

Université de Montréal

**Régulation transcriptionnelle du gène HSPG2 codant
pour Perlecan et son implication dans l'ostéoarthrite**

par

Johanne Landry

Laboratoire de Génétique Moléculaire des Maladies Musculo-Squelettiques
CHU Sainte-Justine

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

août, 2010

© **Johanne Landry**, août 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé:

Régulation transcriptionnelle du gène HSPG2 codant pour Perlecan et son implication dans l'ostéoarthrite

Présenté par

Johanne Landry

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Nikolaus Heveker, président-rapporteur

Alain Moreau, directeur de recherche

Guy Boileau, membre du jury

Résumé

De récents travaux ont mis en évidence une production accrue de Perlecan au stade terminal de l'arthrose ou ostéoarthrite (OA). L'équipe du Dr Moreau a mis en évidence qu'il y a une perte d'expression du facteur de transcription Pitx1 dans l'arthrose et que ce dernier pourrait agir comme un régulateur négatif du gène HSPG2 codant pour le Perlecan.

Afin d'étudier la régulation transcriptionnelle de ce gène, des fragments du promoteur proximal ont été clonés en amont du gène rapporteur luciférase et testés en transfections transitoires. Des co-transfections avec des quantités variables de pSI-mPitx1 et avec des constructions comportant des fragments de différentes régions du promoteur mHSPG2 (jusqu'à 3926 pbs en amont de l'ATG) ont démontrées une activité transcriptionnelle et une stimulation de cette activité en présence de Pitx1, avec des résultats variables selon les types cellulaires. Parallèlement, des expériences en qPCR effectuées sur des ostéoblastes dérivés de souris transgéniques surexprimant Pitx1 ont aussi démontré qu'une surexpression de Pitx1 corrèle avec une augmentation de l'expression de p53, une cible connue de Pitx1, et de Perlecan.

Le lien qui existe entre Pitx1 et Perlecan est encore très méconnu et la cascade régulatrice impliquant ces deux acteurs n'est pas encore établie. Une meilleure connaissance des mécanismes qui régulent la transcription normale et pathologique du gène HSPG2 permettrait sans aucun doute une avancée dans la compréhension du développement et du rôle possible de Perlecan dans la progression de l'ostéoarthrite.

Mots-clés : Perlecan, HSPG2, arthrose, ostéoarthrite, régulation transcriptionnelle, Pitx1

Abstract

Recent work has shown an increase of Perlecan production associated with the terminal stage of osteoarthritis (OA). Dr Moreau's team demonstrated a loss of expression of the transcription factor Pitx1 in osteoarthritis suggesting its putative role as a negative regulator of the HSPG2 gene coding for Perlecan.

To study the transcriptional regulation of this gene, promoter fragments were cloned upstream of a luciferase reporter gene and tested in transient transfection assays. Co-transfections with variable quantities of pSI-mPitx1 and with constructs made with fragments of different lengths of the mHSPG2 promoter demonstrated a transcriptional activity and enhancement of this activity in presence of Pitx1, with variable results depending on cell types. In addition, expression analysis by qPCR on transgenic mice osteoblasts that overexpress Pitx1 showed that the overexpression of Pitx1 correlates with an augmentation of p53, a known Pitx1 target and Perlecan expression.

The link between Pitx1 and Perlecan is still poorly understood and a clear pathway involving those two players is not yet established. A better understanding of mechanisms regulating normal and pathological transcription of the HSPG2 gene encoding for Perlecan would allow a better comprehension of osteoarthritis development and the putative role of Perlecan in its progression.

Keywords : Perlecan, HSPG2, osteoarthritis, transcriptional regulation, Pitx1

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Liste des tableaux	v
Liste des figures	vi
Liste des sigles, Liste des abréviations	vii
Dédicaces	ix
Remerciements	x
Chapitre 1. Revue de littérature	11
1.1 Ostéoarthrite	11
1.2 Héparan sulfates glycosaminoglycans (HSPGs)	15
1.3 Implication de Perlecan dans l'ostéoarthrite	18
1.4 La famille des Pitx	22
1.5 Implication de Pitx1 dans l'ostéoarthrite	24
1.6 Lien entre Pitx1 et Perlecan dans l'ostéoarthrite	25
1.7 Partenaires possible de Pitx1	27
Chapitre 2. Matériel et méthodes	29
2.1 Matériel	29
2.1.1 Culture cellulaire	29
2.1.2 Solutions diverses	29
2.2 Méthodes	30
2.2.1 Détails des amorces PCR et qPCR utilisées	30
2.2.2 Amplification de la librairie génomique	30
2.2.3 Criblage des sous-librairies	32
2.2.4 Enzymes de restrictions et réactions PCR	33
2.2.5 Insertion de fragments de promoteur de Perlecan dans le plasmide pGL4basic-Luc	33
2.2.6 Co-transfection transitoire de cellules à la lipofectamine 2000	33
2.2.7 Calculs et statistiques pour l'élaboration des graphiques de transfections transitoires	34
2.2.8 SYBR Green qPCR	35
2.2.9 Calculs pour la quantification relative (RQ) de l'expression par qPCR	35

Chapitre 3. Résultats	36
3.1 Analyse <i>in silico</i> des sites potentiels de reconnaissance de Pitx1 sur le promoteur du gène codant pour Perlecan	36
3.2 Construction du promoteur de Perlecan murin dans le vecteur d'expression pGL4basic-Luc	39
3.3 Co-transfections transitoires dans divers types cellulaires	44
3.4 Analyse de l'expression de Perlecan endogène dans les cellules C28 transfectées avec pSI ou pSI-mPitx1	55
3.5 Analyse de l'expression de Perlecan endogène et de l'influence possible du facteur de transcription Pitx1 sur son expression	56
3.6 Sites potentiels de p53 sur le promoteur de Perlecan	60
Chapitre 4. Discussion	61
4.1 L'activité basale du promoteur humain de Perlecan nécessite l'exon 1	61
4.2 Pitx1 augmente l'activité transcriptionnelle du promoteur de Perlecan de façon indirecte possiblement via p53	63
4.3 Surexpression de p53 et de Perlecan dans les ostéoblastes de souris transgéniques qui surexpriment Pitx1	64
4.4 La régulation transcriptionnelle par Pitx1 (activation vs inhibition) de Perlecan peut varier selon plusieurs facteurs	67
Chapitre 5. Sommaire	70
Chapitre 6. Perspectives	71
Bibliographie	73
Annexe I. Solutions diverses	79

Liste des tableaux

Tableau I : Trois types de chondrocytes retrouvés lors des stades tardifs de l'ostéoarthrite	14
Tableau II: Les trois principales classes d'héparan sulfate protéoglycans (HSPGs) présents en surface cellulaire.....	15
Tableau III. Différences dans les types cellulaires au stade avancé de l'ostéoarthrite.....	19
Tableau IV. Détails des lignées cellulaires utilisées.....	29
Tableau V. Détails des amorces utilisées lors des divers PCRs.....	30
Tableau VI. Facteurs de transcription pouvant potentiellement réguler de façon négative la transcription de Perlecan.....	62

Liste des figures

Figure 1. Anatomie de l'articulation du genou droit.....	12
Figure 2. Immunofluorescence avec un anticorps contre perlecan sur des chondrocytes matures exprimant Pitx1 normalement (Pitx1), à moitié (1/2 Pitx1) et n'exprimant pas Pitx1 (sans Pitx1).....	26
Figure 3. Carte de restriction du vecteur Lambda FIX II.....	31
Figure 4. Sites consensus de Pitx1 sur la séquence promotrice du gène murin codant pour perlecan	37-38
Figure 5. PCR avec les amorces mHSPG2-4040-F/mHSPG2-3344-R sur 24 sous-librairies d'ADN génomique de souris	40
Figure 6. Constructions dans le vecteur pGL4basic-Luc par insertion de fragments de taille différentes du promoteur murin du gène codant pour perlecan (mHSPG2).....	43
Figure 7. Co-transfections transitoires de pGL4-mHSPG2-3304 pbs et de quantités variables de Pitx1 (pSI-mPitx1) dans divers types cellulaires.....	48
Figure 8. Co-transfections transitoires de pGL4-mHSPG2-3926 pbs et de quantités variables de Pitx1 (pSI-mPitx1) dans les cellules C28 pour un « time course » de lyse cellulaire.....	50
Figure 9. Co-transfections transitoire à la lipofectamine 2000 de pGL4-mHSPG2-3926 pbs, pGL4-mHSPG2-3304 pbs, pGL4-mHSPG2-479 pbs et pGL4-mHSPG2-254 pbs avec 600 ng de Pitx1 (pSI-mPitx1) et sans Pitx1 dans les cellules C28 et MC3T3.....	53
Figure 10. Représentation schématique des quatre constructions et tableau résumé des niveaux d'expression basaux vs induit en présence de Pitx1 dans les cellules C28 et MC3T3.....	54
Figure 11. Analyse des niveaux d'expression de Pitx1, Perlecan et p53 par qPCR sur des ostéoblastes primaires de souris WT et TG qui surexpriment Pitx1	58
Figure 12. Analyse des niveaux d'expression de Pitx1, Perlecan et p53 par qPCR sur des fémurs de souris WT et TG qui surexpriment Pitx1.....	59
Figure 13. Sites de reconnaissance de p53 sur les 254 pbs du promoteur de mHSPG2 en amont de l'ATG initiateur.....	60

Liste des sigles, Liste des abréviations

- 5-aza:** 5-aza-2'-deoxycytidine
- ADNc:** acide désoxyribonucléique complémentaire
- ARNm:** acide ribonucléique messager
- bHLH:** basic helix-loop-helix domain
- Cd-rap:** Cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein
- C/EBP:** CCAAT/enhancer-binding protein
- Egr1:** early growth response I
- EXT:** exostosis-related gene
- FGF:** fibroblasts growth factors
- GAG:** glycosaminoglycan
- GATA:** globin transcription factor
- GNRHI:** gonadotrophin-releasing hormone
- Hg:** hedgehog
- HS:** héparan sulfate
- HSPG:** héparan sulfate glycosaminoglycan
- HSPG2:** héparan sulfate glycosaminoglycan 2 = perlecan
- Pitx:** pituitary homeobox transcription factor
- LH β :** Luteinizing hormone subunit β
- MZF1:** myeloid zinc finger 1
- LH β :** Luteinizing hormone subunit
- OA:** ostéoarthrite
- p53AIP-1:** p53-regulated apoptosis-inducing protein 1
- POMC:** pro-opiomélanocorticine
- PT:** pituitary pars tuberalis
- qPCR:** quantitative polymerase chain reaction
- REG:** réticulum endoplasmique rugueux
- SF1:** steroidogenic factor I

SOD2: superoxide dismutase 2

TGF- β : transforming growth factor- β

TSS: transcription start site (site d'initiation de la transcription)

UTR: untranslated region

VEGF: vascular endothelial growth factor

Wg: Wnt/Wingless

Je dédie ce mémoire à ma mère, Marguerite Larocque, qui a été une inspiration pour moi et qui m'a toujours encouragée dans tous ce que j'ai entrepris. Elle est décédée le 1^{er} janvier 2005, après ma première session de baccalauréat en biochimie, suite à un cancer au cerveau. Où qu'elle soit, sa gentillesse, son courage et sa mémoire demeureront à tout jamais avec moi.

Je t'aime Minou!

Je dédie aussi ce mémoire à Philippe Nadeau qui a été là pour moi depuis la mort de ma mère et sans qui plusieurs obstacles auraient été insurmontables.

Merci pour tout Ph!

Remerciements

Merci au Dr Alain Moreau qui m'a accueilli au sein de son laboratoire après un an de maîtrise effectué au sein d'un autre laboratoire. Sans ce changement de laboratoire et de projet, j'aurai à coup sûr abandonné la maîtrise.

Merci au Dr Nikolaus Heveker, et au Dr Guy Boileau qui ont acceptés de siéger sur mon comité de thèse et d'occuper respectivement les fonctions de président-rapporteur et de membre du jury.

Merci aussi au Dr Nikolaus Heveker pour m'avoir aidé lors de ma transition entre les deux laboratoires où j'ai effectué ma maîtrise et pour avoir accepté d'être mon parrain lors de mon séjour dans le laboratoire du Dr Alain Moreau.

Je veux adresser un remerciement spécial au Dr Benoît St-Jacques qui m'a beaucoup aidé durant ma maîtrise tant au plan expérimental que personnel. Il est une réelle inspiration tant sur le plan humain que sur le plan professionnel. La réussite de ma maîtrise est grandement attribuable à ce chercheur émérite aux qualités humaines remarquables.

Chapitre 1. Revue de littérature

1.1 Ostéoarthrite

L'ostéoarthrite (OA) est une pathologie dégénérative qui affecte un Canadien sur dix durant leur vie et qui se développe sur plusieurs années durant lesquelles il se produit une dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire par les aggrécánases et les collagénases ainsi qu'un épaisissement de l'os sous-jacent (Roach and Aigner, 2007). Il y a généralement présence de douleur et éventuellement une perte de la fonction de l'articulation (Picard et al., 2007; Tesche and Miosge, 2004). Les causes de l'OA demeurent encore méconnues mais plusieurs facteurs tel la génétique et le métabolisme pourraient favoriser l'apparition de l'OA primaire alors que des traumatismes et la sur-utilisation de certaines articulations seraient davantage en cause dans l'OA dite secondaire (Loughlin, 2001; Spector and MacGregor, 2004). Dans ce contexte, il est proposé qu'une combinaison de facteurs puisse déclencher l'OA et serait sous-jacent à un débalancement de l'homéostasie entre les chondrocytes et la matrice environnante, la lésion primaire étant donc directement au niveau du cartilage articulaire (Poole, 1999; von der Mark and Gluckert, 1990).

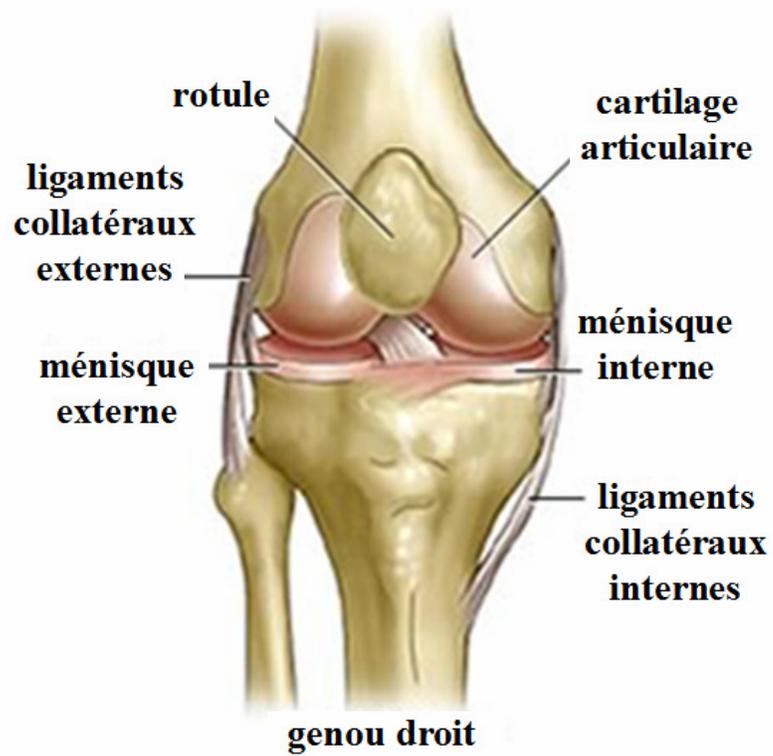


Figure 1. Anatomie de l'articulation du genou droit.

Adapté du site internet médical www.aclsolutions.com/anatomy.php.

Lorsque la lésion primaire survient, il y a perturbation de la structure de la matrice. Par la suite, lors des stades précoces de l'OA, il y a augmentation du contenu hydrique des fibres de collagène et des surfaces de division cellulaire. Ces changements sont additionnés d'une augmentation de la production de collagène de type II (seulement lors de l'initiation de la maladie) (Aigner et al., 1992; Poole, 1999; Poole et al., 1993). L'implication des protéoglycans tel que l'aggrécan, le biglycane et la décorine dans la pathophysiologie de l'OA est bien connue (Buckwalter and Mankin, 1998; Poole, 1999; Poole et al., 1993; von der Mark and Gluckert, 1990). D'ailleurs, une perte de décorine et de biglycane a été constatée dans les couches superficielles du cartilage ostéoarthritique (Poole et al., 1993), tandis qu'une augmentation du taux de transcription, et conséquemment de la quantité de ces protéoglycans, a été détectée dans les couches plus profondes du cartilage ostéoarthritique (Tesche and Miosge, 2004). Lors des stades tardifs de l'OA, il y a présence de régénération et de dégénération des chondrocytes (Aigner and McKenna, 2002; Sandell and Aigner, 2001). Dû à cet état de fait, trois types principaux de chondrocytes ont été identifiés dans le cartilage ostéoarthritique à un niveau ultrastructurel, soit les chondrocytes de type I, les cellules sécrétrices allongées de type II et les cellules dégénératives de type III (tableau I) (Bock et al., 2001; Kouri et al., 1996; Miosge et al., 1998).

Tableau I: Trois types de chondrocytes retrouvés lors des stades tardifs de l'ostéoarthrite (Roach and Aigner, 2007; Tesche and Miosge, 2004)

	Chondrocytes de type I	Cellules sécrétrices allongées de type II	Cellules dégénératives de type III
Phénotype	Chondrocyte typique	Formes irrégulières avec un réticulum endoplasmique rugueux proéminent	Cellules en dégradation
Localisation	Régions macroscopiquement intactes	Zones profondes du cartilage articulaire et régions adjacentes à la « blessure » principale	Région de la « blessure » principale
Stades avancés de l'OA		<p>1) Sécrétion de collagène de types I et III (Miosge et al., 1998; Sandell and Aigner, 2001) et diminution de la sécrétion de collagène de type II (Poole, 1999).</p> <p>2) Augmentation des niveaux de transcription et de traduction de décorine et de biglycane (Bock et al., 2001).</p> <p>3) Formation de fissures qui s'étendent profondément dans le cartilage et dans les regroupements de cellules.</p>	1) Synthèse de toutes les protéases qui participent à la dégradation du cartilage (Roach and Aigner, 2007)

Le premier élément de la dégénération de l'articulation, selon Radin et al (Radin et al., 1978) pourrait être l'augmentation de la masse et de la densité osseuse (Bailey and Mansell, 1997; Li and Aspden, 1997). Cependant, cette hypothèse est encore aujourd'hui très controversée et n'a jamais été confirmée (Picard et al., 2007).

1.2 Héparan sulfates glycosaminoglycans (HSPGs)

Perlecan, un héparan sulfate protéoglycan (HSPG), est le protéoglycan majeur constituant les membranes basales (Lin, 2004; Tesche and Miosge, 2004; Zoeller et al., 2008). Les HSPGs sont des macromolécules présentes à la surface des cellules et dans la matrice extra-cellulaire qui sont composées d'un noyau protéique (core protein) auquel des chaînes d'héparan sulfate (HS) glycosaminoglycan (GAG) sont attachées (Esko and Selleck, 2002). Les trois principales classes de HSPGs retrouvés en surface cellulaire sont les glypicans, les syndecans et les perlecans (Tableau II) (Lin, 2004). Ce classement est basé sur la structure du noyau protéique (Lin, 2004).

Tableau II: Les trois principales classes d'héparan sulfate protéoglycans (HSPGs) présents à la surface cellulaire (Lin, 2004).

	Glypican	Syndecan	Perlecan
Liaison à la membrane plasmatique	glycosylphosphatidylinositol (GPI)	domaine transmembranaire	non
Sécrétion	non	Non	matrice extracellulaire
Composition des chaînes latérales	héparan sulfate (HS) et glycosaminoglycan (GAG)	héparan sulfate (HS) et chondroïtine sulfates (CS)	héparan sulfate (HS) et glycosaminoglycan (GAG)
Schéma (Adapté de (Lin, 2004))			

Les chaînes d'héparan sulfate sont des polysaccharides synthétisés dans l'appareil de Golgi et qui contiennent des répétitions d'unités disaccharides (acide uronique lié à un glucosamine) (Esko and Selleck, 2002). La biosynthèse des chaînes d'héparan sulfate comporte trois étapes importantes soit, l'initiation de la chaîne, la polymérisation de la chaîne et la modification de la chaîne (Lin, 2004). Dans un premier temps, lors de l'initiation de la chaîne, la synthèse des chaînes d'héparan sulfate (HS) glycosaminoglycan (GAG) débute par l'ajout d'un tétrasaccharide sur un résidu sérine du noyau protéique catalysé successivement par les enzymes xylosyl transférase, galactose transférase I-II et acide glucuronique transférase I qui ajoutent respectivement un xylose, deux galactoses et un acide glucuronique, puis, un α -1,4-N-acétylglucosamine est ajouté par l' α -N-acétylglucosamine transférase, ce qui initie le processus de polymérisation de la chaîne d'héparan sulfate (Lin, 2004). Durant le processus de polymérisation de la chaîne, des résidus d'acide glucuronique et de N-acétylglucosamine sont ajoutés en alternance, ce qui est catalysé par la famille de protéines EXT (Lin, 2004). Par la suite, plusieurs modifications de la chaîne surviennent (Lin, 2004). Entre autre, il y a la N-déacétylation et N-sulfation des N-acétylglucosamines, suivie d'une épimérisation en C5 des acides glucuroniques en acide iduronique puis une O-sulfation variable en C2 de l'acide iduronique, en C2 de l'acide glucuronique, en C6 des unités N-acétylglucosamine et N-sulfoglucosamine et occasionnellement en C3 des résidus N-glucosamine (Lin, 2004). Ce processus produit des chaînes d'héparan sulfate glycosaminoglycan d'environ 100 unités de sucres ou plus ayant beaucoup d'hétérogénéité de structure (Lin, 2004).

Les HSPGs jouent plusieurs rôle cruciaux dans de nombreuses cascades signalétiques impliquant entre autre les molécules Wnt/Wingless (Wg), Hedgehog (Hh), TGF- β et les FGFs tant chez la Drosophile que chez les vertébrés (Lin, 2004). Plus particulièrement, le Perlecan serait impliqué dans le contrôle de plusieurs fonctions biologiques comme l'adhésion cellulaire (Brown et al., 1997), le maintien de la matrice extracellulaire (Costell et al., 1999; Hassell et al., 2002), la liaison aux facteurs de

croissance (Aviezer et al., 1994), le développement du cartilage (Arikawa-Hirasawa et al., 1999) et la régulation de la différenciation des chondrocytes (French et al., 1999). Le Perlecan est particulièrement élevé dans l'environnement péricellulaire des chondrocytes (Arikawa-Hirasawa et al., 2001; Melrose et al., 2002) ce qui pourrait suggérer qu'il joue un rôle dans l'attachement des chondrocytes à leur propre matrice (SundarRaj et al., 1995).

Le Perlecan est une protéine d'environ 467 kDa qui comporte cinq domaines distincts. Le domaine N-terminal est unique au Perlecan et les domaines II à V possèdent des similarités de séquences avec d'autres protéines présentes à la surface des cellules et avec des protéines de la matrice extracellulaire (Murdoch et al., 1992). Quant au domaine I, il possède trois sites potentiels d'attachement aux glycosaminoglycans où prennent normalement place les chaînes latérales d'héparan sulfate (French et al., 2002). Ces sites pourraient d'ailleurs jouer un rôle important dans la différenciation des chondrocytes et le développement du cartilage (French et al., 2002).

Chez l'humain, des mutations dans le gène qui code pour le Perlecan (HSPG2) sont la cause de deux pathologies squelettiques soit le Syndrome de Schwartz-Jampel qui est relativement bénin et le syndrome de type Silverman-Handmaker, une dysplasie dyssegmentale néonatale létale (Arikawa-Hirasawa et al., 2002; Arikawa-Hirasawa et al., 2001). Ces découvertes suggèrent que le Perlecan pourrait jouer un rôle important au niveau des fonctions neuromusculaires ainsi qu'au niveau de la formation du cartilage (Arikawa-Hirasawa et al., 2002; Arikawa-Hirasawa et al., 1999; Arikawa-Hirasawa et al., 2001). En effet, la perte de Perlecan lors d'une mutation dans le gène HSPG2 causée par l'insertion d'un codon stop prématuré produit un phénotype chondrodysplasique (Arikawa-Hirasawa et al., 2001).

1.3 Implication de Perlecan dans l'ostéoarthrite

F. Tesche et son équipe ont démontré qu'il y a une production accrue de Perlecan lors des stades avancés de l'ostéoarthrite (Tesche and Miosge, 2004). Pour démontrer cela, ils ont vérifié les niveaux de protéine Perlecan et d'ARNm ainsi que leur distribution dans différents types cellulaires de chondrocytes en stade avancé d'ostéoarthrite obtenues à partir de genoux humains (Tesche and Miosge, 2004). Par histologie, ils ont déterminé qu'il y a une perte de glycosaminoglycans dans les stades tardifs de la maladie, que le tissu cartilagineux est fissuré et que les cellules sont plus regroupées au niveau des cellules adjacentes à la lésion principale (Tesche and Miosge, 2004). Par immunohistochimie, une présence accrue de Perlecan au niveau péricellulaire a été démontré (Tesche and Miosge, 2004). Par microscopie, à un niveau ultrastructurel, cette équipe a réussi à déterminer des différences au niveau du Perlecan entre les différents types cellulaires au stade avancé de l'ostéoarthrite (tableau III) (Tesche and Miosge, 2004).

Tableau III. Différences dans les types cellulaires au stade avancé de l'ostéoarthrite

	Chondrocytes de type I	Cellules sécrétrices allongées de type II
Phénotype	chondrocytes normaux	cellules allongées et irrégulières
REG	structure fine et clairsemée	en grande quantité, proéminent et plus gros
Filipodes	nombreux et incrustés dans une matrice extracellulaire homogène avec des fibres de collagène et des protéoglycans	peu de filipodes
Localisation	régions macroscopiquement intactes	Régions adjacentes à la "blessure" principale
Perlecan (histologie)	<u>histochimie immunogold</u> : matrice extracellulaire qui entoure directement les chondrocytes (matrice péricellulaire). <u>hybridation <i>in situ</i> (niveau ultrastructurel)</u> : coloration éparpillée de l'ARNm de perlecan au niveau de la bordure du REG dans le cytoplasme des chondrocytes.	<u>histochimie immunogold</u> : matrice extracellulaire qui entoure directement les chondrocytes (matrice péricellulaire). Intensité plus importante de la coloration de Perlecan que dans les cellules de type I (20-30% de plus de protéine perlecan). <u>niveau ultrastructurel</u> : en grande quantité dans la matrice interterritoriale, proche des minces fibres de collagènes <u>hybridation <i>in situ</i></u> : coloration plus importante que dans les chondrocytes de type I, de l'ARNm de Perlecan dans le cytoplasme des chondrocytes regroupés (environ 45% de plus que type I). <u>hybridation <i>in situ</i> (niveau ultrastructurel)</u> : plus grand nombre de particules d'or dans le cytoplasme que cellules de type I et non limité à la bordure du REG
Perlecan (RT-PCR)		50% plus d'ARNm de perlecan que type I

Tous les échantillons de chondrocytes qu'ils ont utilisés ont pathophysiologiquement été catégorisés en grade III-IV, soit des stades tardifs de l'ostéoartrite (Collins and Mc, 1960). Les échantillons démontraient des signes de dégénération et, à un moindre niveau, des signes de régénération (Tesche and Miosge, 2004). Les cellules sécrétrices de type II seraient impliquées dans les efforts de régénération du cartilage malade afin de compenser sa dégénération (Aigner and McKenna, 2002; Bock et al., 2001; Kouri et al., 1996; Miosge et al., 1998).

Le Perlecan a été majoritairement trouvé dans les zones profondes du cartilage et dans les cellules regroupées des stades tardifs de l'OA (Tesche and Miosge, 2004). De plus, le Perlecan est trouvé dans la matrice interterritoriale, plus précisément sur les fines fibres de collagène dans les échantillons prélevés dans les régions adjacentes à la lésion principale (Tesche and Miosge, 2004).

Les souris déficientes en Perlecan (KO) démontrent une quantité réduite de fibres de collagène et un manque de réseau de collagène typique (Costell et al., 1999) ce qui suggère un rôle important de ce protéoglycan dans le maintien du réseau de collagène dans le cartilage articulaire (Tesche and Miosge, 2004). Ceci pourrait laisser à penser que les niveaux augmentés de protéines Perlecan dans les stades tardifs de l'OA pourrait être en réalité un effort de la part du cartilage pour stabiliser la matrice extracellulaire et les fibres de collagène incrustées dans cette matrice (Tesche and Miosge, 2004). Comme l'ARNm de Perlecan, la quantité d'ARNm de décorin et de biglycan, deux autres HSPGs, est augmentés d'environ 45% dans les stades tardifs de l'OA (Bock et al., 2001; Tesche and Miosge, 2004).

L'augmentation du niveau d'ARNm et de protéine Perlecan est réalisée par les cellules sécrétrices allongées de type II et ces cellules déposent le Perlecan principalement

dans la matrice péricellulaire, ce qui a été confirmé par une augmentation de 50% de l'ARNm de Perlecan par RT-PCR (Tesche and Miosge, 2004).

Les chaînes latérales de glycosaminoglycan de Perlecan agissent comme un co-récepteur de faible affinité pour les FGFs et l'activité mitogénique a déjà été démontrée pour d'autres types cellulaires (Aviezer et al., 1994). Les cellules de type II qui apparaissent seulement dans les stades tardifs de l'OA sont principalement responsables du processus de régénération de la matrice de cartilage (Bock et al., 2001; Kouri et al., 1996) et produisent plus de Perlecan, ce qui pourrait être bénéfique pour l'intégrité de la matrice et les chondrocytes contenus dans cette matrice.

Dans le cartilage normal, le Perlecan interagit avec d'autres macromolécules d'adhésion extracellulaire pour stabiliser la matrice et pour permettre l'adhésion des chondrocytes à leur propre substrat (Costell et al., 1999; Hassell et al., 2002; SundarRaj et al., 1995). L'augmentation de la quantité de protéine Perlecan, spécialement dans les zones adjacentes à la lésion principale, pourrait être vue comme un effort de la part du tissu cartilagineux de compenser pour la perte rapide de d'autres molécules de la matrice comme l'aggrécan (Poole et al., 1993).

1.4 La famille des Pitx

Pitx signifie «pituitary homeobox transcription factor» (Lanctot et al., 1999; Picard et al., 2007). La famille des Pitx comporte trois membres soit, Pitx1, Pitx2 et Pitx3 (Lanctot et al., 1999; Picard et al., 2007). Les membres de cette famille ont des propriétés transcriptionnelles similaires et reconnaissent la séquence consensus TAATCC et TAAGCC qu'ils lient sous forme de monomère (Kolfshoten et al., 2005; Lamonerie et al., 1996) mais leur patron d'expression et leurs rôles dans le développement sont différents (Drouin et al., 1998a; Drouin et al., 1998b). En effet, tandis que Pitx1 est exprimé, durant le développement, au niveau des membres inférieurs et de la mandibule et qu'il joue un rôle important dans le développement squelettique, Pitx2 est exprimé seulement du côté gauche au niveau des membres inférieurs et est impliqué dans le développement asymétrique de certain organe comme le cœur, l'estomac et l'intestin (Lanctot et al., 1999; Ryan et al., 1998). Puisqu'il y a chevauchement d'expression de Pitx1 et Pitx2 au niveau du membre inférieur gauche, il serait vraisemblable que ce soit pour cette raison que ce membre est moins atteint lors d'une inactivation du gène pitx1 (Lanctot et al., 1999). Pitx3 est, quant à lui, impliqué dans le développement oculaire (Semina et al., 1998; Shi et al., 2005) et joue un rôle aussi au niveau du mésencéphale pour le maintien des neurones dopaminergiques (Ardayfio et al.; Hwang et al., 2009). Une mutation de Pitx3, que ce soit par une insertion qui produit un changement du cadre de lecture (frame shift) ou encore par la substitution d'une sérine par une asparagine, conduit au développement de cataractes (Semina et al., 1998). Ces facteurs de transcription, lors de leur liaison au site consensus TAATCC, peuvent entraîner une activation de la transcription (Drouin et al., 1998a; Drouin et al., 1998b; Lanctot et al., 1997) ou une répression de la transcription (Lopez et al., 2000) en fonction du contexte du promoteur.

Des expériences menées chez des souris Pitx1 *-/-* ont démontré une croissance grandement réduite des membres inférieurs, si bien que ceux-ci ressemblent aux membres

supérieurs, suggérant que Pitx1 pourrait être impliqué dans la détermination de l'identité des membres (Lanctot et al., 1999). La chondrogenèse anormale des membres inférieurs chez ces souris démontre l'implication de Pitx1 dans le développement des os et suggère que ce facteur de transcription est impliqué dans la prolifération, la différenciation et/ou la signalisation du mésenchyme des bourgeons dorsaux des membres inférieurs (Lanctot et al., 1999). De plus, l'inactivation de Pitx1 cause une hypoplasie bilatérale de la mandibule (Lanctot et al., 1999).

Le facteur de transcription Pitx1 est en mesure d'opérer une synergie avec le récepteur nucléaire orphelin SF1 dans l'activation du promoteur LH β , en formant un hétérodimère avec bHLH (NeuroD1) qui active la transcription de POMC (pro-opiomélanocortine) ainsi qu'avec le facteur POU Pit1 qui joue un rôle dans l'expression du gène de la prolactine (Szeto et al., 1996; Tremblay et al., 1998). Parallèlement, le Dr Lopez et son équipe ont découvert que Pitx1 pouvait se lier à d'autres sites que le site consensus TAATCC et que ce facteur de transcription pouvait exercer une répression au lieu d'une activation en étudiant la répression du promoteur de l'interféron A induit par un virus (Lopez et al., 2000). Les autres séquences, ou sites consensus, que Pitx1 est en mesure de reconnaître sont : TAAGTC, TAATTT, TAAGTG, TAAGTA et TAAGCC (Lopez et al., 2000).

1.5 Implication de Pitx1 dans l'ostéoartrite

Pitx1 est impliqué dans le développement du cartilage (chondrogenèse) et la perte de Pitx1 perturbe la différenciation des chondrocytes articulaires (Lanctot et al., 1999). Le Dr Moreau et son équipe ont tenté de déterminer si le facteur de transcription Pitx1, qui est essentiel durant le développement, est important dans le maintien de l'homéostasie du cartilage à l'âge adulte (Picard et al., 2007). Pour étudier cela, des souris sauvages âgées ont été comparées avec des souris hétérozygotes Pitx1 +/- (Picard et al., 2007). Grâce à ces expériences, ils ont été en mesure de déterminer que la protéine Pitx1 joue un rôle particulier dans le développement progressif des articulations des membres inférieurs (Picard et al., 2007) et que l'inactivation partielle de Pitx1 entraîne progressivement un épaissement anormal de l'os sous-chondral, trabéculaire et cortical des têtes de fémurs et une calcification marquée du cartilage, phénomènes présents chez les souris hétérozygotes Pitx1 +/- mais pas chez les souris sauvages (Picard et al., 2007).

Chez l'humain, l'expression de Pitx1 a été étudiée au niveau de l'ARNm et au niveau protéique dans des chondrocytes articulaires (Picard et al., 2007). L'expression de l'ARNm de Pitx1 était difficilement détectée dans les chondrocytes OA, suggérant que l'expression de Pitx1 est régulée de façon intrinsèque dans les chondrocytes OA même lorsque les cellules sont placées dans des conditions de culture favorables (Picard et al., 2007). De plus, par histologie, il a été établi que l'expression de la protéine Pitx1 était fortement diminuée et limitée aux zones plus superficielles dans les cartilages OA, lorsqu'elle était détectée (Picard et al., 2007).

Sommaire, les résultats du Dr Moreau et de son équipe démontrent, chez les souris Pitx1 +/- vieillissantes, que l'inhibition au niveau de l'ARNm et au niveau protéique de Pitx1 est associée aux signes cliniques de l'OA puisqu'une perte de fonction de Pitx1 dans le cartilage articulaire provoque une sévère calcification, l'érosion de la surface articulaire ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur des os adjacents (Picard et al., 2007).

Chez l'humain, le même groupe a démontré qu'il y a une perte d'expression de Pitx1 dans le cartilage OA des genoux (Picard et al., 2007). En effet, l'équipe du Dr Moreau a démontré que Pitx1 est normalement exprimé au niveau du cartilage sain chez les sujets témoins non arthrosiques et qu'il y a une perte d'expression de ce facteur de transcription chez les patients présentant une ostéoarthrite primaire (Picard et al., 2007). De plus, de récents travaux ont démontrés que le polymorphisme de Pitx1 *rs479632* serait présent chez plusieurs patients OA, bien qu'un lien entre ce polymorphisme et l'OA n'ait pas été établi (Fan et al., 2010; Picard et al., 2007). Parallèlement, il a aussi été démontré que Pitx1 est en mesure de régénérer les membres, antérieurs et postérieurs, des axolotls (Shimokawa et al., 2008). Pitx1 est donc un facteur de transcription essentiel sous plusieurs aspects.

1.6 Lien entre Pitx1 et Perlecan dans l'ostéoarthrite

L'équipe de Dr Moreau a découvert qu'il y a une perte d'expression de Pitx1 dans l'ostéoarthrite (Picard et al., 2007). Des expériences préliminaires ont aussi suggéré un lien plus direct entre Perlecan et Pitx1. Des expériences en immunofluorescence conduites sur des bourgeons de croissance des membres de souris cultivés jusqu'à obtenir des chondrocytes matures ont permis de déterminer que Pitx1 pourrait agir comme régulateur négatif du gène HSPG2 qui code pour Perlecan (Moreau et al, données non publiées, figure 2). En effet, lorsque des anticorps contre Perlecan sont utilisés, les chondrocytes qui expriment normalement Pitx1 (souris « wild type ») ont des niveaux de Perlecan normaux (figure 2). Parallèlement, les chondrocytes exprimant la moitié de la quantité normale de Pitx1 (souris hétérozygotes) démontrent une légère augmentation de la quantité de Perlecan (figure 2). Finalement, en absence de Pitx1 (souris « KO »), il y a une surexpression de Perlecan de façon très notable (figure 2).

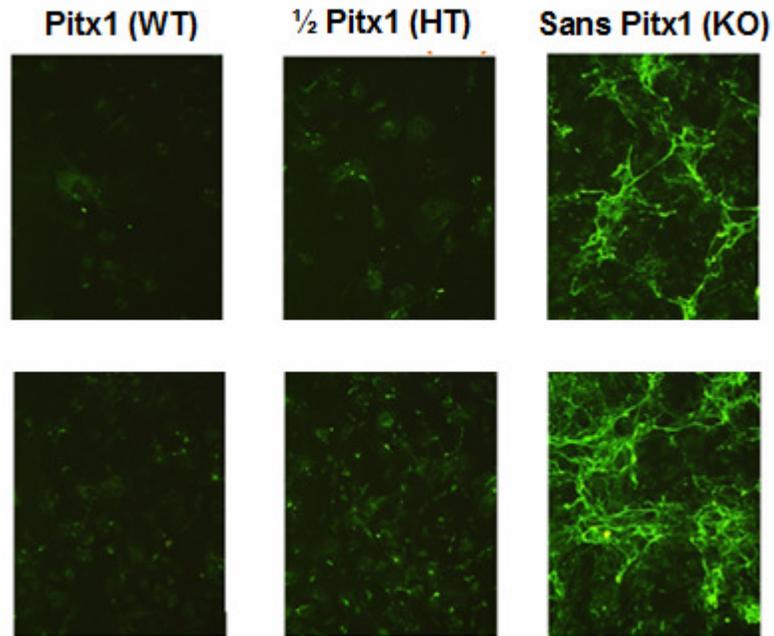


Figure 2. Immunofluorescence avec un anticorps contre Perlecan sur des chondrocytes matures exprimant Pitx1 normalement (Pitx1), à moitié (1/2 Pitx1) et n'exprimant pas Pitx1 (sans Pitx1). (Moreau et al, données non publiées obtenues par le Dr Alain Moreau). Chondrocytes matures obtenus à partir de bourgeons de membres de souris « wild type » (WT), hétérozygotes (HT) et « KO » (KO).

1.7 Partenaires possible de Pitx1

Le facteur de transcription Pitx1 est connu comme un activateur transcriptionnel dans la majorité des cascades régulatrices où il est présent. En effet, Pitx1 et Pitx2 sont en mesure de réguler la transcription de LH β (Luteinizing hormone subunit) en synergie avec les facteurs de transcription SF1 et Egr1 en formant des hétérodimères et aussi de façon indépendante (homodimère ou monomère) (Fortin et al., 2009; Melamed et al., 2002; Quirk et al., 2001; Tremblay et al., 1999). Suite à l'expression de Egr1 stimulée par GNRHI, Egr1 agit avec SF1 et Pitx1 afin de stimuler la transcription de LH β (Fortin et al., 2009; Quirk et al., 2001; Tremblay et al., 1999). Pour ce faire, il y a liaison de ces éléments sur le promoteur de LH β qui contient un site de liaison Pitx1 situé entre les sites tandem Egr1/SF1 (Fortin et al., 2009; Jorgensen et al., 2004).

Par ailleurs, les travaux du Dr Johnston ont démontré que Pitx1 est fortement exprimé dans le *pars tuberalis* (PT) ovin et que ce facteur de transcription stimule l'activité du promoteur du récepteur de la mélatonine MT₁ lors d'expériences de transfections (Johnston et al., 2007). Des co-transfections effectuées avec Pitx1 et Egr1 ont démontré une inhibition de la stimulation du récepteur de la mélatonine MT₁ produite par Pitx1 et parallèlement, une augmentation de l'activité du promoteur LH β (Johnston et al., 2007).

Il a aussi été démontré que Pitx1 augmente l'expression de p53 en se liant directement au promoteur de p53, au niveau de deux sites consensus (Liu and Lobie, 2007). Il est clairement démontré que p53 est un gène suppresseur de tumeur et qu'une inactivation de ce gène par mutations est présente dans 50% des cancers humains (Liu and Lobie, 2007). À l'opposé, une surexpression de la protéine p53 est impliquée dans plusieurs maladies dont le Parkinson, l'Alzheimer, l'arthrosclérose, le diabète et l'ostéoarthrite (Nayak et al., 2009). En effet, les chondrocytes ostéoarthritiques ont une expression accrue de p53 et p53AIP-1 comparativement aux chondrocytes normaux (Hashimoto et al., 2009). Plusieurs composés chimiques sont à l'étude pour évaluer leur potentiel à inhiber p53 et

guérir les maladies dues à une surexpression de cette protéine (Nayak et al., 2009). Cependant, il faut être prudent lors de l'inhibition de p53 puisque ce dernier agit comme suppresseur de tumeur.

Somme toute, bien qu'une augmentation de Pitx1 cause une augmentation de p53 et entraîne une augmentation de l'apoptose des chondrocytes ostéoarthritiques, un lien direct entre l'augmentation de p53 et une activation ou une inhibition de Perlecan n'a pas été démontré dans la littérature. Cependant, une augmentation de Perlecan a été démontrée dans les stades tardifs de l'OA (Tesche and Miosge, 2004) et le Dr Moreau a démontré, avec des expériences en immunofluorescence, que Pitx1 pourrait agir comme régulateur négatif de HSPG2 qui code pour Perlecan (figure 2). Donc, le lien possible entre l'augmentation de p53 et de Perlecan dans l'ostéoarthrite est fort possible mais reste à être établi.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1 Matériel

2.1.1 Culture cellulaire

Les différentes lignées cellulaires et leurs conditions de culture sont indiquées dans le tableau IV.

Tableau IV. Détails des lignées cellulaires utilisées

Lignée cellulaire	Origine	Milieu de culture
C28	Chondrocytes humains	Milieu DMEM/F-12 (1 :1) (Gibco) avec antibiotiques pénicilline 100 U/ml et streptomycine 100 ug/ml (PEN/STREP 1%, Invitrogen, Canada) et FBS 10% (Fisher, Canada)
ATDC5	Cellules mésenchymateuses de souris	Idem C28
HEK	Cellules de rein humain embryonnaires (fibroblastes)	milieu DMEM (Gibco) avec antibiotiques (PEN/STREP 1%, Invitrogen, Canada) et FBS 10% (Fisher, Canada)
MC3T3-E1	Ostéoblastes de souris dérivées de calvaria	Milieu AMEM (Gibco) avec antibiotiques (PEN/STREP 1%, Invitrogen, Canada) et FBS 10% (Fisher, Canada)

2.1.2 Solutions diverses

Les solutions utilisées lors des expériences sont listées à l'Annexe I. *Solutions diverses.*

2.2 Méthodes

2.2.1 Détails des amorces PCR et qPCR utilisées

La liste des amorces utilisées dans le cadre de ce projet, leur composition nucléotidique et les conditions expérimentales utilisées sont indiquées au tableau V.

Tableau V. Détails des amorces utilisées lors des divers PCRs

Paire d'amorces	Séquence des amorces	Fragment amplifié	Température d'hybridation
mHSPG2-4040-F mHSPG2-3344-R	5'-GATCTGGAATCAGCCGGAAAC-3' 5'-GACAAATCTCATGGCGTGAGC-3'	696 pbs	58°C pour 1 min (35 cycles) (PCR)
mHSPG2-4192-F mHSPG2-624-R	5'-GCCACAAGACACATTAC-3' 5'-CTCAAGCATCCCAACAAG-3'	3569 pbs	52°C pour 1 min (35 cycles) (PCR)
mPitx1-F mPitx1-R	5'-CCGCTGTCTACCAAGAGCTTTA-3' 5'-GGGCCGAGAACATGGATT-3'	142 pbs	55°C pour 30 sec (45 cycles) (qPCR)
mHSPG2-12944-F mHSPG2-13125-R	5'-GAGAGGCTCCATCCAAGTAG-3' 5'-CCGTGTGCAACACCAGATTC-3'	182 pbs	55°C pour 30 sec (45 cycles) (qPCR)
mp53-1201-F mp53-1340-R	5'-GGATGCCCATGCTACAGAGG-3' 5'-GCAGAGGCAGTCAGTCTGAG-3'	140 pbs	55°C pour 30 sec (45 cycles) (qPCR)

L'appareil T3 Thermocycler de Biometra® (Allemagne) a été utilisé pour les PCR et l'appareil Mx3000P™ de Stratagene (États-Unis) a été utilisé pour les analyses en qPCR.

2.2.2 Amplification de la librairie génomique

La librairie originale (offerte généreusement par le Dr. René St-Arnaud, Hôpital Shriners pour Enfants, Montréal, QC, Canada) contient des fragments d'ADN génomiques murin 129/SvJ insérés dans les sites XhoI du vecteur Lambda Fix II (figure 3) et avait un titre initial de 8×10^9 PFU/ml.

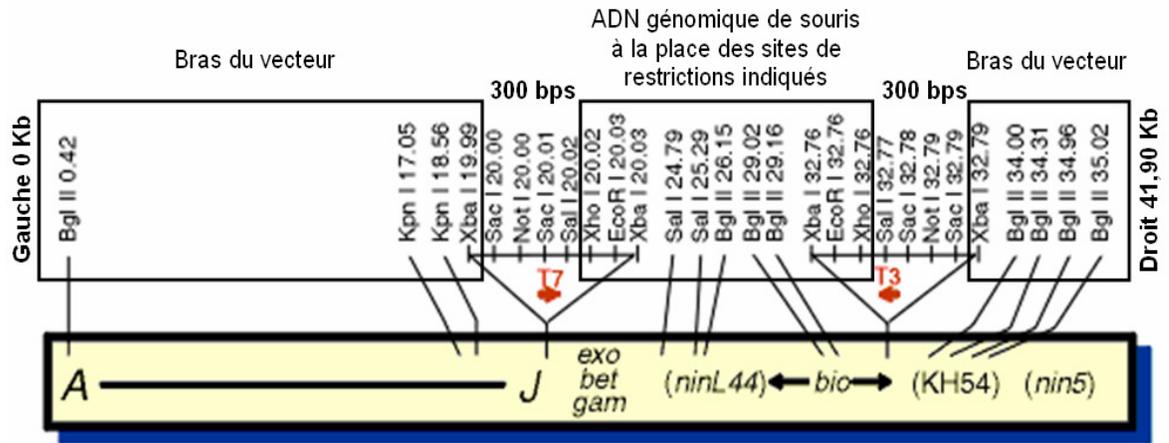


Figure 3. Carte de restriction du vecteur Lambda FIX II.

Adapté du manufacturier Stratagene

Des bactéries compétentes à l'infection ont été préparées de la façon suivante : 2 μ l de bactérie XL-1 blue MRA (Stratagene) ont été ajoutés à 50 ml de milieu LB contenant 10 mM de $MgSO_4$ et 0,02% de maltose puis la culture a été incubée à 37°C durant toute la nuit sous agitation. Le lendemain, la culture a été centrifugée durant 15 minutes à 747 x g, puis les culots ont été égouttés. Un des culots a été resuspendu dans 15 ml de $MgSO_4$ 10 mM jusqu'à obtenir une $DO_{600} = 0,5$ puis l'autre culot a été resuspendu dans 15 ml de NZY/Maltose (concentration finale de maltose 0,2%) jusqu'à l'obtention d'une $DO_{600} = 0,2$.

Le titrage a été effectué en faisant des dilutions sériées de la librairie de phage Lambda Fix II dans du tampon SM. Un aliquot de 10 μ l des dilutions de la librairie a été ajouté à 200 μ l (ou 600 μ l pour les grands pétris) de bactéries compétentes diluées dans le $MgSO_4$ à une $DO_{600} = 0,5$. Les tubes ont été placés dans l'incubateur durant 15 minutes à 37°C pour permettre l'adsorption des phages. Par la suite, 3 ml (ou 7 ml pour les grands pétris) de top agarose fondu puis refroidi à 50-55°C ont été ajoutés dans les tubes à culture puis ont été mélangés et versés rapidement au centre du pétri préalablement réchauffé à

37°C. Suite au durcissement du top agarose (quelques minutes), les pétris ont été placés dans l'incubateur à 37°C, en position inversée, durant toute la nuit. Le lendemain, les plages de lyse ont été comptées afin de déterminer la concentration réelle en PFU/ml de la librairie.

Dans le but d'amplifier la librairie, 24 ml de bactéries diluées dans le NZY/maltose 0,2% à une $DO_{600} = 0,2$ ont été infectés avec l'équivalent de 6×10^5 PFU. La culture a été placée dans l'incubateur à 37°C pendant 10 minutes. Ensuite, les bactéries infectées ont été réparties dans 24 tubes de culture afin de créer des sous-librairies amplifiées séparément. Les sous-librairies ont été incubées à 37°C sous agitation durant trois heures. Subséquemment, le contenu des 24 tubes a été transféré dans 24 tubes à microcentrifuge et trois gouttes de chloroforme ont été ajoutées afin des lyser les bactéries. Les sous-librairies génomiques amplifiées ont été conservées à 4°C. L'amplification obtenue est théoriquement de 40 000 fois et permet d'obtenir une concentration finale de 10^9 PFU/ml ce qui permet une détection facile par PCR des clones positifs pour une séquence donnée. Un titrage a été effectué afin de vérifier que la concentration finale réelle des sous-librairies amplifiées était celle attendue.

2.2.3 Criblage des sous-librairies

Le « lifting » des plaques de lyses a été effectué selon la méthode standard décrites par Sambrook et Russell (Sambrook and Russell, 2001). Les membranes de nylon Hybond (Amersham) ont été utilisées ainsi que les solutions « Southern dénaturant », « Southern neutralisant » et SSC 2X. Ensuite, les filtres ont été hybridés avec la sonde radioactive selon un protocole standard (Sambrook and Russell, 2001). Dans ce protocole, la solution « Church buffer » a été utilisée pour la pré-hybridation et l'hybridation avec la sonde radioactive de 696 pbs (fabriquée avec le Kit « Prime-it Random Primer labeling Kit » de Stratagene et purifiée avec le kit « Illustra Probe Quant G-50 microColumns » de

GeHealthCare). Une solution de lavage à astringence moyenne (1% SDS; 140mM NaPhosphate pH 6.8) a été utilisée pour les lavages.

Le prélèvement des plages de phages, la préparation de stocks concentrés de bactériophages et la purification d'ADN des bactériophages λ après lyse par protéinase K et SDS ont été effectués en suivant les protocoles standards (Sambrook and Russell, 2001).

2.2.4 Enzymes de restrictions et réactions PCR

Les enzymes de restrictions EcoRV, KpnI et XhoI ainsi que la polymérase I (Klenow) et la polymérase T4 provenaient de Invitrogen (États-Unis). Les enzymes de restrictions SfiI et MluI provenaient de Fermentas (Canada). Les enzymes et kits PCR ont été utilisés selon les instructions du manufacturier.

2.2.5 Insertion de fragments de promoteur de Perlecan dans le plasmide pGL4basic-Luc

Les ligations ont été effectuées selon le protocole du manufacturier Fermentas avec le kit T4 DNA ligase ou selon le protocole de New England Biolab avec le kit de ligation rapide. Subséquemment, la transformation du plasmide pGL4basic-Luc+insert a été effectuée d'après un protocole standard (Sambrook and Russell, 2001).

2.2.6 Co-transfection transitoire de cellules à la lipofectamine 2000

Les cellules ont étéensemencées à une densité 135 000 cellules/puits dans des boîtes de 6 puits, 24 heures avant la transfection. Pour chaque transfection, 150 ng du plasmide LacZ (β -gal) (contrôle), 250 ng du plasmide luciférase (pGL4 ou pGL4-mHSPG2), 100 ng à 500 ng du plasmide d'expression de Pitx1 (pSI-mPitx1) et une quantité variable de plasmide pBlueScript ou pSI (pour standardiser la quantité totale de plasmide dans chaque puits) ont été utilisés. Un mélange de 5 μ l de Lipofectamine/puits et de 45 μ l de milieu Opti-MEM/puits a été incubé durant 5 minutes à température pièce avant l'addition des plasmides. Le mélange lipofectamine/Opti-MEM/plasmides a ensuite été

incubé durant 20 minutes à température pièce avant d'être ajouté à 750 μ l de milieu Opti-MEM par puits. Suite à une incubation de 3 heures à 37°C, la solution de transfection a été remplacée par 1 ml de milieu de culture frais. Les plaques ont été placées à l'incubateur pour 24 ou 48 heures (selon le type cellulaire) avant de lyser les cellules. Les cellules ont été lysées dans du tampon Glow-Lysis (Promega) suivant les instructions du fabricant. L'activité luciférase a été lue dans une plaque de 96 puits opaque en plaçant 30 μ l/puits des lysats cellulaire et une quantité équivalente de solution de luciférine. Lors de la lecture β -gal, 30 μ l/puits des lysats cellulaires ont été placés dans une plaque de 96 puits transparente et 30 μ l/puits du mélange de tampon 1X/ONPG ont été ajoutés avec le multipipetteur. Suite à une incubation de 5 minutes, l'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 405nm. Les expériences ont été effectuées selon les paramètres du fabricant *Molecular Devices Corporation* présentés dans le manuel *Lmax® Operator's Manual*. Le respect de ces paramètres permet de s'assurer que les valeurs mesurées se trouvent dans les limites de la courbe de calibration.

2.2.7 Calculs et statistiques pour l'élaboration des graphiques de transfections transitoires

Pour chaque expérience, quatre réplicas d'une même condition ont été effectués. Les résultats obtenus ont été normalisés en divisant la valeur en luciférase obtenue par la valeur en β -galactosidase (standardisation pour l'efficacité de la transfection). Par la suite, la moyenne des valeurs luciférase/ β -gal obtenues a été calculée et la condition pGL4 (vecteur sans insert et sans ajout de Pitx1) a été arbitrairement placée à 1.0. Les expressions relatives (fold change) des autres conditions ont été obtenues en divisant chaque valeur luciférase/ β -gal par la moyenne des valeurs luciférase/ β -gal de pGL4. Ensuite, les écarts types ont été calculés. Finalement, des tests t de Student ont été effectués en comparant les valeurs obtenues avec pGL4 et pGL4-pitx1-300 ng, pGL4-pitx1-300 ng et pGL4-pitx1-600 ng. Les mêmes comparaisons ont été effectuées pour les constructions contenant différentes régions des promoteurs *versus* mHSPG2. Des tests t de Student ont aussi été

effectués entre les mêmes conditions du vecteur pGL4 et de vecteur avec insert pGL4-mHSPG2.

2.2.8 SYBR Green qPCR

Les qPCR ont été effectués avec le kit « QuantiTect SYBR Green PCR Kits » de Qiagen sur des ARN totaux isolés d'ostéoblastes en culture et directement de fémurs de souris sauvages (WT) et transgéniques (TG) qui surexpriment Pitx1 via le promoteur de Col1 α 1 (Rossert et al., 1995).

2.2.9 Calculs pour la quantification relative (RQ) de l'expression par qPCR

Les données mesurées en qPCR (ct ou « cycle-treshold ») pour mPitx1, mHSPG2 et mp53 ont été normalisées par soustraction des « ct » obtenus pour la β -actine ce qui a permis d'obtenir les valeurs « Δ ct » (delta-ct). Pour les ostéoblastes, les données des échantillons WT à un temps donné (jour 0 ou 21) ont été utilisées comme calibrateurs dans le calcul des « $\Delta\Delta$ ct » (delta-delta-ct). Pour les fémurs, une moyenne des WT et une moyenne des TG ont été effectuées puis, la moyenne des WT a été utilisée comme contrôle dans le calcul des « $\Delta\Delta$ ct ». Finalement, les quantifications relatives (RQ ou relative quantification) ont été calculées avec la formule $2^{(-\Delta\Delta ct)}$. Les WT ont donc un RQ de 1.0 qui est la valeur de base arbitraire établie. Puisque cette expérience n'a été faite qu'une seule fois, la signification statistique des différences observées n'a pu être calculée.

Chapitre 3. Résultats

3.1 Analyse *in silico* des sites potentiels de reconnaissance de Pitx1 sur le promoteur du gène codant pour Perlecan

En plus du site consensus TAATCC que Pitx1 reconnaît et lie sous forme de monomère (Lamonerie et al., 1996), cinq autres sites potentiels peuvent être reconnus par ce facteur de transcription, soit TAAGTC, TAATTT, TAAGTG, TAAGTA et TAAGCC (Lopez et al., 2000). Quatre de ces sites consensus ont été identifiés dans la séquence du promoteur proximal du gène murin utilisée pour les constructions dans le vecteur pGL4basic-Luc (figure 4). Le site initiateur de la transcription (TSS) n'a pas encore été identifié mais une analyse *in silico* utilisant l'application « Neural Network Promoter Prediction » (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) suggère que le site le plus proximal serait à la position -238 pbs par rapport à l'ATG. Ni la séquence référence de l'ADNc pleine longueur (NCBI) ni aucun des EST (expressed sequence tags) disponibles pour le gène humain ou murin ne contiennent de séquence en amont de 70 pbs en 5' de l'ATG.

tcgggcgtgg tggcacacgc ctgaaatccc aacacttggg aggcagaggg agacagattt gagtctgagg ccagcctggt ctacagagtg agttccagga
 agcccgcacc accgtgtgcg gacactaagg ttgtgaaccc tccgtctccg tctgtctaaa ctcaagctcc ggtcggacca gatgtctcac tcaaggctcc
 TAAATCC -2993 de ATG

cagcctggaa ctacacagag aaacctgtc tcgaaaaaac aacaaaaaac aaaaaacaaa aacaaaacaa caacaacaaa acaaaaaaac acaaaaaag
 gtccgaccct gatgtctctc ttggggacag agcttttttg ttgttttttg ttttttgttt ttgtttttgt ttgtttttgt ttgtttttgt ttgtttttgt

aaataataac agagctaagc acggttacac gagtctgaa tccaggaag cagggaggtt gtgagttcaa agccagactg agctacatat cagaagttaa
 tttattattg tctcgattcg tgccaatgtg ctacagactt aggtctcttc ctccctccaa cactcaagtt tccgtctgac tccgatgata gtcttcaatt
 TAAATCC -2779 de ATG

agtattaaga gagtaccac ttcccttcta tttagtgtta gctatgtgcc tccccctccc cttttttctt cttttgagac aagatcttag gtatgttcaag
 tcataattct ctactctggt aaggaaggat aaatcacaat cgatacacgg agggggaggg gaaaaaagaa gaaaactctg tcttagaatc catcaagttc

ctgggtttga atttatggca atccctcccgt ctacgctccc caagttccgg gattctagga aagtaccact catttctatg gtgctgggga tcaaacccag
 gacaaaaact taaataccgt taggagggca gagtctgaag ttcaaggccc ctaagatccc ttcattgggta gtaaaagata cagacaccct agtttgggtc

gactgtatgt tatgctatgc aagcactcta ccattgaact acatctccag cttttgaact tcctttaaga atatttattt taccttcagt tgtgtgtatg
 ctgacataca atacgatacg ttctgtgagat ggtaacttga tgtagaggtc gaaaacttga aggaaattct tataataaaa atggaagtca acacacatac

tgggggggat tacacaggag tgtagcacc tcagatgtgt catatcccc agatctggag ttacaggagg ttgtgagctg ccaagtatgg gtgctggggg
 acccccctac atgtgtctct acatcgtggg agtctacaca gtataggggg tctagacctc aatgtctccc aacactcgac ggttcatacc caagcctccc

gaaagcccag gctccctgta aaagatcatt gtttaagcag catatgtgtg gcggtcagag gacaactttg gggagttggt tctcttctac cttttagga
 cttccgggtc cgagggacat ttctagtaa caaattctgc gtatacacac cgccagtctc ctgttgaac cctcaacca agagaagatg gaaacatcct

cccagagata gactctgat ctcaagttct cagactcggg gatcaagttc cctacctgct gagccgttcc tctggcctga cgtctcttcc tttcttctt
 ggtctcttat ctccagacta gagtccaaga gtctgagcca ctatccacag ggatggacga ctccggcaaa agacccgact gcgaagaaa aagaagaaa
 TAAATG -2174 de ATG

ttttcttctc ttttcttctt ttttcttctt ttttcttctt ttttcttctt ttttcttctt ttttcttctt ttttcttctt ttttcttctt ttttcttctt
 agaaagaaag aaagaaagaa agaaagaaag aaagaaagaa agaaagaaag aaagaaagaa aaagaaagaa aaagaaagaa aaagaaagaa aaagaaagaa

cagtgtccct tagtctcat atgcacactg tgagaagggt cagcatggcc cttgcttcc tgaacggagg agacagtgga ggtgaagga tttgttccg
 gtcacaggga atcaggagta tacgtgtgac actcttcca ctctgacccg gaacgaagga cttgcctccg tctgtcaact ccgacttctt aaacaaagcc

acttcacagc tagatggtag aggcaggctt ctctgtgca ctgagaatg cagaggccag gattgtgtcc tcctttgtcc ccttttagcag aacaggggacc
 tgaagtgtcg atctaccatc tccgtccgaa gagacaactg gactcttatc gtgtctccgc ctaacacagg aggaaacagg ggaatctgct ttgtccctgg

actgaggacc acaactgggc atgccttctc tgtctgtccc atccccctgc gaggagcaga tgcaggcctt attaggtgct atgctgggag cctgggctga
 tgactcctgg tgtgacccc tacggaagag acagacaggg tagggggagc ctctctgtct acgtccggaa taatccaca tacgaccctc ggaccggact

ggccagagtg ttggcaggcc cacttggatg tactttctgc tcttcatgct atgagttggt cctcatagat tatgccaca gggcagagaa gagcccagtc
 ccggtctcac aaccgtccgg gtgaacctac atgaaagagc agaagtacga tactcaacca gggagatca atacgggtgt cccgtctctt ctccgggtcag

ttttggagat ggtgtctctg tggaaatagg tcaggatgct agtgtttct caggtcccca agtgtctggc tcctatcaga gagaacatac tttccggaca
 aaaaactcta ccacagagac accttatccc agtctacag tcacaaaaga gtcagggggt tcacagaccg aggatagttg ctcttgtatg aaaggcctgt

gggtctggcg cattcagtga actgggcatc tcctctctgc cacagcccac ctaactcctg gctgcaaagt ctgctaggag tttctggaa cctagcaact
 cccgaccgcg gtaagtcaat tgaccctgaa aggaagacag gtgtcgggtg gattgaggac cgacgtttca gacgatctcc aaaagacctt ggatcgttga

cacaggaaac aatggaaact tgggtttgta ttttttctc cctctatcat cactcaaagg gttttctca aaggcacaca catactttag ttatttttct
 gtgtcctttg ttaccttga acccaaacat aaaaaaagag ggagatagta gtgagtttcc caaaaggagt ttccgtgtgt gtatgaagtc aataaaaaaga

ctccaccat tagcctgggg cttcctggaa attttcagtc aaaaaaaggg gaccctgggt aggtggtaaa gacacacccc agctccagge ttgtgtgtct
 gaggtgggta atcggacccc gaaggacctt taaaagtcag ttttttccc ctgggaccca tccaccattt ctgtgtgggg tccaggtccg aacacacaga

gcccctggga tgcagcagg ttgcctcaat gccagtgact tggcaagaac acctgagact gaggctctgg aagagccttg tctgaacctg ggtatacaaa
 cggggaccct acgtctctcc aacggagtta cggctcactga acctctctg tggactctga ctccgagacc ttctcggaac agacttgac ccatatgttt

gtgatacatc tctgggactg atgtatgtga atcagagtg gtctatgagt gattcagatc gtctgtggca taggggtagg agcaccatct tgtccagtat
 cactatgtag agaccctgac tacatacact tagtctcacc cagatactca ctaagtctag cagacaccgt atccccatcc tctgtgtaga acaggtcata

cagcactggt gatgaatgtg tggaggaaaa atgtagaaca tataggctgt tgagtgtgtg aaaaagcaca caagccttag cacaaaaatg gtgaggaact
 gtgctgtacc ctacttacac acctcctttt tacatcttgt atatccgacc actcacacac tttttctgtg atctcggatc gttgtttaca cactccttga
 TAAATCC -946 de ATG

ggggtgtgtga ttgggtgtgt atccagacta gagagagaac tcagtgggaa gagatatttg ccacaaagct ctgttacctg agttggatcc cggaaaccac
 cccacacact aaccacacac taggtctgat ctctctcttg agtcaccctt ctctataaac ggtgtttcga gacaatggac tcaacctagg gccttgggtg

atgctaggag accattactt tccaaaaac ctctgagctc cacatgtgca ctggggcatg tatgtaggcg cacgcgcgcg cgcgcgcgca cacacacaca
 tacgatcctc tggtaaatgaa aggttttggg gagactcgag gtgtacacgt gaccctgtac atacatccgc gtgcgcgcgc gcgcgcgctg gtgtgtgtgt

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cagaggtaca gaaaaacaaa acaataaata aaagccactt tatagcttgt tgggatgctt gagtctgtag
 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtctccatgt cttttgtttg tghtatttat tttcgggtgaa atatcgaaca acctacgaa ctccagacac

```

aaaggtaaac aaaaaggtaa acaggtacat ggagtgatg tgagcagctg agtgcacgt agatccccct ctctcgaaaa ctgctgtgca ctccgtgtgg
tttccatttg tttttccatt tgtccatgta cctcacctac actcgtcgac tcacgtacac tctaggggga gagagctttt gacgacacgt gaggcacacc

agcacgtggg gtgaaggagc ggcgtgtgcg gagggtcga ggcctgcca ggtggcgtct cagtcctatc ccacactcca agccacgtct ggcgtggagc
tcgtgcacca caacttctcg ccgcacacgc ctccccgagct cggggacggt ccaccgcaga gtcaggatag ggtgtgaggt tcggtgcaga ccgcacctcg

cggttggggc tcateccaca tcgaggggga ttggggccca gacaaaggca cagtcggcgc cgccgctcct ccagagagcc tagctcggcg ctaggaggcg
gccaacccgg agtaggggtg agtccccct aacccccggt ctgtttccgt gtcagccggc gccggcagga ggtctctcgg atcgagcgc gatcctccgc

ggggcccgcc ctgagggggc ggggcccagg cttgttaggg gcgtggtcta tatggtcagg acgcgttgc tcggggggcg aacctggtct tgtgggggtg
ccccggcgcc gactccccgc ccccggtcca gaacaatccc cgcaccagat ataccagtcc tgcgcaacgg agccccgc ttggaccaga acaccacaca

ggctaaatgt ttggaggtgg ggcctagggc tcctgaactt ggcgcctcgg gggcggagcc ggagaccgg gggcggggcg tgcacgggag ggcggggagc
ccgatttaca aacctccacc ccggatcccc aggacttgaa ccgcggagcc ccgcctcgg cctctgggccc cccgccccgc acgtgccctc ccgcccctgc

ggagttggtt ggggggtgg ggggtgggaa agagggcagc agtccgaagg actcggcagg acagcgagct ggtggctcgc ggagggccc agcgagccag
cctcaaccaa cccccccacc ccccaccctt tctccgctcg tcaggcttcc tgagccgtcc tgtcgtcga ccaccgacgc cctccgccc tcgctcggtc
                                                                                                     ARNm

cgaacgaggg cggggcattg ggcagcgggc agtgggctcg ttgctgctgg ggcctgctgt gcacgcggcg ctgctagcgg tgagtttgcg tgaccgaggg
gcttgcctcg gccccgtacc ccgtcgcccc tcaccggagc aacgacgacc ccgacgacga cgtgcccgcc gacgatcgcc actcaaacgc actggctccc
ATG

```

Figure 4. Sites consensus de Pitx1 sur la séquence promotrice du gène murin codant pour Perlecan (dans la partie ayant été insérée dans les constructions). Présence d'un site TAAGCC à -946 pbs de l'ATG, d'un site TAAGTG à -2174 pbs de l'ATG et de deux sites TAATCC à -2779 pbs et -2993 pbs de l'ATG. La séquence 5'UTR présente dans la séquence de l'ADNc (NCBI) est surlignée en jaune.

3.2 Constructions du promoteur de Perlecan murin dans le vecteur d'expression pGL4basic-Luc

Dans le but d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes qui régulent la transcription normale et pathologique du gène HSPG2 qui code pour Perlecan, deux stratégies ont été utilisées pour isoler la région immédiatement en amont du gène HSPG2 de souris (mHSPG2).

Des paires d'amorces permettant d'amplifier par PCR de longs fragments situés dans la région en amont de mHSPG2 ont été générées à partir de la séquence de référence (banque de données NCBI, NM_008305.3). Plusieurs essais ont été effectués avec une variété d'amorces dans des conditions différentes pour amplifier le promoteur proximal de HSPG2 à partir d'ADN génomique de souris C57Bl/6. Aucune de ces tentatives n'a été fructueuse. Les raisons de l'échec de ces tentatives sont inconnues bien qu'il soit possible que la séquence GC riche rende difficile l'appariement des amorces. Ce problème d'appariement a d'ailleurs été rencontré lors de l'obtention de constructions avec de plus petits fragments du promoteur de Perlecan. La région d'intérêt a donc été isolée à partir de sous-librairies amplifiées d'ADN génomique murin (Lardelli and Lendahl, 1994). La librairie originale contient des fragments d'ADN génomiques murin insérés dans les sites XhoI du vecteur Lambda Fix II (figure 3).

Des paires d'amorces permettant d'amplifier par PCR de courts fragments situés dans la région en amont de HSPG2 ont été générées à partir de la séquence de référence (banque de données NCBI, NM_008305.3). Un PCR a été effectué avec la paire d'amorces mHSPG2-4040-F/mHSPG2-3344-R sur les 24 sous-librairies afin d'identifier celles contenant la région située à environ 4 kpbs en amont de l'ATG de HSPG2. Ceci a permis l'amplification d'un fragment de la taille attendue de 696 pbs pour les sous-librairies #3, #6, #8, #9, #10, #11, #17, #19, #20 et #22 (figure 5).

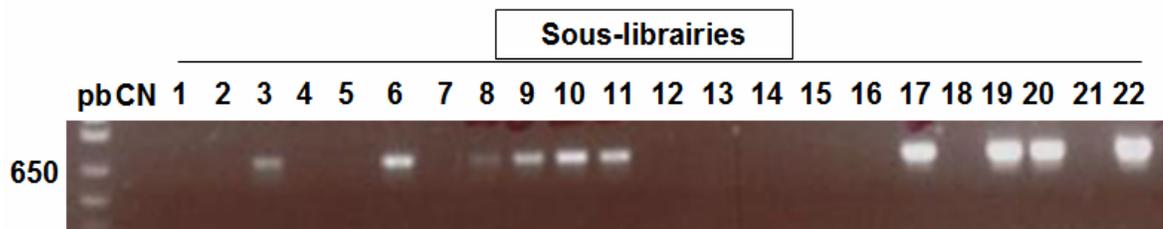


Figure 5. PCR avec les amorces mHSPG2-4040-F/mHSPG2-3344-R sur 24 sous-librairies d'ADN génomique de souris. Amplification d'un fragment de 696 pbs dans les sous-librairies d'ADN génomique de souris #3, #6, #8, #9, #10, #11, #17, #19, #20 et #22. N.B. Les sous-librairies #23 et #24 étaient aussi négatives pour la présence de l'amplicon. pb; longueur en paires de bases, CN; contrôle négatif.

Le fragment amplifié de 696 pbs a été séquencé afin de confirmer que la région d'intérêt était bien amplifiée de façon spécifique. Une homologie de séquence de 100% avec la région théoriquement amplifiée par ces amorces (banque de données NCBI, NM_008305.3) a été obtenue.

Des plages de lyse ont été générées à partir des sous-librairies positives puis un transfert sur filtre a été effectué. Une sonde radioactive a été préparée à partir du fragment de 696 pbs. Les filtres ont été hybridés avec cette sonde radioactive afin d'identifier des clones positifs. Un clone positif a été obtenu lors du criblage de la sous-librairie #22. Deux criblages supplémentaires nous ont permis d'obtenir un clone pur.

Dans le but de sous-cloner un fragment couvrant plusieurs kpbs de séquence de la région du promoteur proximal de HSPG2, deux approches ont été utilisées. D'une part, plusieurs paires d'amorces ont été testées pour amplifier un long fragment à partir de l'ADN isolé du clone #22. D'autre part, l'ADN purifié du clone #22 a été utilisé directement dans des digestions à l'aide d'enzymes de restriction pour générer des fragments de différentes tailles.

Bien qu'un grand nombre de conditions aient été testées dans la première approche, seule la paire d'amorces mHSPG2-4192-F/mHSPG2-624-R a permis d'obtenir un fragment de la taille attendue, soit 3569 pbs. Encore ici, la séquence GC riche a semblé rendre difficile l'appariement des amorces. Donc, hypothétiquement, cette paire d'amorces a mieux fonctionné puisque la séquence est moins GC riche à ces endroits. Le fragment obtenu a ensuite été digéré avec KpnI pour générer un fragment de 3304 pbs avec une extrémité distale KpnI et une extrémité proximale franche (générée par l'utilisation du kit « Phusion HotStart »). Ce fragment a été inséré dans le plasmide pGL4basic-Luc linéarisé avec KpnI et EcoRV afin d'obtenir la construction pGL4-mHSPG2-3304pbs (7546 pbs).

Parallèlement, la deuxième approche a permis d'obtenir des fragments de poids moléculaires de 3,9 kpbs (directement en amont de l'ATG) et de 4,74 kpbs (en amont du fragment de 3,9 kpbs) par digestions enzymatiques du clone #22 avec KpnI et NcoI. Le fragment de 3926 kpbs a été inséré dans le plasmide pGL4basic-Luc linéarisé avec KpnI et NcoI pour générer le plasmide pGL4-mHSPG2-3926pbs (8090 pbs).

Dans le but de déterminer avec une plus grande précision le ou les sites sur le promoteur du gène Perlecan impliqués dans l'activation de la transcription, la construction pGL4-mHSPG2-3926pbs a été digérée avec les enzymes de restrictions KpnI et XhoI. Ces digestions ont permis de retrancher 3447 pbs de la partie distale de l'insert. La recircularisation du plasmide a permis de générer la construction pGL4-mHSPG2-479pbs (4643 pbs).

Finalement, des digestions enzymatiques de pGL4-mHSPG2-479pbs ont été effectuées avec les enzymes de restriction SfiI et MluI afin d'obtenir une construction comportant uniquement les 245 pbs directement en amont de l'ATG. La recircularisation du plasmide a permis l'obtention de la construction pGL4-mHSPG2-254pbs (4405 pbs).

La figure 6 illustre la structure des différentes insertions d'ADN génomiques murin sous-clonés dans le vecteur pGL4basic-Luc. Les constructions pGL4-mHSPG2-3926 pbs et pGL4-mHSPG2-3304 pbs contiennent les quatre sites potentiels d'attachement de Pitx1. La seconde construction ne contient pas les premiers 622 pbs situés dans la région proximale. Les constructions pGL4-mHSPG2-479 pbs et pGL4-mHSPG2-254 pbs contiennent uniquement les 479 pbs et 254 pbs les plus proximales, incluant la partie non-codante de l'exon-1 jusqu'à l'ATG de mHSPG2, ainsi que le site initiateur de la transcription (à -238 pbs de l'ATG initiateur).

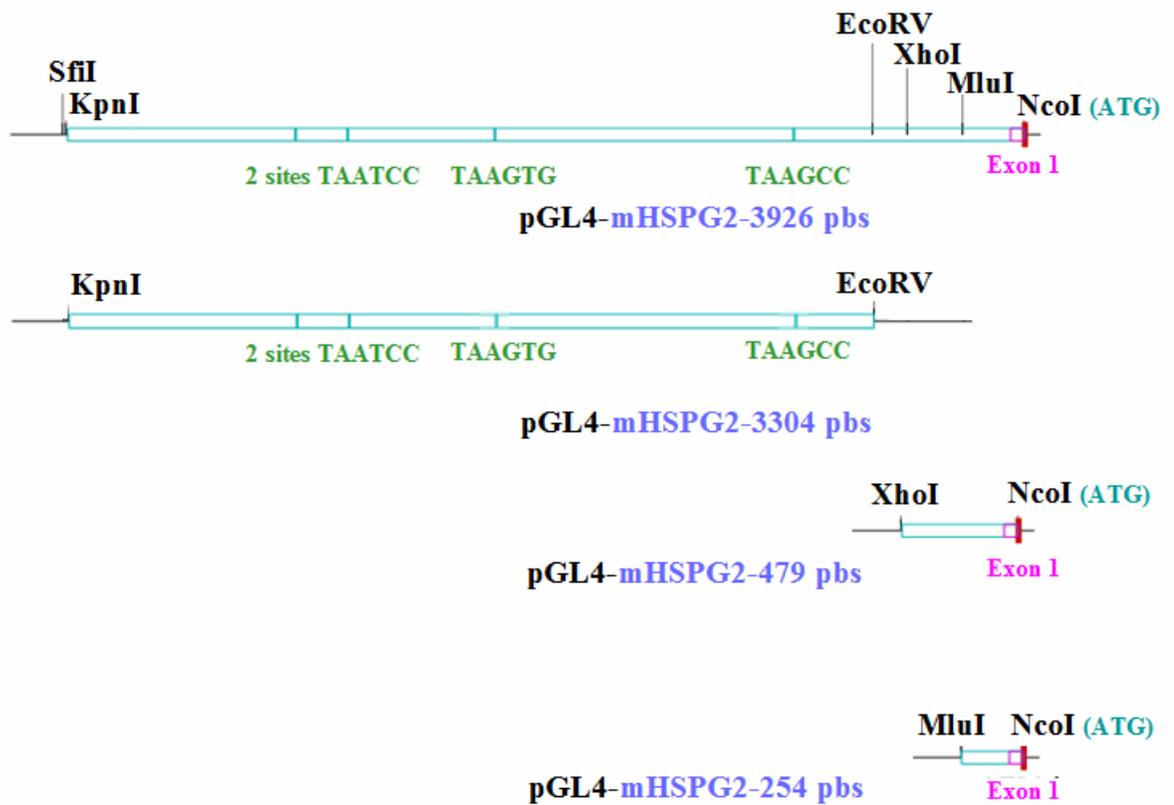


Figure 6. Constructions dans le vecteur pGL4basic-Luc par insertion de fragments de taille différentes du promoteur murin du gène codant pour Perlecan (mHSPG2). Schéma des quatre constructions pGL4-mHSPG2-3926pbs, pGL4-mHSPG2-3304pbs, pGL4-mHSPG2-479pbs et pGL4-mHSPG2-254pbs avec indication des sites consensus de reconnaissance TAATCC (-2993 pbs et -2779 pbs de l'ATG), TAAGTG (-2174 pbs de l'ATG), TAAGCC (-946 pbs de l'ATG) et des sites de restrictions utilisés lors des expériences. Indication de la position de l'exon 1 (lorsqu'applicable) et de l'ATG initiateur de la traduction de Perlecan (lorsqu'applicable).

3.3 Co-transfections transitoires dans divers types cellulaires

Des transfections transitoires à la lipofectamine 2000 (Invitrogen) des différentes constructions (dans le plasmide pGL4basic-Luc) ont été effectuées pour tester l'activité transcriptionnelle des inserts. La majorité des transfections ont été faites dans les cellules C28 (chondrocytes humains) et MC3T3 (ostéoblastes de souris), soit les types cellulaires les plus appropriés pour vérifier nos hypothèses en rapport avec l'activité transcriptionnelle du promoteur de HSPG2 (Perlecan) dans l'ostéoarthrite. Les lignées cellulaires HEK, ATDC5 et ATDC5 différenciées en chondrocytes matures ont aussi été testées dans certaines conditions.

Afin d'étudier l'influence de Pitx1 sur l'activité transcriptionnelle des inserts, des co-transfections avec les constructions et le plasmide pSI-mPitx1, contenant la séquence codante (cDNA) de Pitx1 murin sous le contrôle du promoteur SV40, ont aussi été effectuées. Des quantités variables du vecteur pSI sans insert (Promega) ont été ajoutées dans certaines transfections pour maintenir une quantité constante du promoteur SV40 dans toutes les transfections. Le vecteur pSI a aussi été testé en co-transfection avec les mêmes conditions expérimentales afin de s'assurer que pSI n'avait pas d'effet significatif sur l'expression du gène rapporteur luciférase dans le vecteur pGL4.

Des co-transfections transitoires ont d'abord été effectuées avec la construction pGL4-mHSPG2-3304pbs dans plusieurs types cellulaires avec différentes concentrations de Pitx1. Le plasmide pGL4-mHSPG2-3304pbs transfecté seul n'a pas produit d'augmentation ou de diminution significative du signal luciférase par rapport au bruit de fond (pGL4 seul) sauf dans les cellules C28 et cet effet était relativement mineur bien que statistiquement significatif. L'addition de Pitx1 (pSI-Pitx1) en combinaison avec pGL4-mHSPG2-3304pbs

a permis d'obtenir une augmentation de l'activité luciférase dans les cellules MC3T3, HEK et C28.

Les co-transfections transitoires dans les cellules MC3T3 démontrent une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'environ 2 et 5 fois lors de l'ajout de 300 ng ou 600 ng de Pitx1. Cependant, ces résultats ne sont pas statistiquement significatifs (figure 7B).

Les co-transfections transitoires dans les cellules HEK du plasmide pGL4-mHSPG2-3304pbs et de Pitx1 ont montrées une activation transcriptionnelle significative d'environ 7 et 12 fois respectivement lors de l'ajout de 300 ng ou 600 ng de pSI-Pitx1. Cependant, une augmentation significative du bruit de fond a aussi été observée lors de la co-transfection de 300 ng ou 600 ng de pSI-Pitx1 avec le plasmide pGL4 (figure 7C).

Lors des co-transfections dans les cellules C28, de fortes augmentations de l'activité transcriptionnelle du promoteur mHSPG2, d'environ 40 et 100 fois, ont été mesurés suite à l'ajout de 300 ng ou 600 ng de pSI-Pitx1 respectivement. Ici encore, une part de l'augmentation de l'activité luciférase reflète sans doute des effets non-spécifiques puisque des augmentations significatives du bruit de fond de l'ordre de 10 et 20 fois ont été observées lors de la co-transfection de pSI-Pitx1 avec le plasmide pGL4 vide (figure 7D).

Ces trois types cellulaires, MC3T3, HEK et C28 qui sont respectivement des ostéoblastes de souris, des cellules de rein humain embryonnaire et des chondrocytes humains ont permis de démontrer un patron d'expression commun, i.e. une augmentation de l'activité transcriptionnelle de la construction, qui contient quatre site de reconnaissance pour Pitx1, lors de l'ajout de 300 ng ou 600 ng de Pitx1 (figure 7B, 7C et 7D). L'activité basale de pGL4basic-Luc (bruit de fond) augmente aussi lors de l'ajout de 300 ng ou

600 ng de Pitx1. Cependant, la magnitude d'activation est supérieure lors de l'ajout de Pitx1 à la construction comparativement au vecteur vide dans les mêmes conditions. Parallèlement, la magnitude d'activation n'est pas la même entre les trois types cellulaires (C28 > HEK > MC3T3), ce qui est vraisemblablement attribuable aux facteurs tissus spécifiques (ostéoblastes *vs* cellules de rein *vs* chondrocytes) et espèces spécifiques (humain *vs* souris) présents. En effet, il est possible que les partenaires présents dans la cascade signalétique qui implique Pitx1 soient différents dépendamment du type cellulaire et que l'efficacité de ces facteurs soient plus ou moins grand, ce qui pourrait expliquer une différence de magnitude d'activation d'un type cellulaire à l'autre. Par exemple, le niveau d'expression obtenu dans les cellules C28 (figure 7D) est mieux défini et démontre la plus forte activation transcriptionnelle lors de l'ajout de Pitx1, probablement due au fait que c'est une lignée cellulaire de chondrocytes humains et donc, que les facteurs propres à la spécificité tissulaire sont présents afin de permettre la transmission du signal.

De plus, Perlecan n'est pas situé sur le même chromosome dépendamment de l'espèce. En effet, HSPG2 [homo sapiens] est situé sur le chromosome 1 (location 1p36.1-p34) (banque de données NCBI, Gene ID : 3339) tandis que HSPG2 [mus musculus] est situé sur le chromosome 4 (location 4 D3; 4 71.4 cM) (banque de données NCBI, Gene ID : 15530). Donc, il y a aussi possiblement des éléments distaux qui agissent en cis sur le chromosome, ce qui influence l'activation transcriptionnelle de Perlecan puisque certains facteurs qui contribuent à l'activation de l'expression sont peut-être spécifiques à l'espèce. Par contre, puisque le patron d'expression est le même dans les trois types cellulaires, les résultats obtenus tant avec les C28, les MC3T3 et les HEK sont valables et considérés comme tel. Cependant, puisque cette étude porte sur l'ostéoarthrite, les expériences subséquentes ont été effectuées avec des ostéoblastes de souris (MC3T3-E1) et des chondrocytes humains (C28).

Les co-transfections transitoires effectuées dans les cellules ATDC5, qui sont des cellules mésenchymateuses de souris, et les cellules ATDC5 différenciées en chondrocytes matures (différenciation *in vitro*) n'ont pas permis d'obtenir un patron d'activation similaire aux autres types cellulaires utilisés. Des facteurs tissus spécifiques ont possiblement permis une augmentation de l'expression en présence de Pitx1 dans les MC3T3, les C28 et les HEK en intervenant dans la cascade signalétique de Pitx1 (encore méconnue) et ces facteurs sont vraisemblablement absents dans les cellules ATDC5 ce qui empêche l'activation de la transcription par Pitx1. Les ATDC5 différenciés en chondrocytes matures ont été différenciés *in vitro* et certains facteurs transcriptionnels présents *in vivo* dans les chondrocytes sont possiblement absents ce qui expliquerait que Pitx1 n'a pas ou peu d'effet lorsque la construction est co-transfectée avec Pitx1 dans ce type cellulaire.

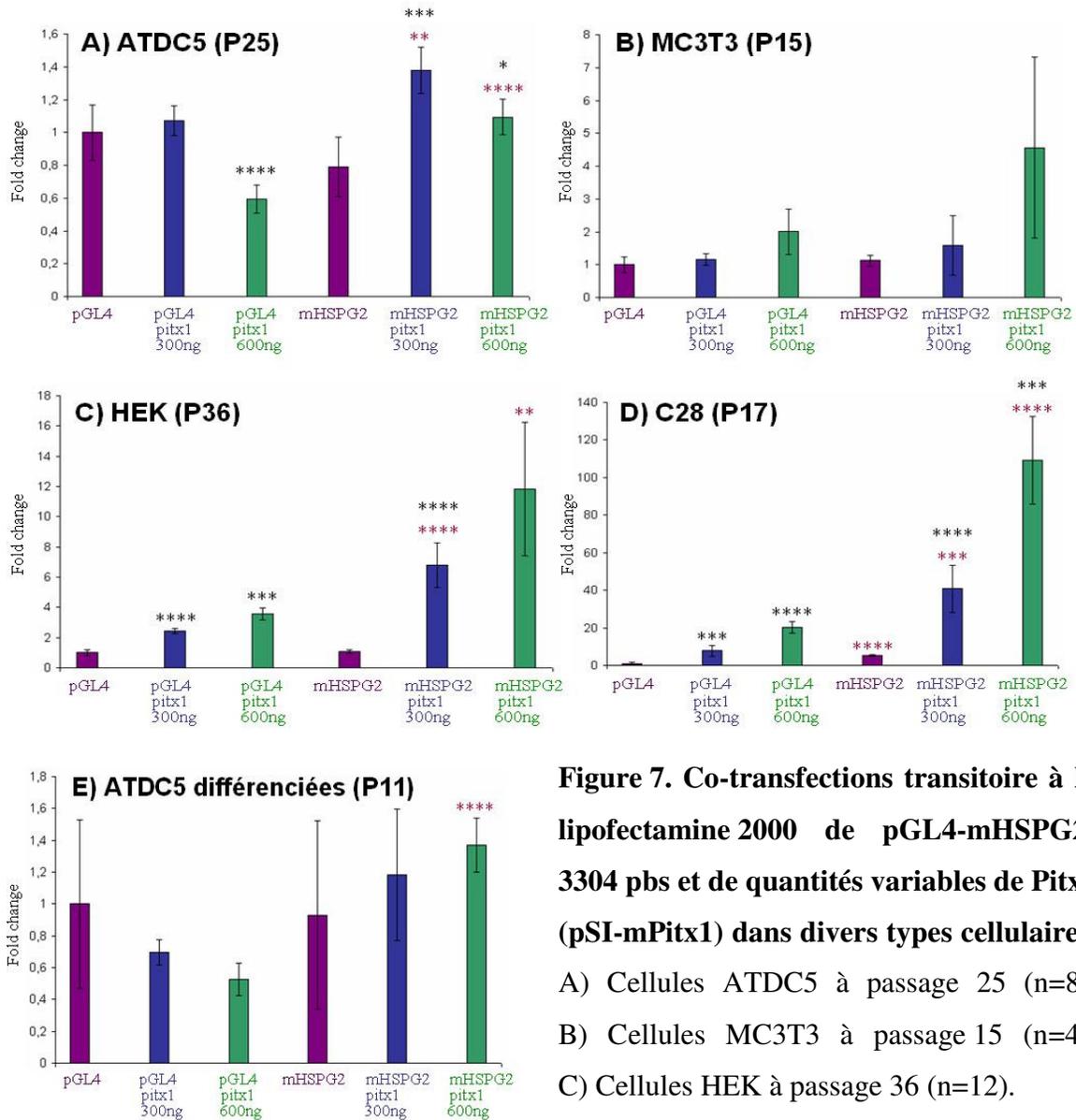


Figure 7. Co-transfections transitoire à la lipofectamine 2000 de pGL4-mHSPG2-3304 pbs et de quantités variables de Pitx1 (pSI-mPitx1) dans divers types cellulaires.
 A) Cellules ATDC5 à passage 25 (n=8).
 B) Cellules MC3T3 à passage 15 (n=4).
 C) Cellules HEK à passage 36 (n=12).

D) Cellules C28 à passage 17 (n=12). E) Cellules ATDC5 différenciées en chondrocytes matures à passage 11 (n=4). Les lysats cellulaires ont été effectués 48 heures post-transfection. Astérisques noirs : test t de Student entre pGL4 et pGL4-pitx1-300ng, pGL4-pitx1-300ng et pGL4-pitx1-600ng et idem pour mHSPG2. Astérisques rouges : test t de Student entre les mêmes conditions du vecteur pGL4 et du vecteur avec insert pGL4-mHSPG2 (mHSPG2). p<0,05 : *, p<0,01 : **, p<0,005 : ***, p<0,001 : ****.

Par la suite, des co-transfections transitoires ont été effectuées avec la construction pGL4-mHSPG2-3926pbs dans les cellules C28 avec différentes concentrations de Pitx1 (pSI-mPitx1). Les cellules ont été lysées 24, 48 ou 72 heures post-transfection afin de déterminer la durée optimale de traitement. Le fait de lyser les cellules à 24, 48 ou 72 heures post-transfection ne change pas le patron obtenu. Cependant, la magnitude de l'effet observé est plus grande à 48 heures. Donc, les cellules C28 ont été lysées à 48 heures post-transfection dans toutes les expériences effectuées subséquemment dans ce type cellulaire. Ces résultats démontrent que l'ajout de l'insert du promoteur murin du gène de Perlecan de 3926 pbs dans le vecteur pGL4 augmente de ± 30 fois l'expression de luciférase comparée au niveau basal (bruit de fond) de pGL4 (figure 8).

Les co-transfections de pSI-Pitx1 avec pGL4, résulte en une légère augmentation de l'expression luciférase (statistiquement significative) mais les valeurs demeurent bien en deçà de ce qui est obtenu avec le plasmide pGL4-mHSPG2-3926pbs lors de l'ajout de Pitx1. La co-transfection de 300 ng ou 600 ng de pSI-Pitx1 en présence de pGL4-mHSPG2-3926pbs conduit à une augmentation de l'expression luciférase de 5 et 12 fois respectivement comparée au plasmide pGL4-mHSPG2-3926pbs seul (figure 8B). Pitx1 semble donc augmenter l'activité transcriptionnelle du fragment de 3,9 kpbs du promoteur de mHSPG2.

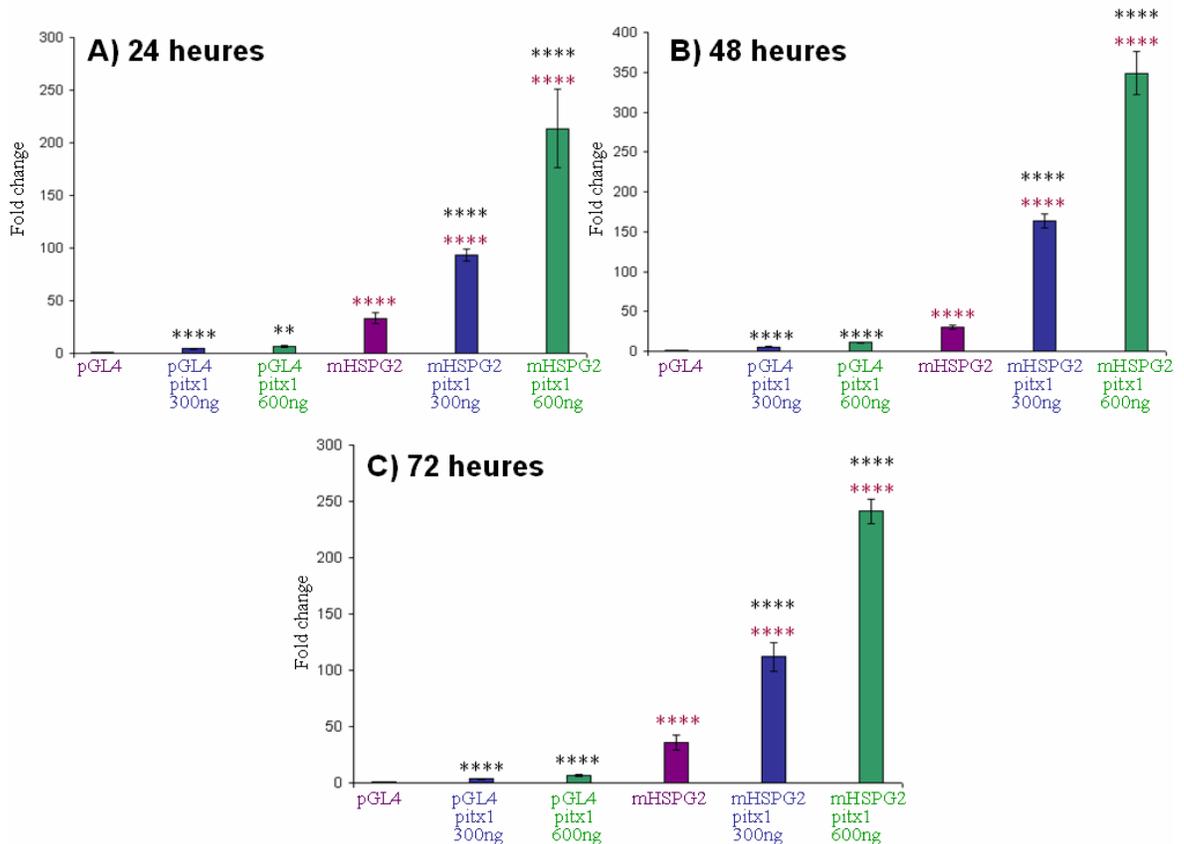


Figure 8. Co-transfections transitoire à la lipofectamine 2000 de pGL4-mHSPG2-3926 pbs et de quantités variables de Pitx1 (pSI-mPitx1) dans les cellules C28 pour un « time course » de lyse cellulaire. A) Lyse des cellules C28 (passage 9) 24 heures post-transfection (n=4). B) Lyse des cellules C28 (passage 9) 48 heures post-transfection (n=4). C) Lyse des cellules C28 (passage 9) 72 heures post-transfection (n=4). Astérisques noirs : test t de Student entre pGL4 et pGL4-pitx1-300ng, pGL4-pitx1-300ng et pGL4-pitx1-600ng et idem pour mHSPG2. Astérisques rouges : test t de Student entre les mêmes conditions du vecteur pGL4 et du vecteur avec insert pGL4-mHSPG2 (mHSPG2).

p<0,05 : *, p<0,01 : **, p<0,005 : ***, p<0,001 : ****.

Dans le but de comparer entre-elles les différentes activations transcriptionnelles obtenues avec les quatre constructions, de nouvelles transfections transitoires ont été effectuées avec les quatre constructions simultanément dans les cellules C28 et MC3T3.

Les régions du promoteur testées dans les différentes constructions transfectées dans les cellules C28 ont permis d'augmenter la transcription basale de 13,6; 2,5; 29,7 et 17,7 fois pour les constructions pGL4-mHSPG2-3926pbs, pGL4-mHSPG2-3304pbs, pGL4-mHSPG2-479pbs et pGL4-mHSPG2-254pbs respectivement par rapport au vecteur pGL4 sans insert. L'ajout de Pitx1 (600 ng) a mis en évidence une induction de la transcription d'environ 5 fois pour toutes les constructions testées par rapport au niveau basal observé pour chaque construction (figure 9 et 10).

Parallèlement, la présence de Pitx1 (600 ng), pour ces mêmes constructions, dans les cellules MC3T3 transfectées a conduit à des augmentations de la transcription de 7,6; 7,9; 5,7 et 5,9 fois. Le niveau basal de transcription est augmenté de l'ordre de 4,3, 1,0, 12,7 et 8,5 fois pour les constructions pGL4-mHSPG2-3926pbs, pGL4-mHSPG2-3304pbs, pGL4-mHSPG2-479pbs et pGL4-mHSPG2-254pbs respectivement par rapport au vecteur pGL4 sans insert (figure 9 et 10).

Bien que le patron d'expression soit le même dans les cellules C28 et les cellules MC3T3, la magnitude d'activation est plus importante dans les cellules C28. Comme mentionnée précédemment, il est possible que des facteurs tissus spécifiques/espèces spécifiques (chondrocytes humain vs ostéoblastes de souris) soient plus efficaces et permettent une activation plus importante selon le type cellulaire testé.

La construction qui comporte 479 pbs en amont de l'ATG initiateur de Perlecan (pGL4-mHSPG2-479pbs), et donc l'exon 1 et le TSS, possède le niveau d'activité luciférase basale le plus élevé ainsi que l'activité stimulée par Pitx1 la plus importante

(figure 9) suivi de près par la construction qui comporte 254 pbs en amont de l'ATG initiateur (pGL4-mHSPG2-254pbs) (figure 9). Ensuite vient la construction la plus importante (pGL4-mHSPG2-3926pbs), qui comporte quatre site de reconnaissance pour Pitx1 et qui va jusqu'à l'ATG initiateur (possède l'exon 1) tant pour le niveau d'activité basale que stimulé par Pitx1. Cette construction comporte possiblement des éléments de régulation négatifs qui diminuent la transcription du gène HSPG2 (figure 9). Finalement, la construction qui possède quatre sites consensus Pitx1, mais qui est amputée de 622 pbs directement en amont de l'ATG initiateur (ne possède pas l'exon 1 ni le TSS) a la plus faible activité transcriptionnelle, tant basale qu'en présence de Pitx1 (figure 9) ce qui suggère que l'exon 1, et possiblement d'autres éléments présents sur la séquence promotrice de Perlecan légèrement en amont de l'ATG initiateur (p.ex. le TSS à -238 pbs en amont de l'ATG initiateur) sont essentiels à l'activation maximale du promoteur.

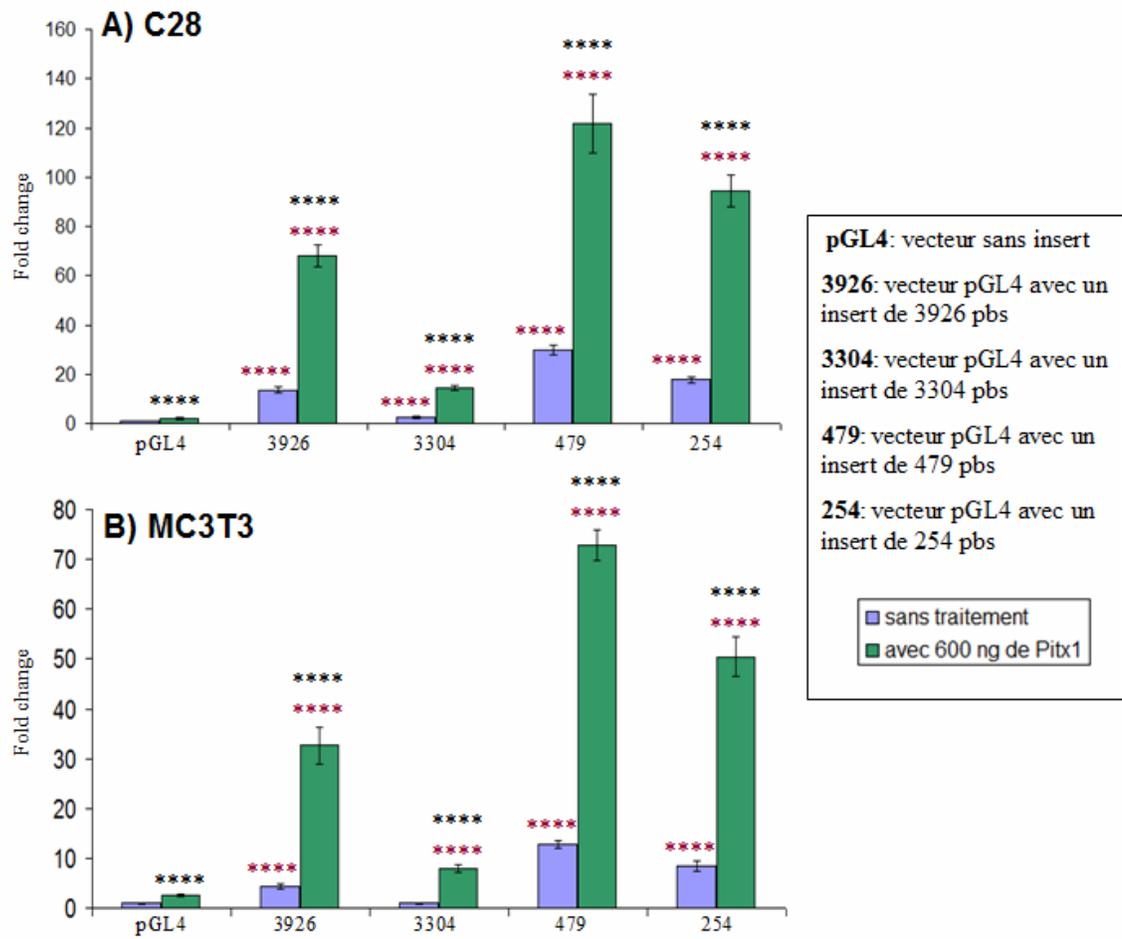


Figure 9. Co-transfections transitoire à la lipofectamine 2000 de pGL4-mHSPG2-3926 pbs, pGL4-mHSPG2-3304 pbs, pGL4-mHSPG2-479 pbs et pGL4-mHSPG2-254 pbs avec 600 ng de Pitx1 (pSI-mPitx1) et sans Pitx1 dans les cellules C28 et MC3T3. A) Co-transfection transitoire des 4 constructions dans les cellules C28 (P7) (n=4). B) Co-transfection transitoire des 4 constructions dans les cellules MC3T3 (P11) (n=4). Le vecteur pGL4 a été utilisé pour évaluer l'expression basale sans et avec Pitx1. Les lysats ont été effectués 48 heures post-transfection. Astérisques noirs : test de student entre pGL4 et pGL4-pitx1-600ng et idem pour mHSPG2. Astérisques rouges : test de student entre les mêmes conditions du vecteur pGL4 et du vecteur avec insert pGL4-mHSPG2 (mHSPG2). $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,005$: *, $p < 0,001$: ****.**

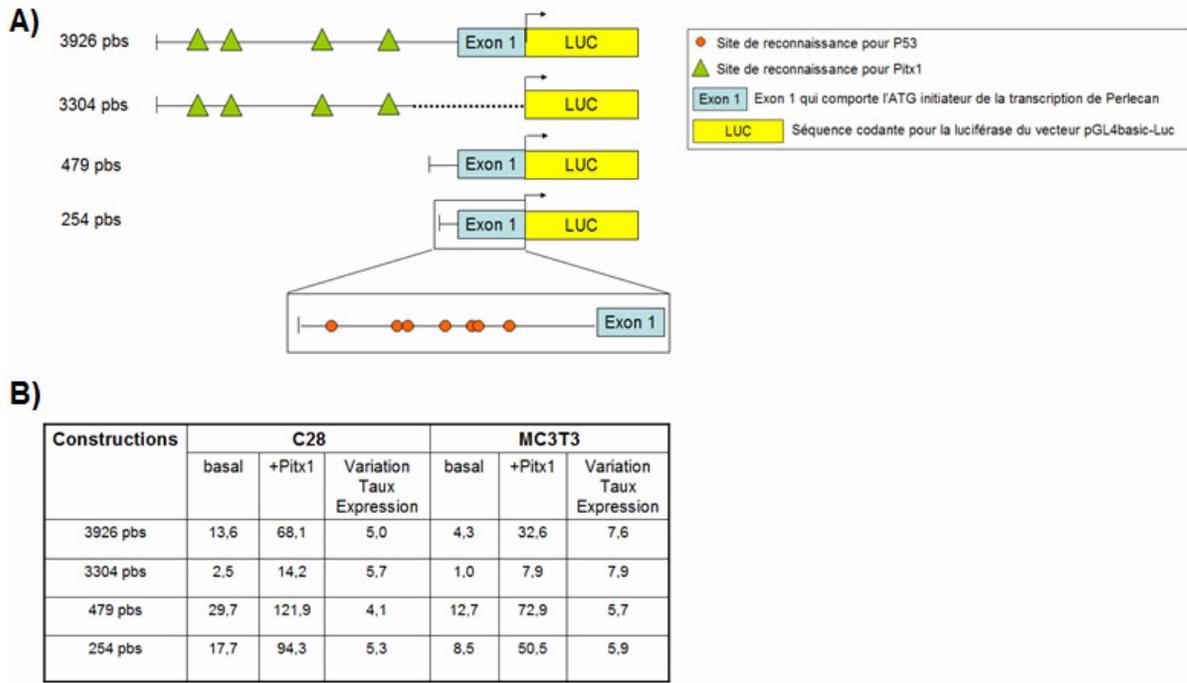


Figure 10. Représentation schématique des quatre constructions et tableau résumé des niveaux d'expression basaux vs induit en présence de Pitx1 dans les cellules C28 et MC3T3. A) Les représentations schématiques de pGL4-mHSPG2-3926pbs, pGL4-mHSPG2-3304pbs, pGL4-mHSPG2-479pbs et pGL4-mHSPG2-254pbs comportent les sites consensus pour Pitx1 (lorsqu'applicable) et l'exon 1 de la séquence codante pour Perlecan (lorsqu'applicable). B) Les variations de niveaux d'expression basaux du tableau résumé ont été calculés par rapport à pGL4 sans insert dont le niveau d'expression est arbitrairement 1. Les variations des niveaux d'expression lors de l'ajout de 600 ng de Pitx1 ont été calculées par rapport au niveau basal de pGL4-mHSPG2-3926/3304/479/254 pbs selon le cas. Les calculs des niveaux d'expression ont été effectués à partir des résultats présentés à la figure 9.

3.4 Analyse de l'expression de Perlecan endogène dans les cellules C28 transfectées avec pSI ou pSI-mPitx1

Dans le but de déterminer l'effet de la surexpression de Pitx1 sur le niveau d'expression de Perlecan endogène, des transfections transitoires ont été effectuées dans les cellules C28 avec pSI ou pSI-mPitx1 (séquence Pitx1 murine dans le vecteur d'expression pSI). Des quantités variables de pSI-Pitx1 ont été utilisées et comme contrôles, les mêmes quantités de pSI (vecteur vide) ont été utilisées. Les cellules C28 (passage 23) ont été lysées avec du Trizol® pour obtenir l'ARN puis l'ADNc a été synthétisée avec le kit «ThermoScript™ RT-PCR System» (Invitrogen). Un qPCR a été effectué afin de détecter une variation potentielle du niveau de Pitx1 (humain et souris) et une variation du niveau d'expression de Perlecan (humain) lorsque le promoteur est en présence de Pitx1.

L'expression de Pitx1 murin n'est pas détectée dans les cellules C28 (chondrocytes humains) avec ou sans pSI mais augmente drastiquement lorsque les concentrations de pSI-mPitx1 augmentent. Il y a donc augmentation de l'ARN de Pitx1 murin lorsque des transfections sont effectuées avec pSI-mPitx1 de façon proportionnelle à l'augmentation de la concentration du vecteur d'expression. Aucune variation significative de l'ARN de Perlecan endogène (humain) lors de l'ajout de Pitx1 murin (pSI-mPitx1) n'a été détectée. L'expression de Pitx1 humain est constante, que ce soit avec pSI ou avec pSI-mPitx1. Cependant, nous avons estimé l'efficacité de transfection dans ces expériences par coloration X-gal des cellules transfectées avec le plasmide contrôle β -gal, à environ 10%. Bien que ce soit un excellent niveau d'efficacité de transfection, 90% des cellules ne sont pas transfectées. De ce fait, le bruit de fond est trop élevé pour que la variation de l'expression de Perlecan par l'ajout de Pitx1 exogène ne soit perceptible. Pour vérifier l'effet d'une surexpression de Pitx1 sur l'expression de Perlecan, des qPCR ont été effectués à partir d'ARN total isolé d'ostéoblastes primaires (cellules jeunes de la moelle osseuse et de la couche ostéogène du périoste qui fabrique l'osséine) provenant de souris

transgéniques qui surexpriment Pitx1 ainsi qu'à partir de fémurs (cellules osseuses matures) de ces mêmes souris (section 3.5).

3.5 Analyse de l'expression de Perlecan endogène et de l'influence possible du facteur de transcription Pitx1 sur son expression

Afin de vérifier si l'absence d'effet de la surexpression de Pitx1 sur l'expression de Perlecan observé au niveau des cellules humaines ne découle pas de changements subtils dans le promoteur humain versus celui de la souris, des expériences en qPCR ont été réalisées sur des ostéoblastes de souris TG surexprimant spécifiquement Pitx1. Le transgène inséré dans le génome de ces souris contient la séquence codante du gène pitx1 murin sous contrôle transcriptionnel d'un fragment de 2.3 kpbs du promoteur du gène Col1 α 1 murin (Rossert et al., 1995). Ce promoteur limite l'expression du transgène aux cellules de la lignée ostéoblastique. Les ostéoblastes primaires utilisés ont été mis en culture et après trois passages ont été ré-ensemencés à 200 000 cellules/puits dans des boîtes de 12 puits dans du milieu de culture supplémenté avec 50 ug/ml d'acide ascorbique et 10 mM de β -glycérophosphate (milieu de différenciation) pour permettre la production de matrice calcifiée caractéristique d'ostéoblastes matures. Les ARN isolés au jour 0 (jour de mise en culture) et au jour 21 de culture ont été analysés, tant pour les contrôles (WT) que pour les transgéniques (TG).

Pour les ostéoblastes des souris de type sauvages (WT) les RQ (relative quantification units) ont été normalisés à 1.0. La surexpression de Pitx1 des ostéoblastes des souris transgéniques au jour 0 et au jour 21 était respectivement de 64 et de 10 fois (figure 11A). Bien que la surexpression de Pitx1 soit significative dans les deux cas, celle-ci est plus faible au jour 21 indiquant une diminution de l'activité du promoteur Col1 α 1 en condition de différenciation.

Au jour 0, il y a surexpression de Perlecan et une quasi équivalence avec le WT de p53 chez les ostéoblastes de souris transgéniques. Les résultats au jour 21 semblent démontrer une quasi équivalence entre l'expression des ostéoblastes transgéniques (TG) et des ostéoblastes de type sauvage (WT) pour Perlecan et une légère augmentation de l'expression de p53 (figure 11B).

Pour les ostéoblastes dérivés des fémurs des souris de type sauvages (WT) les RQ ont été normalisés à 1.0. La surexpression de Pitx1 dans les ostéoblastes dérivés des fémurs des souris transgéniques était de 923 fois (figure 12A). Dans les ostéoblastes dérivés des fémurs des souris transgéniques, il y avait aussi une surexpression de Perlecan et de p53 de 50 et 21 fois respectivement (figure 12B). L'expérience avec ces ostéoblastes n'a été effectuée qu'une seule fois (n=1) due à la disponibilité limitée du matériel histologique. Pour cette raison, des études statistiques n'ont pas pu être effectuées.

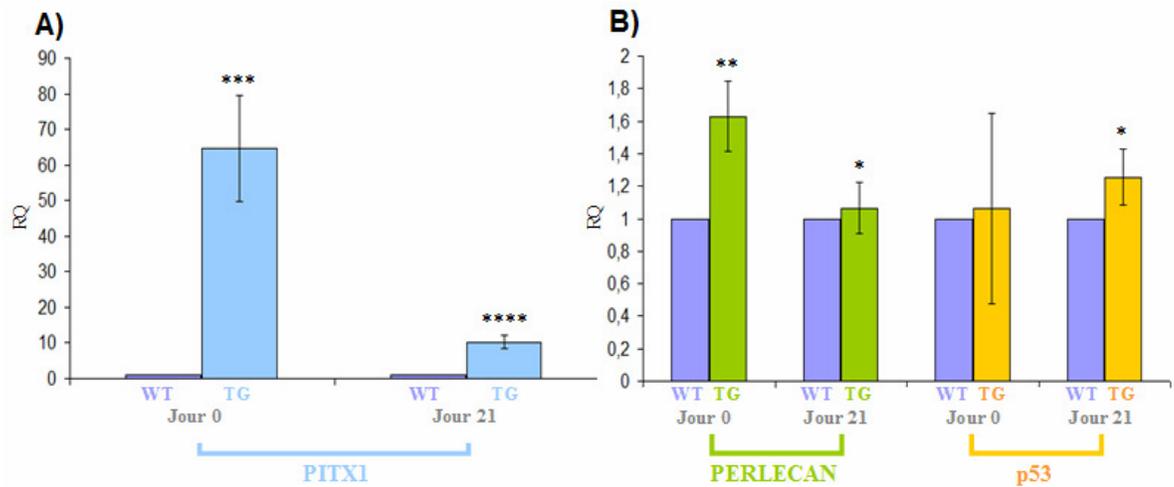


Figure 11. Analyse des niveaux d'expression de Pitx1, Perlecan et p53 par qPCR sur des ostéoblastes primaires de souris sauvage (WT) et transgénique (TG) qui surexpriment Pitx1 (n = 3). A) Pitx1. B) Perlecan et p53. Astérisques: test de student entre WT et TG pour les mêmes conditions. $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,005$: *, $p < 0,001$: ****.**

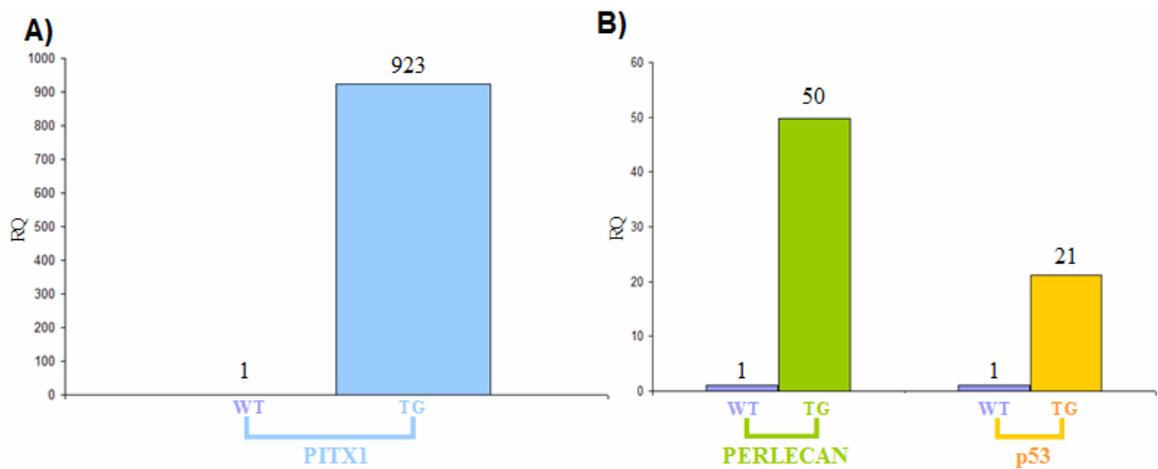


Figure 12. Analyse des niveaux d'expression de Pitx1, Perlecan et p53 par qPCR sur des fémurs (gauche) de souris sauvage (WT) et transgénique (TG) qui surexpriment Pitx1 (n = 1). A) Pitx1. B) Perlecan et p53. N.B. Cette expérience n'a été effectuée qu'une seule fois due à la disponibilité du matériel. Il a donc été impossible d'effectuer des études statistiques et c'est pourquoi les valeurs obtenues sont inscrites au dessus des colonnes (n=1).

3.6 Sites potentiel de p53 sur le promoteur de Perlecan

Puisque la construction pGL4-mHSPG2-254pbs, qui ne contient aucun site consensus pour Pitx1, possède une forte activité transcriptionnelle stimulée par Pitx1, la séquence a été analysée afin de trouver des sites de liaison de facteurs de transcription pouvant être induits par Pitx1. Dans ce contexte, plusieurs sites de reconnaissance de p53 ont été découverts *in silico* en utilisant le programme *Alggen* (Alba et al.) (figure 13).

```

1  ggctcgcgt tgcctcgggg gcggaacctg gtcttggtgg gtgtggctaa atgtttggag gtggggccta
   ccggagcgca acggagccc cgccttggac cagaacaccc cacaccgatt tacaaacctc caccccggat

71  gggtcctga acttggecc tcgggggggg agccggagac ccgggggggg ggcgtgcacg ggagggcggg
   cccgaggact tgaaccgcgg agcccgcgcc tcggcctctg ggcccgcgcc ccgcacgtgc cctcccgcgc
                                     Insert 254 bps

141  gacgggagtt ggttgggggg gtgggggggtg ggaaagaggc gagcagtcgg aaggactcgg caggacagcg
      ctgccctcaa ccaaccccc cccccccac cctttctccg ctgctcagge ttctgagcc gtccctgtcgc

211  agctggtggc tgcgggaggc gccgagcggag ccagcgaacg aggcggggcc atggaagatg ccaaaaacat
      tcgaccaccg acgcctccg cggtcgtctc ggtegettgc tccggcccgg taccttctac ggtttttcta
                                     E1                                     ATG
                                     NcoI

```

Figure 13. Sites de reconnaissance de p53 sur les 254 pbs du promoteur de mHSPG2 en amont de l'ATG initiateur. Les sites de reconnaissance de p53 sont surlignés en vert sur la séquence de 254 pbs (en bleu). L'exon I est surligné en jaune et l'ATG initiateur est indiqué par la couleur beige.

Chapitre 4. Discussion

4.1 L'activité basale du promoteur humain de Perlecan nécessite l'exon 1

L'exon 1 contient le site d'initiation de la transcription et l'ATG initiateur de la traduction de Perlecan, ce qui explique l'augmentation notable de la transcription basale avec les trois constructions ayant l'exon 1, ce qui n'est pas le cas avec la construction qui ne comporte pas ces éléments. Ceci confirme donc l'importance de cette région du promoteur qui comporte vraisemblablement les éléments essentiels pour le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base (figure 10).

Le niveau d'expression basal de la construction pGL4-mHSPG2-479pbs est plus du double de celui de pGL4-mHSPG2-3926pbs (figure 10B). Ceci suggère donc la présence d'un ou de plusieurs éléments répresseurs sur la séquence la plus grande. Des analyses *in silico* ont donc été effectuées avec le programme *TFSearch* (Akiyama, Copyright 1994-2000) afin de déterminer si la séquence comportait des sites de reconnaissance pour des facteurs de transcription déjà connus pour leur effet répressif. En effet, plusieurs sites de reconnaissance pour des répresseurs connus ont été identifiés sur la séquence du promoteur de 3926 pbs dont GATA-2, GATA-3, MZF1, C/EBP et c-Myc (tableau IV).

Dans la littérature, les facteurs GATA-2, GATA-3 et MZF1 n'ont pas été mis en évidence à ce jour dans le cartilage et/ou dans l'OA. Cependant, il a été démontré que C/EBP est régulé de façon positive dans l'OA (Goldring and Marcu, 2009) et que c'est un facteur qui inhibe l'expression du gène *Cd-rap*, qui produit une petite protéine sécrétée par la matrice et qui est exprimée dans le cartilage en développement et dans le cartilage adulte ainsi que par les chondrocytes en culture (Imamura et al., 2005).

Parallèlement, il a aussi été démontré que c-Myc réprime la transcription du gène Sp1 (Gartel, 2006). Or, les sites de liaisons pour Sp1/Sp3 contribuent à l'activité basale du

promoteur des ostéoblastes en régulant l'expression de la N-cadhérine, une protéine importante dans le contrôle de la différenciation des cellules squelettiques. Il semblerait que MZF1 puisse aussi stimuler l'expression de la N-cadhérine dans les ostéoblastes. MZF1 peut vraisemblablement agir comme inhibiteur ou comme activateur de la transcription selon le contexte (tableau VI) (Le Mee et al., 2005). Toutefois, aucun de ces facteurs de transcription ont été mis en évidence à ce jour dans la régulation transcriptionnelle de Perlecan.

Les facteurs C/EBP et c-Myc semblent donc être les facteurs les plus intéressants à étudier puisqu'ils ont déjà un rôle connu au niveau du cartilage et de l'OA (Imamura et al., 2005) ou dans les ostéoblastes (Gartel, 2006). Un moyen efficace de vérifier si ces facteurs jouent un rôle dans la régulation du promoteur de Perlecan serait d'effectuer des qPCR afin d'évaluer l'expression de Perlecan en présence et en l'absence de ces facteurs.

Tableau VI. Facteurs de transcription pouvant potentiellement réguler de façon négative la transcription de Perlecan

Facteurs de transcription dont un ou des sites de reconnaissances sont présents sur le promoteur de Perlecan	Références	Élément(s) régulé(s) négativement
GATA-2 et GATA-3	(Di Lisi et al., 2007)	L'activité du promoteur cardiaque de la troponine I dans les cellules des muscles squelettiques
	(Obara et al., 2008)	L'expression du gène de l'érythropoïétine
MZF1	(Perrotti et al., 1995)	Le développement hématopoïétique
	(Yan et al., 2006)	L'activité du promoteur ERCC1
C/EBP	(Imamura et al., 2005)	L'expression du gène <i>Cd-rap</i> dans les chondrocytes
c-Myc	(Gartel, 2006)	Réprime la transcription des gènes Miz-1 et Sp1

4.2 Pitx1 augmente l'activité transcriptionnelle du promoteur de Perlecan de façon indirecte possiblement via p53

La variation du niveau d'expression lors de l'ajout de Pitx1 est d'environ 5 fois supérieure au niveau d'activité basal sans Pitx1, que la construction comporte des sites consensus pour Pitx1 ou non (3926 *vs* 479 et 254) (figure 10B). Les sites consensus pour Pitx1 ne semblent donc pas nécessaires à l'activation transcriptionnelle du promoteur de Perlecan par Pitx1. Pitx1 activerait donc vraisemblablement la transcription de Perlecan de façon indirecte (figure 10).

Dans le but de déterminer par quel(s) mécanisme(s) l'activation indirecte pouvait opérer, des sites consensus pour des facteurs de transcriptions activateurs qui peuvent potentiellement agir en partenariat avec Pitx1 ont été cherchés avec *TFSearch* (Akiyama, Copyright 1994-2000) et *Alggen* (Alba et al.). Sur les 254 pbs d'insert du promoteur murin de Perlecan, sept sites consensus pour le facteur de transcription p53 ont été identifiés (figure 13). Sachant que Pitx1 est en mesure d'induire l'expression de p53 (Liu and Lobie, 2007), il est possible que p53 puisse ensuite stimuler l'expression de Perlecan de façon directe en se liant à ces nombreux sites consensus. De plus, des liens ont déjà été établis entre une augmentation de p53 et l'OA (Nayak et al., 2009; Tak et al., 1999). En effet, une surexpression de p53 a été détectée dans les tissus synoviaux des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde et d'ostéoarthrite (Nayak et al., 2009; Tak et al., 1999).

Dans le but de déterminer si l'activation par Pitx1 passe bien par une cascade signalétique qui implique p53, des siRNA contre p53 pourraient être utilisés pour faire un knockdown de p53 et ainsi valider si l'activation de la transcription induite par Pitx1 est dépendante de p53. Suite au knockdown par les siRNA, des transfections pourraient être effectuées afin de déterminer si les niveaux d'expression sont les mêmes en présence et en

absence de Pitx1. Dans cette éventualité, la preuve serait alors faite que l'activation de la transcription par Pitx1 du promoteur de Perlecan se fait via p53.

En parallèle, le Pifithrin- α , qui a démontré une bonne efficacité dans l'inhibition de p53 tant *in vitro* que *in vivo* pourrait être utilisé dans le but d'inhiber de façon plus efficace p53 (environ 100% d'inhibition) (Rocha et al., 2003) puisque la technique avec le siRNA permet environ 80% d'inhibition.

4.3 Surexpression de p53 et de Perlecan dans les ostéoblastes de souris transgéniques qui surexpriment Pitx1

Afin d'établir une corrélation entre Pitx1, Perlecan et p53, des qPCR avec des ostéoblastes provenant de souris transgéniques qui surexpriment Pitx1 ont été effectués. Ces expériences ont permis de quantifier l'effet de Pitx1 sur l'expression de Perlecan et de p53.

Les qPCR effectués avec les ostéoblastes primaires de souris ont permis de démontrer une surexpression de Pitx1. Cette surexpression semble corrélée avec une faible augmentation de l'expression de Perlecan et de p53 dans les ostéoblastes primaires de souris (figure 11). La variation d'expression dans les ostéoblastes au jour 0 *vs* au jour 21 serait probablement attribuable à la diminution de l'expression du promoteur Col1a1 (transgène) lorsque les cellules demeurent en culture *vs* lorsqu'elles sont récupérées immédiatement. L'expression du transgène est sous le contrôle d'un fragment du promoteur de collagène I et son activité transcriptionnelle peut varier en condition de culture. Par exemple, il est possible que le transgène subisse des modifications épigénétiques (hyperméthylation) qui conduisent à une inhibition de la transcription (silencing).

Parallèlement, les qPCR effectués avec les ostéoblastes dérivés des fémurs de souris ont permis de démontrer que la surexpression de Pitx1 est corrélée à une augmentation de l'expression de Perlecan et de p53 (figure 12).

L'expression de Pitx1 des ostéoblastes dérivés des fémurs des souris transgéniques est 14 fois plus élevée que l'expression de Pitx1 par les ostéoblastes des souris transgéniques (jour 0) (figure 11A et 12A). Ceci se répercute dans l'augmentation de l'expression de Perlecan et p53 qui sont, elles aussi, de magnitude supérieure, soit 31 et 17 fois supérieures dans les ostéoblastes dérivés des fémurs vs les ostéoblastes (figures 11B et 12B). L'activation de l'expression de Perlecan et p53 semble donc avoir une certaine proportionnalité avec l'intensité de l'expression de Pitx1 dans les ostéoblastes dérivés des fémurs mais la corrélation est plus difficile à établir pour les ostéoblastes primaires vue la faible augmentation de Perlecan et p53 malgré une forte augmentation de Pitx1. La présence de facteurs de transcriptions tissu spécifique peut avoir joué un rôle dans la plus grande activation de Perlecan et p53 dans les ostéoblastes dérivés des fémurs vs les ostéoblastes primaires. De plus, les ostéoblastes dérivés des fémurs ont terminé leur maturation alors que les ostéoblastes primaires n'ont pas fini de se différencier, ce qui peut aussi influencer la réponse au facteur de transcription Pitx1.

Ces résultats permettent donc d'étayer une nouvelle hypothèse qui soutend que Pitx1 serait en mesure d'activer la transcription de Perlecan et que cette activation pourrait dépendre de p53, une cible transcriptionnelle connue de Pitx1 (activation indirecte) (Liu and Lobie, 2007). De fait même, l'hypothèse initiale qui soutenait que Pitx1 régulait de façon négative Perlecan est réfutée, du moins dans le contexte de la présente étude. De plus, notre nouvelle hypothèse est supportée par le fait que plusieurs sites de liaison du facteur de transcription p53 sont présents dans les 254 pbs du promoteur de Perlecan directement en amont de l'ATG initiateur (figure 13). La cascade régulatrice encore méconnue de Pitx1 pourrait impliquer d'autres facteurs transcriptionnels intermédiaires.

Des résultats obtenus précédemment dans le laboratoire par des collègues démontrent qu'une inactivation partielle de Pitx1 conduit graduellement à la formation d'un phénotype ostéoarthritique (Picard et al., 2007). Les résultats obtenus lors de la présente étude démontrent qu'une augmentation de Pitx1 stimule l'expression de p53 qui, à son tour,

pourrait stimuler l'expression de Perlecan. Donc, une diminution de Pitx1 devrait ultimement entraîner une diminution de l'expression de Perlecan, un protéoglycan impliqué dans le développement et la maintenance du cartilage (Tesche and Miosge, 2004).

Cependant, Tesche et son équipe ont démontré une augmentation de Perlecan dans les stades tardifs de l'OA qui est produit principalement par les cellules sécrétrices allongées de type II qui sont à proximité du cartilage le plus affecté, probablement dans une dernière tentative de «sauver» les tissus affectés (Tesche and Miosge, 2004). Dans ce contexte, une perte quasi complète de l'expression de Pitx1 survient dans les stades tardifs de l'OA (Picard et al., 2007). Les résultats obtenus lors de la présente étude révèlent que la surexpression de Pitx1 régule positivement l'expression de Perlecan de façon indirecte, possiblement via p53. Donc, une diminution de Pitx1 entraînerait potentiellement une diminution de p53 et, éventuellement, une diminution de Perlecan.

Théoriquement, au début du stade avancé de la maladie, il y a encore du cartilage et donc, il y a encore présence des cellules allongées sécrétrices de type II, qui sont responsable en grande partie de l'expression de Perlecan (Tesche and Miosge, 2004). Lorsque la maladie progresse, le cartilage se dégrade de plus en plus et il y a mort des cellules allongées sécrétrices de type II. Ces cellules ayant disparue, il n'y a plus de Perlecan et ultimement, il y a disparition du cartilage. Parallèlement, la diminution de Pitx1 entraîne une diminution de p53 et il a été démontré qu'une diminution de p53 prévient l'entrée en apoptose des chondrocytes malades et permet donc de préserver les cellules cartilagineuses restantes (Hashimoto et al., 2009).

Parallèlement, il est aussi possible que la diminution de Pitx1 entraîne une diminution de p53 mais pas nécessairement une diminution de Perlecan. En effet, il est possible que plus d'une cascade signalétique régule l'expression de Perlecan et que, lorsque l'expression de p53 est diminuée, une autre cascade signalétique entre en jeu afin

d'augmenter l'expression de Perlecan, ou du moins, maintenir un niveau d'expression suffisant pour permettre la subsistance du cartilage. Il est possible que certains partenaires potentiels de Pitx1 soient stimulés par une baisse d'expression de Pitx1 et ainsi stimuler l'expression de Perlecan.

Parallèlement, sachant que la diminution de l'expression de p53 dans les chondrocytes OA prévient l'entrée en apoptose des chondrocytes articulaires (Hashimoto et al., 2009), et ainsi prévient la dégénération du cartilage, on peut supposer que l'organisme tente de protéger, par tous les moyens, le cartilage restant.

4.4 La régulation transcriptionnelle par Pitx1 (activation vs inhibition) de Perlecan peut varier selon plusieurs facteurs

Au départ, dû aux résultats préliminaires en immunohistologie obtenus dans les bourgeons de membres chez les souris, une inhibition de l'activité transcriptionnelle de Perlecan était attendue lors d'une augmentation de Pitx1 (figure 2). Cependant, les résultats obtenus lors de la présente étude démontrent plutôt une activation de la transcription de Perlecan lors de l'augmentation de Pitx1 dans les cellules C28 et MC3T3 ainsi que dans les ostéoblastes et les fémurs murins *in vitro* et *in vivo*.

L'activation observée lors de cette étude (activation au lieu d'une inhibition) est peut-être due au fait que les types cellulaires utilisés étaient différents. En effet, la dernière étape de différenciation des chondrocytes de la plaque croissance (bourgeons de membres) et des chondrocytes humains (transfections transitoire dans les C28) est différente. Ces types cellulaires, bien que similaire, ne sont donc pas au même «time point» et les facteurs présents pour interagir dans la cascade signalétique de Pitx1 sont possiblement différents.

Cette explication est aussi valable pour les ostéoblastes et les fémurs de souris qui sont d'un type cellulaire différent et qui peuvent donc, eux aussi, posséder des facteurs de transcription permettant l'activation de la transcription et pas l'inhibition. Donc, dépendamment des partenaires présents (tissu spécifique/espèce spécifique), Pitx1 peut vraisemblablement agir comme activateur ou inhibiteur de la transcription de Perlecan.

Il aurait été préférable de répéter les qPCR sur les bourgeons de membres Pitx1 KO afin de comparer les résultats obtenus avec les différents types cellulaires mais nous n'avions plus accès à ces cellules au moment des expériences en qPCR.

Parallèlement, il est aussi possible que l'activation de Perlecan observée lors de l'augmentation de Pitx1 (au lieu d'une inhibition de Perlecan comme le suggérait l'étude préliminaire) soit due au fait que les constructions utilisées ne contenaient qu'une fraction du promoteur (proximal) du gène de Perlecan. La construction la plus importante comportait 3926 pbs du promoteur proximal en amont de l'ATG du gène. Il est donc possible que certains éléments de régulation négatifs importants lors de la régulation du gène HSPG2 dans les cellules de bourgeons de membres (figure 2) soient absents dans ces constructions.

Il est aussi vraisemblable que certains facteurs transcriptionnels aient été absents *in vitro*, mais présents *in vivo* et que la cascade régulatrice qui implique Pitx1, et qui est encore méconnue, n'ait pas été complète. Par exemple, la dimérisation de Pitx1 avec un ou plusieurs autres facteurs pourrait moduler son activité et être responsable de l'inhibition de la transcription du gène codant pour Perlecan.

Finalement, la configuration 3D de la séquence *in vivo* pourrait permettre le rapprochement de régions régulatrices beaucoup plus distales permettant ainsi à certains éléments de régulation négatifs de réprimer la transcription de Perlecan. Il a été prouvé que

la liaison de Pitx1 à plus d'un site consensus induit un changement conformationnel de l'ADN cible ce qui permet à Pitx1 d'effectuer une transactivation du gène, ou dans le cas qui nous occupe, une transrépression, permettant ainsi l'interaction d'éléments de réponses proximaux avec des « enhancers » distaux (Melamed et al., 2002). De plus, il a été démontré que Pitx1 est phosphorylé sur trois résidus lorsqu'il est lié à l'ADN (Melamed et al., 2002). Donc, puisque les expériences de la présente étude ont été menées *in vitro*, il est possible que certains changements épigénétiques nécessaire à l'inhibition de l'expression de Perlecan par Pitx1 présents *in vivo* aient été absent et que seule l'activation ait été possible.

Chapitre 5. Sommaire

Les résultats démontrent que Pitx1 est en mesure d'activer la transcription de Perlecan de façon indirecte i.e. sans que des sites consensus de Pitx1 ne soient présents dans la séquence (figure 9 et 10). Il est vraisemblable que cette activation passe par le facteur p53 qui est un partenaire connu de Pitx1 (Liu and Lobie, 2007). La séquence promotrice de Perlecan comporte d'ailleurs sept sites consensus pour ce facteur et une augmentation de p53 et de Perlecan a été démontrée lors de la surexpression de Pitx1 (figures 11 et 12). Ceci suggère donc que Pitx1 pourrait être en mesure d'induire l'expression de p53 qui à son tour stimulerait l'expression de Perlecan.

Puisque la relation entre Pitx1, Perlecan et l'ostéoarthrite n'avait jamais été étudiée auparavant, ces travaux ont permis de mieux comprendre la relation qui existe entre ces trois éléments, sans toutefois pouvoir établir la cascade signalétique proprement dite.

Chapitre 6. Perspectives

D'autres sites de liaisons que p53 ont été découverts sur le promoteur de Perlecan avec *TFSearch* (Akiyama, Copyright 1994-2000) et *Alggen* (Alba et al.) pour les facteurs EGR-1 (diminué dans l'OA (Wang et al., 2000)), E2F et SF-1 (Fortin et al., 2009; Melamed et al., 2002; Quirk et al., 2001; Tremblay et al., 1999) et il a été démontré que ces facteurs sont des partenaires possible de Pitx1 (Fortin et al., 2009; Melamed et al., 2002; Quirk et al., 2001; Tremblay et al., 1999). Il faudrait donc vérifier si ces facteurs de transcriptions sont en mesure d'interagir avec Pitx1 de façon efficace et de participer à l'activation de l'expression de Perlecan en intervenant dans la cascade régulatrice, encore méconnue, de Pitx1. Ceci pourrait être effectué par des co-précipitations de Pitx1 et des facteurs avec lesquels il interagit. Les facteurs ayant co-précipités avec Pitx1 pourraient ensuite être analysés pour déterminer leur identité.

Parallèlement, des siRNA contre C/EBP et c-Myc devraient être utilisés et des qPCR devraient être effectués afin d'évaluer l'expression de Perlecan en présence et en l'absence de ces facteurs. Ces deux facteurs devraient être étudiés avant d'autres facteurs de répression puisqu'ils ont déjà un rôle connu au niveau du cartilage et de l'OA (Imamura et al., 2005) ou dans les ostéoblastes (Gartel, 2006).

Ultimement, la compréhension des mécanismes qui régulent la transcription normale et pathologique du gène HSPG2 qui code pour Perlecan permettrait vraisemblablement une meilleure compréhension du développement et de la progression de l'ostéoarthrite. Éventuellement, des méthodes visant à prévenir le développement, ralentir la progression et peut-être même traiter des patients atteints d'ostéoarthrite sous sa forme la plus sévère pourraient être élaborés.

De plus, puisque Perlecan est impliqué dans des maladies comme le Syndrome de Schwartz-Jampel et le syndrome de type Silverman-Handmaker (Arikawa-Hirasawa et al., 2002; Arikawa-Hirasawa et al., 2001) et qu'il est impliqué dans le contrôle de plusieurs fonctions biologiques, une meilleure compréhension du mécanisme de régulation de ce protéoglycan permettrait de faire avancer la recherche dans plusieurs domaines et de possiblement trouver une cure à des maladies qui n'en ont pas encore ou du moins, avancer des pistes de solutions.

Bibliographie

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

Aigner, T., Stoss, H., Weseloh, G., Zeiler, G., and von der Mark, K. (1992). Activation of collagen type II expression in osteoarthritic and rheumatoid cartilage. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 62, 337-345.

Akiyama, Y. (Copyright 1994-2000). TFSearch. In Parallel Applocation TRC Laboratory, RWCP, Japan (Computational Biology Research Center, AIST, Japan).

Alba, M.M., Farré, D., Garcia, D., Escudero, R., Nunez, O., Martinez, J., and Messeguer, X. Alggen - Promo Version 3.0.2 (Evolutionary Genomics Group (Research Unit on Biomedical Informatics, Universitat Pompeu Fabra)

Universitat Politècnica de Catalunya).

Ardayfio, P.A., Leung, A., Park, J., Hwang, D.Y., Moran-Gates, T., Choi, Y.K., Carlezon, W.A., Jr., Tarazi, F.I., and Kim, K.S. Pitx3-deficient aphakia mice display unique behavioral responses to psychostimulant and antipsychotic drugs. *Neuroscience* 166, 391-396.

Arikawa-Hirasawa, E., Le, A.H., Nishino, I., Nonaka, I., Ho, N.C., Francomano, C.A., Govindraj, P., Hassell, J.R., Devaney, J.M., Spranger, J., *et al.* (2002). Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia. *Am J Hum Genet* 70, 1368-1375.

Arikawa-Hirasawa, E., Watanabe, H., Takami, H., Hassell, J.R., and Yamada, Y. (1999). Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet* 23, 354-358.

Arikawa-Hirasawa, E., Wilcox, W.R., and Yamada, Y. (2001). Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type: unexpected role of perlecan in cartilage development. *Am J Med Genet* 106, 254-257.

Aviezer, D., Hecht, D., Safran, M., Eisinger, M., David, G., and Yayon, A. (1994). Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. *Cell* 79, 1005-1013.

Bailey, A.J., and Mansell, J.P. (1997). Do subchondral bone changes exacerbate or precede articular cartilage destruction in osteoarthritis of the elderly? *Gerontology* 43, 296-304.

Bock, H.C., Michaeli, P., Bode, C., Schultz, W., Kresse, H., Herken, R., and Miosge, N. (2001). The small proteoglycans decorin and biglycan in human articular cartilage of late-stage osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 9, 654-663.

- Brown, J.C., Sasaki, T., Gohring, W., Yamada, Y., and Timpl, R. (1997). The C-terminal domain V of perlecan promotes beta1 integrin-mediated cell adhesion, binds heparin, nidogen and fibulin-2 and can be modified by glycosaminoglycans. *Eur J Biochem* *250*, 39-46.
- Buckwalter, J.A., and Mankin, H.J. (1998). Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* *47*, 487-504.
- Collins, D.H., and Mc, E.T. (1960). Sulphate ($^{35}\text{SO}_4$) uptake by chondrocytes in relation to histological changes in osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis* *19*, 318-330.
- Costell, M., Gustafsson, E., Aszodi, A., Morgelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., Addicks, K., Timpl, R., and Fassler, R. (1999). Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol* *147*, 1109-1122.
- Di Lisi, R., Picard, A., Ausoni, S., and Schiaffino, S. (2007). GATA elements control repression of cardiac troponin I promoter activity in skeletal muscle cells. *BMC Mol Biol* *8*, 78.
- Drouin, J., Lamolet, B., Lamonerie, T., Lanctot, C., and Tremblay, J.J. (1998a). The PTX family of homeodomain transcription factors during pituitary developments. *Mol Cell Endocrinol* *140*, 31-36.
- Drouin, J., Lanctôt, C., and Tremblay, J.J. (1998b). La famille Ptx des facteurs de transcription à homéodomaine. *Med Sci (Paris)* *14*, 335-339.
- Esko, J.D., and Selleck, S.B. (2002). Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem* *71*, 435-471.
- Fan, J., Shi, D., Dai, J., Zhu, L., Qin, J., Shao, Z., Qiu, X., Xu, Z., Chen, D., and Jiang, Q. (2010). Genetic polymorphism of PITX1 in susceptibility to knee osteoarthritis in a Chinese Han population: a case-control study. *Rheumatol Int*.
- Fortin, J., Lamba, P., Wang, Y., and Bernard, D.J. (2009). Conservation of mechanisms mediating gonadotrophin-releasing hormone 1 stimulation of human luteinizing hormone beta subunit transcription. *Mol Hum Reprod* *15*, 77-87.
- French, M.M., Gomes, R.R., Jr., Timpl, R., Hook, M., Czymmek, K., Farach-Carson, M.C., and Carson, D.D. (2002). Chondrogenic activity of the heparan sulfate proteoglycan perlecan maps to the N-terminal domain I. *J Bone Miner Res* *17*, 48-55.
- French, M.M., Smith, S.E., Akanbi, K., Sanford, T., Hecht, J., Farach-Carson, M.C., and Carson, D.D. (1999). Expression of the heparan sulfate proteoglycan, perlecan, during mouse embryogenesis and perlecan chondrogenic activity in vitro. *J Cell Biol* *145*, 1103-1115.
- Gartel, A.L. (2006). A new mode of transcriptional repression by c-myc: methylation. *Oncogene* *25*, 1989-1990.

- Goldring, M.B., and Marcu, K.B. (2009). Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* *11*, 224.
- Hashimoto, S., Nishiyama, T., Hayashi, S., Fujishiro, T., Takebe, K., Kanzaki, N., Kuroda, R., and Kurosaka, M. (2009). Role of p53 in human chondrocyte apoptosis in response to shear strain. *Arthritis Rheum* *60*, 2340-2349.
- Hassell, J., Yamada, Y., and Arikawa-Hirasawa, E. (2002). Role of perlecan in skeletal development and diseases. *Glycoconj J* *19*, 263-267.
- Hwang, D.Y., Hong, S., Jeong, J.W., Choi, S., Kim, H., Kim, J., and Kim, K.S. (2009). Vesicular monoamine transporter 2 and dopamine transporter are molecular targets of Pitx3 in the ventral midbrain dopamine neurons. *J Neurochem* *111*, 1202-1212.
- Imamura, T., Imamura, C., Iwamoto, Y., and Sandell, L.J. (2005). Transcriptional Co-activators CREB-binding protein/p300 increase chondrocyte Cd-rap gene expression by multiple mechanisms including sequestration of the repressor CCAAT/enhancer-binding protein. *J Biol Chem* *280*, 16625-16634.
- Johnston, J.D., Schuster, C., Barrett, P., and Hazlerigg, D.G. (2007). Regulation of the ovine MT1 melatonin receptor promoter: interaction between multiple pituitary transcription factors at different phases of development. *Mol Cell Endocrinol* *268*, 59-66.
- Jorgensen, J.S., Quirk, C.C., and Nilson, J.H. (2004). Multiple and overlapping combinatorial codes orchestrate hormonal responsiveness and dictate cell-specific expression of the genes encoding luteinizing hormone. *Endocr Rev* *25*, 521-542.
- Kolfschoten, I.G., van Leeuwen, B., Berns, K., Mullenders, J., Beijersbergen, R.L., Bernards, R., Voorhoeve, P.M., and Agami, R. (2005). A genetic screen identifies PITX1 as a suppressor of RAS activity and tumorigenicity. *Cell* *121*, 849-858.
- Kouri, J.B., Jimenez, S.A., Quintero, M., and Chico, A. (1996). Ultrastructural study of chondrocytes from fibrillated and non-fibrillated human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* *4*, 111-125.
- Lamonerie, T., Tremblay, J.J., Lanctot, C., Therrien, M., Gauthier, Y., and Drouin, J. (1996). Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes Dev* *10*, 1284-1295.
- Lanctot, C., Lamolet, B., and Drouin, J. (1997). The bicoid-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* *124*, 2807-2817.
- Lanctot, C., Moreau, A., Chamberland, M., Tremblay, M.L., and Drouin, J. (1999). Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development* *126*, 1805-1810.
- Lardelli, M., and Lendahl, U. (1994). Generating bacteriophage lambda sublibraries enriched for rare clones. *Biotechniques* *16*, 420-422.

- Le Mee, S., Fromigue, O., and Marie, P.J. (2005). Sp1/Sp3 and the myeloid zinc finger gene MZF1 regulate the human N-cadherin promoter in osteoblasts. *Exp Cell Res* 302, 129-142.
- Li, B., and Aspden, R.M. (1997). Mechanical and material properties of the subchondral bone plate from the femoral head of patients with osteoarthritis or osteoporosis. *Ann Rheum Dis* 56, 247-254.
- Lin, X. (2004). Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* 131, 6009-6021.
- Liu, D.X., and Lobie, P.E. (2007). Transcriptional activation of p53 by Pitx1. *Cell Death Differ* 14, 1893-1907.
- Lopez, S., Island, M.L., Drouin, J., Bandu, M.T., Christeff, N., Darracq, N., Barbey, R., Doly, J., Thomas, D., and Navarro, S. (2000). Repression of virus-induced interferon A promoters by homeodomain transcription factor Ptx1. *Mol Cell Biol* 20, 7527-7540.
- Loughlin, J. (2001). Genetic epidemiology of primary osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 13, 111-116.
- Melamed, P., Koh, M., Preklathan, P., Bei, L., and Hew, C. (2002). Multiple mechanisms for Pitx-1 transactivation of a luteinizing hormone beta subunit gene. *J Biol Chem* 277, 26200-26207.
- Melrose, J., Smith, S., Knox, S., and Whitelock, J. (2002). Perlecan, the multidomain HS-proteoglycan of basement membranes, is a prominent pericellular component of ovine hypertrophic vertebral growth plate and cartilaginous endplate chondrocytes. *Histochem Cell Biol* 118, 269-280.
- Miosge, N., Waletzko, K., Bode, C., Quondamatteo, F., Schultz, W., and Herken, R. (1998). Light and electron microscopic in-situ hybridization of collagen type I and type II mRNA in the fibrocartilaginous tissue of late-stage osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 6, 278-285.
- Murdoch, A.D., Dodge, G.R., Cohen, I., Tuan, R.S., and Iozzo, R.V. (1992). Primary structure of the human heparan sulfate proteoglycan from basement membrane (HSPG2/perlecan). A chimeric molecule with multiple domains homologous to the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J Biol Chem* 267, 8544-8557.
- Nayak, S.K., Panesar, P.S., and Kumar, H. (2009). p53-Induced apoptosis and inhibitors of p53. *Curr Med Chem* 16, 2627-2640.
- Obara, N., Suzuki, N., Kim, K., Nagasawa, T., Imagawa, S., and Yamamoto, M. (2008). Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood* 111, 5223-5232.

- Perrotti, D., Melotti, P., Skorski, T., Casella, I., Peschle, C., and Calabretta, B. (1995). Overexpression of the zinc finger protein MZF1 inhibits hematopoietic development from embryonic stem cells: correlation with negative regulation of CD34 and c-myc promoter activity. *Mol Cell Biol* *15*, 6075-6087.
- Picard, C., Azeddine, B., Moldovan, F., Martel-Pelletier, J., and Moreau, A. (2007). New emerging role of pitx1 transcription factor in osteoarthritis pathogenesis. *Clin Orthop Relat Res* *462*, 59-66.
- Poole, A.R. (1999). An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci* *4*, D662-670.
- Poole, A.R., Rizkalla, G., Ionescu, M., Reiner, A., Brooks, E., Rorabeck, C., Bourne, R., and Bogoch, E. (1993). Osteoarthritis in the human knee: a dynamic process of cartilage matrix degradation, synthesis and reorganization. *Agents Actions Suppl* *39*, 3-13.
- Quirk, C.C., Lozada, K.L., Keri, R.A., and Nilson, J.H. (2001). A single Pitx1 binding site is essential for activity of the LHBeta promoter in transgenic mice. *Mol Endocrinol* *15*, 734-746.
- Radin, E.L., Abernethy, P.J., Townsend, P.M., and Rose, R.M. (1978). The role of bone changes in the degeneration of articular cartilage in osteoarthrosis. *Acta Orthop Belg* *44*, 55-63.
- Roach, H.I., and Aigner, T. (2007). DNA methylation in osteoarthritic chondrocytes: a new molecular target. *Osteoarthritis Cartilage* *15*, 128-137.
- Rocha, S., Campbell, K.J., Roche, K.C., and Perkins, N.D. (2003). The p53-inhibitor pifithrin-alpha inhibits firefly luciferase activity in vivo and in vitro. *BMC Mol Biol* *4*, 9.
- Rossert, J., Eberspaecher, H., and de Crombrughe, B. (1995). Separate cis-acting DNA elements of the mouse pro-alpha 1(I) collagen promoter direct expression of reporter genes to different type I collagen-producing cells in transgenic mice. *J Cell Biol* *129*, 1421-1432.
- Ryan, A.K., Blumberg, B., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., Tamura, K., Tsukui, T., de la Pena, J., Sabbagh, W., Greenwald, J., Choe, S., *et al.* (1998). Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* *394*, 545-551.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning Laboratory Manual*, Third edn (Cold Spring Harbor, New York, CSHL Press).
- Sandell, L.J., and Aigner, T. (2001). Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* *3*, 107-113.
- Semina, E.V., Ferrell, R.E., Mintz-Hittner, H.A., Bitoun, P., Alward, W.L., Reiter, R.S., Funkhauser, C., Daack-Hirsch, S., and Murray, J.C. (1998). A novel homeobox gene PITX3 is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD. *Nat Genet* *19*, 167-170.

- Shi, X., Bosenko, D.V., Zinkevich, N.S., Foley, S., Hyde, D.R., Semina, E.V., and Vihtelic, T.S. (2005). Zebrafish *pitx3* is necessary for normal lens and retinal development. *Mech Dev* 122, 513-527.
- Shimokawa, T., Yasutaka, S., Kominami, R., Tanaka, S., and Shinohara, H. (2008). *Pitx1* expression in developing and regenerating axolotl limbs. *Okajimas Folia Anat Jpn* 85, 5-10.
- Spector, T.D., and MacGregor, A.J. (2004). Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage* 12 Suppl A, S39-44.
- SundarRaj, N., Fite, D., Ledbetter, S., Chakravarti, S., and Hassell, J.R. (1995). Perlecan is a component of cartilage matrix and promotes chondrocyte attachment. *J Cell Sci* 108 (Pt 7), 2663-2672.
- Szeto, D.P., Ryan, A.K., O'Connell, S.M., and Rosenfeld, M.G. (1996). P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7706-7710.
- Tak, P.P., Smeets, T.J., Boyle, D.L., Kraan, M.C., Shi, Y., Zhuang, S., Zvaifler, N.J., Breedveld, F.C., and Firestein, G.S. (1999). p53 overexpression in synovial tissue from patients with early and longstanding rheumatoid arthritis compared with patients with reactive arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 42, 948-953.
- Tesche, F., and Miosge, N. (2004). Perlecan in late stages of osteoarthritis of the human knee joint. *Osteoarthritis Cartilage* 12, 852-862.
- Tremblay, J.J., Lanctot, C., and Drouin, J. (1998). The pan-pituitary activator of transcription, *Ptx1* (pituitary homeobox 1), acts in synergy with SF-1 and *Pit1* and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene *Lim3/Lhx3*. *Mol Endocrinol* 12, 428-441.
- Tremblay, J.J., Marcil, A., Gauthier, Y., and Drouin, J. (1999). *Ptx1* regulates SF-1 activity by an interaction that mimics the role of the ligand-binding domain. *EMBO J* 18, 3431-3441.
- von der Mark, K., and Gluckert, K. (1990). [Biochemical and molecular biologic aspects of early detection of human arthroses]. *Orthopade* 19, 2-15.
- Wang, F.L., Connor, J.R., Dodds, R.A., James, I.E., Kumar, S., Zou, C., Lark, M.W., Gowen, M., and Nuttall, M.E. (2000). Differential expression of *egr-1* in osteoarthritic compared to normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 8, 161-169.
- Yan, Q.W., Reed, E., Zhong, X.S., Thornton, K., Guo, Y., and Yu, J.J. (2006). *MZF1* possesses a repressively regulatory function in *ERCC1* expression. *Biochem Pharmacol* 71, 761-771.
- Zoeller, J.J., McQuillan, A., Whitelock, J., Ho, S.Y., and Iozzo, R.V. (2008). A central function for perlecan in skeletal muscle and cardiovascular development. *J Cell Biol* 181, 381-394.

Annexe I. Solutions diverses

Transfert sur filtre

Tampon SSC 20X: 3.0 M NaCl; 0,3 M citrate de sodium, pH 7.0

Southern Dénaturant: 1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH

Southern Neutralisant: 1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl pH 8,0

Solution d'hybridation (Church buffer): 7% (w/v) SDS; 300 mM NaPhosphate pH 6.8; 5 mM EDTA

Solution de lavage astringence moyenne : 1% SDS; 140mM NaPhosphate pH 6.8

Tampon SM (SM Buffer) : SM; 5,8 g NaCl; 2,0 g MgSO₄ • 7H₂O; 50,0 ml 1M Tris-HCl (pH 7,5); 5,0 ml gélatine 2%; eau déionisée jusqu'à 1 litre; autoclaver.

Milieu LB (LB Broth) : 10 g NaCl; 10 g tryptone; 5 g extrait de levure par litre.

Milieu NZY (NZY Broth) : 5 g NaCl; 2 g MgSO₄ • 7H₂O; 5 g extrait de levure; 10 g NZ amine (casein hydrolysate), par litre.

Top agarose NZY (NZY Top Agar): 0,7% (w/v) agarose.

Pétris NZY (NZY Agar) : 5 g NaCl; 2 g MgSO₄ • 7H₂O; 5 g extrait de levure; 10 g NZ amine (casein hydrolysate); 15 g agar, par litre.

Pétris LB (LB Agar) : 10 g NaCl; 10 g tryptone; 5 g extrait de levure; 20 g agar; par litre.

T-Broth : 10 g bio-tryptone ; 5 g NaCl par litre.

Tampon β-gal 5X : 25 ml PBS 10X; 2,5 ml KCl 1M; 0,25 ml MgCl₂ 1M; 0,875 ml β-mercaptoethanol 14,3M et 21,38 ml eau déionisée.