses constitue un grand facteur de risque pour développer l'OA (Marks R et al, 2002). Nous savons également que les cellules stromales peuvent se différencier en ostéoblastes ou en adipocytes et ce, en présence de certains facteurs de transcription tel que Runx2 dans le cas des Ob (Nuttall M.E. et al, 2000). Or, la leptine inhibe la différenciation des cellules stromales en adipocytes tout en favorisant leur différenciation en ostéoblastes (Thomas T. et al, 2001). En plus de partager un ancêtre commun avec les adipocytes, des études ont montré que les Ob sont capables de synthétiser et de sécréter la leptine toutefois en moindre quantité par rapport aux adipocytes (Reseland J.E. et al, 2001; Thomas T. et al, 2002; Reseland J.E et al, 2002; Lajeunesse D. et al, 1996).

Par ailleurs, chez les souris STR/ort qui développent l'OA de manière spontanée, les niveaux de leptine sont élevés (Walton M. et al, 1977; Young M.F. et al, 2005; Price J.S. et al, 2002), ce qui suggère fortement que la leptine module la fonctionnalité des Ob dans des modèles animaux OA et que cette hormone constitue le lien entre l'obésité et la maladie d'OA (Pottie P. et al, 2004). À la lumière des résultats obtenus, nous pouvons donc supposer que la leptine soit impliquée dans le phénotype anormal des Ob OA.

Pour mieux cerner le rôle de cette leptine produite et synthétisée dans les Ob OA de l'os sous-chondral, il a fallu d'abord comprendre la régulation de la synthèse de la leptine en présence de différents facteurs clés dans la maladie d'OA.

Nos résultats montrent que 10ng/ml de HGF ont un effet peu significatif sur la synthèse de la leptine dans les Ob OA car suite à cette stimulation, la synthèse de leptine observée est quasi équivalente à celle au niveau basale. Par contre, l'ajout de 50nM de vitamine D₃ a quadruplé la synthèse de leptine en comparaison au niveau basal. La combinaison entre la vitamine D₃ et le facteur HGF a affecté la synthèse de la leptine de manière similaire aux résultats obtenus en présence unique de la vitamine D₃. Ceci confirme donc que le HGF n'a pas d'effet significatif sur la synthèse de la leptine. Le facteur TGF-β1 inhibe de moitié l'expression de la leptine endogène des Ob OA. Quant à l'effet de la leptine exogène sur sa propre synthèse, cette dernière semble exercer une rétroaction positive de manière dose-dépendante. Un effet maximal de 11 fois le niveau de base est observé avec une stimulation de 10 µg/ml de leptine exogène dans les Ob OA.

Nos résultats suggèrent que la synthèse augmentée de la leptine dans les Ob OA ne dépend pas des facteurs TGF-β1 et HGF puisque cette synthèse est inhibée par le TGF-β1 et n'est pas affectée par HGF. De plus, puisque TGF-β1 est augmentée dans nos Ob OA, ceci peut aussi vouloir dire que nos Ob OA échappent en partie au contrôle de TGF-β1. Par ailleurs, chez les modèles animaux, les chondrocytes OA secrètent beaucoup plus de leptine que les chondrocytes normaux (Pottie et al, 2004). De plus, il a été montré que les facteurs HGF et TGF-β1 provenant de l'os sous-chondral se rendent au cartilage et mène ainsi à la dégradation de ce tissu (Westacott et al, Blanquaert F. et al, 2000; Skrtic S. et al, 2000). Parallèlement, nous avons montré que ces facteurs stimulent la production du récepteur OB-Rb (Figure 4C). Toutefois, la dose-réponse leptine diminue l'expression de ce récepteur (Figure 4A et 4B). En accord avec toutes ces données, ces résultats montrent que ces facteurs de croissance ne stimulent pas la synthèse de la leptine mais qu'ils favorisent la production du récepteur OB-Rb. Ainsi, HGF et TGF-β entraînent une signalisation anormale de la leptine dans les Ob de l'os sous-chondral OA. De plus, l'effet stimulant de la vitamine D₃ sur la synthèse la leptine soutient que cette protéine puisse jouer un rôle clé dans le phénotype des Ob. Et il a été mentionné ci-haut que la détermination du phénotype des Ob OA doit se faire en condition stimulante avec la D3.

Le facteur HGF est uniquement produite par les Ob et non pas les chondrocytes. Ce facteur est surexprimé dans les Ob OA avant de se rendre dans le cartilage pour y induire la synthèse de MMP-13 qui va enclencher la dégradation de ce tissu cartilagineux (Guévrémont M. et al, 2003; Reboul P. et al, 2001). Toutefois, notre étude montre qu'il a un effet mineur sur la leptine. Quant au facteur TGF- β 1, il est surexprimé dans les Ob OA où il serait impliqué dans le turnover et la synthèse de la matrice osseuse, ainsi que pour stimuler l'activité des collagénases (Dequeker J. et al, 1996). Cependant, nos résultats montrent que ce dernier inhibe la synthèse de la leptine. Pour terminer, l'effet de la vitamine D3 sur la synthèse de la leptine est renforcé par la rétroaction de la leptine sur sa propre expression. De plus, les niveaux physiologiques de la D3 semblent primordiaux pour les caractéristiques phénotypiques des Ob tel que mentionné dans la section précédente.

Toutes ces données nous ont mené donc à déterminer l'impact réel de la leptine sur le phénotype des Ob OA de l'os sous-chondral.

L'effet de la leptine sur l'activité de la phosphatase alcaline (ALP)

Les sections précédentes ont montrés que : 1) L'ALP est un important déterminant du phénotype des Ob OA en condition stimulante avec le 1,25(OH) $_2$ D $_3$. 2) Son niveau d'activité est plus élevé dans les Ob OA en comparaison à son niveau d'activité dans les Ob N. Parallèlement, nos données montrent que le 1,25(OH) $_2$ D $_3$ quadruple la synthèse de la leptine dans les Ob OA de l'os sous-chondral. Ces prémices suggèrent donc que la leptine puisse être impliquée dans le phénotype anormal des Ob OA.

Dans un premier temps, nous avons confirmé le phénotype anormal des Ob OA utilisés en montrant que ces derniers avaient un niveau d'activité d'ALP augmenté de 2 fois en comparaison à celui des Ob N. Par la suite, nous avons déterminé l'effet de la leptine exogène sur l'ALP dans les Ob OA et les résultats démontrent que l'activité de l'ALP passe d'environ 1100 μ mol/mg à environ 1750 μ mol/mg de protéines avec une signifiante de $p < 0.005$. Ensuite, nous avons vérifié le rôle de la leptine endogène sur l'activité de l'ALP en utilisant trois inhibiteurs chimiques : 1) un anticorps empêchant la liaison entre la leptine et son OB-Rb par compétition (anti-RL), 2) AG490 qui est un inhibiteur de la phosphorylation de Stat 3, membre important de la cascade de signalisation (JAK/STAT) et 3) le Piceatannol

(Pce), inhibiteur de la phosphorylation de JAK2 arrêtant la transduction du signal. L'utilisation de ces trois types d'inhibiteurs dans les Ob OA a diminué le niveau d'activité de l'ALP à un seuil très proche de celui des Ob N.

L'ensemble de ces résultats prouvent que la leptine endogène des Ob OA module l'activité de la phosphatase alcaline à la hausse puisqu'en utilisant des inhibiteurs de la signalisation de cette leptine endogène, on ramène ce niveau d'activité presque au même seuil que celui des Ob N. De plus, la leptine endogène module à la hausse l'activité phosphatase alcaline mais sans pour autant atteindre le seuil maximal puisque l'ajout de leptine exogène a aussi réussi à augmenter davantage l'activité enzymatique de l'ALP.

Afin de vérifier si l'effet exercé par la leptine sur l'activité de l'ALP était attribuable principalement à cette adipocytokine, nous avons eu recours à la technique des ARNs d'interférence (SiRNA) permettant de bloquer la signalisation de la leptine. Nous avons donc utilisé SiLep qui bloquait l'expression de la leptine ainsi que SiOB-Rb contre l'expression des récepteurs OB-Rb. Dans un premier temps, nous avons vérifié l'efficacité d'inhibition des ces SiRNA par RT-PCR en temps réel, et nous avons donc montré que SiLep a diminué de 70% l'expression de la leptine avec une signifiante de $p < 0.05$ et que SiOB-Rb diminuait aussi de 70% l'expression du OB-Rb avec une signifiante de $p < 0.05$ dans des Ob OA (Figure 6F). Dans les mêmes conditions, l'ajout de SiLep a baissé de plus de la moitié l'activité d'ALP des Ob OA avec une signifiante de $p < 0.0005$ et l'ajout de SiOB-Rb a fait chuté cette même activité d'un peu moins de la moitié avec une signifiante de $p < 0.015$, démontrant encore une fois que la leptine endogène et sa signalisation contribuait à maintenir élevée l'activité de la phosphatase alcaline dans les Ob OA.

En conclusion, nous pouvons retenir que l'augmentation du niveau d'activité de l'ALP dans les Ob OA de l'os sous-chondral est bel et bien attribuable à la leptine endogène. Sachant que la synthèse de la leptine est stimulée en présence du $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ et que cette condition stimulante est nécessaire pour déterminer l'activité d'ALP, on peut donc suggérer que l'effet stimulant de la leptine endogène sur l'activité de l'ALP est indépendante de l'effet de la vitamine D_3 sur cette même activité enzymatique. D'autant plus qu'il a été montré que les Ob OA répondent normalement lorsqu'ils sont stimulés avec

le $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Hilal G. et al, 1999; Hilal G. et al, 2001). Par ailleurs, nous avons démontré que l'effet stimulant de la leptine n'est pas à son maximum puisque la leptine exogène exerce un effet plus marqué. Cela suggère donc que la leptine collaborerait avec d'autres protéines et/ou facteurs de croissances afin de hausser davantage l'activité de l'ALP dans les Ob OA. Sachant que l'ALP produit localement par les Ob est un indicateur de la formation osseuse alors cela suggère que l'augmentation de l'ALP par la leptine dans les Ob OA stimule fortement la différenciation des Ob OA. De plus, rapellons aussi que cette enzyme permet d'augmenter la concentration locale du phosphate inorganique, tout en détruisant les inhibiteurs de la formation des cristaux d'hydroxyapatite (Khosla S. et al, 2003). Nos résultats s'accordent donc avec ceux de Thomas et al (2002) qui a montré que la leptine stimule la différenciation des Ob. On peut supposer donc que ce nombre grandissant d'Ob matures favorise la formation osseuse et entraîne la sclérose de l'os sous-chondral des sujets OA.

L'effet de la leptine sur la sécrétion d'ostéocalcine (OC)

Les expériences précédentes ont montré que les Ob OA secrètent plus d'ostéocalcine que les Ob N et que la détermination de ce paramètre doit être mesuré en condition stimulante avec du $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Il a été aussi montré que cette vitamine stimule la synthèse de la leptine. Ces données nous suggèrent que la leptine peut moduler la sécrétion d'OC anormale des Ob OA. Pour ce faire, nous avons d'abord montré que les Ob OA secrètent 2 fois plus d'ostéocalcine que les Ob N avec une significiance de $p < 0.005$. Ensuite, nous avons évalué l'impact de la leptine exogène sur cette sécrétion dans les Ob OA, et nous avons noté que la sécrétion d'OC des Ob OA ne variait pas de manière significative en présence de leptine exogène.

Par la suite, nous avons voulu déterminer l'impact de la leptine produite de manière endogène par les Ob OA sur leur sécrétion d'ostéocalcine. Pour ce faire, nous avons inhibé la signalétique de la leptine en présence d'un anticorps qui empêche la liaison de la leptine à son récepteur OB-Rb par compétition (anti-RL). Nous n'avons pas eu recours aux inhibiteurs chimiques Tyrphostin et Piceatanol car leur coloration biaisait la détermination de la sécrétion d'OC. Les résultats présentés à la Figure 6B ont montré que l'inhibition de la

signalisation de la leptine a diminué de 50% le niveau d'OC des Ob OA soit presque au même seuil que le niveau d'OC des Ob N avec une signifiante de $p < 0.025$. Ceci démontre que la leptine endogène des Ob OA contribue à augmenter leur sécrétion d'ostéocalcine et ce jusqu'à son niveau maximal puisque l'ajout de la leptine exogène n'a pas fait varier les niveaux d'OC de manière significative. Cette protéine non collagénique est indicatrice du remodelage osseux et est impliquée dans la minéralisation osseuse (Deftos L.J. et al, 1992; Khosla S et al, 2003). Ces résultats nous mènent à penser que la leptine produite localement au niveau de l'os sous-chondral OA débalance le remodelage osseux en faveur de la formation osseuse et donc contribue à la sclérose de l'os sous-chondral observée chez les sujets OA. Ceci suggère aussi qu'en augmentant les niveaux d'OC, la leptine soit indirectement responsable de l'hypominéralisation de l'os sous-chondral OA. En effet, l'OC est capable de fixer des ions calcium, or cette fixation induit une baisse du calcium disponible pour la minéralisation des Ob, donc elle serait plutôt pro-résorbative. D'autres études suggèrent aussi que la fixation des ions calcium par OC provoque la formation d'un microenvironnement saturé en calcium, qui serait propice à la formation d'hydroxyapatite donc à la formation osseuse (Liu Y et al, 2007).

Afin de vérifier cette hypothèse nous avons eu recours aux SiLep et SiOB-Rb afin d'inhiber l'expression de la leptine et de son récepteur OB-Rb. Nous avons déterminé que SiLep a diminué de 65% la sécrétion d'OC et que SiOB-Rb a également réduit de 60% cette sécrétion dans les Ob OA avec une signifiante de $p < 0.05$. Ces résultats démontrent donc que la leptine endogène des Ob OA joue un rôle clé dans la modulation de leur sécrétion d'OC et par conséquent dans le remodelage osseux de l'os sous-chondral des patients OA. Or, l'intensification du remodelage osseux des Ob OA par la leptine augmenterait la rigidité de l'os sous-chondral, ce qui affecterait sa capacité à absorber les chocs (Burr D.B. et al, 1997; Radin E.L. et al, 1986; Radin E.L. et al, 1997).

Ceci prouve également qu'en augmentant la sécrétion d'ostéocalcine des Ob OA, la leptine contribue au déséquilibre entre protéines non-collagénique et le collagène de type I. Ainsi, ce déséquilibre provoquerait une augmentation du volume osseux sans pour autant modifier en conséquence la densité minérale osseuse (BMD) (Bailey A.J et al, 2002). De plus, des études chez des modèles animaux OA ont montré une augmentation du volume

osseux et du BMD plus remarquables que les lésions affectant le cartilage articulaire (Carlson C.S. et al, 1994; Carlson C.S. et al, 1996; Dedrick D.K. et al, 1993; Yang C. et al, 1993; Vener M.J. et al, 1992; Oettmeier R. et al, 1992; Brandt K.D. et al, 1991). De manière surprenante, cette augmentation apparente du BMD chez ces animaux reflétait seulement l'augmentation matérielle de la densité et non de la densité minérale, ce qui serait causé par une augmentation de la matrice collagénique qui est sous-minéralisée (Mansell J.P. et al, 1997, Mansell J.P. et al, 1998; Bailey A.J et al, 2002). Pour finir, il faut noter que l'ensemble de ces altérations de l'os sous-chondral telle que sa rigidité qui entraîne une augmentation de son volume et de son BMD apparent, sont des effets qui ont été observés chez les sujets obèses. Or, ces derniers ont des niveaux de leptine à la hausse (Ferguson V.L. et al, 2003).

L'étude courante a permis de confirmer une augmentation de la matrice collagénique dans l'os sous-chondral. En effet, la mesure du pro-peptide de l'extrémité C-terminal du collagène de type I (CICP) a été mesurée dans des Ob OA et N en présence ou non de la leptine et en présence d'inhibiteurs chimiques de la signalétique de la leptine soit anti-RL, AG-490 et Pce. Les résultats obtenus ont montré que le niveau de CICP relâché par les Ob OA était le double de celui des Ob N avec une significiance de $p < 0.005$. De plus, la synthèse du CICP dans les Ob OA est stimulée à son maximum par la leptine endogène puisque l'ajout de la leptine exogène n'a eu aucun effet. Lorsqu'on inhibe la signalisation de la leptine par de l'anti-RL, AG-490 ou Pce, le niveau détecté de CICP diminue jusqu'à un seuil quasi-équivalent à celui des Ob N. Ces données prouvent donc que la leptine endogène des Ob OA stimule le relargage du CICP.

Ceci s'accorde avec l'observation d'une augmentation du collagène de type 1 de l'os trabéculaire dans les têtes de fémur chez les sujets OA (Mansell J.P. et al, 1998), et celle de la stimulation par la leptine de la synthèse de la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type 1 *in vitro* dans les Obs (Mansell J.P. et al, 1997; Gordeladze J.O. et al, 2002). Toutefois, l'inégalité du ratio des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ constituantes des fibres de collagène de type 1 ainsi que la formation des homotrimères affectent la qualité ainsi que la fonctionnalité de ces fibres de collagène dans les Ob OA. Or, la synthèse de ces fibres de collagène est stimulée en

présence de leptine (Bailey A.J. et al, 2002). D'autres données ont montré que l'augmentation du collagène de type 1 dans la matrice osseuse *in vivo* pourrait altérer la différenciation des cellules mésenchymateuse en ostéoblastes. Par ailleurs, cette augmentation de la synthèse de collagène de type 1 dans les Ob OA favoriserait la maturation des Ob à partir des cellules stromales tandis que la maturation des adipocytes et des chondrocytes serait diminué (Murphy J.M. et al, 2002).

L'effet de la leptine sur la prolifération cellulaire des Ob OA

Les résultats précédents ont montré que la leptine endogène contribue donc au remodelage anormal de l'os sous-chondral OA en augmentant la sécrétion d'OC et que la leptine affecte également la différenciation des Ob OA en augmentant le niveau d'activité de l'ALP. Par ailleurs, l'étude de Takahashi et al (2007) a montré que la leptine peut induire la prolifération des cellules stromales multipotentes de souris via la voie de signalisation MAP kinases (MAPK). Ces données laissent sous-entendre que cette adipocytokine peut également moduler la prolifération des Ob OA via la voie de signalisation MAPK ce qui mènerait à la sclérose de l'os sous-chondral OA, hypothèse qui sera discutée dans la présente section.

L'effet d'une dose-réponse de leptine sur la prolifération des Ob OA a été déterminé par incorporation de BrdU. Les résultats ont montré que la prolifération des Ob OA était augmentée de manière significative à des doses de 0.1, 1 et 10 µg/ml de leptine exogène. Aussi, ces mêmes doses induisaient la phosphorylation des protéines p44 et p42, protéines importantes de la voie de signalisation de la famille MAP kinases (Erk1/2). La stimulation de la prolifération des Ob OA confirme les données qui ont montré que la leptine inhibe l'apoptose des Ob OA et que les protéines reflétant l'apoptose cellulaire telles que Bax- α et Bcl-2 sont modulées de manière différentes dans ces mêmes cellules (Fu L. et al, 2005, Massicotte F. et al, 2006). Ces résultats s'accordent également aux données antérieures démontrées par notre laboratoire, selon lesquelles la leptine induit la prolifération des cellules SaOS-2 via la voie Erk1/2. De plus, une autre étude réalisée dans notre laboratoire a montré que le taux de prolifération des Ob OA dépasse de manière significative celui des Ob N, et que le blocage de la voie erk1/2 inhibait la prolifération des ostéoblastes OA en

condition basale (Massicotte F. et al, 2006). Par ailleurs, la phosphorylation des protéines p44 et p42 corrèle avec une stimulation de la prolifération des Ob OA. Quant à cette stimulation de la prolifération, elle est sous contrôle de l'activation du facteur de transcription Runx2 qui à son tour promouvoit la différenciation des Ob OA (Xiao G. et al, 2002).

En favorisant la prolifération des Ob OA, la leptine pourrait augmenter la formation de l'os sous-chondral et donc sa sclérose. Sachant que le niveau de leptine est augmenté chez les sujets obèses et que ces doses varient entre 30ng/ml et 100 ng/ml (Considine R.V. et al, 1996), notre courbe dose-réponse à la leptine sur la prolifération cellulaire des Ob OA *in vitro* comprend des concentrations physiologiques. Ainsi, cela confirme que ces hauts niveaux de leptine constituent un grand risque de développer ou de faire progresser l'OA chez les sujets obèses. De plus, ces données prouvent que la leptine produite localement au niveau de l'os sous-chondral favorise la formation du tissu osseux, ce qui est contraire à l'effet de la leptine systémique sur le métabolisme osseux. En effet, les études dans des modèles animaux ont montré que les hauts niveaux de leptine systémique inhibent la formation du tissu osseux (Cirmanová V. et al, 2008). Pour terminer, il faut noter que des expériences complémentaires sont nécessaires afin de corroborer la relation de causalité entre la stimulation de la prolifération des Ob OA par la leptine ainsi que la phosphorylation des protéines p42/p44. Cela pourrait être fait en utilisant des inhibiteurs chimiques de la voie Erk 1/2 tels que PD98029.

L'effet de la leptine sur l'expression de TGF- β 1

Dans la section précédente, il a été montré que la leptine stimule la sclérose de l'os sous-chondral OA via une augmentation de la prolifération et de la différenciation des Ob OA. Le facteur TGF- β 1 stimule également la formation osseuse, la formation d'ostéophytes dans des modèles animaux OA (Van Beuningen H.M. et al, 2000; Bakker A.C. et al, 2001), et la différenciation des Ob en stimulant le facteur de transcription Runx2 (Alliston T. et al, 2001). De plus, Dumond H. et al ont montré que les injections intraarticulaires de leptine stimulent l'expression de TGF- β 1 dans cartilage de rat. Ainsi, dans cette section nous allons évaluer la relation entre la leptine et le facteur TGF- β 1 dans l'os sous-chondral OA.

Dans un premier temps, nous avons montré que les Ob OA produisent 3 fois plus de TGF- β 1 que les Ob N avec une signifiante de $p < 0.05$, ce qui confirme les résultats obtenus auparavant dans notre laboratoire (Massicotte F. et al, 2002). Par la suite, notre étude a montré que la leptine exogène avait peu d'effet ou diminuait faiblement le niveau de TGF- β 1 relâché par les Ob OA tandis que l'inhibition de la signalétique de la leptine endogène en présence d'inhibiteurs chimique (AG-490 et Pce) baissait la sécrétion de TGF- β 1 des Ob OA à un seuil presque équivalent à celui des Ob N avec une signifiante de $p < 0.025$ et $p < 0.005$.

Une étude antérieure a montré que les effets du TGF- β 1 dans le cartilage de rat sont médiés par la leptine qui y stimule l'expression de ce facteur de croissance (Dumond H. et al, 2003), ce résultat a été infirmé mais cette fois-ci dans l'os sous-chondral par la présente étude qui montre que la leptine a diminué ou pas d'effet sur l'expression du TGF- β 1 de manière dose-dépendante (Figure S1). On remarque une augmentation suivie d'un plateau à 10 ng/ml de leptine avant de diminuer en cas de stimulation avec 0.1, 1 et 10 μ g/ml de leptine exogène. Ce profil permet d'expliquer la baisse de la production de TGF- β 1 que l'on observe lors de la stimulation avec 1 μ g/ml de leptine exogène des Ob OA (voir figure 7), et prouve aussi que la leptine endogène stimule de manière transitoire la sécrétion du TGF- β 1 les Ob OA à son niveau maximal. En conclusion, la leptine exerce une stimulation biphasique et dose-dépendante sur l'expression et la production du facteur de croissance TGF- β 1.

En induisant l'expression du TGF- β 1, la leptine contribue indirectement à la formation d'ostéophytes en plus du rôle plus direct de TGF- β sur l'ossification endochondrale (Kume K. et al, 2002). Par ailleurs, la leptine semble encore une fois participer de manière directe et indirecte au « cross-talk » qui se fait au niveau de la zone de démarcation entre l'os sous-chondral OA et la zone calcifiée du cartilage articulaire. En effet, la leptine augmente les niveaux de TGF- β 1 des Ob OA et donc ce facteur de croissance peut se rendre dans les zones intermédiaires et profondes du tissu cartilagineux via les microfractures pour y induire la dégradation de ce tissu par l'induction des MMPs

(Moldovan F. et al, 1997; Burr et al, Lajeunesse et al, Lajeunesse et Reboul, Martel-pelletier J. et al).

Ceci suggère fortement que les hauts niveaux de leptine des Ob OA pourraient atteindre les chondrocytes via les microfractures pour aller y stimuler sa propre expression, comme il a été démontré que les chondrocytes de la plaque de croissance de jeunes animaux expriment la leptine et même si à ce jour aucune étude n'a encore fait une telle démonstration dans le cartilage humain (Maor G. et al, 1997). Une fois le tissu cartilagineux atteint, la leptine provenant des Ob OA collaborerait avec la leptine produite par des chondrocytes afin de stimuler l'expression de TGF- β 1 au niveau du cartilage articulaire tel que démontré dans des rats (Dumond H. et al, 2003).

La signalisation de la leptine dans les Ob OA sous-chondraux

Dans les sections précédentes, nous avons montré une augmentation de la synthèse de la leptine dans les Ob OA, et que cette adipokine joue un rôle important dans le phénotype anormal des Ob de l'os sous-chondral OA en stimulant l'activité de la phosphatase alcaline ainsi que la sécrétion d'ostéocalcine de ces cellules. La leptine semble également médier la sclérose de l'os sous-chondral OA en induisant la prolifération des Ob OA de manière dose-dépendante. Cette hormone module également l'expression de certains facteurs de croissance clés du métabolisme osseux tel que le TGF- β 1. L'ensemble de ces données suggèrent que la signalisation de la leptine dans l'os sous-chondral des patients OA pourrait être anormalement élevée en réponse aux niveaux élevés de leptine présents, sujet qui sera discuté dans cette section.

La leptine transmet son signal via la voie de signalisation JAK/Stat qui mène à l'activation de plusieurs gènes essentiels (Zhang et al, 1995). Durant cette étude, nous avons évalué les effets de la leptine sur la phosphorylation des protéines clés dans la voie de signalisation JAK/Stat. La phosphorylation de JAK 2 et Stat 3 furent évaluées par immunobuvardage de type western. Les résultats obtenus ont montré une activation de JAK 2 et de Stat 3 par la leptine de manière dose-dépendante (figure S2 et S3) dans les Ob OA. La phosphorylation de ces deux protéines était plus importante à des doses de 1 μ g/ml et

10µg/ml de leptine exogène ajoutées. Toutefois, dans le cas de Jak2, nos résultats restent à confirmer car n=2.

Sachant que la synthèse de la leptine est augmentée dans les Ob OA tel qu'il a été montré précédemment, nous pouvons suggérer que la phosphorylation des protéines JAK 2 et Stat3 est stimulée dans l'os sous-chondral OA. La leptine signale principalement via la voie de signalisation JAK/Stat, donc plus il y a de leptine et plus le signal transmis sera augmenté, ce qui est reflété par l'activation de JAK2 suivi par l'activation de Stat3 par phosphorylation. La protéine Stat 3 va ensuite être transloquée au noyau pour aller y induire plusieurs gènes. L'étude récente de Tomohiro H. et al (2008) a montré que l'inhibition de Stat 3 dans les souris entraîne une diminution de l'expression des facteurs RANKL dans les ostéoblastes et donc l'inhibition de l'ostéoclastogénèse qui est gp-130 dépendante. Les données de cette étude suggèrent donc qu'en activant les protéines Stat3 de manière dose-dépendante, la leptine s'implique indirectement dans la résorption osseuse en induisant l'expression de RANKL.

Cette prémisse est pertinente mais dépendamment si nos malades OA se trouvaient dans la phase précoce ou tardive de la maladie. En effet, il faut rappeler que des études réalisées dans des modèles de chiens ont identifié deux phases de la maladie OA soit la phase précoce qui est un peu plus résorptive, tandis que la phase tardive est sclérotique (Pastoureau P.C et al, 1999, Pelletier J.P. et al, 2004). Cette distinction reste déterminante dans le cas présent car les Ob OA en phase sclérotique ont une matrice hypominéralisée et donc malgré que la dose-réponse de la leptine y induise l'expression de RANKL via la phosphorylation de Stat 3, la résorption osseuse y serait moindre (Tomohiro H, 2008). Bailey et al ont montré que la matrice des Ob OA était hypominéralisée car elle est composée d'homotrimères de fibres de collagène. Aussi, la maturité ainsi que la qualité de cette matrice osseuse sont déterminantes au moment de l'ancrage des ostéoclastes sur celle-ci durant la résorption osseuse (Lakkakorpi P.T. et al, 1991, Couret I. 2004). Dans notre étude, la détermination du phénotype a confirmé que nos cellules étaient essentiellement des ostéoblastes. Ainsi, on peut conclure que malgré la stimulation de l'expression de RANKL via la phosphorylation de Stat 3, la leptine favoriserait la sclérose osseuse.

Ces résultats suggèrent donc que la synthèse augmentée de la leptine dans les Ob OA entraîne un déséquilibre du couplage entre formation et résorption osseux dans Ob OA. Ce déséquilibre est en faveur de la formation osseuse donc de la sclérose de l'os sous-chondral OA. Dans les sections précédentes, ceci a été infirmé par la stimulation de la prolifération des Ob OA en corrélation avec la phosphorylation des protéines p42/p44 MAPK de manière dose-dépendante par les hauts niveaux de leptine dans les Ob OA.

E. Conclusion et perspectives

Le vieillissement d'une grande partie de la population implique une recrudescence de plusieurs maladies chroniques et handicapantes comme l'ostéoarthrose. L'impact de ce phénomène sanitaire sur le plan économique et sociétal devient inquiétant et grandissant. Ainsi, une meilleure compréhension de l'OA constitue une urgence dans l'ultime but de générer des thérapies plus efficaces ou encore de l'éradiquer.

La présente étude a soutenu le rôle important joué par l'os sous-chondral dans l'apparition et/ou la progression de l'OA. De plus, elle est la première étude à confirmer que la leptine fait le pont entre l'OA et l'obésité par culture primaire des Ob OA humains.

En effet, on a démontré que les changements phénotypiques des Ob OA sont entraînés par une hausse d'expression de la leptine. Ainsi, la leptine stimule la différenciation en augmentant l'activité de la phosphatase alcaline et a une rétroaction sur sa propre expression. Cette hormone entraîne également un débalancement du remodelage osseux des Ob OA en stimulant la sécrétion d'ostéocalcine. De plus, ce déséquilibre est accentué par une stimulation de la prolifération des Ob OA en corrélant avec l'activation de la voie p42/p44 MAPK et un effet biphasique sur l'expression du facteur de croissance TGF- β 1 qui est dose-dépendante. Pour terminer, nous avons montré que ces différents effets de la leptine dans les Ob OA sont dûs à une signalisation augmentée de la leptine de façon dose-dépendante.

Les résultats de cette étude suggèrent que les Ob OA synthétisent plus de leptine que les Ob N, cette hormone va ensuite affecter les paramètres phénotypiques de ces cellules ainsi que la sécrétion de facteurs de croissance. Tout ceci en favorisant la sclérose osseuse et en participant au « cross-talk » entre ce tissu et le cartilage articulaire. Ainsi, le cartilage articulaire serait soumis à une exposition importante de leptine provenant de deux sources principales : 1) la membrane synoviale et 2) l'os sous-chondral OA. Ces hauts niveaux de leptine participeraient ainsi à la dégénérescence du cartilage articulaire des patients OA et ce phénomène serait accéléré chez les sujets obèses.

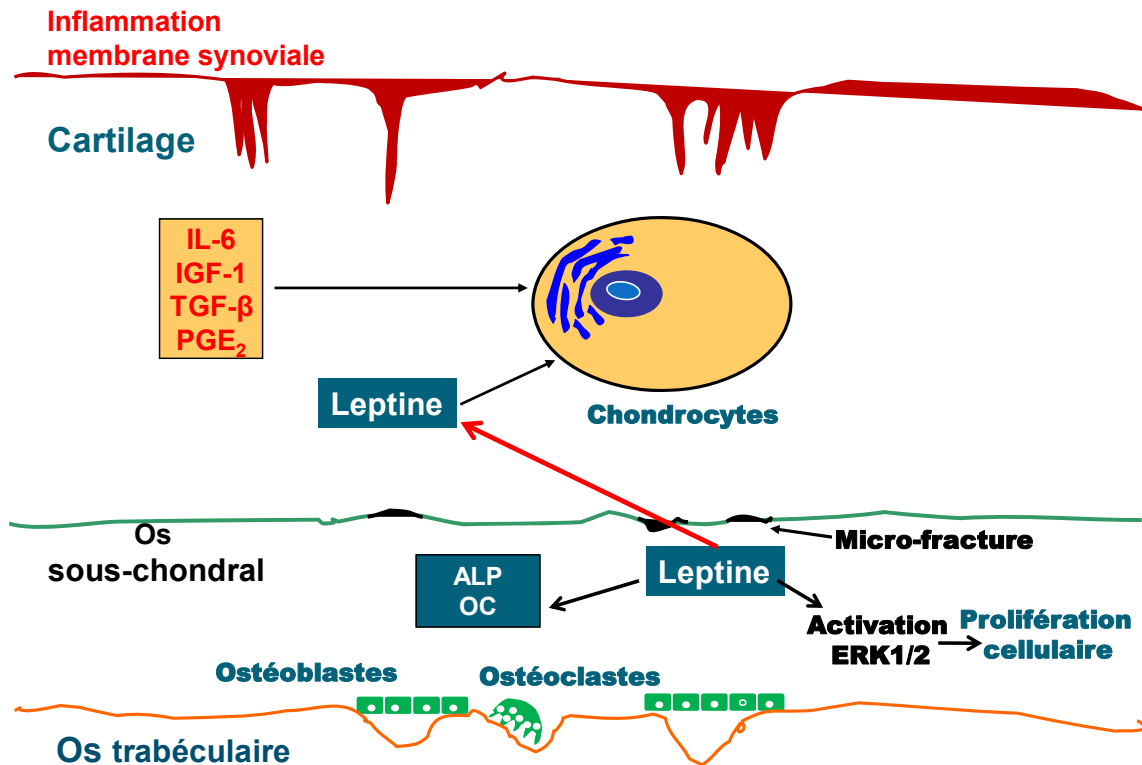


Figure 10: Le modèle proposé. Les résultats présentés, suggèrent que la leptine module les paramètres phénotypiques des ostéoblastes de l'os sous-chondral de patients OA en augmentant l'activité de la phosphatase alcaline ainsi que la sécrétion d'ostéocalcine. Les hauts niveaux de leptine stimulent la prolifération des Ob et ce résultat corrèle avec l'activation des protéines p44 et p42. La présence de leptine au niveau du cartilage articulaire des sujets OA alors que les chondrocytes n'en expriment pas, serait expliqué par le transfert de cette molécules en provenance des Ob de l'os sous-chondral OA au tissu cartilagineux via les microcraques. Une fois, au niveau du cartilage, la leptine va moduler plusieurs facteurs tout en contribuant à la dégradation de ce tissu.

Les perspectives futures

Une étude récente de Choi S.C. (2008) a montré que les facteurs de croissance FGF-2 et -4 modulent la prolifération des cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse en activant la voie de signalisation p44/p42 MAPK. On pourrait donc étudier une possible relation entre la leptine et ces facteurs FGF-2 et FGF-4 et ce dans le but de soutenir l'effet de causalité entre les hauts niveaux de leptine et l'induction de la prolifération des ostéoblastes OA. Parallèlement, il serait nécessaire de faire des expériences d'inhibition de la voie p44/p42 par un inhibiteur chimique tel que PD98089 pour vérifier si les grandes concentrations de leptine conservent leurs effets prolifératifs dans ces conditions. Quant à la signalisation de la leptine dans les Ob OA, nous pourrions inhiber la liaison de Stat 3 sur l'ADN en utilisant l'inhibiteur PIAS3 tel que suggéré dans l'étude d'Hinaka T. et al (2008), afin de visualiser l'effet de cette inhibition sur l'expression des gènes comme ALP, OC, TGF- β 1 et IGF-1. Sachant que le facteur de transcription Stat3 participe à la résorption osseuse en activant l'expression de RANKL et donc c-Fos (Choi S.C. 2008), on pourrait vérifier par des expériences de co-culture entre ostéoblastes et ostéoclastes l'effet de la leptine produite par les blastes sur la fonction des ostéoclastes. De plus, par ce même type d'expérience, on pourrait vérifier si la leptine des Ob ne participe pas directement ou indirectement à l'ostéoclastogénèse via par exemple, la stimulation de RANKL ou OSCAR.

Cette étude a de nouveau confirmé le rôle important de la leptine produite localement au niveau de l'os sous-chondral dans la pathophysiologie de l'OA. Il reste encore quelques questions quant à la fonction de cette adipokine et à première vue, on pourrait suggérer des inhibiteurs de la leptine comme traitement potentiel de l'OA. Cependant, les études dans des souris OB/OB ont montré une plus grande sévérité de l'obésité dans ces souris et de plus, la leptine systémique n'a pas les mêmes effets que la leptine produite localement au niveau de l'articulation. Ainsi, pour qu'un tel traitement soit efficace, il faudrait élaborer une stratégie pour pouvoir contrôler ces effets problématiques. Toutefois, des traitements ne ciblant pas la leptine directement mais plutôt les protéines clés de sa voie de signalisation telle que STAT3 serait un meilleur choix s'il n'entraîne pas d'effet secondaire sur l'ostéoclastogénèse.

F. Références

Alliston T, Choy L, Ducy P, Karsenty G and Derynck R. TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfal and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J* 20: 2254-2272, 2001.

Altman RD, Bloch DA, Dougados M, Hochberg M, Lohmander S, Pavelka K, Spector T and Vignon E. Measurement of structural progression in osteoarthritis of the hip: the Barcelona consensus group. *Osteoarthritis Cartilage* 12: 515-524, 2004.

Aubin JE, Liu F, Malaval L and Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 17: 77S-83S, 1995.

Bailey AJ, Mansell JP, Sims TJ and Banse X. Biochemical and mechanical properties of subchondral bone in osteoarthritis. *Biorheology* 41: 349-358, 2004.

Bailey AJ, Sims TJ and Knott L. Phenotypic expression of osteoblast collagen in osteoarthritic bone: production of type I homotrimer. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 176-182, 2002.

Bakker AD, Soejima K, Klein-Nulend J and Burger EH. The production of nitric oxide and prostaglandin E(2) by primary bone cells is shear stress dependent. *J Biomech* 34: 671-677, 2001.

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

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

Beresford JN, Gallagher JA, Poser JW and Russell RG. Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of 1,25(OH)2D3, 24,25(OH)2D3, parathyroid hormone, and glucocorticoids. *Metab Bone Dis Relat Res* 5: 229-234, 1984.

Bernotiene E, Palmer G and Gabay C. The role of leptin in innate and adaptive immune responses. *Arthritis Res Ther* 8: 217, 2006.

Bichell DP, Rotwein P and McCarthy TL. Prostaglandin E2 rapidly stimulates insulin-like growth factor-I gene expression in primary rat osteoblast cultures: evidence for transcriptional control. *Endocrinology* 133: 1020-1028, 1993.

Bikle DD, Sakata T, Leary C, Elalieh H, Ginzinger D, Rosen CJ, Beamer W, Majumdar S and Halloran BP. Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone. *J Bone Miner Res* 17: 1570-1578, 2002.

Billingham RC, Wu W, Ionescu M, Reiner A, Dahlberg L, Chen J, van Wart H and Poole AR. Comparison of the degradation of type II collagen and proteoglycan in nasal and articular cartilages induced by interleukin-1 and the selective inhibition of type II collagen cleavage by collagenase. *Arthritis Rheum* 43: 664-672, 2000.

Birk DE and Mayne R. Localization of collagen types I, III and V during tendon development. Changes in collagen types I and III are correlated with changes in fibril diameter. *Eur J Cell Biol* 72: 352-361, 1997.

Birk DE and Mayne R. Localization of collagen types I, III and V during tendon development. Changes in collagen types I and III are correlated with changes in fibril diameter. *Eur J Cell Biol* 72: 352-361, 1997.

Bjorbaek C, Buchholz RM, Davis SM, Bates SH, Pierroz DD, Gu H, Neel BG, Myers MG, Jr. and Flier JS. Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. *J Biol Chem* 276: 4747-4755, 2001.

Bjorbaek C and Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 59: 305-331, 2004.

Blanquaert F, Pereira RC and Canalis E. Cortisol inhibits hepatocyte growth factor/scatter factor expression and induces c-met transcripts in osteoblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E509-E515, 2000.

Blundell TL and Humbel RE. Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature* 287: 781-787, 1980.

Boivin G, Mesguich P, Pike JW, Bouillon R, Meunier PJ, Haussler MR, Dubois PM and Morel G. Ultrastructural immunocytochemical localization of endogenous 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and its receptors in osteoblasts and osteocytes from neonatal mouse and rat calvaria. *Bone Miner* 3: 125-136, 1987.

Bonassar LJ, Sandy JD, Lark MW, Plaas AH, Frank EH and Grodzinsky AJ. Inhibition of cartilage degradation and changes in physical properties induced by IL-1 β and retinoic acid using matrix metalloproteinase inhibitors. *Arch Biochem Biophys* 344: 404-412, 1997.

Bonnet CS and Walsh DA. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)* 44: 7-16, 2005.

Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, Kurdyla JT, McNulty DE, Drake FH, Gowen M and Levy MA. Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem* 271: 12517-12524, 1996.

Boyd SK, Matyas JR, Wohl GR, Kantzas A and Zernicke RF. Early regional adaptation of periarticular bone mineral density after anterior cruciate ligament injury. *J Appl Physiol* 89: 2359-2364, 2000.

Boyd SK, Muller R, Matyas JR, Wohl GR and Zernicke RF. Early morphometric and anisotropic change in periarticular cancellous bone in a model of experimental knee osteoarthritis quantified using microcomputed tomography. *Clin Biomech (Bristol , Avon)* 15: 624-631, 2000.

Boyd SK, Muller R and Zernicke RF. Mechanical and architectural bone adaptation in early stage experimental osteoarthritis. *J Bone Miner Res* 17: 687-694, 2002.

Brandt KD. Studies in animal models of osteoarthritis as predictors of a structure-modifying effect of diacerhein in humans with osteoarthritis. *Biorheology* 43: 589-594, 2006.

Brandt KD, Myers SL, Burr D and Albrecht M. Osteoarthritic changes in canine articular cartilage, subchondral bone, and synovium fifty-four months after transection of the anterior cruciate ligament. *Arthritis Rheum* 34: 1560-1570, 1991.

Brandt KD, Radin EL, Dieppe PA and van de PL. Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann Rheum Dis* 65: 1261-1264, 2006.

Brissenden JE, Ullrich A and Francke U. Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. *Nature* 310: 781-784, 1984.

Brown AN, McKinley TO and Bay BK. Trabecular bone strain changes associated with subchondral bone defects of the tibial plateau. *J Orthop Trauma* 16: 638-643, 2002.

Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD and Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* 21: 225-235, 1997.

Buckwalter JA and Lane NE. Does participation in sports cause osteoarthritis? *Iowa Orthop J* 17: 80-89, 1997.

Bukulmez H, Matthews AL, Sullivan CM, Chen C, Kraay MJ, Elston RC, Moskowitz RW, Goldberg VM and Warman ML. Hip joint replacement surgery for idiopathic osteoarthritis aggregates in families. *Arthritis Res Ther* 8: R25, 2006.

Burger EH, Van der Meer JW, van de Gevel JS, Gribnau JC, Thesingh GW and van Furth R. In vitro formation of osteoclasts from long-term cultures of bone marrow mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 156: 1604-1614, 1982.

Burgeson RE and Nimni ME. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clin Orthop Relat Res* 250-272, 1992.

Burguera B, Hofbauer LC, Thomas T, Gori F, Evans GL, Khosla S, Riggs BL and Turner RT. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology* 142: 3546-3553, 2001.

Burr DB. The importance of subchondral bone in osteoarthrosis. *Curr Opin Rheumatol* 10: 256-262, 1998.

Burr DB, Miller L, Grynblas M, Li J, Boyde A, Mashiba T, Hirano T and Johnston CC. Tissue mineralization is increased following 1-year treatment with high doses of bisphosphonates in dogs. *Bone* 33: 960-969, 2003.

Burr DB and Radin EL. Microfractures and microcracks in subchondral bone: are they relevant to osteoarthrosis? *Rheum Dis Clin North Am* 29: 675-685, 2003.

Burr DB and Schaffler MB. The involvement of subchondral mineralized tissues in osteoarthrosis: quantitative microscopic evidence. *Microsc Res Tech* 37: 343-357, 1997.

Cahue S, Sharma L, Dunlop D, Ionescu M, Song J, Lobanok T, King L and Poole AR. The ratio of type II collagen breakdown to synthesis and its relationship with the progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 15: 819-823, 2007.

Camarda AJ, Butler WT, Finkelman RD and Nanci A. Immunocytochemical localization of gamma-carboxyglutamic acid-containing proteins (osteocalcin) in rat bone and dentin. *Calcif Tissue Int* 40: 349-355, 1987.

Canalis E, Centrella M and McCarthy TL. Regulation of insulin-like growth factor-II production in bone cultures. *Endocrinology* 129: 2457-2462, 1991.

Canalis E and Gabbitas B. Skeletal growth factors regulate the synthesis of insulin-like growth factor binding protein-5 in bone cell cultures. *J Biol Chem* 270: 10771-10776, 1995.

Canalis E, McCarthy TL and Centrella M. Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. *Annu Rev Med* 42: 17-24, 1991.

Cantor JP, Iliopoulos D, Rao AS, Druck T, Semba S, Han SY, McCorkell KA, Lakshman TV, Collins JE, Wachsberger P, Friedberg JS and Huebner K. Epigenetic modulation of endogenous tumor suppressor expression in lung cancer xenografts suppresses tumorigenicity. *Int J Cancer* 120: 24-31, 2007.

Carman WJ, Sowers M, Hawthorne VM and Weissfeld LA. Obesity as a risk factor for osteoarthritis of the hand and wrist: a prospective study. *Am J Epidemiol* 139: 119-129, 1994.

Castoldi M, Pistone M, Caruso C, Puddu A, Filanti C, Piccini D, Tacchetti C and Manduca P. Osteoblastic cells from rat long bone. II: Adhesion to substrata and integrin expression in primary and propagated cultures. *Cell Biol Int* 21: 7-16, 1997.

Celil AB and Campbell PG. BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate Osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways. *J Biol Chem* 280: 31353-31359, 2005.

Celil AB, Hollinger JO and Campbell PG. Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. *J Cell Biochem* 95: 518-528, 2005.

Chandrasekhar S and Harvey AK. Transforming growth factor-beta is a potent inhibitor of IL-1 induced protease activity and cartilage proteoglycan degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 1352-1359, 1988.

Chen XB, Xue ZX, Yang YW and Zhou SX. [A histologic observation of bone formation induced by subperiosteal implantation of resorbable porous block beta-tricalcium phosphate on calvarial surface in rabbits]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 11: 40-42, 2002.

Chen XW and Cai JT. [The impact of selective cyclooxygenase-2 inhibitor celexibo on the formation of cholesterol gallstone]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 42: 797-799, 2003.

Chen XW, Garner SC and Anderson JJ. Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen-receptor-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 295: 417-422, 2002.

Choi SC, Kim SJ, Choi JH, Park CY, Shim WJ and Lim DS. Fibroblast growth factor-2 and -4 promote the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells by the activation of the PI3K-Akt and ERK1/2 signaling pathways. *Stem Cells Dev* 17: 725-736, 2008.

Christakos S and Prince R. Estrogen, vitamin D, and calcium transport. *J Bone Miner Res* 18: 1737-1739, 2003.

Cirmanova V, Bayer M, Starka L and Zajickova K. The effect of leptin on bone: an evolving concept of action. *Physiol Res* 57 Suppl 1: S143-S151, 2008.

Clark JM and Huber JD. The structure of the human subchondral plate. *J Bone Joint Surg Br* 72: 866-873, 1990.

Clement K et Karsenty G. Contrôle neural du remodelage osseux : le rôle crucial de la leptine, *Med Sci*, 2005; 21 : 681- 683.

Cohen-Solal M and de Vernejoul MC. [Genetics of osteoporosis]. *Rev Med Interne* 25 Suppl 5: S526-S530, 2004.

Conover CA and Khosla S. Role of extracellular matrix in insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 regulation of IGF-II action in normal human osteoblasts. *Growth Horm IGF Res* 13: 328-335, 2003.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL and . Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334: 292-295, 1996.

Cooper C, Campbell L, Byng P, Croft P and Coggon D. Occupational activity and the risk of hip osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 55: 680-682, 1996.

Cremer M.A, Rosloniec E.F, Kang A.H. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J. Mol. Med.* 76:275-288, 1996.

Couret I. Les marqueurs biologiques de l'os et du cartilage, *Méd Nuc - Image fonct et métab*, 2003 ; 27(11) :614-619.

Cowles EA, DeRome ME, Pastizzo G, Brailey LL and Gronowicz GA. Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development. *Calcif Tissue Int* 62: 74-82, 1998.

Davidson NE, Prestigiacomo LJ and Hahm HA. Induction of jun gene family members by transforming growth factor alpha but not 17 beta-estradiol in human breast cancer cells. *Cancer Res* 53: 291-297, 1993.

Davis MA, Ettinger WH, Neuhaus JM, Cho SA and Hauck WW. The association of knee injury and obesity with unilateral and bilateral osteoarthritis of the knee. *Am J Epidemiol* 130: 278-288, 1989.

Day TF, Guo X, Garrett-Beal L and Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 8: 739-750, 2005.

Day TF, Guo X, Garrett-Beal L and Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 8: 739-750, 2005.

de Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 1-11, 2004.

de Vernejoul MC, Cohen-Solal M and Orcel P. Bone cytokines. *Curr Opin Rheumatol* 5: 332-338, 1993.

Dedrick DK, Goldstein SA, Brandt KD, O'Connor BL, Goulet RW and Albrecht M. A longitudinal study of subchondral plate and trabecular bone in cruciate-deficient dogs with osteoarthritis followed up for 54 months. *Arthritis Rheum* 36: 1460-1467, 1993.

Deftos LJ, Wolfert RL, Hill CS and Burton DW. Two-site assays of bone gla protein (osteocalcin) demonstrate immunochemical heterogeneity of the intact molecule. *Clin Chem* 38: 2318-2321, 1992.

DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 80: 1689S-1696S, 2004.

Derynck R and Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425: 577-584, 2003.

Devos R, Guisez Y, Van der HJ, White DW, Kalai M, Fountoulakis M and Plaetinck G. Ligand-independent dimerization of the extracellular domain of the leptin receptor and determination of the stoichiometry of leptin binding. *J Biol Chem* 272: 18304-18310, 1997.

Dhesi JK, Bearne LM, Moniz C, Hurley MV, Jackson SH, Swift CG and Allain TJ. Neuromuscular and psychomotor function in elderly subjects who fall and the relationship with vitamin D status. *J Bone Miner Res* 17: 891-897, 2002.

Dieppe P. Subchondral bone should be the main target for the treatment of pain and disease progression in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7: 325-326, 1999.

Dieppe P, Cushnaghan J, Young P and Kirwan J. Prediction of the progression of joint space narrowing in osteoarthritis of the knee by bone scintigraphy. *Ann Rheum Dis* 52: 557-563, 1993.

Dietrich JW, Canalis EM, Maina DM and Raisz LG. Hormonal control of bone collagen synthesis in vitro: effects of parathyroid hormone and calcitonin. *Endocrinology* 98: 943-949, 1976.

Drew JS, White MP and Stein LA. Smooth muscle myosin subfragment-1 is a kinetic analogue for heavy meromyosin in the extended conformation. *Cell Motil Cytoskeleton* 26: 291-300, 1993.

Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM and Karsenty G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100: 197-207, 2000.

Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A and Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382: 448-452, 1996.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL and Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89: 747-754, 1997.

Dumond H, Presle N, Terlain B, Mainard D, Loeuille D, Netter P and Pottie P. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48: 3118-3129, 2003.

Dyrstad SM, Soltvedt R and Hallen J. Physical fitness and physical training during Norwegian military service. *Mil Med* 171: 736-741, 2006.

Elefteriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clement K, Vaisse C and Karsenty G. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 434: 514-520, 2005.

Engsig MT, Chen QJ, Vu TH, Pedersen AC, Therkidsen B, Lund LR, Henriksen K, Lenhard T, Foged NT, Werb Z and Delaisse JM. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol* 151: 879-889, 2000.

Epstein S, Poser J, McClintock R, Johnston CC, Jr., Bryce G and Hui S. Differences in serum bone GLA protein with age and sex. *Lancet* 1: 307-310, 1984.

Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE and Derynck R. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 80: 371-378, 1995.

Fallon MD, Teitelbaum SL, Weinstein RS, Goldfischer S, Brown DM and Whyte MP. Hypophosphatasia: clinicopathologic comparison of the infantile, childhood, and adult forms. *Medicine (Baltimore)* 63: 12-24, 1984.

Felson DT. Preventing knee and hip osteoarthritis. *Bull Rheum Dis* 47: 1-4, 1998.

Felson DT. The sources of pain in knee osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 17: 624-628, 2005.

Felson DT and Chaisson CE. Understanding the relationship between body weight and osteoarthritis. *Baillieres Clin Rheumatol* 11: 671-681, 1997.

Felson DT, Chaisson CE, Hill CL, Totterman SM, Gale ME, Skinner KM, Kazis L and Gale DR. The association of bone marrow lesions with pain in knee osteoarthritis. *Ann Intern Med* 134: 541-549, 2001.

Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, Kington RS, Lane NE, Nevitt MC, Zhang Y, Sowers M, McAlindon T, Spector TD, Poole AR, Yanovski SZ, Ateshian G, Sharma L, Buckwalter JA, Brandt KD and Fries JF. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med* 133: 635-646, 2000.

Felson DT, Lawrence RC, Hochberg MC, McAlindon T, Dieppe PA, Minor MA, Blair SN, Berman BM, Fries JF, Weinberger M, Lorig KR, Jacobs JJ and Goldberg V. Osteoarthritis: new insights. Part 2: treatment approaches. *Ann Intern Med* 133: 726-737, 2000.

Felson DT and Nevitt MC. The effects of estrogen on osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 10: 269-272, 1998.

Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Naimark A, Weissman BN, Aliabadi P and Levy D. The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 38: 1500-1505, 1995.

Ferguson VL, Ayers RA, Bateman TA and Simske SJ. Bone development and age-related bone loss in male C57BL/6J mice. *Bone* 33: 387-398, 2003.

Fernihough JK, Billingham ME, Cwyfan-Hughes S and Holly JM. Local disruption of the insulin-like growth factor system in the arthritic joint. *Arthritis Rheum* 39: 1556-1565, 1996.

Figenschau Y, Knutsen G, Shahazeydi S, Johansen O and Sveinbjornsson B. Human articular chondrocytes express functional leptin receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 190-197, 2001.

Friedman JM. Obesity. Brown fat and yellow mice. *Nature* 366: 720-721, 1993.

Fruhbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 393: 7-20, 2006.

Fruhbeck G, Jebb SA and Prentice AM. Leptin: physiology and pathophysiology. *Clin Physiol* 18: 399-419, 1998.

Fu L, Patel MS, Bradley A, Wagner EF and Karsenty G. The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation. *Cell* 122: 803-815, 2005.

Gabay O, Hall JD, Berenbaum F, Henrotin Y, Sacher C. Osteoarthritis and obesity: Experimental models. *Joint Bone Spine* 75: 675-679, 2008.

Garrett IR, Chen D, Gutierrez G, Zhao M, Escobedo A, Rossini G, Harris SE, Gallwitz W, Kim KB, Hu S, Crews CM and Mundy GR. Selective inhibitors of the osteoblast proteasome stimulate bone formation in vivo and in vitro. *J Clin Invest* 111: 1771-1782, 2003.

Gazit D, Ebner R, Kahn AJ and Derynck R. Modulation of expression and cell surface binding of members of the transforming growth factor-beta superfamily during retinoic acid-induced osteoblastic differentiation of multipotential mesenchymal cells. *Mol Endocrinol* 7: 189-198, 1993.

Gevers G and Dequeker J. Collagen and non-collagenous protein content (osteocalcin, sialoprotein, proteoglycan) in the iliac crest bone and serum osteocalcin in women with and without hand osteoarthritis. *Coll Relat Res* 7: 435-442, 1987.

Ghilardi N and Skoda RC. The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Mol Endocrinol* 11: 393-399, 1997.

Goldring MB. The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Connect Tissue Res* 40: 1-11, 1999.

Goldring MB. Anticytokine therapy for osteoarthritis. *Expert Opin Biol Ther* 1: 817-829, 2001.

Goldring SR and Goldring MB. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* S27-S36, 2004.

Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U and Reseland JE. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J Cell Biochem* 85: 825-836, 2002.

Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S and Riggs BL. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* 141: 4768-4776, 2000.

Goto T, Maeda H and Tanaka T. A selective inhibitor of matrix metalloproteinases inhibits the migration of isolated osteoclasts by increasing the life span of podosomes. *J Bone Miner Metab* 20: 98-105, 2002.

Govinden R and Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther* 98: 257-265, 2003.

Grampp S, Henk CB and Imhof H. CT and MR assessment of osteoporosis. *Semin Ultrasound CT MR* 20: 2-9, 1999.

Grampp S, Henk CB and Imhof H. [Bone densitometry: comparative value and limitations of different techniques]. *Wien Med Wochenschr* 149: 472-478, 1999.

Grano M, Galimi F, Zambonin G, Colucci S, Cottone E, Zallone AZ and Comoglio PM. Hepatocyte growth factor is a coupling factor for osteoclasts and osteoblasts in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7644-7648, 1996.

Grant SF, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I and Ralston SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat Genet* 14: 203-205, 1996.

Greene WB and Kahler SG. Hypophosphatemic rickets: still misdiagnosed and inadequately treated. *South Med J* 78: 1179-1184, 1985.

Grinspoon S, Thomas L, Miller K, Herzog D and Klibanski A. Effects of recombinant human IGF-I and oral contraceptive administration on bone density in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2883-2891, 2002.

Guevremont M, Martel-Pelletier J, Massicotte F, Tardif G, Pelletier JP, Ranger P, Lajeunesse D and Reboul P. Human adult chondrocytes express hepatocyte growth factor (HGF) isoforms but not HGF: potential implication of osteoblasts on the presence of HGF in cartilage. *J Bone Miner Res* 18: 1073-1081, 2003.

Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, Kraus VB, Olson SA, Pisetsky DS, Setton LA and Weinberg JB. The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. *Clin Orthop Relat Res* 17-26, 2004.

Gundberg CM, Anderson M, Dickson I and Gallop PM. "Glycated" osteocalcin in human and bovine bone. The effect of age. *J Biol Chem* 261: 14557-14561, 1986.

Gundberg CM, Wilson PS, Gallop PM and Parfitt AM. Determination of osteocalcin in human serum: results with two kits compared with those by a well-characterized assay. *Clin Chem* 31: 1720-1723, 1985.

Hamrick MW. Leptin, bone mass, and the thrifty phenotype. *J Bone Miner Res* 19: 1607-1611, 2004.

Hamrick MW, Della-Fera MA, Choi YH, Pennington C, Hartzell D and Baile CA. Leptin treatment induces loss of bone marrow adipocytes and increases bone formation in leptin-deficient ob/ob mice. *J Bone Miner Res* 20: 994-1001, 2005.

Hanada R, Teranishi H, Pearson JT, Kurokawa M, Hosoda H, Fukushima N, Fukue Y, Serino R, Fujihara H, Ueta Y, Ikawa M, Okabe M, Murakami N, Shirai M, Yoshimatsu H, Kangawa K and Kojima M. Neuromedin U has a novel anorexigenic effect independent of the leptin signaling pathway. *Nat Med* 10: 1067-1073, 2004.

Hartman C, Hino B, Lerner A, Eshach-Adiv O, Berkowitz D, Shaoul R, Pacht A, Rozenthal E, Tamir A, Shamaly H and Shamir R. Bone quantitative ultrasound and bone mineral density in children with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 39: 504-510, 2004.

Hauschka PV and Carr SA. Calcium-dependent alpha-helical structure in osteocalcin. *Biochemistry* 21: 2538-2547, 1982.

Hauschka PV, Frenkel J, DeMuth R and Gundberg CM. Presence of osteocalcin and related higher molecular weight 4-carboxyglutamic acid-containing proteins in developing bone. *J Biol Chem* 258: 176-182, 1983.

Hauschka PV and Reid ML. Vitamin D dependence of a calcium-binding protein containing gamma-carboxyglutamic acid in chicken bone. *J Biol Chem* 253: 9063-9068, 1978.

Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE and Jurutka PW. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 13: 325-349, 1998.

Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, McLane J, Bone A, Destefano J, Rodan GA and Duong IT. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum* 50: 1193-1206, 2004.

Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, Wesolowski GA, Rodan GA and Duong IT. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone* 38: 234-243, 2006.

Heinegard D, Franzen A, Hedbom E and Sommarin Y. Common structures of the core proteins of interstitial proteoglycans. *Ciba Found Symp* 124: 69-88, 1986.

Henk CB, Brodner W, Grampp S, Breitenseher M, Thurnher M, Mostbeck GH and Imhof H. The postoperative spine. *Top Magn Reson Imaging* 10: 247-264, 1999.

Herneth AM, Breitenseher MJ, Funovics M, Nehrer S, Huber WD and Imhof H. Quiz case 12. Marie-Bamberger syndrome (MBS) (hypertrophic osteoarthropathy (HOA) secondary to ulcerative colitis (UC). *Eur J Radiol* 32: 124-128, 1999.

Hikata T, Takaishi H, Takito J, Hakozaiki A, Furukawa M, Uchikawa S, Kimura T, Okada Y, Matsumoto M, Yoshimura A, Nishimura R, Reddy SV, Asahara H and

Toyama Y. PIAS3 negatively regulates RANKL-mediated osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblasts. *Blood* 2008.

Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Duval N and Lajeunesse D. Abnormal regulation of urokinase plasminogen activator by insulin-like growth factor 1 in human osteoarthritic subchondral osteoblasts. *Arthritis Rheum* 42: 2112-2122, 1999.

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

Hilal G, Massicotte F, Martel-Pelletier J, Fernandes JC, Pelletier JP and Lajeunesse D. Endogenous prostaglandin E2 and insulin-like growth factor 1 can modulate the levels of parathyroid hormone receptor in human osteoarthritic osteoblasts. *J Bone Miner Res* 16: 713-721, 2001.

Hilal G, Massicotte F, Martel-Pelletier J, Fernandes JC, Pelletier JP and Lajeunesse D. Endogenous prostaglandin E2 and insulin-like growth factor 1 can modulate the levels of parathyroid hormone receptor in human osteoarthritic osteoblasts. *J Bone Miner Res* 16: 713-721, 2001.

Hill PA, Tumber A and Meikle MC. Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. *Endocrinology* 138: 3849-3858, 1997.

Hock JM, Centrella M and Canalis E. Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 122: 254-260, 1988.

Hock JM, Gera I, Fonseca J and Raisz LG. Human parathyroid hormone-(1-34) increases bone mass in ovariectomized and orchidectomized rats. *Endocrinology* 122: 2899-2904, 1988.

Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR and Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med* 2: 1132-1136, 1996.

Hunter DJ, Hart D, Snieder H, Bettica P, Swaminathan R and Spector TD. Evidence of altered bone turnover, vitamin D and calcium regulation with knee osteoarthritis in female twins. *Rheumatology (Oxford)* 42: 1311-1316, 2003.

Hunter DJ and Spector TD. The role of bone metabolism in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 5: 15-19, 2003.

Ihle JN. Cytokine receptor signalling. *Nature* 377: 591-594, 1995.

Imhof H, Breitenseher M, Kainberger F, Rand T and Trattnig S. Importance of subchondral bone to articular cartilage in health and disease. *Top Magn Reson Imaging* 10: 180-192, 1999.

Ivaska KK, Hentunen TA, Vaaraniemi J, Ylipahkala H, Pettersson K and Vaananen HK. Release of intact and fragmented osteocalcin molecules from bone matrix during bone resorption in vitro. *J Biol Chem* 279: 18361-18369, 2004.

Javelaud D and Mauviel A. [Transforming growth factor-betas: smad signaling and roles in physiopathology]. *Pathol Biol (Paris)* 52: 50-54, 2004.

Javelaud D and Mauviel A. Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. *Oncogene* 24: 5742-5750, 2005.

Jobling AI, Nguyen M, Gentle A and McBrien NA. Isoform-specific changes in scleral transforming growth factor-beta expression and the regulation of collagen synthesis during myopia progression. *J Biol Chem* 279: 18121-18126, 2004.

Johnson JA, Grande JP, Roche PC and Kumar R. Ontogeny of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in fetal rat bone. *J Bone Miner Res* 11: 56-61, 1996.

Kamiya M, Harada A, Mizuno M, Iwata H and Yamada Y. Association between a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene and genetic susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament in Japanese patients. *Spine* 26: 1264-1266, 2001.

Karsenty G. Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. *Cell Metab* 4: 341-348, 2006.

Kidd BL, Morris VH and Urban L. Pathophysiology of joint pain. *Ann Rheum Dis* 55: 276-283, 1996.

Kline AD, Becker GW, Churgay LM, Landen BE, Martin DK, Muth WL, Rathnachalam R, Richardson JM, Schoner B, Ulmer M and Hale JE. Leptin is a four-helix bundle: secondary structure by NMR. *FEBS Lett* 407: 239-242, 1997.

Klippel JH. Biologic therapy for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 343: 1640-1641, 2000.

Knott L and Bailey AJ. Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone* 22: 181-187, 1998.

Kobayashi S and Tamura N. [Reiter's syndrome]. *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu* 376-378, 1996.

Korner J, Savontaus E, Chua SC, Jr., Leibel RL and Wardlaw SL. Leptin regulation of Agrp and Npy mRNA in the rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 13: 959-966, 2001.

Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ and Hastrup S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393: 72-76, 1998.

Kruse K and Kracht U. Evaluation of serum osteocalcin as an index of altered bone metabolism. *Eur J Pediatr* 145: 27-33, 1986.

Kujala UM, Kettunen J, Paananen H, Aalto T, Battie MC, Impivaara O, Videman T and Sarna S. Knee osteoarthritis in former runners, soccer players, weight lifters, and shooters. *Arthritis Rheum* 38: 539-546, 1995.

Kume K, Satomura K, Nishisho S, Kitaoka E, Yamanouchi K, Tobiume S and Nagayama M. Potential role of leptin in endochondral ossification. *J Histochem Cytochem* 50: 159-169, 2002.

Lajeunesse D. Altered subchondral osteoblast cellular metabolism in osteoarthritis: cytokines, eicosanoids, and growth factors. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2: 504-506, 2002.

Lajeunesse D, Pelletier JP and Martel-Pelletier J. Osteoarthritis: a metabolic disease induced by local abnormal leptin activity? *Curr Rheumatol Rep* 7: 79-81, 2005.

Lajeunesse D and Reboul P. Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. *Curr Opin Rheumatol* 15: 628-633, 2003.

Lakkakorpi PT, Horton MA, Helfrich MH, Karhukorpi EK and Vaananen HK. Vitronectin receptor has a role in bone resorption but does not mediate tight sealing zone attachment of osteoclasts to the bone surface. *J Cell Biol* 115: 1179-1186, 1991.

Lakkakorpi PT and Vaananen HK. Kinetics of the osteoclast cytoskeleton during the resorption cycle in vitro. *J Bone Miner Res* 6: 817-826, 1991.

Laron Z. The essential role of IGF-I: lessons from the long-term study and treatment of children and adults with Laron syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4397-4404, 1999.

Lawrence DA. Latent-TGF-beta: an overview. *Mol Cell Biochem* 219: 163-170, 2001.

LAWRENCE JS. Rheumatism in cotton operatives. *Br J Ind Med* 18: 270-276, 1961.

Lee SC, Shea M, Battle MA, Kozitza K, Ron E, Turek T, Schaub RG and Hayes WC. Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by RhBMP-2 in PLGA matrix. *J Biomed Mater Res* 28: 1149-1156, 1994.

Lian JB and Gundberg CM. Osteocalcin. Biochemical considerations and clinical applications. *Clin Orthop Relat Res* 267-291, 1988.

Link TM, Majumdar S, Grampp S, Guglielmi G, van Kuijk C, Imhof H, Glueer C and Adams JE. Imaging of trabecular bone structure in osteoporosis. *Eur Radiol* 9: 1781-1788, 1999.

Linkhart TA and Mohan S. Parathyroid hormone stimulates release of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II from neonatal mouse calvaria in organ culture. *Endocrinology* 125: 1484-1491, 1989.

Liu Y, Cooper PR, Barralet JE and Shelton RM. Influence of calcium phosphate crystal assemblies on the proliferation and osteogenic gene expression of rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 28: 1393-1403, 2007.

Logan CY and Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810, 2004.

Lohmander LS, Lark MW and Sandy JD. [Mechanisms of degradation of argecanes in osteoarthritic cartilage]. *Rev Prat* 46: S11-S14, 1996.

Loughlin J. The genetic epidemiology of human primary osteoarthritis: current status. *Expert Rev Mol Med* 7: 1-12, 2005.

Loughlin J, Sinsheimer JS, Mustafa Z, Carr AJ, Clipsham K, Bloomfield VA, Chitnavis J, Bailey A, Sykes B and Chapman K. Association analysis of the vitamin D receptor gene, the type I collagen gene COL1A1, and the estrogen receptor gene in idiopathic osteoarthritis. *J Rheumatol* 27: 779-784, 2000.

MacLaughlin WS, Jr. and Manson RR. Perianal Paget's disease with and without infiltrating carcinoma. *J Maine Med Assoc* 70: 149-151, 1979.

Madej T, Boguski MS and Bryant SH. Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett* 373: 13-18, 1995.

Maetzel A, Makela M, Hawker G, Bombardier C. Osteoarthritis of the hip and knee and mechanical occupational exposure – a systematic overview of the evidence. *J Rheumatol.* 24(8): 1599-1607, 1997.

Malemud CJ. Cytokines as therapeutic targets for osteoarthritis. *BioDrugs* 18: 23-35, 2004.

Manicourt DH, Altman RD, Williams JM, Devogelaer JP, Druetz-Van Egeren A, Lenz ME, Pietryla D and Thonar EJ. Treatment with calcitonin suppresses the responses of bone, cartilage, and synovium in the early stages of canine experimental osteoarthritis and significantly reduces the severity of the cartilage lesions. *Arthritis Rheum* 42: 1159-1167, 1999.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21: 115-137, 2000.

Mansell J.P, Tarlton J.F and Bailey A.J. Biochemical evidence for altered subchondral bone collagen metabolism in osteoarthritis of the hip. *British Journal of Rheumatology* 36(1):16-9, 1997.

Mansell J.P and Bailey A.J. Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J Clin Invest.* 101(8):1596-603, 1998.

Manson MD and Cantwell BJ. Model is as model does. *Nat Cell Biol* 2: E199-E201, 2000.

Marie P. Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *Médecine/Science* 17 (12) :1252-1259, 2001.

Marks R, Allegrante JP, Ronald MC and Lane JM. Hip fractures among the elderly: causes, consequences and control. *Ageing Res Rev* 2: 57-93, 2003.

Martel-Pelletier J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 6: 374-376, 1998.

Martel-Pelletier J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7: 371-373, 1999.

Martel-Pelletier J, Alaaeddine N and Pelletier JP. Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci* 4: D694-D703, 1999.

Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Reboul P and Pelletier JP. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Rheum Dis* 62: 501-509, 2003.

Martin A, David V, Vico L and Thomas T. Impaired energetic metabolism after central leptin signaling leads to massive appendicular bone loss in hindlimb-suspended rats. *J Bone Miner Res* 23: 2040-2047, 2008.

Martin JA, Brown T, Heiner A and Buckwalter JA. Post-traumatic osteoarthritis: the role of accelerated chondrocyte senescence. *Biorheology* 41: 479-491, 2004.

Massicotte F, Aubry I, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fernandes J and Lajeunesse D. Abnormal insulin-like growth factor 1 signaling in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Arthritis Res Ther* 8: R177, 2006.

Massicotte F, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP and Lajeunesse D. Modulation of insulin-like growth factor 1 levels in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Bone* 38: 333-341, 2006.

Massicotte F, Lajeunesse D, Benderdour M, Pelletier JP, Hilal G, Duval N and Martel-Pelletier J. Can altered production of interleukin-1beta, interleukin-6, transforming growth factor-beta and prostaglandin E(2) by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 491-500, 2002.

McCarthy TL, Centrella M, Raisz LG and Canalis E. Prostaglandin E2 stimulates insulin-like growth factor I synthesis in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *Endocrinology* 128: 2895-2900, 1991.

McClelland P, Onyia JE, Miles RR, Tu Y, Liang J, Harvey AK, Chandrasekhar S, Hock JM and Bidwell JP. Intermittent administration of parathyroid hormone (1-34) stimulates matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in rat long bone. *J Cell Biochem* 70: 391-401, 1998.

McKinley TO and Bay BK. Trabecular bone strain changes associated with subchondral stiffening of the proximal tibia. *J Biomech* 36: 155-163, 2003.

Melick RA, Farrugia W, Heaton CL, Quelch KJ, Scoggins BA and Wark JD. The metabolic clearance rate of osteocalcin in sheep. *Calcif Tissue Int* 42: 185-190, 1988.

Millward-Sadler SJ and Salter DM. Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction. *Ann Biomed Eng* 32: 435-446, 2004.

Milz S and Putz R. Quantitative morphology of the subchondral plate of the tibial plateau. *J Anat* 185 (Pt 1): 103-110, 1994.

Mital MA and Millington PF. Osseous pathway of nutrition to articular cartilage of the human femoral head. *Lancet* 1: 842, 1970.

Moldovan F, Pelletier JP, Mineau F, Dupuis M, Cloutier JM and Martel-Pelletier J. Modulation of collagenase 3 in human osteoarthritic cartilage by activation of extracellular transforming growth factor beta: role of furin convertase. *Arthritis Rheum* 43: 2100-2109, 2000.

Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN and Eisman JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 367: 284-287, 1994.

Mullis PE, Patel MS, Brickell PM and Brook CG. Constitutionally short stature: analysis of the insulin-like growth factor-I gene and the human growth hormone gene cluster. *Pediatr Res* 29: 412-415, 1991.

Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A and Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 46: 704-713, 2002.

Murray RE, McGuigan F, Grant SF, Reid DM and Ralston SH. Polymorphisms of the interleukin-6 gene are associated with bone mineral density. *Bone* 21: 89-92, 1997.

Myers SL, Brandt KD, Burr DB, O'Connor BL and Albrecht M. Effects of a bisphosphonate on bone histomorphometry and dynamics in the canine cruciate deficiency model of osteoarthritis. *J Rheumatol* 26: 2645-2653, 1999.

Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR and de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108: 17-29, 2002.

Narbaitz R, Stumpf WE, Sar M, Huang S and DeLuca HF. Autoradiographic localization of target cells for 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in bones from fetal rats. *Calcif Tissue Int* 35: 177-182, 1983.

Netter P, Bannwarth B, Lopicque F, Harrewyn JM, Frydman A, Tamisier JN, Gaucher A and Royer RJ. Total and free ketoprofen in serum and synovial fluid after intramuscular injection. *Clin Pharmacol Ther* 42: 555-561, 1987.

Netter P, Bannwarth B and Pere P. [Mode of action and pharmacokinetics of non-steroidal anti-inflammatory agents in adults (excluding salicylates)]. *Rev Prat* 37: 2471-2475, 1987.

Nicholson GC, Malakellis M, Collier FM, Cameron PU, Holloway WR, Gough TJ, Gregorio-King C, Kirkland MA and Myers DE. Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL). *Clin Sci (Lond)* 99: 133-140, 2000.

Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 147: 5542-5548, 2006.

Nuttall ME, Stroup GB, Fisher PW, Nadeau DP, Gowen M and Suva LJ. Distinct mechanisms of action of selective estrogen receptor modulators in breast and osteoblastic cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1550-C1557, 2000.

Oettmeier R, Arokoski J, Roth AJ, Helminen HJ, Tammi M and Abendroth K. Quantitative study of articular cartilage and subchondral bone remodeling in the knee joint of dogs after strenuous running training. *J Bone Miner Res* 7 Suppl 2: S419-S424, 1992.

Ohyama Y and Yamasaki T. Eight cytochrome P450s catalyze vitamin D metabolism. *Front Biosci* 9: 3007-3018, 2004.

Omdahl JL, Bobrovnikova EA, Choe S, Dwivedi PP and May BK. Overview of regulatory cytochrome P450 enzymes of the vitamin D pathway. *Steroids* 66: 381-389, 2001.

Otawara Y, Hosoya N, Kasai H, Okuyama N and Moriuchi S. Purification and characterization of calcium-binding protein containing gamma-carboxyglutamic acid from rat bone. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 26: 209-219, 1980.

Otero M, Lago R, Gomez R, Dieguez C, Lago F, Gomez-Reino J and Gualillo O. Towards a pro-inflammatory and immunomodulatory emerging role of leptin. *Rheumatology (Oxford)* 45: 944-950, 2006.

Otero M, Lago R, Gomez R, Lago F, Gomez-Reino JJ and Gualillo O. Phosphatidylinositol 3-kinase, MEK-1 and p38 mediate leptin/interferon-gamma synergistic NOS type II induction in chondrocytes. *Life Sci* 81: 1452-1460, 2007.

Otero M, Lago R, Lago F, Casanueva FF, Dieguez C, Gomez-Reino JJ and Gualillo O. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS Lett* 579: 295-301, 2005.

Otterness IG, Bliven ML, Eskra JD, te Koppele JM, Stukenbrok HA and Milici AJ. Cartilage damage after intraarticular exposure to collagenase 3. *Osteoarthritis Cartilage* 8: 366-373, 2000.

Paredes Y, Massicotte F, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S and Lajeunesse D. Study of the role of leukotriene B(4) in abnormal function of human subchondral osteoarthritis osteoblasts: effects of cyclooxygenase and/or 5-lipoxygenase inhibition. *Arthritis Rheum* 46: 1804-1812, 2002.

Pash JM, Delany AM, Adamo ML, Roberts CT, Jr., LeRoith D and Canalis E. Regulation of insulin-like growth factor I transcription by prostaglandin E2 in osteoblast cells. *Endocrinology* 136: 33-38, 1995.

Patel MS and Elefteriou F. The new field of neuroskeletal biology. *Calcif Tissue Int* 80: 337-347, 2007.

Patwari P, Fay J, Cook MN, Badger AM, Kerin AJ, Lark MW and Grodzinsky AJ. In vitro models for investigation of the effects of acute mechanical injury on cartilage. *Clin Orthop Relat Res* S61-S71, 2001.

Pelletier JP, Boileau C, Brunet J, Boily M, Lajeunesse D, Reboul P, Laufer S and Martel-Pelletier J. The inhibition of subchondral bone resorption in the early phase of experimental dog osteoarthritis by licofelone is associated with a reduction in the synthesis of MMP-13 and cathepsin K. *Bone* 34: 527-538, 2004.

Pelletier JP, Boileau C, Brunet J, Boily M, Lajeunesse D, Reboul P, Laufer S and Martel-Pelletier J. The inhibition of subchondral bone resorption in the early phase of experimental dog osteoarthritis by licofelone is associated with a reduction in the synthesis of MMP-13 and cathepsin K. *Bone* 34: 527-538, 2004.

Pelletier JP, Lajeunesse D, Jovanovic DV, Lascau-Coman V, Jolicoeur FC, Hilal G, Fernandes JC and Martel-Pelletier J. Carprofen simultaneously reduces progression of morphological changes in cartilage and subchondral bone in experimental dog osteoarthritis. *J Rheumatol* 27: 2893-2902, 2000.

Poole CA, Zhang ZJ and Ross JM. The differential distribution of acetylated and deetyrosinated alpha-tubulin in the microtubular cytoskeleton and primary cilia of hyaline cartilage chondrocytes. *J Anat* 199: 393-405, 2001.

Portale AA, Halloran BP and Morris RC, Jr. Physiologic regulation of the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D by phosphorus in normal men. *J Clin Invest* 83: 1494-1499, 1989.

Pottie P, Presle N, Terlain B, Netter P, Mainard D and Berenbaum F. Obesity and osteoarthritis: more complex than predicted! *Ann Rheum Dis* 65: 1403-1405, 2006.

Price JS, Chambers MG, Poole AR, Fradin A and Mason RM. Comparison of collagenase-cleaved articular cartilage collagen in mice in the naturally occurring STR/ort model of osteoarthritis and in collagen-induced arthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 172-179, 2002.

Price PA and Baukol SA. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 255: 11660-11663, 1980.

Price PA and Baukol SA. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ increases serum levels of the vitamin K-dependent bone protein. *Biochem Biophys Res Commun* 99: 928-935, 1981.

Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J and Raman N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 1447-1451, 1976.

Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D and van den Berg WB. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage* 14: 13-29, 2006.

Prolo P, Wong ML and Licinio J. Leptin. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 1285-1290, 1998.

Pujol JP, Galera P, Redini F, Mauviel A and Loyau G. Role of cytokines in osteoarthritis: comparative effects of interleukin 1 and transforming growth factor-beta on cultured rabbit articular chondrocytes. *J Rheumatol Suppl* 27: 76-79, 1991.

Pulai JI, Chen H, Im HJ, Kumar S, Hanning C, Hegde PS and Loeser RF. NF-kappa B mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments. *J Immunol* 174: 5781-5788, 2005.

Quasnichka HL, Anderson-MacKenzie JM and Bailey AJ. Subchondral bone and ligament changes precede cartilage degradation in guinea pig osteoarthritis. *Biorheology* 43: 389-397, 2006.

Radin EL. Biomechanics of the human hip. *Clin Orthop Relat Res* 28-34, 1980.

Radin EL, Paul IL, Lowy M. A comparison of the dynamic force transmitting properties of subchondral bone and articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 52(3): 444-56, 1970.

Radin EL, Paul IL, Tolkoff MJ. Subchondral bone changes in patients with early degenerative joint disease. *Arthritis Rheum.* 13(4): 400-5, 1970.

Radin EL, Paul IL. Does cartilage compliance reduce skeletal impact loads? The relative force-attenuating properties of articular cartilage, synovial fluid, periarticular soft tissues and bone. *Arthritis Rheum.* 13(2): 139-44, 1970.

Radin EL, Martin RB, Burr DB, Caterson B, Boyd RD and Goodwin C. Effects of mechanical loading on the tissues of the rabbit knee. *J Orthop Res.* 2(3):221-34, 1984.

Rand T, Trattig S, Breitscheher M, Wurnig C, Marschner B and Imhof H. The postoperative shoulder. *Top Magn Reson Imaging* 10: 203-213, 1999.

Raval-Pandya M, Freedman LP, Li H and Christakos S. Thyroid hormone receptor does not heterodimerize with the vitamin D receptor but represses vitamin D receptor-mediated transactivation. *Mol Endocrinol* 12: 1367-1379, 1998.

Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM and Martel-Pelletier J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest* 97: 2011-2019, 1996.

Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM and Martel-Pelletier J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest* 97: 2011-2019, 1996.

Redini F, Daireaux M, Mauviel A, Galera P, Loyau G and Pujol JP. Characterization of proteoglycans synthesized by rabbit articular chondrocytes in response to transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Biochim Biophys Acta* 1093: 196-206, 1991.

Redini F, Galera P, Mauviel A, Loyau G and Pujol JP. Transforming growth factor beta stimulates collagen and glycosaminoglycan biosynthesis in cultured rabbit articular chondrocytes. *FEBS Lett* 234: 172-176, 1988.

Redini F, Mauviel A, Pronost S, Loyau G and Pujol JP. Transforming growth factor beta exerts opposite effects from interleukin-1 beta on cultured rabbit articular chondrocytes through reduction of interleukin-1 receptor expression. *Arthritis Rheum* 36: 44-50, 1993.

Reijman M, Bierma-Zeinstra SM, Pols HA, Koes BW, Stricker BH and Hazes JM. Is there an association between the use of different types of nonsteroidal antiinflammatory drugs and radiologic progression of osteoarthritis? The Rotterdam Study. *Arthritis Rheum* 52: 3137-3142, 2005.

Reijman M, Hazes JM, Pols HA, Bernsen RM, Koes BW and Bierma-Zeinstra SM. Role of radiography in predicting progression of osteoarthritis of the hip: prospective cohort study. *BMJ* 330: 1183, 2005.

Reseland JE and Gordeladze JO. Role of leptin in bone growth: central player or peripheral supporter? *FEBS Lett* 528: 40-42, 2002.

Reseland JE, Syversen U, Bakke I, Qvigstad G, Eide LG, Hjertner O, Gordeladze JO and Drevon CA. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J Bone Miner Res* 16: 1426-1433, 2001.

Rinderknecht E and Humbel RE. Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities: evidence for structural homology with insulin B chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 4379-4381, 1976.

Rinderknecht E and Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253: 2769-2776, 1978.

Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab* 24: 111-119, 1998.

Roberts AB. TGF-beta signaling from receptors to the nucleus. *Microbes Infect* 1: 1265-1273, 1999.

Robey PG. Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function. *Connect Tissue Res* 35: 131-136, 1996.

Rotwein P. Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors* 5: 3-18, 1991.

Sahu A. Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology* 145: 2613-2620, 2004.

SALMON WD, Jr. and DAUGHADAY WH. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 49: 825-836, 1957.

Salo J, Metsikko K, Palokangas H, Lehenkari P and Vaananen HK. Bone-resorbing osteoclasts reveal a dynamic division of basal plasma membrane into two different domains. *J Cell Sci* 109 (Pt 2): 301-307, 1996.

Sato S, Hanada R, Kimura A, Abe T, Matsumoto T, Iwasaki M, Inose H, Ida T, Mieda M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Fujita T, Kato S, Kangawa K, Kojima M, Shinomiya K and Takeda S. Central control of bone remodeling by neuromedin U. *Nat Med* 13: 1234-1240, 2007.

Setton LA, Mow VC and Howell DS. Mechanical behavior of articular cartilage in shear is altered by transection of the anterior cruciate ligament. *J Orthop Res* 13: 473-482, 1995.

Sharif M, George E and Dieppe PA. Correlation between synovial fluid markers of cartilage and bone turnover and scintigraphic scan abnormalities in osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 38: 78-81, 1995.

Sharif M, Saxne T, Shepstone L, Kirwan JR, Elson CJ, Heinegard D and Dieppe PA. Relationship between serum cartilage oligomeric matrix protein levels and disease progression in osteoarthritis of the knee joint. *Br J Rheumatol* 34: 306-310, 1995.

Sharma L and Chang A. Overweight: advancing our understanding of its impact on the knee and the hip. *Ann Rheum Dis* 66: 141-142, 2007.

Sirotkin AV and Grossmann R. Leptin directly controls proliferation, apoptosis and secretory activity of cultured chicken ovarian cells. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 148: 422-429, 2007.

Skrtic S and Ohlsson C. Cortisol decreases hepatocyte growth factor levels in human osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int* 66: 108-112, 2000.

Sodek KL, Tupy JH, Sodek J and Grynblas MD. Relationships between bone protein and mineral in developing porcine long bone and calvaria. *Bone* 26: 189-198, 2000.

Sokoloff L. Microcracks in the calcified layer of articular cartilage. *Arch Pathol Lab Med* 117: 191-195, 1993.

Solovieva S, Leino-Arjas P, Saarela J, Luoma K, Raininko R and Riihimaki H. Possible association of interleukin 1 gene locus polymorphisms with low back pain. *Pain* 109: 8-19, 2004.

Song Y, Kato S and Fleet JC. Vitamin D receptor (VDR) knockout mice reveal VDR-independent regulation of intestinal calcium absorption and ECaC2 and calbindin D9k mRNA. *J Nutr* 133: 374-380, 2003.

Sowers MF, Hochberg M, Crabbe JP, Muhich A, Crutchfield M and Updike S. Association of bone mineral density and sex hormone levels with osteoarthritis of the hand and knee in premenopausal women. *Am J Epidemiol* 143: 38-47, 1996.

St Arnaud R. The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Arch Biochem Biophys* 473: 225-230, 2008.

Stockwell RA. Chondrocytes. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 12: 7-13, 1978.

Takahashi S, Tanaka H and Oki J. Development of spinal motoneurons in rats after a neonatal hypoxic insult. *Pediatr Neurol* 21: 715-720, 1999.

Takahashi Y, Okimura Y, Mizuno I, Iida K, Takahashi T, Kaji H, Abe H and Chihara K. Leptin induces mitogen-activated protein kinase-dependent proliferation of C3H10T1/2 cells. *J Biol Chem* 272: 12897-12900, 1997.

Tanaka H and Seino Y. Direct action of 1,25-dihydroxyvitamin D on bone: VDRKO bone shows excessive bone formation in normal mineral condition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90: 343-345, 2004.

Tare RS, Oreffo RO, Clarke NM and Roach HI. Pleiotrophin/Osteoblast-stimulating factor 1: dissecting its diverse functions in bone formation. *J Bone Miner Res* 17: 2009-2020, 2002.

Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem* 272: 6093-6096, 1997.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA and Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271, 1995.

Taylor LM, Turksen K, Aubin JE and Heersche JN. Osteoclast differentiation in cocultures of a clonal chondrogenic cell line and mouse bone marrow cells. *Endocrinology* 133: 2292-2300, 1993.

Terlain B, Presle N, Pottier P, Mainard D and Netter P. [Leptin: a link between obesity and osteoarthritis?]. *Bull Acad Natl Med* 190: 1421-1435, 2006.

Tissandré E, Guéguen Y, Lobaccaro J.M.A, Aigueperse J, Souidi M. Vitamine D : métabolisme, régulation et maladies associées, *Med Sci (Paris)*, 2006; 22 :1095-1100.

Thomas T and Burguera B. Is leptin the link between fat and bone mass? *J Bone Miner Res* 17: 1563-1569, 2002.

Thomas T, Burguera B, Melton LJ, III, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL and Khosla S. Role of serum leptin, insulin, and estrogen levels as potential mediators of the relationship between fat mass and bone mineral density in men versus women. *Bone* 29: 114-120, 2001.

Todorovic V, Jurukovski V, Chen Y, Fontana L, Dabovic B and Rifkin DB. Latent TGF-beta binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 38-41, 2005.

Troen BR. The regulation of cathepsin K gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 1068: 165-172, 2006.

Tyler JA. Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *Biochem J* 260: 543-548, 1989.

Urban P, Truan G, Bellamine A, Laine R, Gautier JC and Pompon D. Engineered yeasts simulating P450-dependent metabolisms: tricks, myths and reality. *Drug Metabol Drug Interact* 11: 169-200, 1994.

Vaananen HK and Laitala-Leinonen T. Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys* 473: 132-138, 2008.

Valdes AM, Loughlin J, Oene MV, Chapman K, Surdulescu GL, Doherty M and Spector TD. Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 56: 137-146, 2007.

Valdes R, Fernandez-Veledo S, Aymerich I, Casado FJ and Pastor-Anglada M. TGF-beta transcriptionally activates the gene encoding the high-affinity adenosine transporter CNT2 in rat liver parenchymal cells. *Cell Mol Life Sci* 63: 2527-2537, 2006.

van Beuningen HM, Glansbeek HL, van der Kraan PM and van den Berg WB. Osteoarthritis-like changes in the murine knee joint resulting from intra-articular transforming growth factor-beta injections. *Osteoarthritis Cartilage* 8: 25-33, 2000.

van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ and van den Berg WB. Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest* 71: 279-290, 1994.

Van Cromphaut SJ, Dewerchin M, Hoenderop JG, Stockmans I, Van Herck E, Kato S, Bindels RJ, Collen D, Carmeliet P, Bouillon R and Carmeliet G. Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13324-13329, 2001.

van der Kraan PM, Buma P, van Kuppevelt T and van den Berg WB. Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 631-637, 2002.

van der Kraan PM, Glansbeek HL, Vitters EL and van den Berg WB. Early elevation of transforming growth factor-beta, decorin, and biglycan mRNA levels during cartilage matrix restoration after mild proteoglycan depletion. *J Rheumatol* 24: 543-549, 1997.

Vener MJ, Thompson RC, Jr., Lewis JL and Oegema TR, Jr. Subchondral damage after acute transarticular loading: an in vitro model of joint injury. *J Orthop Res* 10: 759-765, 1992.

Verhaeghe J, Van Herck E, Van Bree R, Van Assche FA and Bouillon R. Osteocalcin during the reproductive cycle in normal and diabetic rats. *J Endocrinol* 120: 143-151, 1989.

Verrecchia F and Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol* 118: 211-215, 2002.

Viereck V, Siggelkow H, Tauber S, Raddatz D, Schutze N and Hufner M. Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-D₃, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts. *J Cell Biochem* 86: 348-356, 2002.

Walton M. Degenerative joint disease in the mouse knee; radiological and morphological observations. *J Pathol* 123: 97-107, 1977.

Wang Y, Kuropatwinski KK, White DW, Hawley TS, Hawley RG, Tartaglia LA and Baumann H. Leptin receptor action in hepatic cells. *J Biol Chem* 272: 16216-16223, 1997.

Wasserman RH, Smith CA, Brindak ME, De Talamoni N, Fullmer CS, Penniston JT and Kumar R. Vitamin D and mineral deficiencies increase the plasma membrane calcium pump of chicken intestine. *Gastroenterology* 102: 886-894, 1992.

Westacott CI, Webb GR, Warnock MG, Sims JV and Elson CJ. Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone. *Arthritis Rheum.* 40(7):1282-1291, 1997.

White CP, Morrison NA, Gardiner EM and Eisman JA. Vitamin D receptor alleles and bone physiology. *J Cell Biochem* 56: 307-314, 1994.

White DW, Kuropatwinski KK, Devos R, Baumann H and Tartaglia LA. Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization. *J Biol Chem* 272: 4065-4071, 1997.

White DW and Tartaglia LA. Leptin and OB-R: body weight regulation by a cytokine receptor. *Cytokine Growth Factor Rev* 7: 303-309, 1996.

White DW and Tartaglia LA. Evidence for ligand-independent homo-oligomerization of leptin receptor (OB-R) isoforms: a proposed mechanism permitting productive long-form signaling in the presence of excess short-form expression. *J Cell Biochem* 73: 278-288, 1999.

White DW, Wang DW, Chua SC, Jr., Morgenstern JP, Leibel RL, Baumann H and Tartaglia LA. Constitutive and impaired signaling of leptin receptors containing the Gln --> Pro extracellular domain fatty mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10657-10662, 1997.

Wohl GR, Shymkiw RC, Matyas JR, Kloiber R and Zernicke RF. Periarticular cancellous bone changes following anterior cruciate ligament injury. *J Appl Physiol* 91: 336-342, 2001.

Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R and Franceschi RT. Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2. *J Biol Chem* 277: 36181-36187, 2002.

Yamada Y and Seino Y. [Genetic factors and insulin resistance]. *Nippon Rinsho* 58: 315-319, 2000.

Yamagishi T, Nakajima Y, Nishimatsu S, Nohno T, Ando K and Nakamura H. Expression of bone morphogenetic protein-5 gene during chick heart development: possible roles in valvuloseptal endocardial cushion formation. *Anat Rec* 264: 313-316, 2001.

Yang CY and Meng CL. Stimulation of PGE2 synthesis in a co-culture of periosteal fibroblasts and osteoblast-like cells by parathyroid hormone. *J Lipid Mediat* 7: 23-30, 1993.

Yang XB, Roach HI, Clarke NM, Howdle SM, Quirk R, Shakesheff KM and Oreffo RO. Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification. *Bone* 29: 523-531, 2001.

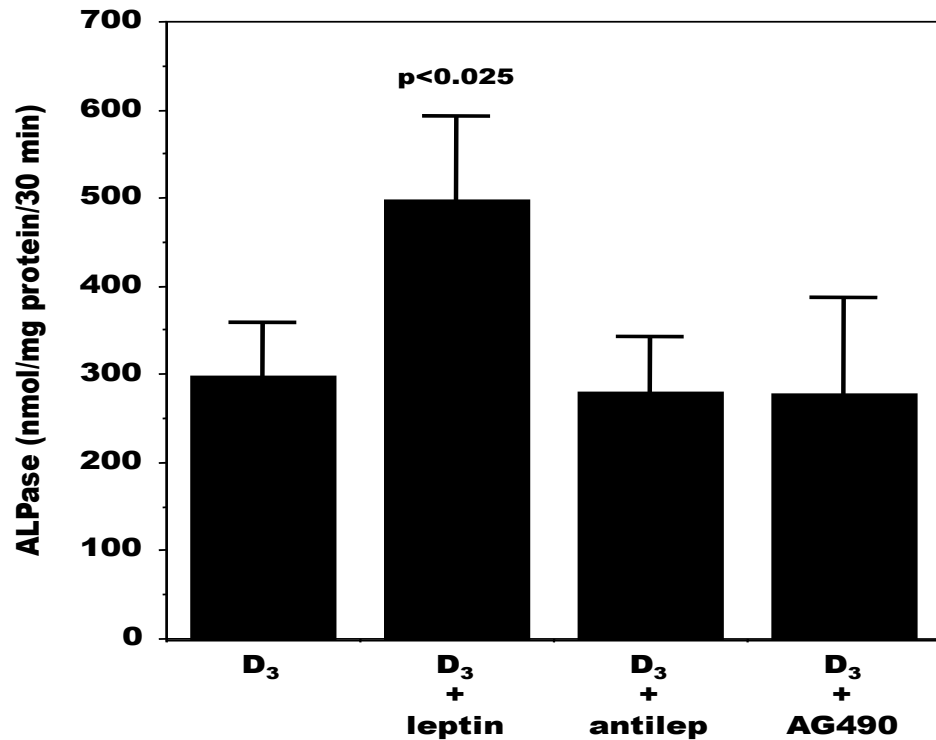
Young MF. Mouse models of osteoarthritis provide new research tools. *Trends Pharmacol Sci* 26: 333-335, 2005.

Zhang F, Chen Y, Heiman M and Dimarchi R. Leptin: structure, function and biology. *Vitam Horm* 71: 345-372, 2005.

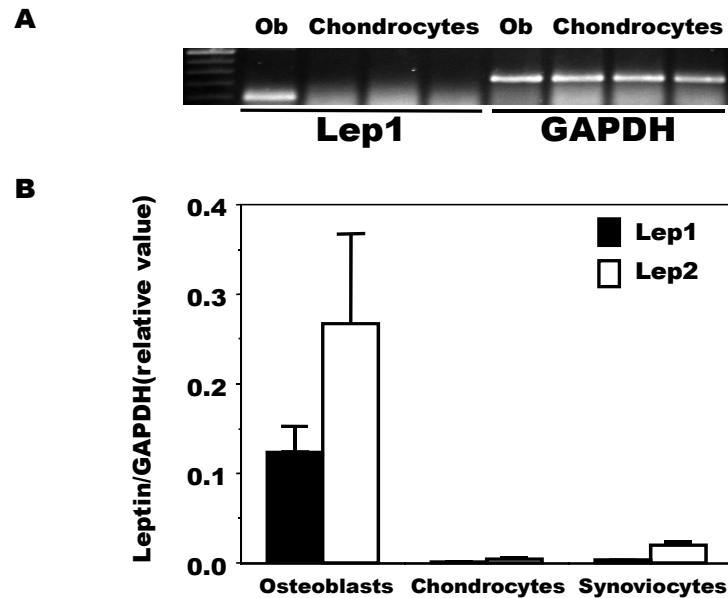
Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L and Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432, 1994.

Zhao G, Monier-Faugere MC, Langub MC, Geng Z, Nakayama T, Pike JW, Chernausek SD, Rosen CJ, Donahue LR, Malluche HH, Fagin JA and Clemens TL. Targeted overexpression of insulin-like growth factor I to osteoblasts of transgenic mice: increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation. *Endocrinology* 141: 2674-2682, 2000.

Zhou H, Choong P, McCarthy R, Chou ST, Martin TJ and Ng KW. In situ hybridization to show sequential expression of osteoblast gene markers during bone formation in vivo. *J Bone Miner Res* 9: 1489-1499, 1994.



Annexe 1: Modulation de l'activité de la phosphatase alcaline dans les ostéoblastes normaux. Les Ob normaux ont été traités pendant 48h avec du milieu contenant 0.5% FBS avec 1,25(OH)₂D₃ (50nM). Les cellules ont ensuite été traités avec la leptine exogène, des anticorps anti-leptine (anti RL), tyrphostin (AG490, 100μM) pendant 30 minutes précédé par un ajout de 1,25(OH)₂D₃. À la fin des 48h, les cellules ont été lysées dans le tampon ALPase afin de mesurer l'activité de la phosphatase alcaline.



Annexe 2: Comparaison du niveau d'expression de la leptine dans les ostéoblastes, chondrocytes et synoviocytes. Les cellules confluentes (Ob, chondrocytes ou synoviocytes) de patients OA ont été prélevées dans le tampon trizol et l'ARN a été isolée, purifié et quantifié. Il y a eu ensuite une réaction de transcription inverse et une réaction de PCR semi-quantitatif a été réalisée en utilisant des amorces Lep1 et GAPDH. A) Représentation de la migration des produits PCR sur gel d'agarose B) Quantification des bandes résultantes de la migration.