

Université de Montréal

Le rôle de la signalisation Wnt dans le phénotype anormal des ostéoblastes
ostéoarthrosiques

par
Thomas Chan

Sciences Biomédicales
Centre de recherche du CHUM Notre-Dame
Faculté de Médecine

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade M.Sc en Sciences Biomédicales
option Musculo-Squelettique

Juillet 2010

© Thomas Chan, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :
Le rôle de la signalisation Wnt dans le phénotype anormal des ostéoblastes
ostéoarthrosiques

présenté par :
Thomas Chan

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Muhammad Zafarullah
président-rapporteur

Dr Daniel Lajeunesse
directeur de recherche

Dre Florina Moldovan
membre du jury

RÉSUMÉ

L'ostéoarthrose (OA) est une pathologie de forte incidence affectant les articulations. Elle est caractérisée principalement par une dégradation du cartilage articulaire, un déséquilibre au niveau du remodelage osseux et une sclérose de l'os sous-chondral. L'étiologie de cette pathologie reste encore méconnue, cependant il semble de plus en plus que tous les tissus composant l'articulation soient affectés dans cette pathologie. L'importance du rôle de l'os dans le développement de l'OA est incontestable et représente donc une cible thérapeutique intéressante. Des études effectuées par tomодensitométrie ont démontré une structure et une organisation anormales du tissu osseux des patients OA. Parallèlement, les cultures primaires d'ostéoblastes (Ob) humains OA issus de l'os sous-chondral démontrent un phénotype altéré et une faible minéralisation *in vitro*. La signalisation Wnt, essentielle dans l'embryogenèse, a montré avoir un rôle clé dans la régulation de l'ostéogenèse en régulant notamment la différenciation terminale des Ob. Le facteur de croissance transformant- β 1 (TGF- β 1), un facteur agissant notamment sur la prolifération et sur le début de la différenciation des Ob, est surexprimé par les Ob OA et pourrait moduler cette signalisation. Aussi, deux populations de patients OA peuvent être différenciées *in vitro* par la production de prostaglandines E₂ (PGE₂) par leurs Ob et les PGE₂, dans une étude sur le cancer colorectal, ont montré moduler la signalisation Wnt.

Notre hypothèse de travail est que l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine est diminuée dans les Ob OA. Cette diminution est responsable de la sous-minéralisation et de l'altération du phénotype des Ob humains OA. Par ailleurs, DKK2, dont l'expression est contrôlée par TGF- β 1, est responsable de la diminution de l'activité Wnt/ β -caténine et les PGE₂ peuvent en partie corriger cette situation. L'objectif général de cette étude est d'une part, de démontrer le rôle de TGF- β 1, DKK2 et de PGE₂ sur l'altération de la signalisation Wnt/ β -caténine et d'autre part, de démontrer le lien entre TGF- β 1 et DKK2 et l'effet de ces derniers sur le phénotype des Ob.

Dans cette étude on a montré que la signalisation canonique Wnt est altérée dans les Ob OA et que cela était responsable de l'altération du phénotype des Ob OA. On a

montré, parmi les acteurs de la signalisation Wnt, que l'expression de l'antagoniste Dickkopf-1 (DKK1) était relativement similaire entre les Ob OA et normaux contrairement à celle de l'antagoniste DKK2 qui était augmentée et à celle de l'agoniste Wnt7B qui était diminuée dans les Ob OA. On a également montré que les PGE₂ pouvaient potentialiser l'activité de la signalisation Wnt dans les Ob OA. L'inhibition de DKK2 a permis d'augmenter l'activité de la signalisation Wnt et de corriger le phénotype anormal ainsi que d'augmenter la minéralisation des Ob OA. L'inhibition de TGF-β1, un facteur aussi surexprimé dans les Ob OA, a également permis la correction du phénotype et l'augmentation de la minéralisation dans les Ob OA. L'inhibition de TGF-β1 a aussi menée à l'inhibition de DKK2. Le contraire ne fût pas observé démontrant ainsi la régulation de DKK2 par TGF-β1.

En conclusion, la signalisation canonique Wnt est diminuée dans les Ob OA et cela est dû au niveau élevé de DKK2 dans ces Ob. TGF-β1 régule positivement DKK2 et donc la surexpression de TGF-β1 entraîne celle de DKK2 ce qui a pour conséquences d'altérer le phénotype des Ob. Les PGE₂ ont aussi montré pouvoir potentialiser l'activité de la signalisation Wnt et auraient donc un rôle positif. Ensemble, ces données suggèrent que ces altérations au niveau des Ob OA pourraient être responsables de la structure osseuse anormale observée chez les patients OA.

Mots clés : Ostéoarthrose, os sous-chondral, ostéoblaste, minéralisation, remodelage osseux, signalisation Wnt, PGE₂, DKK2, TGF-β1, Wnt7B.

SUMMARY

Osteoarthritis (OA) is a disease affecting joints and it has a very strong incidence in the population. It is characterized by articular cartilage degradation, an abnormal bone remodelling cycle and subchondral bone sclerosis. The aetiology of this disease is still unknown although OA is now considered as a joint disease involving all the tissues of the joint. The importance of bone in OA pathogenesis is now considered as fundamental and thus bone represent an interesting target for treatments. Tomodensitometric studies have shown an abnormal structure and organisation of the bone tissue of OA patients. In parallel, primary human OA osteoblast (Ob) cultures grown from the tibiofemoral subchondral bone show an abnormal phenotype and a reduced mineralization *in vitro*. The Wnt signalling pathway, known primarily for its important role in embryogenesis, is of utmost importance in osteogenesis and it has been shown to regulate terminal Ob differentiation. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), known to act on proliferation and on early phases of the differentiation of Ob, is overexpressed by OA Ob and could also modulate the Wnt signalling activity. Furthermore, two populations of OA patients can be discriminated *in vitro* by the production of prostaglandins E₂ (PGE₂) of their Ob. In a study on colorectal cancer, PGE₂ was shown to modulate the canonical Wnt signalling pathway.

Our hypothesis is that canonical Wnt signalling is diminished in OA Ob. This reduction is responsible for the poor mineralization and the abnormal phenotype of human OA Ob. Furthermore, DKK2, overexpressed in OA Ob and whose expression is controlled by TGF- β 1, is responsible for the diminution of Wnt signalling activity, and PGE₂ can partly correct this situation. The general goal of this study is twofold: 1) to demonstrate the role of TGF- β 1, DKK2 and of PGE₂ in the Wnt signalling activity; 2) to demonstrate the link between TGF- β 1 and DKK2 and their effect on the abnormal OA Ob phenotype.

We have shown in this study that the canonical Wnt signalling pathway is altered in OA Ob and that this was responsible for the altered phenotype observed in OA Ob. Also, we have shown that among the mediators of the Wnt signalling pathway, the

expression of antagonist Dickkopf-1 (DKK1) was similar between OA and normal Ob. In contrast, the antagonist DKK2 was overexpressed and the expression of the agonist Wnt7B was low in OA Ob. Moreover, PGE₂ increased Wnt signalling activity in OA Ob. The inhibition of DKK2 expression also increased Wnt signalling activity and corrected the abnormal phenotype along with increasing the mineralization of OA Ob. The inhibition of TGF- β 1 expression, also overexpressed in OA Ob, also resulted in the correction of the phenotype and increased the mineralization of OA Ob. Inhibiting TGF- β 1 expression also led to DKK2 inhibition. As the contrary was not observed, this demonstrated that TGF- β 1 could regulate DKK2 expression.

To conclude, Wnt signalling is reduced in OA Ob and this is due to elevated DKK2 levels in these cells. High levels of TGF- β 1 in OA Ob increased DKK2 expression which could be responsible, at least partially, for their altered phenotype. PGE₂ was shown to also increase Wnt signalling activity in OA Ob. Taken together these data suggest that such alterations in OA Ob could be responsible for the abnormal bone structure observed in OA patients.

Tags: Osteoarthritis, subchondral bone, osteoblast, mineralization, bone turnover, Wnt signalling, PGE₂, DKK2, TGF- β 1, Wnt7B.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire.....	iii
Summary.....	v
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xvii
Dédicace.....	xviii
Remerciements.....	xix
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	1
<i>1 L'ostéoarthrose.....</i>	<i>3</i>
<i>1.1 Définition.....</i>	<i>3</i>
<i>1.1.1 Les différentes articulations affectées par l'OA.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2 Diagnostic et critères de l'American College of Rheumatology.....</i>	<i>5</i>
<i>1.1.3 Ostéoarthrose primaire et secondaire.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2 Épidémiologie.....</i>	<i>8</i>
<i>1.2.1 Prévalence et incidence.....</i>	<i>8</i>
<i>1.2.2 Facteurs de risques.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.2.1 Impacts des traumatismes articulaires.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.2.2 Sexe et génétique.....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.2.3 Activité physique.....</i>	<i>11</i>

1.2.2.4	<i>Obésité</i>	12
1.2.2.5	<i>Âge</i>	12
1.3	<i>Les traitements actuels</i>	13
1.3.1	<i>Phase précoce</i>	13
1.3.2	<i>Phase avancée</i>	15
2	<i>Les tissus affectés dans l'ostéarthrose</i>	16
2.1	<i>Le cartilage articulaire</i>	18
2.1.1	<i>Composition du cartilage articulaire</i>	18
2.1.1.1	<i>Les cellules</i>	18
2.1.1.2	<i>La matrice extracellulaire</i>	20
2.1.2	<i>Le cartilage articulaire ostéoarthrosique</i>	22
2.2	<i>Le tissu osseux</i>	26
2.2.1	<i>Anatomie et composition</i>	26
2.2.1.1	<i>Os cortical</i>	28
2.2.1.2	<i>Os trabéculaire</i>	28
2.2.1.3	<i>Matrice osseuse</i>	28
2.2.2	<i>Les cellules osseuses</i>	31
2.2.2.1	<i>L'ostéoblaste et sa différenciation</i>	31
2.2.2.2	<i>L'ostéoclaste et sa différenciation</i>	32
2.2.3	<i>Le remodelage osseux</i>	33
2.2.3.1	<i>Le cycle du remodelage osseux</i>	34

2.2.3.2	<i>Régulation du remodelage osseux</i>	36
2.2.3.2.1	<i>Facteurs locaux</i>	36
2.2.3.2.2	<i>Facteurs systémiques</i>	38
2.2.4	<i>L'os sous-chondral dans l'ostéarthrose</i>	39
2.2.4.1	<i>Fonction dans la résistance au choc mécanique</i>	40
2.2.4.2	<i>La sclérose osseuse</i>	40
2.2.4.2.1	<i>L'ostéoblaste ostéoarthrosique</i>	41
2.2.4.2.1.1	<i>Un phénotype altéré</i>	41
2.2.4.2.1.2	<i>Un métabolisme altéré et une minéralisation anormale</i>	42
2.3	<i>Les autres tissus articulaires et leur implication dans l'ostéarthrose</i>	43
3	<i>La signalisation Wnt dans l'ostéarthrose</i>	44
3.1	<i>La signalisation canonique Wnt/β-caténine</i>	45
3.1.1	<i>Fonctionnement</i>	45
3.2	<i>Les voies de signalisation Wnt non-canoniques</i>	48
3.3	<i>Les acteurs extracellulaires de la signalisation Wnt</i>	49
3.3.1	<i>Les agonistes</i>	49
3.3.2	<i>Les antagonistes</i>	50
3.4	<i>Les « cross-talk » de la signalisation Wnt</i>	51
3.5	<i>Évidence d'un rôle de la signalisation Wnt dans l'OA</i>	53
4	<i>Hypothèse de recherche</i>	56

CHAPITRE 2: MANUSCRIT	57
CHAPITRE 3: MATÉRIEL ET MÉTHODE	90
CHAPITRE 4: RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	99
CHAPITRE 5: DISCUSSION	103
CHAPITRE 6: CONCLUSION	115
CHAPITRE 7: RÉFÉRENCES	120

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Échelle Kellgren-Lawrence pour l'évaluation radiographique de la gonarthrose	6
Tableau II : Description des sites affectés par l'OA primaire et des causes de l'OA secondaire	7

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

Figure 1: Schéma représentant différentes phases de l'arthrose du genou.....	4
Figure 2: Incidence de l'ostéoarthrose de la main, de la hanche et du genou au sein des membres de la <i>Fallon Community Health Plan</i> (de 1991 à 1992) par rapport à l'âge et au sexe.....	9
Figure 3: Schéma de la différenciation des cellules mésenchymateuses.....	17
Figure 4: Schéma des 4 différentes couches du cartilage articulaire.....	21
Figure 5: Schéma des structures de l'os trabéculaire et de l'os cortical.....	27
Figure 6: Schéma du cycle du remodelage osseux.....	34
Figure 7: Schéma de la signalisation canonique Wnt/ β -caténine en présence et en l'absence de Wnt.....	47
Figure 8: Schéma des voies de signalisation Wnt non-canoniques.....	48
Figure 9: Lien entre la signalisation canonique Wnt et celle des PGE ₂ via les récepteurs EPs.....	52
Figure 10: Lien entre la signalisation des membres de la famille des TGF- β /BMP et la signalisation canonique Wnt.....	53

CHAPITRE 2: MANUSCRIT

Figure 1: Expression of Wnt antagonists and receptors in normal and OA Ob by real-time PCR.....	84
Figure 2: Transcriptional activity of β -catenin in normal and OA Ob: effect of PGE ₂ and DKK2.....	85
Figure 3: Modulation of β -catenin accumulation in normal and OA Ob.....	86
Figure 4: Effect of siDKK2 and siTGF- β 1 inhibition on alkaline phosphatase activity and osteocalcin release by OA Ob.....	87
Figure 5: Relationship between TGF- β 1 and DKK2 expression in normal and OA Ob.....	88
Figure 6: Effect of DKK2 on BMP-2 induced alizarin red staining.....	89

CHAPITRE 3: RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Figure S1 : Expression de Wnt7B dans les ostéoblastes normaux et OA.....	100
Figure S2 : Effet de l'inhibition de DKK2 et de TGF- β 1 sur l'expression de Wnt7B.....	101
Figure S3 : Expression temporelle de DKK2 dans les ostéoblastes OA.....	102

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACR	American College of Rheumatology
ADAMTS	A Disintegrin And Metalloproteinase with a Thrombospondin type-1 motif
ALPase	Alkaline Phosphatase
APC	Adenomatous Polyposis Coli
β -TrCP	β -Transducin repeat Containing Protein
BMI	Body Mass Index
BML	Bone Marrow Lesion
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSP	Bone Sialoprotein
Ca ²⁺	calcium ion
CATK	Cathepsin K
cGMP	cyclic Guanosine Monophosphate
CKI	Casein Kinase I
COL	Collagen
COX-2	Cyclooxygenase
DKK	Dickkopf
Dsh	Dishevelled
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
EP	Prostaglandin E Receptor
Fz	Frizzled
GDF-5	Growth/Differentiation Factor 5
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
IGF	Insulin Growth Factor

IL-1 Interleukin
IL-1RN Interleukin-1 Receptor Antagonist
KO Knockout
LEF Lymphoid Enhancer-binding Factor
LDL Low density Lipoprotein
LRP LDL Receptor-related Protein
L-SOX5 a new Long form of SOX5
LTB Leukotriene B
M-CSF Macrophage Colony Stimulating Factor
MMP Matrix Metalloprotease
MRI Magnetic Resonance Imaging
NSAID Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug
OA Osteoarthritis
Ob Osteoblast
OPG Osteoprogesterin
OPPG Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome
Osx Osterix
PCP Planar Cell Polarity
PGE Prostaglandin
Pitx Paired-like homeodomain
PKC Protein Kinase C
 PO_4^{2-} phosphate ion
PTH Parathyroid Hormone
RANKL Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand
ROR Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor
Runx2 Runt-related transcription factor 2
RYK Receptor tyrosine Kinase

sFRP secreted Frizzled-Related Protein

siRNA small inhibitory RNA

SMAD Mothers againsts decapentaplegic homolog

SOST Sclerostin

SOX-9 SRY(sex determining region)-box 9

TCF T-Cell Factor

TGF Transforming Growth Factor

TNF Tumor Necrosis Factor

TRAP TNF-receptor Associated Protein

Wif Wnt inhibitory factor

WOMAC Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index

DÉDICACE

« Je dédie ce mémoire tout d'abord à ma mère qui, malgré qu'elle ne soit plus de ce monde, reste ma source d'inspiration et la raison ma persévérance. Je le dédie ensuite à ma famille qui m'a soutenu tout au long de mes études »

REMERCIEMENTS

J'aimerais principalement remercier mon directeur de recherche, le Dr Daniel Lajeunesse, non seulement pour m'avoir accueilli dans son laboratoire mais aussi pour l'écoute, l'aide, l'encouragement, le support, les conseils qu'il m'a donné tout au long de ma maîtrise. Merci Daniel pour cette magnifique expérience de recherche que tu m'as permis de vivre.

J'aimerais aussi particulièrement remercier le Dr Pascal Reboul, le Dr Denis Couchourel, Aline Delalandre et François Mineau pour leur grand support. Je n'oublierai jamais cette ambiance de recherche unique parsemée de discussions scientifiques et non scientifiques pertinentes et d'humour qui rendait cette recherche d'autant plus stimulante et agréable.

J'aimerais ensuite remercier David Hum, le Dr Élie Abed et Marie-Solange Mutabaruka qui m'ont aussi été d'une aide très appréciable en plus d'être de formidables collègues. Enfin, j'aimerais remercier les secrétaires ainsi que tous les autres membres de l'Unité de recherche en Arthrose de l'hôpital Notre-Dame pour l'aide qu'ils ont pu m'apporter.

Et finalement, je remercie ma famille pour leur support ainsi que ceux que j'ai oublié de remercier et qui auraient joué un rôle plus ou moins important lors de ces études (de cette manière je n'oublie de remercier personne).

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Lors des deux dernières décennies l'emphase de la recherche sur l'ostéoartrrose (OA) était mise surtout sur le cartilage car il s'agissait à première vue du tissu le plus affecté. Par ce fait, le rôle des autres composantes de l'articulation ont historiquement eu tendance à être négligé. Aujourd'hui, l'ostéoartrrose est vue comme étant une pathologie affectant l'articulation en entier et donc chaque tissu composant l'articulation devrait avoir droit à une attention particulière.

Comme dans beaucoup d'autres pathologies, l'OA implique des changements morphologiques et de la douleur. La particularité de cette pathologie est que ces deux caractéristiques n'évoluent pas clairement ensemble et la progression de cette pathologie chez chaque patient est différente. Les patients OA forment alors un groupe très hétérogène en vue de l'évolution de la pathologie. De plus, plusieurs études ont démontré une grande hétérogénéité quant à la réponse des patients aux divers traitements. Par contre, en phase avancée d'OA, les patients présentent des caractéristiques communes. Dans une première partie, après avoir décrit et discuté de la complexité de l'OA, je présenterai l'épidémiologie et passerai en revue les traitements actuels de l'OA.

Au cours du temps, la recherche sur l'OA a grandement portée sur l'étude du cartilage articulaire éclipsant de ce fait l'étude des autres tissus impliqués dans l'OA. Ainsi, puisque la douleur représente la condition pour laquelle les patients consultent majoritairement, il est important de souligner que le cartilage est un tissu avasculaire contrairement à l'os qui présente également des altérations importantes. Le tissu osseux et la membrane synoviale peuvent par contre expliquer la présence de douleurs dans l'OA, symptôme principal de l'OA symptomatique. L'os devient de plus en plus une cible pour les traitements de l'OA. Dans une seconde partie, après avoir montré leur origine commune, je décrirai les différents tissus impliqués ou potentiellement impliqués dans l'OA en apportant une attention particulière à l'os car il s'agit évidemment du tissu étudié.

Pour étudier l'OA, divers modèles sont utilisés, et ils ont chacun leurs avantages et leurs désavantages. Diverses voies signalétiques pourraient être en cause dans l'OA comme le démontre plusieurs modèles de souris délétée. La signalisation Wnt est connue

depuis longtemps pour son rôle dans l'embryogenèse mais ce n'est que depuis une dizaine d'année qu'il a été démontré que cette signalisation est impliquée dans l'ostéogenèse et l'ostéoblastogenèse. Dans une dernière partie, je décrirai la signalisation Wnt avant de finalement montrer les évidences de son implication dans l'OA.

1. L'ostéoarthrose

1.1. Définition

L'ostéoarthrose aurait été décrite pour la première fois décrite au XVIIIème siècle par Hunter qui avait décrit l'arthrite sèche de la hanche¹. Au XIXème siècle, les notions d'usure du cartilage et de prolifération ostéophytique furent apportées par Cruveilhier et Bruca à la définition de ce type d'arthrite particulière¹. Depuis, au cours du XXème siècle avec les avancées de la science ainsi que des méthodes d'imagerie, plusieurs auteurs ont amélioré cette définition en y donnant plus de précision. Je vous présente ici une définition brève de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui décrit globalement cette pathologie relativement complexe : *« L'arthrose est la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral. Ce déséquilibre peut être initié par de multiples facteurs : génétiques, de développement, métaboliques et traumatiques. L'arthrose touche tous les tissus de l'articulation diarthrodiale et se manifeste par des modifications morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques des cellules de la matrice cartilagineuse conduisant à un ramollissement, une fissuration, une ulcération et une perte de cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral avec production d'ostéophytes et de kystes sous-chondraux. Quand elle devient symptomatique, l'arthrose entraîne douleur et raideur articulaires, un éventuel épanchement articulaire avec des degrés variables d'inflammation locale². »* L'évolution de cette définition témoigne donc des avancées quant à la compréhension de l'étiologie de cette pathologie. Aujourd'hui l'OA est la forme la plus commune d'arthrite et elle est la principale cause de limitations fonctionnelles au sein de la population âgée. Bien que l'OA soit classée dans les maladies arthritiques, elle se distingue principalement des autres formes d'arthrites par le fait que l'inflammation

n'est pas une des causes primaires de la pathologie. Dans l'OA, l'inflammation est plutôt une conséquence d'un problème métabolique articulaire antécédent.



Figure 1. **Schéma représentant différentes phases de l'arthrose du genou.** On peut voir dans ce schéma quelques changements macroscopiques importants au niveau de l'os et du cartilage. On peut voir, en phase débutante, un début de pincement articulaire et un effritement du cartilage et en phase évoluée, on observe une sclérose osseuse importante avec une présence d'ostéophytes et un pincement articulaire marqué. (Image tirée du site www.chirurgie-arthrose.com)

1.1.1. Les différentes articulations affectées par l'OA

L'OA peut affecter presque toutes les articulations mais certaines se retrouvent beaucoup plus affectées que d'autres. L'OA affecte principalement les articulations du genou, de la hanche, de la colonne vertébrale et de la main³. Pour la main, toutes les articulations ne sont pas affectées, dans la majorité des cas les articulations interphalangiennes proximales et distales de la main et la première articulation carpo-métacarpienne du pouce sont les plus touchées⁴. Plus rarement, l'épaule, la cheville et le pied peuvent être affectés. La grande majorité des cas d'OA sont toutefois des cas de gonarthrose (OA du genou) et de coxarthrose (OA de la hanche)⁵. Ces informations s'avèrent utiles pour différencier l'OA des formes d'arthrites inflammatoires telle la polyarthrite rhumatoïde qui peut affecter souvent le coude, le poignet et le pied.

1.1.2. Diagnostic et critères de l'*American College of Rheumatology*

En clinique la distinction entre une forme d'arthrite inflammatoire et l'OA se fait relativement facilement. À l'aide d'une série de questions ainsi qu'avec un examen physique simple, on peut déterminer si le patient présente de l'OA⁶⁻⁸. Les principaux symptômes de la gonarthrose sont des raideurs matinales de moins de 30 minutes, des crépitements, des douleurs et une perte de fonction au niveau de l'articulation affectée⁶. Dans le cas d'une gonarthrose (OA du genou) ou d'une coxarthrose (OA de la hanche), le patient peut aussi se plaindre d'une instabilité au niveau de l'articulation. Dans le cas d'une OA sévère, des douleurs nocturnes de longue durée peuvent survenir. Généralement, le patient souffrant d'OA présente ces symptômes depuis déjà plusieurs années.

Il est important de différencier l'OA radiographique de l'OA pathologique. En effet, on estime que 33% de la population âgée de 63 à 93 ans présente de la gonarthrose radiographique⁹. Pourtant, seulement 9,5% de cette population est symptomatique⁹. Inversement, des patients peuvent présenter des symptômes sans toutefois présenter de l'OA radiographique. L'OA radiographique peut être caractérisée à l'aide de l'échelle Kellgren-Lawrence (Tableau I). Cette échelle allant de 0 à 4, en ordre croissant de sévérité, permet d'évaluer la sévérité de l'OA radiographique. L'évaluation prend en compte la présence d'ostéophytes, de pincement articulaire, de sclérose osseuse et d'attrition au niveau de l'articulation. Ainsi, à partir du grade 2, on considère généralement que le patient présente de l'OA radiographique¹⁰. Bien que l'utilisation des rayons-X apporte beaucoup d'information quant à la présence d'ostéophytes, à la sclérose osseuse et à l'épanchement articulaire, la radiographie ne permet pas d'obtenir de l'information sur l'état des tissus mous tel le cartilage et sur la présence ou non de lésions de la moelle osseuse. En utilisant l'imagerie par résonance magnétique (MRI), une méthode en plein développement, on est capable d'observer de manière relativement précise l'état de tous les tissus de l'articulation¹¹. Les seuls désavantages et raisons pour lesquelles cette technique n'est pas souvent utilisée sont le coût élevé de l'appareil, la taille gigantesque de l'information numérisée recueillie ainsi que la durée du test qui est relativement longue.

Tableau I. **Échelle Kellgren-Lawrence pour l'évaluation radiographique de la gonarthrose.** Cette échelle allant de 0 à 4 permet la classification des patients OA selon la sévérité des signes radiographiques. (Tableau inspiré de celui retrouvé dans l'article de Kijowski et al.¹²)

Grade	Description Radiographique
0	Normal
1	Ostéophytes possibles
2	Ostéophytes et pincement articulaire
3	Ostéophytes modérés, pincement articulaire, sclérose, attrition possible
4	Ostéophyte larges, pincement articulaire important, sclérose sévère, attrition

L'OA pathologique ou clinique tient inévitablement compte de la douleur ressentie au niveau de l'articulation puisqu'il s'agit de la principale raison de la consultation¹³. L'OA radiographique ne signifie donc pas que le patient est symptomatique comme mentionné précédemment. Comme l'OA n'évolue pas de la même manière chez différents individus¹⁴, *l'American College of Rheumatology* (ACR) a émis une liste de critères pour définir l'OA clinique de différentes articulations. Ces critères pour définir l'OA émanent depuis la fin des années 1980, permettent aux études cliniques et fondamentales sur l'OA d'avoir plus de constance en prenant ces critères comme référence. Par ailleurs, le MRI permettant de voir des tissus affectés par l'OA, non-observables par radiographie classique, pourrait permettre dans un futur proche l'instauration de critères plus précis pour définir l'OA ainsi que son stade de sévérité.

1.1.3. Ostéoarthrose primaire et secondaire

L'OA dont on ne connaît pas l'origine ou dont on n'est pas certain de celle-ci est définie comme étant primaire ou idiopathique. Inversement, l'OA se définit comme étant secondaire lorsqu'on connaît sa provenance. Des problèmes au niveau développemental, mécanique, traumatique, métabolique, endocrinien, inflammatoire ou autre peuvent induire une OA secondaire (Tableau II)¹⁵.

Tableau II. **Description des sites affectés par l'OA primaire et des causes de l'OA secondaire.** (Tableau inspiré de l'article de Hart et al.¹⁵)

Idiopathique ou primaire	Secondaire
A. Localisée	A. Développementale
1. Mains	B. Mécanique
2. Pieds	C. Traumatique
3. Genou	D. Métabolique
4. Hanche	E. Endocrine
5. Colonne vertébrale	F. Inflammatoire
6. Autres sites	G. Diverse
B. Générale	

Le terme d'OA idiopathique est contesté par plusieurs¹⁶⁻¹⁸ entre autre à cause de la progression des techniques d'imagerie. Deux grands courants de pensée se confrontent quant à l'étiologie de l'OA. Certains proposent que l'origine de l'OA primaire soit en fait biomécanique¹⁹. Un ou des tissus de l'articulation répondraient anormalement à un stress mécanique. En effet, des corrélations importantes ont été faites entre des lésions au niveau méniscal et ligamentaire et l'incidence de l'OA¹⁸, pourtant la corrélation est loin d'être absolue¹⁸. D'autres proposent que l'OA primaire serait un problème métabolique tissulaire²⁰, cela sera discuté dans la deuxième section et dans la discussion. Un ou des tissus de l'articulation répondraient anormalement à un stress mécanique. Ces deux courants de pensée quant à l'étiologie de l'OA s'accordent sur un point soit celui de l'implication possible de tous les tissus de l'articulation. À noter que ces deux

courants de pensée peuvent se compléter ce qui rendrait ainsi l'étiologie de l'OA encore plus complexe.

1.2. Épidémiologie

1.2.1. Prévalence et incidence

L'OA est la forme la plus commune d'arthrite. Chez la population âgée, cette pathologie est une de celles causant le plus de limitations fonctionnelles dans les tâches quotidiennes. Une étude britannique a montré que 90% des patients atteints d'OA symptomatique démontraient ces limitations²¹. Selon Santé Canada, l'OA radiographique serait présente chez plus de 50% de la population adulte mais seulement 10% de la population canadienne serait atteinte d'OA symptomatique. Dans cette section, on discutera uniquement de l'OA symptomatique.

L'incidence de l'OA varie beaucoup en fonction de l'articulation affectée, de l'âge ainsi que du sexe (Figure 2). Avant l'âge de 50ans, l'OA touche davantage l'homme^{22,23}. Après 50ans, âge correspondant plus ou moins à l'atteinte de la ménopause chez la femme, celle-ci se retrouve deux fois plus affectée que l'homme²⁴. L'OA de la main affecte environ 10% de la population âgée de 40 à 49 et 80% de la population âgée de plus de 70ans²¹. La coxarthrose, quant à elle, affecte de 2 à 10% la population âgée de plus de 55ans²¹. Finalement, la gonarthrose, l'OA avec la plus forte prévalence, affecte 15% de la population âgé de moins de 45ans et 40% de la population âgée de plus de 75ans²¹.

Il est aussi intéressant de noter que l'incidence de tous les types d'OA est la plus élevée dans la tranche d'âge de 70 à 79ans mais diminue dans la tranche d'âge suivante soit celle de 80 à 89ans²⁴. Également, la plupart de ces études concernant l'incidence et la prévalence de l'OA ne distinguent pas l'OA primaire de l'OA secondaire. Ce renseignement s'avèrerait utile pour les recherches cliniques et fondamentales étant donné que les patients OA ont démontré répondre différemment aux divers traitements existants.

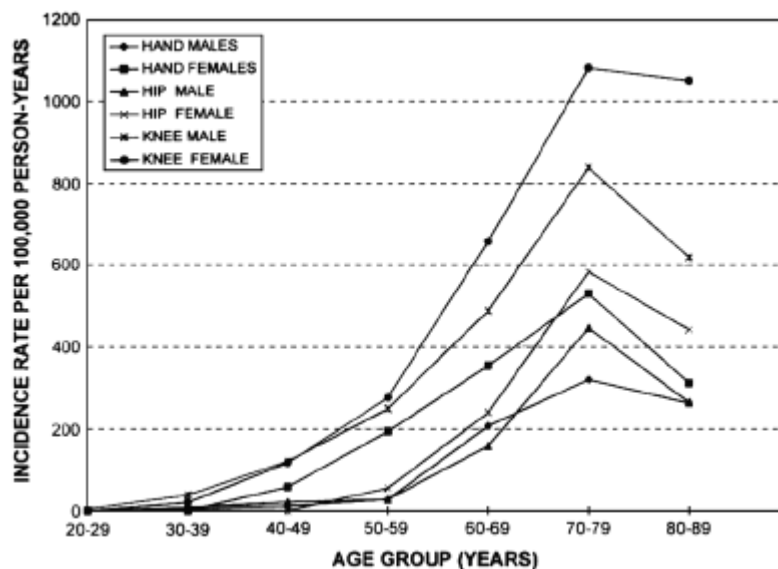


Figure 2. **Incidence de l'ostéoarthrose de la main, de la hanche et du genou au sein des membres de la Fallon Community Health Plan (de 1991 à 1992) par rapport à l'âge et au sexe²⁴.** On peut y voir des courbes croissantes jusqu'à la tranche d'âge de 70-79 qui par la suite décroissent.

1.2.2. Facteurs de risque

Malgré que l'origine de l'OA reste encore aujourd'hui méconnue, il existe plusieurs facteurs de risque pouvant nous en donner des indices. L'âge et l'obésité, les plus importants facteurs de risque, seront présenté à la fin de cette section.

1.2.2.1. Impacts des traumatismes articulaires

Dans de nombreux cas de gonarthrose, les traumatismes articulaires semblent être en cause¹⁸. Un traumatisme articulaire peut mener à des déchirures méniscales et ligamentaires ainsi qu'à des lésions de la moelle osseuse^{18,25}. Souvent, lors d'un traumatisme articulaire, ces trois tissus se retrouvent en même temps affectés²⁵. Ces traumatismes pourront déstabiliser l'articulation et entraîner un stress anormal à son niveau. Des études ont montré que 50% des patients ayant subi une lésion au niveau du ligament antérieur croisé ou du ménisque développeront l'OA¹⁸. Il est à noter que ces chiffres incluent uniquement les patients ayant consulté lors de ce traumatisme. En effet, une étude américaine a montré à l'aide de l'IRM que 4,8% de la population âgée de 50 à

90 ans présenteraient des lésions du ligament antérieur croisé non rapportées¹⁸. Bien que ces lésions au niveau ligamentaire et méniscal soient fortement reliées à l'OA, ces dernières ne provoqueraient pas directement de la douleur, une caractéristique importante de l'OA symptomatique. Ce sont plutôt les lésions de la moëlle osseuse qui sont reliées à la douleur ainsi qu'à la perte de cartilage articulaire^{26,27}, deux importantes caractéristiques de l'OA. Une meilleure compréhension de ces lésions et de ses conséquences permettraient sûrement de mieux comprendre l'OA et son évolution.

Comme l'IRM n'est pas performée sur tous les patients OA, l'utilisation des termes OA primaire et secondaire dans ces circonstances peut être remise en question. De plus, puisqu'il n'y a qu'un patient sur deux avec une lésion du ligament antérieur croisé ou du ménisque qui va développer l'OA, dans quelle catégorie devrait-on classer ce patient ?

1.2.2.2. Sexe et Génétique

Avant l'âge de 50 ans l'OA affecte plus l'homme que la femme^{22,23}, mais suite à cet âge, la femme se retrouve deux fois plus affectée²⁴. Cet âge transitoire correspond environ à la survenue de la ménopause chez la femme. Une étude aux Etats-Unis a montré que l'OA générale (affectant au moins 3 articulations) radiographique était 3 fois plus fréquente chez les femmes entre 45 et 64ans¹⁶. Les œstrogènes ont un rôle essentiel au niveau de l'os et joueraient un rôle essentiel dans le maintien du tonus musculaire¹⁶. Une forte baisse d'œstrogènes survenant à la ménopause pourrait entraîner plusieurs déséquilibres métaboliques et favoriser le développement de l'OA chez certaines femmes. Les effets bénéfiques de la thérapie œstrogénique sont encore sujet à débats²². À cause des différentes hormones utilisées lors de différentes études, il est difficile de conclure quant à l'efficacité de ce traitement.

Les études sur les jumeaux ont montré le caractère héréditaire que peut avoir l'OA. Cette hérédité varie toutefois grandement en fonction du sexe de l'individu. Une étude sur les jumeaux a montré que l'héritabilité de l'OA générale était de 39 à 65% chez la femme²⁸. Des études ont également montré que les enfants de patients ayant subi des remplacements de hanche ou de genou à cause de l'OA avaient 27% de chance de

développer une forme sévère d'OA²⁹. Les études génomiques réalisées sur la population OA afin de déterminer certains polymorphismes ont fait ressortir plusieurs gènes qui pourraient favoriser l'apparition de l'OA. Parmi les gènes que l'on a identifiés, on retrouve la protéine sécrétée *Frizzled-related protein 3*, l'asporin, le facteur de croissance *Growth/Differentiation Factor 5* (GDF-5), l'interleukine-1 α (IL-1 α), IL-1 β , l'antagoniste du récepteur IL-1 IL1RN^{23,30}, et même récemment la cyclooxygénase-2 (COX-2) dans le cas de l'OA du genou³¹. Également, des mutations au niveau des gènes codant pour le collagène de type I, II, IX, le récepteur de la vitamine D ainsi que les récepteurs aux œstrogènes ont montré être associées à l'OA primaire^{23,32,33}. Les études réalisées avec des souris ont montré que des mutations au niveau du *TGF- β binding protein-3* et du collagène de type I provoquaient l'apparition de l'OA chez ces souris^{34,35}.

1.2.2.3. Activité physique

De nombreuses études ont été réalisées quant au lien entre une certaine activité physique répétitive et l'OA. La plupart de ces études arrivent aux mêmes conclusions. Celles-ci étant que les travailleurs dont leur emploi fait appel à une utilisation routinière d'une certaine articulation sont plus à risque de développer de l'OA au niveau de cette articulation plus tard dans leur vie que la population générale. Il en est de même pour le sport en prenant l'exemple du lanceur de baseball qui est plus à risque de développer l'OA de l'épaule que la population générale³⁶.

Bien que l'activité physique puisse être un facteur de risque important, l'inactivité physique pourrait l'être également. En effet, une faiblesse des quadriceps est aussi associée à un risque élevé de développer l'OA du genou³⁷. Cela peut en partie s'expliquer par le fait qu'un des rôles importants de ce muscle est de réduire le stress au niveau du cartilage et de l'os lors d'une charge ou d'un exercice.

1.2.2.4. Obésité

Chez l'homme et particulièrement chez la femme, l'obésité est fortement associée à la gonarthrose. Ainsi des études ont montré que l'obésité survient avant l'apparition de l'OA²². L'obésité est plus fortement reliée à la gonarthrose bilatérale plutôt qu'à la gonarthrose unilatérale³⁸. Le risque de gonarthrose augmente lorsque l'indice de poids corporel (BMI) augmente³⁹. Il est intéressant de noter que chez les individus ayant un BMI élevé et ne présentant pas d'OA, ces individus présentaient une masse musculaire élevée⁴⁰. Celle-ci bien que plus dense pourrait servir de protection à l'articulation. L'obésité est également reliée à la coxarthrose et surtout à la coxarthrose bilatérale⁴¹. Des études ont également montrées que chez l'homme, l'OA de la main serait aussi relié à l'obésité⁴² indiquant donc un lien métabolique probable. Les adipocytes, cellules du tissu adipeux, les ostéoblastes et chondrocytes proviennent des cellules stromales de la moëlle osseuse. Un déséquilibre dans la différenciation de ces cellules stromales pourraient ainsi favoriser le développement de l'OA directement et/ou indirectement.

1.2.2.5. Âge

L'âge est le facteur de risque le plus important de l'OA de toutes les articulations. L'OA se développe avec le temps et touche surtout la population de plus de 60 ans⁵. La prévalence de l'OA atteint son plateau chez la population de 75 à 80 ans. Les changements fonctionnels des cellules et des tissus, la sarcopénie, les pertes de proprioception et de balance ainsi qu'une augmentation dans la laxité des jointures sont tous des facteurs reliés au vieillissement et contribuent au vieillissement du système musculo-squelettique⁴³. Le vieillissement de ce système en concert avec les facteurs de risque non-reliés au vieillissement favorisent le développement de l'OA⁴³. L'incapacité de l'organisme à réparer les tissus articulaires abimés va donc avec le vieillissement contribuer au développement progressif de l'OA.

1.3. Les traitements actuels

Bien qu'il existe de nombreux traitements pour l'OA, la majorité de ces derniers sont palliatifs et deviennent souvent inefficaces en phase avancée de l'OA. Bien que certains traitements ont montré améliorer très légèrement la fonction des patients OA en phase précoce, aucun ne s'avère être significativement efficace pour l'amélioration de la fonction des patients. La chirurgie est aujourd'hui le seul moyen efficace pour traiter la douleur et améliorer la fonction du patient. Il s'agit toutefois d'une méthode de dernier recours très coûteuse.

La cible de la majorité des traitements pour la préservation de la fonction articulaire est le cartilage, pourtant l'os, grandement impliqué dans le développement de l'OA, n'a pas reçu l'attention qu'il mérite. Ce n'est que depuis quelques années que l'os commence à être une cible de choix notamment grâce aux études démontrant son importance dans le développement de l'OA. J'insisterai ici sur les traitements visant le tissu osseux.

Les études cliniques sur l'OA représentent toujours un grand défi et sont souvent très coûteuses. Les raisons pour cela sont qu'elles nécessitent souvent un suivi des patients durant une longue période de temps soit un minimum d'un an et font souvent appel à l'utilisation d'appareil très coûteux tel le MRI. La longueur de ces études s'explique par la nature de la maladie qui est progressive ainsi que par l'hétérogénéité de sa progression auprès de la population OA.

1.3.1. Phase précoce de l'ostéoarthrose

Comme dans de nombreuses maladies, l'alimentation et l'exercice sont deux habitudes de vie ayant montré pouvoir être bénéfiques dans le traitement de l'OA. Une étude a montré que la vitamine C (acide ascorbique), connue pour son effet sur la minéralisation osseuse⁴⁴ avait ralenti significativement la progression de l'OA dans un modèle OA chirurgicalement induit de cochon d'Inde. De plus, l'étude de Framingham sur la gonarthrose a montré que le risque de développer l'OA était 3 fois moindre chez les deux tiers de la population consommant le plus de vitamine C⁵. Les antioxydants, le

resvératrol et la vitamine D sont d'autres facteurs souvent présents dans l'alimentation pouvant contribuer à ralentir la progression de l'OA mais surtout à prévenir son apparition^{45,46}. L'exercice est souvent prescrit car il contribue à l'amélioration de la condition du patient à différents niveaux. L'exercice peut servir notamment à la perte de poids, à la préservation de la flexibilité de l'articulation ainsi qu'au renforcement musculaire pour la stabilité de l'articulation⁴⁷. Les exercices favorables aux patients OA sont ceux qui n'engendrent que peu de stress sur les articulations tels les sports aquatiques, le vélo stationnaire et la marche⁴⁷. L'alimentation et l'exercice s'avèrent aussi les outils principaux pour la perte de poids et celle-ci réduirait significativement les symptômes chez les patients souffrant de gonarthrose⁴⁷⁻⁴⁹. Une étude relationnelle sur la douleur et la fonction entre la perte de poids et l'OA de la main serait intéressante pour l'indentification d'une implication métabolique dans ce type d'OA. L'acétaminophène est le premier traitement suggéré aux patients OA et lorsque ce dernier s'avère inefficace, la viscosuppléance ainsi que l'injection de corticostéroïdes au niveau local sont utilisées comme traitement. La viscosuppléance a comme avantage de ne pas avoir d'effets secondaires majeures et pouvoir agir sur la fonction de l'articulation mais possède comme désavantage son coût élevé et son efficacité controversée. L'injection de corticostéroïdes s'avère être beaucoup plus efficace que la viscosuppléance dans le traitement de la douleur mais la durée de son efficacité est variable et dure environ 3 mois. Ce traitement entraîne peu d'effets secondaires si l'injection est faite au bon endroit. Les effets de la glucosamine restent sujets à controverse bien qu'une étude majeure publiée dans le journal *Lancet* a montré des effets significativement positifs sur la douleur et la fonction des patients OA. La critique de ces résultats est très pertinente, bien que les résultats soient significatifs statistiquement, ils ne le sont pas cliniquement puisque l'amélioration au test *Western Ontario and McMaster Universities Arthritis index* (WOMAC) du groupe traité est inférieur à 10%. Les biphosphonates ont montré avoir des effets intéressants chez les patients en phase précoce d'OA. L'alendronate et le risédronate ont montré diminuer la formation d'ostéophytes. Les biphosphonates, dans un modèle de chien dont un ligament antérieur croisé a été sectionné pour induire l'OA, ont également montré réduire les marqueurs de résorption osseuse qui seraient augmentés chez les patients en début d'OA. D'autres molécules visant l'os et ayant

démontrées des effets positifs sur des modèles animaux OA sont le ranélate de strontium, la calcitonine et les inhibiteurs de cathepsine K⁵⁰.

1.3.2. Phase avancée de l'ostéoarthrose

Peu de traitements s'avèrent efficace en phase avancée car la plupart de ces derniers visent à diminuer la douleur et à retarder le plus possible l'éventuelle opération. Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (NSAID), les narcotiques et l'injection de corticostéroïdes sont utilisés. Notons que les NSAIDs ont le grand désavantage de présenter des effets secondaires majeurs tels des ulcères⁵¹ et des événements cardiovasculaires⁵². L'utilisation des narcotiques s'avère être intéressante car ils n'entraîneraient que peu d'effets secondaires tout en étant efficace, leur utilisation est pourtant très limité à cause du risque de dépendance qui pourtant s'avère être très faible chez les patients n'étant pas à risque.

Finalement, le remplacement prothétique de hanche ou de genou est effectué lorsque les traitements contre la douleur ne fonctionnent plus. Ces opérations sont très coûteuses. Les avancées au niveau prothétique ont grandement évoluées durant les deux dernières décennies comme le démontre le suivi des patients. Dans le cas d'un remplacement prothétique de la hanche, le patient peut retrouver la quasi-totalité de sa mobilité sans limitations majeures de mouvements. Le remplacement prothétique de genou, bien qu'il soit efficace pour l'élimination de la douleur, reste très restrictif en ce qui a trait aux mouvements permis. Le patient ayant ce type de prothèse ne devra pas courir et sera très limité dans ses mouvements pour éviter le déboitement de la prothèse. Cela est principalement dû à la complexité de l'articulation du genou dont les mouvements sont difficiles à reproduire à l'aide d'une prothèse. La durée de vie des nouvelles prothèses de hanche est estimée à 15-20 ans et celle des prothèses du genou à 10-15 ans. Notons que lors des révisions, l'opération devient très invasive et le risque de complications augmente beaucoup.

Les recherches en vue d'un traitement pouvant ralentir grandement la progression de l'OA ou améliorer la fonction articulaire des patients OA sont donc un

défi de grande taille car jusqu'à présent aucun traitement de ce genre existe sauf la chirurgie.

2. Les tissus affectés dans l'ostéoarthrose

Bien que l'OA soit caractérisée par des changements morphologiques et métaboliques au niveau du cartilage et de l'os sous-chondral, les récentes définitions ajoutent le fait que les autres tissus puissent être également affectés. Pourtant, la majorité des études restent toujours concentrées sur le cartilage. Chez les patients OA, des problèmes métaboliques majeurs ont été identifiés au niveau du cartilage et du tissu osseux. Plus récemment, il a été montré dans un modèle de souris OA spontanée que les cellules ligamentaires avaient un phénotype anormal. De plus, des patients ayant une forme primaire d'OA auraient une masse graisseuse répartie différemment dans la moëlle osseuse et dans les muscles en comparaison avec des sujets normaux. Il a aussi été observé qu'il y avait une plus grosse perte de fibre musculaire de type-2 dans les muscles glutéaux des patients OA. On ne sait toujours pas si ces changements seraient la conséquence de stress mécaniques anormaux ou d'un traumatisme précédent non-identifié, ou s'il y aurait à la base un problème métabolique qui serait présent et favorable au développement de l'OA. Une autre question reste encore sans réponse, est-ce que lors du développement de l'OA tous les tissus sont affectés en même temps ou si un tissu est affecté avant un autre ?

Bien que beaucoup s'accordent sur le fait de l'implication possible de tous les tissus de l'articulation dans l'OA, l'interprétation de cet énoncé reste tout de même débattue. Certains suggèrent que l'OA serait causé par une anomalie mécanique au niveau de l'articulation et que l'OA serait définie par un échec dans la réparation d'un dommage articulaire causé par un stress mécanique excessif¹⁹. D'autres proposent que, l'OA du moins dans sa forme primaire et générale, affecterait l'ensemble du système musculo-squelettique. Dans ce cas, l'OA serait alors perçue comme un problème métabolique affectant plusieurs des tissus issus de la différenciation des cellules mésenchymateuses présentes dans la moëlle osseuse. En effet, les cellules mésenchymateuses peuvent se différencier en ostéocytes, chondrocytes, adipocytes,

myocytes, fibrocytes et ténocytes (Figure 3). Un problème dans la différenciation des cellules mésenchymateuses pourrait avoir des conséquences au niveau de tous ces tissus.

Je présenterai dans cette partie les différents tissus affectés dans l'OA en portant une attention particulière au tissu osseux principalement et au cartilage articulaire, le tissu osseux étant l'objet de l'étude.

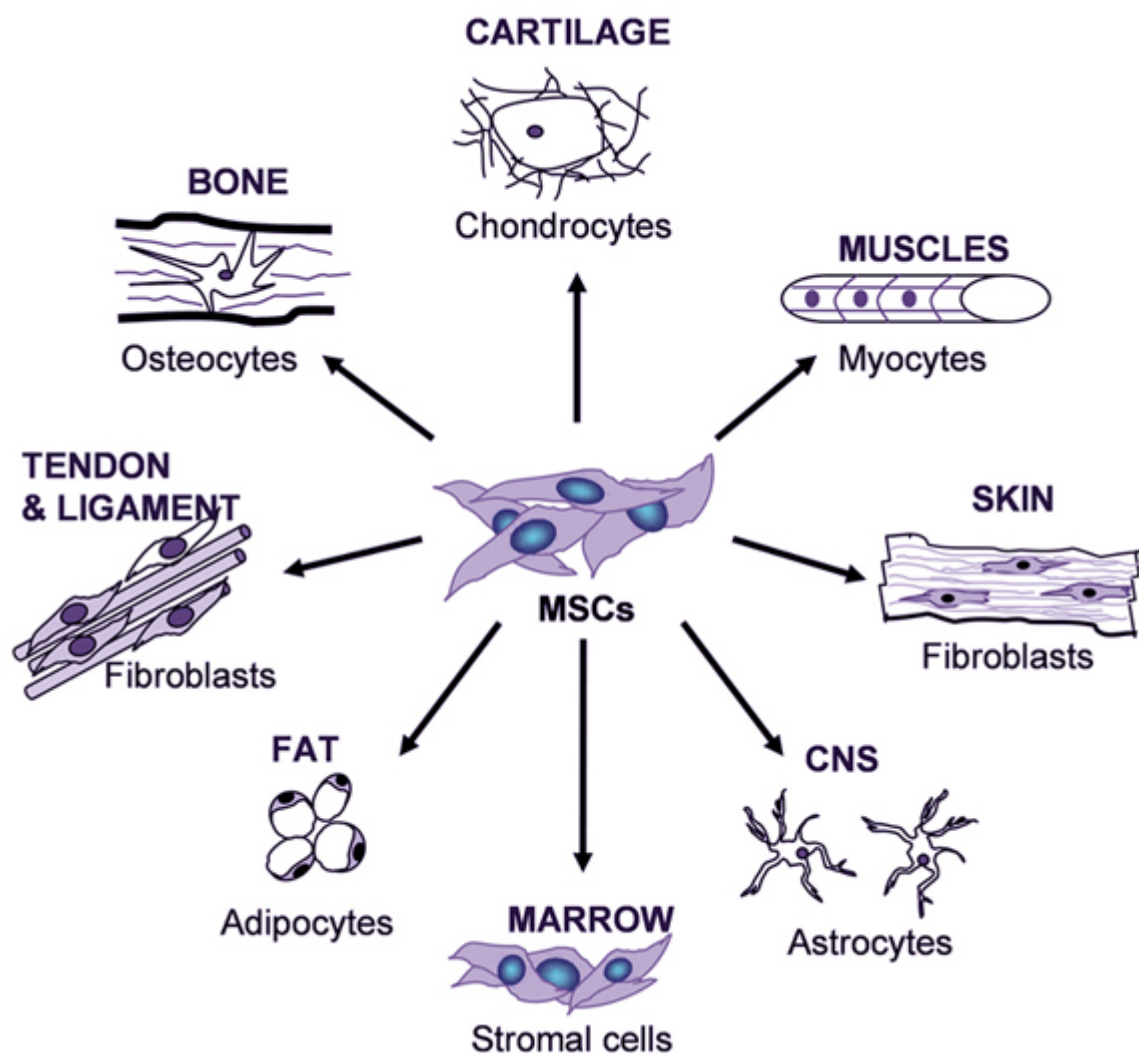


Figure 3. Schéma de la différenciation des cellules mésenchymateuses⁵³. On peut voir les différents tissus issus de la différenciation des cellules mésenchymateuses.

2.1. Le cartilage articulaire

Dès le développement du fœtus, le cartilage joue un rôle primordial dans le développement des os longs. Lors de l'ossification endochondrale, les chondrocytes hypertrophiés vont fabriquer une matrice spécifique pour permettre le développement des premiers ostéoblastes et donc de l'os. Le cartilage, durant le développement de l'os jusqu'à l'atteinte de sa maturité, recouvre les épiphyses des os longs.

Le cartilage articulaire normal est avasculaire, aneural et sans innervation⁵⁴. Il est composé d'un seul type de cellule soit les chondrocytes. Ces dernières produisent une matrice riche en différents types de collagènes et protéoglycanes. Par cette composition, le cartilage articulaire, outre ces propriétés de résistances aux forces de compression et d'élasticité, aura un faible coefficient de friction permettant ainsi un bon glissement des os lors de mouvements. À l'âge adulte, les chondrocytes ne se divisent que très peu et le renouvellement de la matrice est très lent. Comme sa dégradation progressive est une des caractéristiques principales de l'OA, ce tissu est l'objet la majorité des études sur l'OA. Dans cette partie, je ne décrirai que brièvement ce tissu car il n'est pas l'objet principal de l'étude.

2.1.1. Composition du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire adulte est de couleur blanche et légèrement translucide. Sa surface est lisse et brillante. Son épaisseur est variable selon l'articulation, c'est au niveau de l'articulation fémoropatellaire qu'il est le plus épais soit de 6-7mm.

Le cartilage articulaire est composé de 4 couches distinctes, ces couches se différencient par des chondrocytes morphologiquement différents produisant une matrice spécifique. Chaque couche aura donc des propriétés particulières.

2.1.1.1. Les cellules

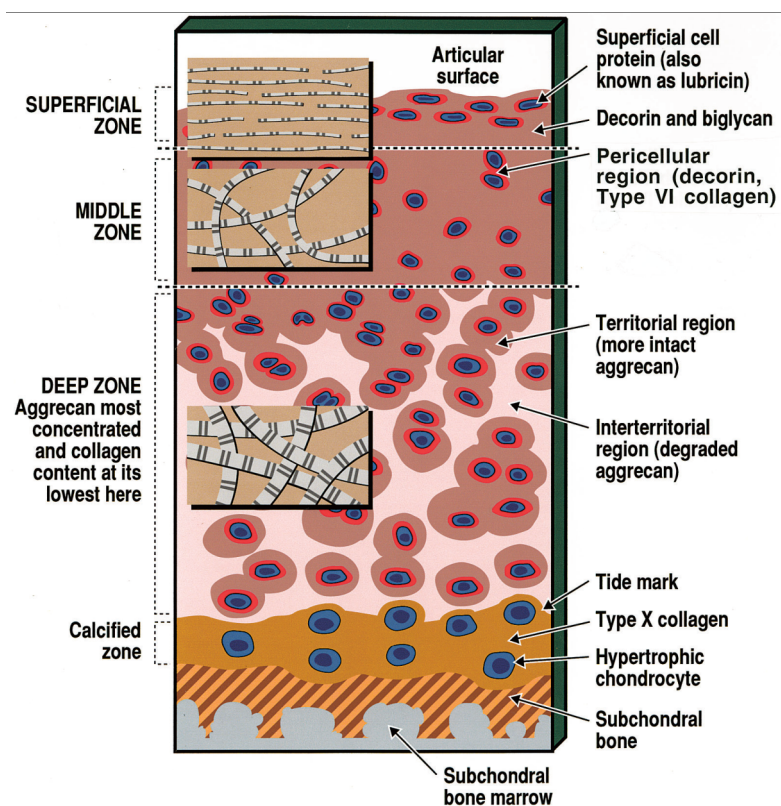
Les cellules composant le cartilage articulaire sont les chondrocytes. Ils ont pour rôle de former, organiser et maintenir la matrice extracellulaire⁵⁴. Ils occupent environ

10% du volume total du cartilage articulaire mais que 2% de son volume sec. Lors de la différenciation des cellules mésenchymateuses, l'expression des gènes Sox9, L-Sox5, Sox6 et le collagène de type IIA⁵⁵ vont caractériser les chondrocytes. Le cartilage étant avasculaire, les chondrocytes fonctionnent principalement en anaérobie, c'est l'un des rares tissus à fonctionner en hypoxie. Le substrat énergétique principal des chondrocytes est le glucose. Les chondrocytes sont des cellules qui ne migrent pas et dans le cartilage mature normal, elles ne se multiplient que très peu. Une ligne de démarcation (« *tidemark* » en anglo-saxon) sépare l'os sous-chondral du cartilage non-calcifié, cette barrière bloque le réseau vasculaire présent dans l'os sous-chondral et ne laisse passer que quelques constituants spécifiques (Figure 4). Bien qu'une étude récente de Pan et al⁵⁶ a clairement démontré que des facteurs solubles peuvent transiter de la région sous-chondral au cartilage articulaire validant ainsi l'idée d'un transfert potentiel de nutriments et autres facteurs entre le tissu osseux sous-chondral et le cartilage articulaire calcifié, ces échanges seraient plus limités avec le cartilage articulaire non-calcifié. Pour ce dernier, les nutriments sembleraient provenir principalement du liquide synovial, Cependant, on ne connaît pas encore bien les échanges permis par le *tidemark*. Des études ont montré qu'il existerait des canaux entre l'os sous-chondral et le cartilage décalcifié⁵⁷. En fait, les coupes histologiques en 2 dimensions ne représenteraient pas nécessairement toujours la réalité. La structure tridimensionnelle du *tidemark* serait beaucoup plus complexe et pourrait bien démontrer des liens importants entre le tissu osseux et le cartilage non-calcifié comme le suggère Lyons et al⁵⁷. Le *tidemark* dont sa composition et son organisation ne sont pas encore bien caractérisées⁵⁸, a une épaisseur de 3µm. Une autre étude chez le cheval a démontrée que le *tidemark* serait perméable aux solutés de faible poids moléculaire contrairement à ce que des études précédentes avaient suggéré. Tout cela suggère qu'il y aurait plus d'interactions entre l'os sous-chondral et/ou trabéculaire et le cartilage non-calcifié. Bien que les nutriments pour les chondrocytes semblent provenir principalement du liquide synovial, certains pourraient également provenir du tissu osseux. Cela suggérerait aussi que d'autres facteurs tels des cytokines puissent traverser cette barrière. Cette communication, encore mal comprise, pourrait être importante dans l'OA, où des altérations sont observées dans le tissu osseux et dans le cartilage.

2.1.1.2. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire du cartilage articulaire a une composition très hétérogène, d'autant plus que sa composition varie entre un individu jeune et mature et cette matrice peut être décomposée en 4 couches (Figure 4). La structure et la composition de la matrice est importante pour les fonctions du cartilage articulaire. Avant de décrire la composition de ces couches et leurs fonctions potentielles, il est intéressant de noter que l'eau représente de 65 à 80% et que les macromolécules (protéines et protéoglycanes) représentent de 20 à 35% du poids humide du cartilage articulaire⁵⁹. Également, le collagène de type II représente 95% des collagènes présents dans le cartilage, les autres collagènes étant les collagènes de type IX, XI, III, V, VI, X, XII et XIV⁵⁹. Notons que parmi ces collagènes, seul le collagène de type X est spécifique au cartilage articulaire⁶⁰. Comme mentionné dans la section précédente, des mutations au niveau de ces types de collagène peuvent contribuer au risque de développer l'OA.

A



B

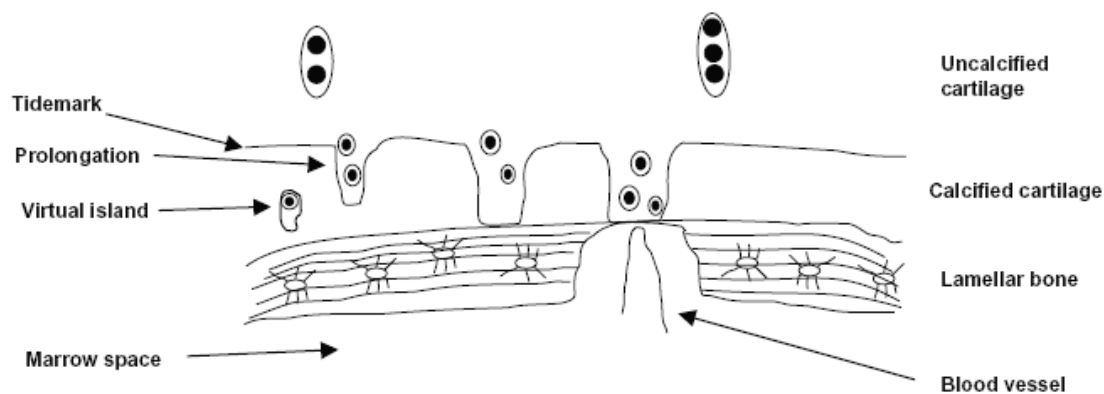


Figure 4. **Schéma des 4 différentes couches du cartilage articulaire**^{57,60}. A) On peut y voir les couches superficielle, intermédiaire, profonde et calcifiée. On note également la présence de la ligne de démarcation (« *tidemark* ») entre la couche profonde et la couche calcifiée. B) Schéma de la ligne de démarcation démontrant qu'il pourrait y avoir une interaction entre l'os et le cartilage non-calcié.

À la surface du cartilage articulaire on retrouve la couche superficielle qui est caractérisée par de petits chondrocytes plats et par des fibres de collagène majoritairement de type II orientées parallèlement à la surface. Les chondrocytes de cette couche sont les seuls à produire la lubriline⁶⁰, celle-ci ayant pour rôle la lubrification du cartilage articulaire. Cette couche est celle qui est majoritairement responsable de l'élasticité du cartilage. En dessous de cette couche, il y a la couche intermédiaire. Les chondrocytes présents dans cette couche sont moins nombreux, gros et de forme sphérique et il n'y a pas d'orientation particulière des fibres de collagène. Il y a ensuite la couche profonde qui est caractérisée par un contenu en protéoglycanes élevé malgré la faible quantité de collagène. Finalement, situé sur l'os sous-chondral, il y a la couche calcifiée qui possède des propriétés mécaniques intermédiaires entre celle du cartilage non-calcifié et de l'os sous-chondral. Les chondrocytes de cette couche sont majoritairement hypertrophiés et produisent spécifiquement du collagène de type X. Ce type de collagène possède des propriétés pour lier le calcium, ce qui explique donc la calcification de cette couche. Cette couche calcifiée protège de l'invasion vasculaire. Comme mentionné précédemment, la ligne de démarcation est située entre la couche calcifiée et la couche profonde. Cette ligne de démarcation empêche le cartilage de l'invasion vasculaire, elle est aussi très sélective pour le passage des molécules.

Cette matrice extracellulaire est soumise à un remodelage grandement régulé. Différentes protéinases et notamment les métalloprotéinases (MMPs) régulent ce remodelage⁶¹. Notons que différentes cytokines et facteurs de croissance sont attachés à la matrice extracellulaire. Lorsque celle-ci est dégradée, ces facteurs sont relâchés et peuvent agir sur le métabolisme des chondrocytes.

2.1.2. Le cartilage articulaire ostéoarthrosique

Dans cette partie, il serait intéressant de porter une attention particulière aux altérations générales du cartilage articulaire lors du développement de l'OA pour les comparer à celles présentes dans l'os sous-chondral, soit le tissu d'intérêt dans cette étude. À vue d'œil, le cartilage OA apparaît jaunâtre ou brunâtre avec une apparence rugueuse⁶². En phase avancée d'OA, on peut voir une perte de matrice cartilagineuse et au

niveau des épiphyses l'os cortical peut être visible⁶². Au niveau microscopique et moléculaire, la structure du cartilage ainsi que le métabolisme de ses chondrocytes va s'altérer progressivement lors du développement de l'OA. La balance entre la dégradation de la matrice extracellulaire et sa synthèse lors du remodelage va être perturbée et ne retrouvera jamais son équilibre normal. Cela sera dû non seulement à une altération de l'expression de certains gènes clés de la matrice extracellulaire tel le collagène de type II mais également à l'expression de « nouveaux gènes ». Ces « nouveaux gènes » sont en fait des gènes qui ne sont normalement pas exprimés dans le cartilage mature normal et dans le cartilage vieillissant.

Lors du début de l'OA, il y a une augmentation de la quantité d'eau présente dans le cartilage⁶² et cela pourrait donc nuire à la fonction normale du cartilage. Également, le métabolisme des chondrocytes va s'altérer progressivement. Ces derniers vont augmenter leur synthèse de protéines structurales pour balancer la perte de celles-ci au sein de la matrice extracellulaire^{63,64}. Parallèlement à cela, il y aura une augmentation de la prolifération chondrocytaire bien que celle-ci soit modérée^{62,65}. En phase plus avancée de l'OA, la synthèse de protéines matricielles ne sera pas suffisante pour compenser la dégradation de celles-ci au niveau de la matrice extracellulaire⁶². De plus, l'expression des protéines structurales sera altérée, une augmentation de production de protéinases sera présente et un changement dans le phénotype des chondrocytes sera observé par l'expression de gènes non-présents dans les chondrocytes normaux^{62,66}. La conséquence de toutes ces altérations au niveau microscopique sera une modification structurale de la matrice extracellulaire. Cela entraînera une perte dans la fonctionnalité du cartilage articulaire le rendant ainsi inapte à réagir correctement lorsque soumis à des stress mécaniques normaux⁶². Finalement, le cartilage se verra dégradé de manière progressive.

Deux phénomènes principaux sont directement responsables de cette perte de fonction du cartilage articulaire : une dysfonction dans l'expression de protéines collagéniques par les chondrocytes parallèlement à l'augmentation de la production et de l'activité de certaines protéinases dégradant la matrice extracellulaire. Lippiello et al. ont démontré que la synthèse du collagène de type II était 5 fois plus élevée dans le cartilage OA humain, celle-ci pouvait toutefois varier selon l'avancement de l'OA⁶⁷. Également,

dans le cas de coxarthrose, il a été montré que le collagène de type X serait présent en grande quantité dans la zone profonde et calcifiée du cartilage OA⁶⁸ suggérant ainsi une hypertrophie des chondrocytes à ce niveau. Ce collagène de type X, comme mentionné précédemment, est responsable de la calcification du cartilage, cela pourrait donc expliquer la calcification accrue du cartilage articulaire OA⁶². Dans un modèle de chien OA induit, il a été démontré qu'en phase précoce d'OA, la production d'aggrécanes ne suivait pas celle de collagène de type II⁶⁹ et cela suggérerait une formation de matrice anormale. De plus, les chondrocytes OA synthétisent des types de collagènes non-présents ou peu présents dans le cartilage normal tel le collagène de type III et VI⁶². Le collagène de type III est retrouvé dans différents tissus et jouerait un rôle dans la réparation tissulaire^{70,71}. Le collagène de type VI, quant à lui, est retrouvé dans la matrice extracellulaire du cartilage fœtal⁷¹ et cela supporte l'hypothèse suggérant que les chondrocytes OA retourneraient vers un phénotype de chondro-progénéiteur. Pour appuyer cette hypothèse, il a aussi été noté que la nouvelle synthèse d'aggrécane dans le cartilage OA pour pallier sa perte, ressemblait d'avantage à celle retrouvée dans le cartilage juvénile que dans le cartilage adulte⁷². La dégradation accrue de la matrice extracellulaire est une autre problématique dans le cartilage OA. Différentes protéinases sont responsables de cette dégradation, parmi les plus importantes on retrouve les MMPs (métalloprotéinases), les ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) et les protéinases à cystéine contenant différentes cathepsines. La dégradation de la matrice extracellulaire semble majoritairement survenir à la surface du cartilage articulaire et au alentour des chondrocytes⁶². Parmi ces différentes protéinases, celles étant retrouvées en grande quantité dans le cartilage OA et jouant un rôle important dans la dégradation de la matrice du cartilage articulaire OA sont la MMP-1, la MMP-2, la MMP-3, la MMP-9, la MMP-13, et l'ADAMTS-4⁷². La MMP-13 serait la MMP la plus exprimée lors du début de l'OA^{73,74} et la MMP-1 serait la plus active durant la phase inflammatoire de l'OA⁷². Les MMP-2 et MMP-9 seraient quant à elles exprimées lors de la fibrillation du cartilage et ne sont pas retrouvées dans le cartilage normal⁷². Cela suggère donc que ces dernières MMPs auraient un rôle dans la progression de l'OA et donc dans des phases plus tardives de l'OA. La MMP-3, quant à elle, est retrouvé dans le cartilage normal mais est surexprimée au début de l'OA.

Toutefois, son expression est diminuée lors des phases plus tardives de l'OA. L'expression spécifique de ces différentes protéinases lors des différentes phases de l'OA suggère un contrôle spécifique de leur expression. Différentes cytokines et facteurs de croissance ont montré potentiellement réguler l'expression de certaines de ces protéinases et plus récemment, l'implication de microARN pourrait également avoir un rôle important dans cette régulation⁶⁶.

Plusieurs cytokines et facteurs de croissance sont des facteurs cataboliques du cartilage OA. IL-1 β et le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) sont les deux cytokines ayant montrées des rôles cataboliques importants⁷². D'autres facteurs sont impliqués dans le catabolisme du cartilage articulaire toutefois, ils pourraient également avoir des actions anaboliques dépendamment du contexte cellulaire et environnemental^{72,75}. Parmi ces facteurs on retrouve le facteur de croissance transformant- β (TGF- β), différents membres de la famille des protéines morphogénétiques de croissance dont la *Bone Morphogenic Protein-2* (BMP-2) et les prostaglandines E₂ (PGE₂)^{72,75}. Aucune hiérarchie n'a clairement été démontrée entre ces facteurs. Pour rendre la compréhension de la régulation de ces facteurs plus complexe, des microARN ont montrés également être potentiellement impliqué dans la régulation de l'expression de facteurs cataboliques⁷⁶. De plus, des protéines impliquées dans la signalisation Wnt, altérée dans l'OA se rajoute à la problématique.

Bien que tout cela semble bien complexe, diminuer la dégradation du cartilage articulaire ne contribuerait qu'à corriger une partie du problème car les autres tissus affectés dans l'OA tel l'os resteraient altérés et l'OA pourrait continuer à progresser. Notons également qu'une corrélation existe entre les lésions de moëlle osseuse (BML) et la dégradation du cartilage : un agrandissement de la BML a fortement été corrélé avec une augmentation de la perte de cartilage tandis qu'une réduction de la lésion l'était avec une diminution de la perte de cartilage^{77,78}. Cela suggèrerait donc qu'une altération dans le tissu osseux soit à l'origine de la dégradation du cartilage articulaire comme le démontre certains modèles animaux OA.

2.2. Le tissu osseux

Plus de 200 os composent le squelette du corps humain⁷⁹. Ils peuvent être classés dans quatre catégories différentes selon leur morphologie et leur type de formation. Ce tissu osseux, par sa structure et sa composition, joue différentes fonctions essentielles dans le corps humain. Ce tissu est très actif métaboliquement comme le démontre ses fonctions, il est donc soumis à un remodelage constant. Outre son rôle de support au reste du corps, son rôle locomoteur en concert avec les muscles, les tendons et les ligaments, et son rôle protecteur des organes vitaux en pensant à la cage thoracique et à la boîte crânienne, le tissu osseux possède des rôles métaboliques primordiaux. En effet, il permet le maintien de l'équilibre phosphocalcique renfermant 99% du calcium et 90% du phosphore de l'organisme^{80,81}, il contient la moëlle osseuse étant le site d'hématopoïèse et le réservoir de cellules mésenchymateuses, facteurs de croissance et cytokines⁷⁹. Une formation inadéquate ou un remodelage inadéquat de ce tissu peut donc mener à l'altération de ces fonctions. Comme le démontre certaines maladies, la diète, des facteurs génétiques ainsi que des traumatismes mécaniques peuvent altérer la formation du tissu osseux. L'os possède également une autre fonction très importante soit celle de la résistance aux chocs mécaniques. Cette fonction nous intéressera particulièrement car elle semble être en cause dans l'OA.

2.2.1. Anatomie et composition

Les os sont liés entre eux par des ligaments et sont liés avec les muscles par les tendons. Les quatre catégories d'os sont les os longs, les os courts, les os plats et les os irréguliers⁷⁹. La première catégorie soit celle des os longs est celle dont on portera le plus d'attention dans cette étude. Ces os sont composés d'une diaphyse et de 2 épiphyses, on retrouve notamment dans cette catégorie le tibia, le fémur, les métacarpes et les métatarses. Parmi les os courts, on retrouve la rotule, parmi les os plats, le crâne, la mandibule et les côtes, et finalement font parti des os irréguliers les vertèbres. Il est intéressant de noter que tous ces os ne se développent pas tous de la même manière lors

de la croissance. Les os longs se forment par ossification endochondrale et membranaire contrairement aux os plats qui ne se forment que par ossification membranaire.

Le tissu osseux est un tissu conjonctif, les cellules composant ce tissu sont donc entourées d'une matrice extracellulaire particulière, celle-ci étant minéralisée. L'ostéon, présent dans l'os cortical et trabéculaire (Figure 5), est l'unité de base du tissu osseux. Les ostéons sont juxtaposés dans ce dernier et sont centrés autour des vaisseaux sanguins (Figure 5). Notons que le squelette humain est composé à 80% d'os cortical et donc qu'à 20% d'os trabéculaire et le ratio os cortical sur os trabéculaire peut grandement varier selon le type d'os⁷⁹.

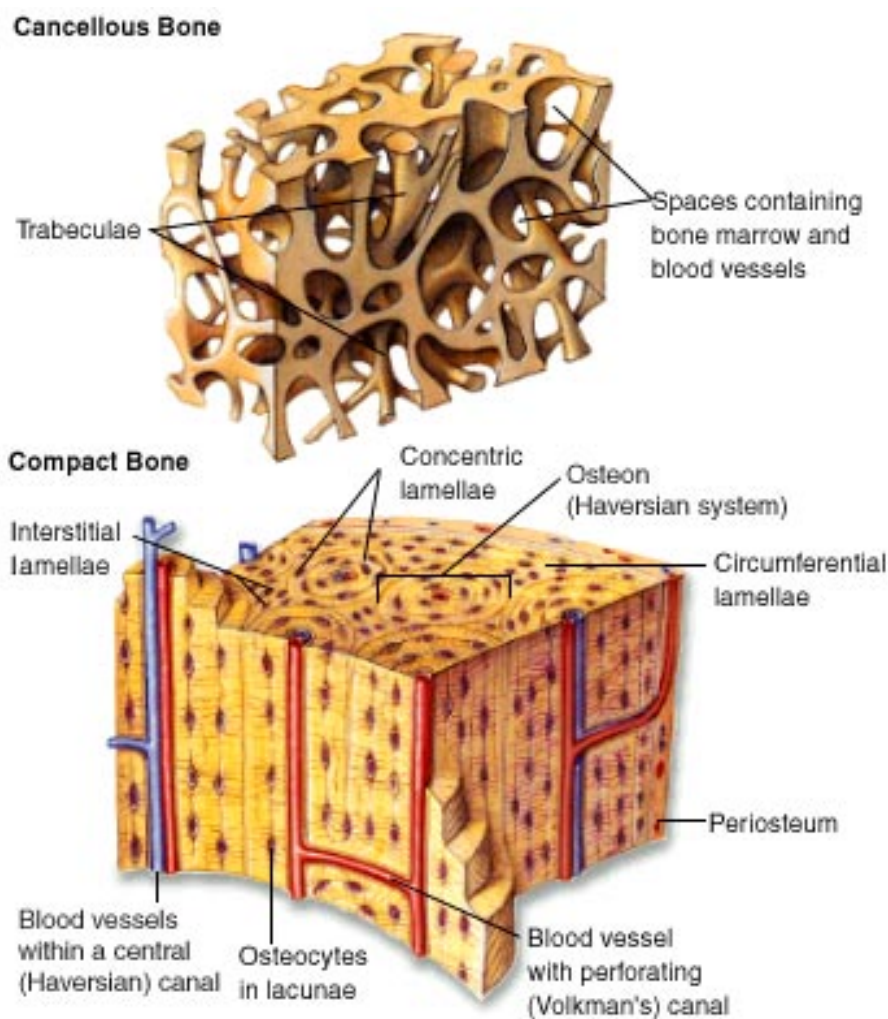


Figure 5. **Schéma des structures de l'os trabéculaire et de l'os cortical.** En haut, on voit l'os trabéculaire caractérisé par son aspect poreux et en bas, il y a l'os cortical qui est beaucoup plus dense. (Image tirée du site universitaire www.anatomiahumana.ucv.cl)

2.2.1.1. Os cortical

L'os cortical constitue la partie extérieure de tous les os. Il constitue la diaphyse des os long et il est plus dense que l'os trabéculaire. Dans les os longs il est entouré du périoste au niveau des diaphyses et du cartilage au niveau des épiphyses. La forme de ses ostéons est cylindrique et on y retrouve au centre un vaisseau sanguin nommé canal de Havers. Les ostéons, orientés parallèlement à la diaphyse, sont reliés entre eux par les canaux de Volkmann. L'os cortical est moins souvent remodelé que l'os trabéculaire.

2.2.1.2. Os trabéculaire

L'os trabéculaire également appelé os spongieux dû à la similarité de sa structure à celle d'une éponge, est moins dense que l'os cortical. Il est composé de travées orientées dans divers sens influencés par les sollicitations mécaniques⁸². Les travées sont richement vascularisées et entourées de tissu adipeux et hématopoïétique⁸³. Sa structure lui permet d'avoir une grande surface d'échange avec les liquides interstitiels. Il est plus souvent soumis au remodelage osseux que l'os cortical et donc participe d'avantage à l'équilibre phosphocalcique. Il est aussi grandement impliqué dans la résistance aux stress mécaniques telles les forces de compression à l'endroit des épiphyses des os longs.

2.2.1.3. Matrice osseuse

Comme le cartilage, la matrice osseuse possède un contenu en collagène important, toutefois le type principal de collagène n'est pas le même. Cette matrice osseuse est également beaucoup moins hydratée que le cartilage. La matrice osseuse est composée de 50 à 70% de minéral, de 20 à 40% de matière organique, de 5 à 10% d'eau et de moins de 3% de lipides⁷⁹.

Les protéines collagéniques représentent de 85 à 90% des protéines de la matrice osseuse, le collagène de type I étant le collagène principal et le plus abondant de l'os. Il est également le type de collagène le plus important de la peau, des tendons et des ligaments⁸⁴. Le collagène de type I est retrouvé sous forme d'une triple hélice hétérotrimérique⁸⁵ composée de 2 chaînes $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$. Au sein d'une lamelle osseuse les fibres de collagène sont orientées parallèlement mais leur orientation change d'une lamelle à l'autre d'où la structure lamellaire de l'os. Ce collagène fibreux et relativement rigide va aussi être stabilisé par des agents de pontages. La composition et l'orientation de ces triples hélices de collagène de type I sont essentielles pour ces propriétés mécaniques⁸⁴. Ces fibres collagéniques forment ensemble le squelette de la matrice extracellulaire et plusieurs protéines non collagéniques, facteurs de croissance et protéines plasmatiques sont liés à ces fibres⁷⁹. Lorsque cette matrice est nouvellement formée par les ostéoblastes, on la nomme matrice ostéoïde, elle est par la suite minéralisée.

Les protéines non collagéniques ne représentent que 10% du tissu organique de l'os. Elles possèdent toutefois des rôles très importants notamment dans la minéralisation de la matrice ostéoïde et dans le remodelage osseux⁷⁹. Ces protéines peuvent être divisées en 3 catégories dépendamment de leur provenance et de leur nature. Dans une catégorie il y a les protéines secrétées par les ostéoblastes qui siègent dans cette matrice et peuvent être spécifiques au tissu osseux, cette catégorie est quantitativement la plus importante. Dans une deuxième catégorie, on retrouve les protéines plasmatiques qui peuvent provenir de d'autres organes et qui arrive dans le tissu osseux par le réseau vasculaire. Finalement, on retrouve dans la dernière catégorie les facteurs de croissance dont notamment TGF- $\beta 1$ ainsi que plusieurs membres de la famille des facteurs de croissance apparentés à l'insuline (IGF) dont IGF-1. Parmi les protéines composant la première catégorie, on retrouve l'ostéocalcine, l'ostéonectine, la sialoprotéine osseuse (BSP) II et l'ostéopontine (BSPI).

L'ostéocalcine est une protéine spécifique du tissu osseux et plus précisément des ostéoblastes. Sa synthèse est sous la dépendance de la vitamine K. Les corticoïdes ont un effet inhibiteur⁸⁶ tandis que la vitamine D possède un fort effet inducteur de sa synthèse et ceci autant *in vitro* qu'*in vivo*⁸⁷. Possédant des effets chimiotactiques pour

les monocytes, précurseurs des ostéoclastes, et suite aux études de la souris délétée (KO) en ostéocalcine ayant une formation osseuse accrue⁸⁸, l'ostéocalcine est soupçonnée d'avoir un rôle d'inhibiteur de la formation osseuse. Notons cependant que la concentration d'ostéocalcine est utilisée comme indice de formation osseuse⁸⁹ car il s'agit de la seule protéine unique aux ostéoblastes. L'ostéonectine est une glycophosphoprotéine ayant une forte affinité pour les cristaux d'hydroxyapatite de calcium et pour le collagène de type I⁹⁰. Elle possède des effets inhibiteurs pour la croissance des cristaux d'hydroxyapatite et des propriétés antiadhésives pour les ostéoblastes^{90,91}. La BSPII est spécifique au tissu osseux mais contrairement à l'ostéocalcine, elle est exprimée non seulement par les ostéoblastes mais aussi par les ostéoclastes et les chondrocytes hypertrophiques⁹². La BSPII a la propriété de fortement se lier à l'hydroxyapatite, et *in vitro*, elle stimulerait la résorption osseuse⁹³. La BSPI, présente dans différents tissus, favoriserait la résorption osseuse comme le démontre la souris KO en BSPI⁹⁴. Les protéoglycanes, dont la chondroïtine sulfate, possèdent de longues chaînes polysaccharidiques et elles forment avec le collagène un réseau tridimensionnel; elles ont donc un rôle⁹⁵ structurel. Outre leur forte affinité avec le collagène, elles ont également une forte affinité avec le TGF- β . La phosphatase alcaline est une enzyme associée à la différenciation des ostéoblastes, comme son nom l'indique elle permet la libération de phosphate inorganique par le clivage des liaisons organophosphates dans des conditions basiques. Elle participerait au processus de minéralisation et étant libérée dans le sang, elle est utilisée comme marqueur de l'activité ostéoblastique⁹⁶.

La rigidité de la matrice osseuse est principalement due à sa minéralisation⁹⁷. La fraction minérale représente environ 70% du poids sec de l'os⁹⁸. Des concentrations adéquates de minéraux sont nécessaires pour une bonne minéralisation osseuse. Celle-ci est caractérisée par la formation de cristaux d'hydroxyapatite de calcium $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Ils ont une forme hexagonale, aplatie et se situent sur et entre les fibres de collagène⁹⁹. Ces cristaux sont le résultat d'une précipitation des ions phosphate et calcium, et le rapport Ca/P est de 1,77 chez l'humain⁹⁸. Les étapes de formation des ces cristaux est relativement complexe et a été l'objet de nombreux débats⁹⁷. Toutefois, l'ostéocalcine semble importante pour aider à la précipitation des ions et la phosphatase

alcaline permet la liaison des cristaux aux fibres de collagène^{99,100}. La liaison de glycoaminoglycanes sur les fibres de collagène freine la minéralisation⁹⁹.

2.2.2. Les cellules osseuses

Deux grands types de cellules sont retrouvés dans l'os, ils ont des origines différentes ainsi que des actions différentes mais très synchronisées.

2.2.2.1. L'ostéoblaste et sa différenciation

L'ostéoblaste dérive des cellules souches mésenchymateuses contenues dans la moëlle osseuse. Les fonctions principales de ces cellules sont de synthétiser la matrice extracellulaire soit l'ostéoïde et de la minéraliser pour rendre l'os fonctionnel. Ils sont donc responsables de la formation osseuse. Suite à la minéralisation, une partie des ostéoblastes vont être incorporés dans la matrice ostéoïde et se différencier en ostéocytes et une autre partie des ostéoblastes deviendront des cellules bordantes ou mourront par apoptose. Leur réticulum endoplasmique ainsi que leur appareil de golgi sont très développés, également de nombreuses mitochondries sont contenues dans leur cytoplasme^{101,102}. Tout cela témoigne donc d'une synthèse protéique importante pour principalement bâtir la matrice extracellulaire.

Les facteurs de transcription *runt-related transcription factor 2* (Runx2) et ostérix (Osx) sont les deux principaux facteurs amenant les cellules souches à se différencier en ostéoblastes. Runx2 agirait depuis les cellules ostéochondro-progénitrices comme le démontre les souris KO. Chez les souris KO en Runx2, l'ossification endochondrale et membranaire sont absentes, la maturation des chondrocytes est altérée et leur nombre d'adipocytes est élevé¹⁰³⁻¹⁰⁵. Osx, quant à lui, agirait sous la dépendance des BMP pour la différenciation terminale des ostéoblastes. Osx est indispensable à cette différenciation et distingue la voie ostéogénique de la voie chondrogénique¹⁰⁶. Plus récemment, la signalisation Wnt a montré être impliquée dans le processus de formation osseuse. En effet, des mutations activatrices au niveau du co-récepteur *low-density lipoprotein receptor-related protein 5* (LRP5) ont été liées à un phénotype ayant une masse osseuse élevée par augmentation de formation osseuse¹⁰⁷. Des mutations

inactivatrices au niveau de ce même récepteurs ont quant à elles été liées au phénotype inverse¹⁰⁸.

Un dixième des ostéoblastes se différencieront en ostéocytes⁷⁹ et ils vont être « emprisonnés » dans la matrice minéralisée. Il s'agit des cellules les plus abondantes du tissu osseux¹⁰⁹. Les ostéocytes vont adopter une forme étoilée et vont ainsi créer un réseau au sein de la matrice osseuse à l'aide de jonction Gap afin de communiquer entre eux⁷⁹. Ces cellules sont sensibles au stress mécanique et au mouvement de fluides¹¹⁰. Suite à ce type de stimuli, ils vont pouvoir synthétiser et sécréter certaines molécules pour ainsi s'adapter à l'environnement. La sclérostine (SOST) est spécifiquement sécrétée par l'ostéocyte et cette molécule est un puissant inhibiteur de la formation osseuse¹¹¹. Les ostéocytes peuvent vivre plusieurs décennies dans l'os humain si l'os n'est pas résorbé. Ils peuvent toutefois subir une apoptose notamment si leur jonction Gap est perturbée⁷⁹.

Les cellules bordantes comme leur nom l'indique sont situées le long des surfaces osseuses et recouvre 90% de ces dernières¹⁰⁰. Ce sont des cellules aplaties communiquant avec les ostéocytes. Leur principale fonction serait d'initier la communication entre la surface osseuse, l'environnement cellulaire et les ostéocytes^{100,109}.

2.2.2.2. L'ostéoclaste et sa différenciation

Les ostéoclastes contrairement aux ostéoblastes dérivent des cellules souches hématopoïétiques contenues également dans la moëlle osseuse. La différenciation des cellules monocytaires en ostéoclastes se fait en plusieurs étapes et fait intervenir les ostéoblastes qui sont indispensables à leur maturation. La formation du pré-ostéoclaste nécessite la liaison du *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) au récepteur c-fms de la cellule monocyttaire. L'ostéoclaste mature résulte de la fusion de plusieurs pré-ostéoclastes, il s'agit donc d'une cellule multinucléée qui peut contenir jusqu'à 8 noyaux chez les mammifères¹¹². C'est la cytokine *receptor activating for nuclear factor κ B ligand* (RANKL) produite par les ostéoblastes qui est responsable de cette fusion des pré-ostéoclastes et donc à la formation des ostéoclastes matures polarisés¹¹³. Ces

derniers sont caractérisés par leur expression de phosphatase acide résistante (TRAP), de cathepsin K (CATK), du récepteur de calcitonine et de l'intégrine β_3 ¹¹⁴.

Les ostéoclastes matures ont pour rôle de résorber la matrice osseuse. Cette résorption va permettre la libération des ions calcium et phosphate dans le sang pour contribuer à l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme ainsi qu'à la formation éventuelle d'un nouveau tissu osseux. L'ostéoclaste possède donc de nombreux lysosomes contenant de nombreuses enzymes de dégradation telles TRAP et différentes collagénases. Ces enzymes vont être libérées par exocytose au niveau du pôle basal de l'ostéoclaste également appelé bordure en brosse faisant contact avec la matrice osseuse. Cette résorption va ainsi mener à la formation d'une lacune au niveau de l'os nommée lacune de Howship¹¹³. L'ostéoclaste a une durée de vie moyenne de 14 jours, il subit par la suite l'apoptose¹¹⁵.

2.2.3. Le remodelage osseux

Le tissu osseux est un tissu métaboliquement très actif étant constamment soumis à un remodelage osseux. Celui-ci représente un cycle constitué d'une phase d'activation suivie de la résorption par les ostéoclastes et d'une phase de formation par les ostéoblastes. Ces deux types cellulaires exécutent leur fonction de manière très coordonnée et chacune de ces phases nécessite la présence de ces deux types de cellules¹¹⁶. La phase de résorption et de réversion dure environ 1 mois tandis que la phase de formation est beaucoup plus longue et dure en moyenne de 3 mois¹⁰⁰. Ce remodelage osseux est très important car il permet la réalisation de trois fonctions importantes. Il permet la préservation de l'homéostasie minérale de l'organisme, l'adaptation du squelette à son environnement et la réparation de l'os usé afin qu'il conserve ses propriétés biomécaniques optimales¹¹⁷. Une dysfonction de ce remodelage osseux est en cause dans différentes pathologies osseuses telles l'ostéoporose, l'ostéopétrose et l'OA^{116,118}. Ce remodelage est donc grandement régulé par plusieurs facteurs systémiques et locaux en plus d'être sous l'influence de d'autres systèmes cellulaires incluant le système nerveux sympathique, le système immunitaire, le système

vasculaire ainsi que le cartilage articulaire¹¹⁶. Le remodelage peut aussi être initié par un stimuli mécanique¹¹⁹.

Chez l'adulte, le remodelage osseux se fait de manière continue et à chaque année 3% de l'os cortical et 25% de l'os trabéculaire sont remodelés¹²⁰. Dans une première partie le cycle du remodelage osseux sera décrit puis dans une seconde, on discutera de sa régulation.

2.2.3.1. Le cycle du remodelage osseux

Sans compter la phase de quiescence, ce cycle est composé de 4 phases majeures étant celles d'activation, de résorption, de réversion et de formation pour ainsi revenir à la phase de quiescence (Figure 6). En phase de quiescence, les cellules bordantes recouvrent les surfaces osseuses.

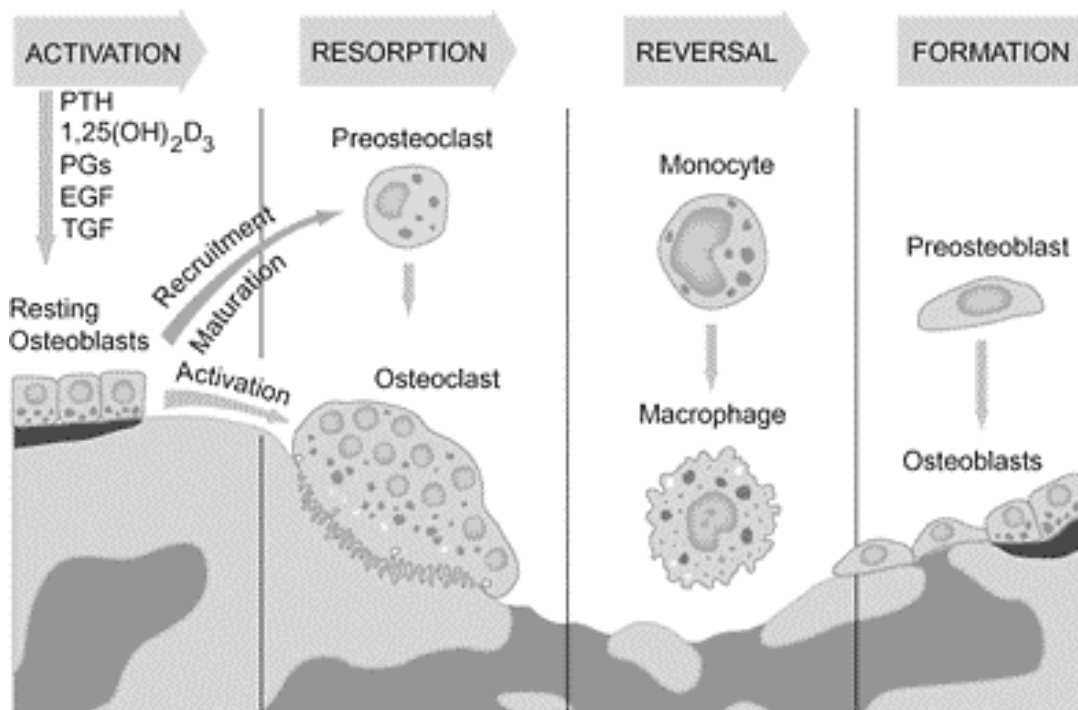


Figure 6. **Schéma du cycle du remodelage osseux**¹²¹. On peut voir les 4 phases de ce cycle ainsi que l'implication des ostéoblastes et des ostéoclastes.

Un signal est nécessaire pour le déclenchement du cycle. Ce signal, de nature hormonal ou transmis par des cytokines, pourrait provenir des ostéocytes qui entreraient

en apoptose à cause notamment de la formation de microfractures et favoriserait l'ostéoclastogenèse^{116,122}. Ce signal serait plutôt systémique et affecterait le tissu osseux dans son ensemble si l'organisme devait rétablir un équilibre minéral. Ce serait les cellules bordantes qui capteraient ce signal et prépareraient la surface osseuse minéralisée aux ostéoclastes. Tout cela constitue la phase d'activation.

La phase de résorption débute par la migration des pré-ostéoclastes vers la surface osseuse ciblée pour la résorption. Ces pré-ostéoclastes vont par la suite se fusionner ensemble pour former des ostéoclastes multinucléés matures fonctionnels. Cette étape est grandement régulée par la cytokine RANKL et l'ostéoprogestérine (OPG) et nécessite la présence des ostéoblastes. Une fois sur la surface osseuse, les ostéoclastes vont d'abord acidifier leur microenvironnement à l'aide notamment de pompes à protons¹²³. Cela permettra la dissolution de la fraction minérale. Suite à cette déminéralisation, les ostéoclastes vont sécréter des enzymes protéolytiques telles les MMPs pour dégrader la partie organique de la matrice osseuse¹²³. Notons qu'un environnement acide est nécessaire pour l'activité des ostéoclastes¹²³. La lacune de Howship sera ainsi formée.

Une phase de réversion survient suite à la résorption. Il s'agit d'une phase de transition dans laquelle les ostéoclastes vont quitter la lacune de Howship. La ligne cémentante soit le fond de la lacune de Howship, riche en ostéopontine, va attirer de manière progressive les cellules ostéoprogénitrices¹²⁴.

La prolifération des cellules ostéoprogénitrices au niveau de la ligne cémentante de la lacune de Howship va caractériser le début de la phase de formation. Celle-ci va se poursuivre avec la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes mature qui sécréteront la matrice ostéoïde non-minéralisée. Après une à deux semaines, cette matrice va progressivement être minéralisée. La minéralisation va se faire en deux phases : la phase primaire et la phase secondaire. La phase primaire se fait de manière rapide tandis que la phase secondaire se fait de manière plus lente, selon le niveau de remodelage et consiste à remplir la lacune de Howship¹²⁵. Notons que la phase secondaire de minéralisation n'est pas toujours complétée¹²⁵. Les ostéoclastes, en communiquant de manière paracrine avec les ostéoblastes, joueraient un rôle important dans l'activation de la formation osseuse¹¹⁶.

Finalement, la phase de quiescence revient. Durant cette phase, la minéralisation secondaire de la matrice est parachevée indépendamment des ostéoblastes.

2.2.3.2. Régulation du remodelage osseux

Cette régulation fait toujours intervenir des facteurs locaux, ces derniers peuvent toutefois être issus ou pas de l'action d'hormones systémiques. On verra dans cette section les principaux facteurs locaux et systémiques contrôlant le remodelage osseux connus à ce jour. Une bonne balance dans la synthèse et l'expression de ces facteurs est nécessaire pour un remodelage osseux optimal.

2.2.3.2.1. Facteurs locaux

Le système RANKL/OPG possède un rôle fondamental dans l'ostéoclastogenèse comme le démontre différents modèles de souris KO. Ce système témoigne bien de la complicité entre les ostéoblastes et les ostéoclastes dans le remodelage osseux. Plusieurs hormones et cytokines agissent sur ce système pour médier la résorption osseuse.

Le fonctionnement de ce système implique, comme mentionné précédemment, la présence des ostéoblastes qui sécrètent RANKL et l'OPG. Lorsque RANKL se lie au récepteur RANK présent au niveau de la membrane des pré-ostéoclastes, cela mènera à l'activation, la différenciation et à la fusion de ces cellules¹¹⁹. La résorption pourra ainsi débuter. Notons que RANKL possède un rôle anti-apoptotique dans les ostéoclastes matures¹¹⁹. La glycoprotéine OPG est également sécrétée par les ostéoblastes et cette molécule a été découverte avant RANKL. Il s'agit d'un récepteur « piège » pour RANKL; en effet, sa présence a pour but de neutraliser RANKL. En se faisant, RANKL ne pourra se lier à RANK et la résorption sera ainsi inhibée. Lorsqu'on inhibe OPG, une augmentation de la résorption osseuse est observée et vice versa. Le ratio RANKL/OPG régule donc le niveau de résorption osseuse.

Le principal système contrôlant l'ostéoblastogenèse est le système de signalisation Wnt, on y reviendra dans la dernière section puisqu'il représente un thème important pour cette étude.

Divers facteurs de croissance et cytokines modulent le remodelage osseux et bien qu'ils agissent souvent sur les deux systèmes mentionnés précédemment, ils peuvent directement agir sur les cellules osseuses. Parmi ceux-ci, on retrouve le TGF- β 1, les *bone morphogenic proteins* (BMPs), IGF-1, les prostaglandines, le TNF- α ainsi que différentes interleukines telles IL-1 et IL-6.

Le TGF- β 1 est l'un des facteurs les plus abondants de la matrice osseuse. Secrété sous une forme inactive par les ostéoblastes, il peut être activé soit par l'acidification du milieu ou par une protéase telle la plasmine¹²⁶. TGF- β 1 se lie aux récepteurs de type I et II sérine-thréonine kinase et entraîne la phosphorylation des protéines SMAD 2, 3 et 4¹²⁷. Injecté localement, ce facteur de croissance peut stimuler *in vivo* la formation osseuse¹²⁸. *In vitro*, le TGF- β 1 agit en défaveur de la résorption osseuse en inhibant la prolifération et la formation des pré-ostéoclastes et en induisant l'apoptose des ostéoclastes matures¹¹⁶. TGF- β 1 possède des actions diverses sur les ostéoblastes. Ces actions diffèrent selon le stade de différenciation de ces cellules. Il favorise la prolifération ainsi que la production de matrice extracellulaire dans les ostéoblastes en début de différenciation¹²⁷. Globalement TGF- β 1 favorise la formation osseuse¹²⁷.

Les BMPs font partie de la superfamille des TGF- β et signalent via les mêmes récepteurs. Les BMP 2, 4 et 7 sont les plus importants dans l'os. *In vitro*, ils favorisent la différenciation des cellules mésenchymateuses vers les voies ostéochondrocytaire et ostéoblastique¹²⁹. Ils jouent un rôle très important dans le développement du squelette.

Les IGF dont IGF-1 sont très présents dans le tissu osseux et ils ont un rôle important dans la formation osseuse. IGF-1 possède une action mitogène sur les chondrocytes ainsi que les ostéoblastes¹³⁰. En augmentant notamment la transcription de collagène, il stimule la différenciation ostéoblastique^{130,131}.

Les prostaglandines peuvent avoir des effets stimulateur ou inhibiteur pour la formation ou la résorption osseuse selon la dose et le type d'administration. Les ostéoblastes peuvent produire localement des prostaglandines, la plus importante et abondante étant la PGE₂.

Le TNF- α est un stimulateur puissant de la résorption osseuse. Il réalise cela en favorisant la production d'ostéoclastes multinucléés ainsi qu'en stimulant l'activité des

ostéoclastes matures. Il potentialise l'activité de l'IL-1 et agit sur l'ostéoclastogenèse en agissant sur le système RANK/RANKL ainsi que par une voie indépendante¹³².

Les interleukines jouent des rôles importants dans le remodelage osseux, parmi les plus importantes on retrouve IL-1 et IL-6. Ces deux interleukines peuvent être produites par les cellules de lignée monocyttaire ainsi que par les ostéoblastes. Comme TNF- α , il favorise la résorption osseuse.

2.2.3.2.2. Facteurs systémiques

Plusieurs hormones peuvent réguler le remodelage osseux. Parmi les plus importantes, on retrouve les hormones calciotropes telles la parathormone (PTH) et la vitamine D ainsi que les hormones sexuelles oestrogènes et androgènes. Les hormones thyroïdiennes ainsi que les hormones hypophysaires telle l'hormone de croissance peuvent également jouer des rôles importants dans le contrôle du remodelage osseux et ceci de manière directe ou indirecte.

La PTH est stimulée en cas d'hypocalcémie et elle va être responsable de stimuler la résorption osseuse en augmentant la prolifération et l'activité des ostéoclastes afin d'augmenter la calcémie. Les récepteurs de la PTH se situent sur les ostéoblastes et n'existent pas dans les ostéocytes et les ostéoclastes¹³³. Dépendamment du mode d'administration, la PTH peut exercer des effets différents *in vivo*, plusieurs de ces effets sont encore mal connus. Un effet anabolique, avec notamment une augmentation de l'activité des ostéoblastes, sur le tissu osseux est observé lorsqu'elle est administrée de manière intermittente. Injectée de manière continue, elle présente l'effet inverse. Ces effets de la PTH feraient principalement intervenir le système RANKL/OPG. La PTH est également capable d'augmenter la synthèse de nombreux facteurs locaux tels l'IL-6, l'IGF-1 et le TGF- β 1. La PTH serait également capable d'inhiber l'expression de SOST par les ostéocytes et donc de stimuler la formation osseuse¹³⁴. Un autre effet important de la PTH est celui de la stimulation de la production de calcitriol par le rein. Notons que la concentration plasmique de PTH semblerait augmenter avec l'âge ce qui pourrait expliquer en partie les changements au niveau du remodelage osseux au cours de la vie¹³⁵.

La vitamine D peut prendre diverses formes selon son hydroxylation, elle peut ainsi être active ou inactive. La forme active de la vitamine D est la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, cette forme est également appelée calcitriol. Comme la PTH, le calcitriol joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie phosphocalcique. En favorisant l'absorption digestive du calcium et du phosphate, il contribue à la minéralisation du squelette¹³⁶. Les études menées *in vitro* ont permis de montrer que le calcitriol possédait un rôle important dans la régulation de l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes ainsi que dans la synthèse des protéines de la matrice osseuse¹³⁷. L'administration *in vivo* de doses pharmacologiques de calcitriol mène à une augmentation de l'activité et du recrutement des ostéoclastes. Du côté des ostéoblastes, le calcitriol module leur prolifération et stimule leur expression de phosphatase alcaline, d'ostéocalcine et de collagène de type I¹³⁷.

Les œstrogènes sont de puissants inhibiteurs de l'ostéoclastogénèse et donc de la résorption osseuse. Leurs principales cellules cibles sont les ostéoblastes. Ils réalisent cela notamment en inhibant l'expression de plusieurs facteurs locaux stimulant la résorption osseuse tels IL-6 et RANKL exprimés par les cellules stromales et ostéoblastiques. Les changements osseux observés chez beaucoup de femmes ménopausées démontrent l'importance des œstrogènes dans le contrôle du remodelage osseux. Les androgènes favoriseraient également la formation osseuse de manière directe et indirecte¹³⁸.

2.2.4. L'os sous-chondral dans l'ostéoarthrose

La sclérose de l'os sous-chondral est l'un des critères importants dans le diagnostic de l'OA. De plus, son rôle important dans la résistance au choc mécanique, démontré par Radin et Rose¹³⁹, est connu depuis longtemps. Pourtant les études menées lors des dernières décennies sur l'OA ont pourtant ciblée majoritairement le cartilage articulaire. Ce n'est que récemment que plus de groupes de recherche se sont mis à s'intéresser aux altérations au niveau de l'os sous-chondral dans l'OA. On verra dans cette section l'importance de l'étude de l'os sous-chondral dans l'OA ainsi que les altérations au niveau des cellules qui le composent.

2.2.4.1. Fonction dans la résistance au choc mécanique

Les articulations sont souvent soumises à des charges, ce qui est particulièrement le cas des articulations portantes. Ces charges peuvent avoir un poids et une direction variable, et peuvent aussi être répétitives. Les différents tissus composant l'articulation jouent donc des rôles particuliers pour soutenir ces charges. Comme mentionné précédemment, le cartilage est trop mince pour absorber totalement des charges importantes. Son rôle est principalement de minimiser la friction dans la jointure, de répartir au maximum la charge au niveau de la jointure ainsi que de transférer aux structures osseuses sous-jacentes les charges reçues¹³⁹. L'os sous-chondral et l'os trabéculaire vont donc être les principaux tissus à absorber les charges¹⁴⁰.

Le cartilage articulaire repose directement sur l'os sous-chondral. Les forces de pression exercées sur l'os sous-chondral, et particulièrement lorsque celles-ci sont latérales, vont mener à un stress au niveau de l'interface soit entre le cartilage articulaire et l'os sous-chondral, plus rigide. Ce stress appelé « *shear stress* » en termes anglo-saxons pourra entraîner des microfractures au niveau du tissu osseux. Ces microfractures vont engendrer un remodelage initié par le recrutement des ostéoclastes¹⁴⁰.

2.2.4.2. La sclérose osseuse

Le développement de la sclérose osseuse de l'os sous-chondral est une des caractéristiques importantes de l'OA. En effet, la morphologie de ce tissu se voit altérée et conséquemment, ses propriétés mécaniques le sont aussi. On ne sait toujours pas si cette sclérose apparaît avant, après ou en même temps que la dégradation du cartilage articulaire. Les observations menées sur des modèles animaux¹⁴¹⁻¹⁴³ supportent toutefois l'hypothèse suggérant que la sclérose osseuse soit à l'origine de la dégradation du cartilage articulaire ou du moins qu'elle apparaît avant celle-ci.

À ce jour, les causes de l'apparition de la sclérose osseuse dans l'OA sont encore mal connues. Toutefois, on soupçonne que ce sont les microfractures, apparaissant de manière répétée, qui en soient la cause ou du moins une des causes^{140,144}. La succession

des mécanismes moléculaires menant à cette sclérose est encore sujet à débat. Néanmoins plusieurs altérations dans le phénotype et dans le métabolisme des ostéoblastes ont été démontrées.

2.2.4.2.1. L'ostéoblaste ostéoarthrosique

La sclérose osseuse dans l'OA suggèrerait inévitablement une altération dans le métabolisme des cellules produisant et constituant cette matrice étant en l'occurrence les ostéoblastes et/ou les ostéocytes. Effectivement, des études *ex vivo* et *in vitro*, utilisant des échantillons d'os sous-chondral humains OA comme modèle d'étude, démontrent plusieurs altérations similaires dans le métabolisme et dans le phénotype de ces ostéoblastes^{145,146}. Est-ce qu'un facteur systémique pourrait être à l'origine de ces altérations, on y reviendra dans la discussion.

2.2.4.2.1.1. Un phénotype altéré

Comme mentionné précédemment les marqueurs phénotypiques des ostéoblastes sont l'ostéocalcine et moins spécifiquement le collagène de type I ainsi que l'activité phosphatase alcaline. Dans les ostéoblastes humains OA issus de culture primaire, ces trois marqueurs sont altérés. Ils sont tous significativement plus élevés que dans les ostéoblastes normaux^{85,145}.

Une étude *in vitro* portant sur les niveaux de sécrétion de PGE₂ des ostéoblastes humains OA a permis de différencier 2 populations de patients OA¹⁴⁷. En effet, les ostéoblastes de certains patients secrètent significativement plus de PGE₂ que d'autres patients chez lesquels leurs ostéoblastes sécrétaient des niveaux comparables à ceux des individus normaux. Cette différence métabolique observée dans les ostéoblastes de patients OA pourrait servir à expliquer en partie certaines différences observées en clinique entre les patients OA ou/et suite à certains traitements, en pensant particulièrement aux NSAIDs.

2.2.4.2.1.2. Un métabolisme altéré et une minéralisation anormale

Un changement structural de l'os¹⁴⁸ et particulièrement de l'os sous-chondral tel qu'observé chez les patients OA témoignerait inévitablement d'une altération dans le métabolisme des cellules osseuses. Cette altération affecterait particulièrement le remodelage osseux. C'est effectivement ce qui est observé *in vivo* ainsi qu'*in vitro*. *In vivo*, des études ont montré que les marqueurs de résorption osseuse étaient élevés dans le sérum de patients OA en phase précoce. Les marqueurs de formation osseuse, soient l'ostéocalcine et l'ostéopontine, étaient respectivement plus élevés dans le liquide synovial et le sérum des patients OA en phase avancée¹⁴⁹. *In vitro*, les productions de plusieurs cytokines, facteurs de croissance et hormones intervenant dans le remodelage osseux ont aussi montré des altérations. Comme ces derniers peuvent agir les uns sur les autres, il n'est pas évident de savoir si l'altération d'un facteur est directement ou indirectement responsable de l'altération d'un autre.

Parmi les facteurs locaux altérés dans les ostéoblastes OA, on retrouve notamment l'IGF-1 et le TGF- β 1. Du côté hormonal, le récepteur de la PTH serait moins exprimé et les ostéoblastes OA produiraient anormalement plus de leptine¹⁵⁰. Une augmentation de la libération locale de l'IGF-1 observée dans les ostéoblastes OA aurait des effets à divers niveaux. Elle altérerait le système urokinase/plasmine pour ainsi favoriser la production de la matrice extracellulaire. Parallèlement, l'IGF-1 agirait via la voie ERK1/2 pour augmenter la prolifération des ostéoblastes, retarder leur apoptose et augmenter leur activité phosphatase alcaline¹⁵¹. Toutes ces altérations sont observées dans les ostéoblastes OA. Bien qu'il y ait une augmentation d'éléments de la matrice extracellulaire tel le collagène de type 1, la minéralisation de celle-ci est altérée⁸⁵. Le ratio entre les chaînes de collagène de type 1 α 1 et α 2 au niveau d'explants osseux de patients OA a montré être de 4:1 à 17:1 comparativement à 2,4:1 pour les individus normaux¹⁵². Cette altération dans le ratio est également présente *in vitro*⁸⁵. Cette altération a pu être en partie expliquée par une surexpression de TGF- β 1 dans les ostéoblastes OA. En effet, l'inhibition de TGF- β 1 a pu corriger le ratio des hélices du collagène de type 1 ainsi qu'améliorer la minéralisation osseuse⁸⁵. La réponse à la PTH dans les ostéoblastes OA est aussi diminuée à cause d'une plus faible expression de son

récepteur. Cela entraînerait une diminution de la dégradation matricielle et donc possiblement une augmentation relative du contenu en collagène de type 1 telle qu'observée¹⁵². En ce qui a trait aux cytokines et aux eicosanoïdes, IL-1 β , IL-6, PGE₂ et LTB₄ seraient les plus importants régulateurs de la matrice extracellulaire osseuse. Or, ces trois derniers sont altérés dans les ostéoblastes OA mais de manière différente chez les patients OA. En effet, dans un groupe de patients gonarthrosiques, la production de PGE₂ et d'IL-6 serait élevée dans leurs ostéoblastes tandis que pour l'autre groupe de patients, les niveaux de production de PGE₂ et IL-6 seraient normaux. Par contre, la production de LTB₄ serait inversée en fonction de celle de PGE₂ dans ces mêmes deux groupes¹⁵³. Toutefois, les PGE₂ et les LTB₄ ne joueraient pas un rôle direct dans le développement de la sclérose osseuse¹⁵⁴ bien qu'ils puissent y jouer un rôle secondaire⁸⁵. Par ailleurs, la signalisation Wnt, jouant un rôle clé dans la formation osseuse serait aussi altérée et on y reviendra dans la dernière partie.

2.3. Les autres tissus articulaires et leur implication dans l'ostéoarthrose

Outre le cartilage et l'os, d'autres tissus possèdent des rôles mécaniques importants dans le contrôle des charges mécaniques sur l'articulation. Parmi ces tissus, on retrouve les muscles, les ligaments ainsi que les ménisques.

Comme mentionné précédemment des problèmes au niveau de ces tissus sont corrélés à une augmentation du risque de développer l'OA. Bien qu'une déchirure du ligament et/ou du ménisque ainsi qu'une faiblesse des quadriceps soient associées à un risque de développer l'OA, une altération dans le métabolisme de ces tissus pourrait favoriser, du moins dans certain cas, la survenue de ces déchirures ou faiblesses. En effet, il a été montré dans un modèle de souris spontanée OA que des altérations au niveau des ligaments seraient présentes avant même la survenue de lésions à leur niveau¹⁵⁵.

Malgré la reconnaissance du fait que chaque tissu composant l'articulation puisse être affecté dans l'OA, peu d'études se sont intéressées aux altérations métaboliques pouvant être présentes au sein de tous ces tissus chez les patients OA. Pourtant, certaines études démontrent des altérations métaboliques au sein du ménisque¹⁵⁶, des

ligaments¹⁵⁵, des tendons¹⁵⁷ et des muscles³⁷. L'exemple des altérations au sein des cellules méniscales, soit des chondrocytes, démontre bien l'importance de considérer ces tissus dans le traitement de l'OA. En effet, en mettant en culture ces chondrocytes OA issues du ménisque, une calcification accrue a été observée par rapport aux cellules normales¹⁵⁶. Cette altération pourrait donc mener à une dysfonction des propriétés biomécaniques du ménisque chez les patients OA¹⁵⁶.

La membrane synoviale et le tissu gras sont deux autres tissus ayant montré avoir ou potentiellement avoir des rôles secondaires dans l'OA. En effet, l'inflammation de la membrane synoviale survenant suite à la présence de résidus cartilagineux dans le liquide synovial peut entraîner de la douleur. En ce qui a trait au tissu gras, qui serait réparti de manière anormale au niveau de l'articulation des patients OA, il pourrait sécréter des adipokines. Ces dernières peuvent agir sur différents types cellulaires tels les ostéoblastes et les chondrocytes²⁰. Le métabolisme de ces cellules pourrait ainsi être altéré.

Rappelons que les cellules composant les tissus articulaires proviennent en grande partie de la différenciation des cellules mésenchymateuses. Une altération de ces dernières ou leur différenciation préférentielle vers certains types cellulaires pourraient expliquer, du moins en partie, l'altération de ces tissus dans l'OA.

3. La signalisation Wnt dans l'ostéoarthrose

L'étiologie du mot Wnt provient de l'association entre le gène de la drosophile « *wingless* » (wg) et de l'oncogène int-1 découvert à l'origine chez la souris^{158,159}. Le gène wg se révélait être le gène homologue de la drosophile du gène int-1 (maintenant appelé Wnt-1) découvert précédemment chez la souris¹⁶⁰. La famille des protéines Wnt a donc grandement été étudiée pour ses implications dans l'embryogenèse ainsi que dans le développement de tumeurs. Son rôle dans la formation osseuse n'a été découvert que depuis une décennie alors qu'une mutation de son co-récepteur *low-density lipoprotein receptor-related protein-5* (LRP-5) a montré être responsable d'un phénotype osseux particulier chez l'humain. Une mutation « perte de fonction » et une mutation « gain de fonction » de ce co-récepteur étaient responsables respectivement du syndrome

d'ostéoporose avec pseudogliome (OPPG) et d'un phénotype de masse osseuse élevée^{108,161}. Depuis cette découverte, de nombreuses études ont confirmé le rôle primordial de cette famille de protéines dans l'ostéogenèse ainsi que dans l'ostéoblastogenèse.

La signalisation Wnt fait intervenir la famille de ligands Wnt dont 19 membres sont connus à ce jour¹⁶², ainsi que le récepteur Frizzled (Fz) et les co-récepteur LRP-5 et LRP-6. Il existe également de nombreux antagonistes dont la famille la plus importante est celle des dickkopfs (DKK). La liaison d'un ligand Wnt à son récepteur peut activer la cellule de différentes manières, ainsi il existe une voie canonique impliquant l'accumulation de β -caténine dans la cellule et plusieurs voies non-canoniques. Certains ligands Wnt vont pouvoir agir exclusivement ou pas via certaines de ces voies. La voie de signalisation canonique Wnt/ β -caténine est la voie la mieux connue et étudiée, elle semble être aussi la plus importante dans le tissu osseux¹⁶³. Toutefois, les voies non-canoniques pourraient s'avérer être également importantes. Pour rajouter à la complexité de cette signalisation, plusieurs « *cross-talk* » avec d'autres voies signalétiques sont présents. Il est tout de même important de préciser qu'il n'y aurait que quelques agonistes et antagonistes ayant des rôles importants dans l'ostéogenèse et l'ostéoblastogenèse comme le démontre notamment les études de souris KO.

Une altération de cette signalisation est en cause dans diverses maladies osseuses telle l'ostéoporose et plus récemment, il a été démontré qu'elle serait aussi altérée dans un modèle animal d'OA. On verra donc dans cette partie comment fonctionne cette signalisation, ses principaux agonistes et antagonistes dans le tissu osseux ainsi que son rôle potentiel dans le développement de l'OA.

3.1. La voie de signalisation canonique Wnt/ β -caténine

3.1.1. Fonctionnement

Bien que cette voie de signalisation fût découverte depuis deux décennies, où un lien entre un ligand Wnt et la β -caténine fût établi, le rôle de plusieurs acteurs de la cascade reste encore mal compris. Toutefois, le fonctionnement général de cette voie est

bien élucidé. Avant de décrire le fonctionnement de cette voie, il est important de noter que la β -caténine, une protéine cytosolique et nucléaire également impliquée dans l'adhésion cellulaire, est la cible principale de cette voie signalétique.

Avant de décrire en détail le fonctionnement de cette signalisation, le fonctionnement général de cette voie sera présenté dans ce paragraphe. La liaison d'un ligand Wnt avec son récepteur va favoriser la forme libre, déphosphorylée, de la β -caténine. Celle-ci pourra ainsi être transloquée dans le noyau et agir comme facteur co-transcriptionnel pour induire la transcription de gènes spécifiques. En l'absence de ligand Wnt, la β -caténine est phosphorylée par le complexe de dégradation pour être par la suite dégradée par le protéasome.

En l'absence de ligand Wnt, la β -caténine se trouve associée, dans le cytoplasme, avec un complexe de dégradation (Figure 7). Ce complexe de dégradation est composé de plusieurs protéines dont les principales sont les kinases *glycogen synthase kinase 3 β* (GSK-3 β) et la *casein kinase 1 α* (CK1 α), ainsi que des protéines d'échafaudage Axin et *Adenomatous Polyposis Coli* (APC). Au sein de ce complexe la β -caténine va être phosphorylée au niveau de certains résidus. Cette phosphorylation de la β -caténine va permettre au complexe *β -transducin repeat-containing protein* (β -TrCP) *E3 ubiquitin-ligase* de la reconnaître rapidement et de l'ubiquitiner. Ubiquitinée, la β -caténine sera reconnue et dégradée par le protéasome.

En présence d'un ligand Wnt, celui-ci va se lier, à la surface de la cellule, à son récepteur à 7 passages transmembranaires Fz et présentement 10 isoformes de ce récepteur sont connus. Cette liaison entraînera un changement de sa conformation ainsi que le recrutement du co-récepteur à un passage transmembranaire LRP5 ou 6 (Figure 7). Le recrutement de ce co-récepteur est nécessaire à la transduction du signal. Activé, Fz induirait le recrutement à son domaine intracellulaire, la phosphorylation et l'activation de *dishevelled* (Dsh). LRP5/6 de son côté, lorsqu'activé par un ligand Wnt, verrait son domaine intracellulaire phosphorylé et recruterait l'axin pour ainsi, avec Dsh, déstabiliser le complexe de dégradation en recrutant ses composantes à la membrane. La β -caténine non-phosphorylée pourra ainsi s'accumuler dans le cytoplasme pour ensuite être transloquée dans le noyau. Les mécanismes de translocation de la β -caténine vers le noyau sont mal connus mais il semblerait que celle-ci ne nécessite aucune protéine de

liaison pour pénétrer le noyau. Une fois dans le noyau, la β -caténine agirait en tant que co-facteur en se liant aux facteurs de transcription *lymphoid enhancer-binding factor 1* (LEF) et *T cell-specific transcription factor* (TCF). Cette liaison va entraîner l'expulsion de groucho lié à LEF/TCF en l'absence de β -caténine, groucho étant un répresseur de transcription associé à des histones déacétylases. Ainsi, il y aura un recrutement d'histones acétyltransférases qui entraîneront la transcription des gènes cibles du ligand Wnt. Notons également qu'il a récemment été montré que la β -caténine pouvait aussi se lier au facteur de transcription Pitx2 pour transformer cet inhibiteur de transcription en activateur de transcription^{164,165}. Bien que Pitx2 ne semble pas être très présent dans le tissu osseux, ce n'est pas le cas pour son homologue Pitx1, qui y est présent. De plus Pitx1 a aussi été identifié dans le cartilage articulaire et est diminué dans le cartilage OA humain¹⁶⁶. Ce dernier a montré être impliqué dans l'OA¹⁶⁶. On y reviendra dans la discussion.

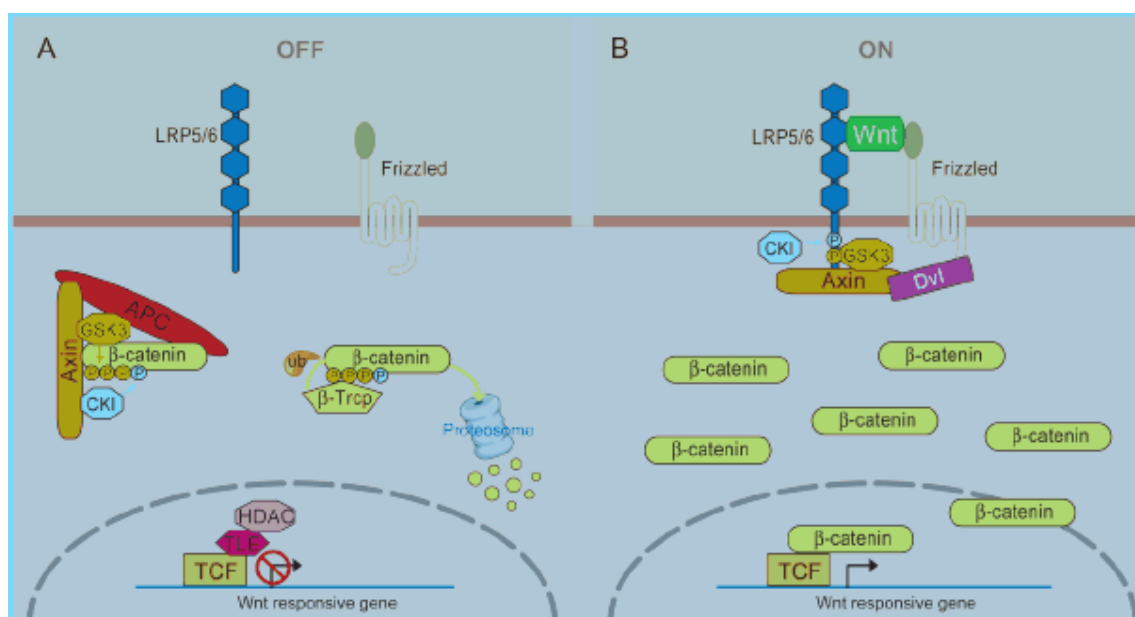


Figure 7. **Schéma de la signalisation canonique Wnt/β-caténine en présence et en l'absence de Wnt**¹⁶⁷. À gauche, on voit d'une part, qu'en absence d'agoniste, le complexe de dégradation de la β -caténine est stabilisé et d'autre part, la dégradation par le protéasome de la β -caténine phosphorylée par ce complexe. À droite on voit qu'en présence d'agoniste les composantes du complexe de dégradation sont dissociés et la présence de β -caténine déphosphorylée dans le cytosol et dans le noyau.

3.2. Les voies de signalisation Wnt non-canoniques

Les voies de signalisation Wnt non-canoniques sont définies comme étant les voies indépendantes de la fonction transcriptionnelle de la β -caténine. En plus d'être nombreuses, elles sont pour la plupart encore mal comprises. Neuf voies de signalisation Wnt non-canoniques ont été décrites par Semenov et al¹⁶⁸. Parmi ces dernières on retrouve la voie Wnt/PCP (« Polarité Planaire Cellulaire »), la voie Wnt-cGMP/ Ca^{2+} ainsi que des voies impliquant des récepteurs tyrosine-kinase telles Wnt-ROR2 et Wnt-RYK. Il est toutefois important de mentionner qu'il est probable que les ligands Wnt n'agiraient pas préférentiellement vers une voie plutôt qu'une autre mais agiraient en fonction des récepteurs présents sur la cellule¹⁶⁹.

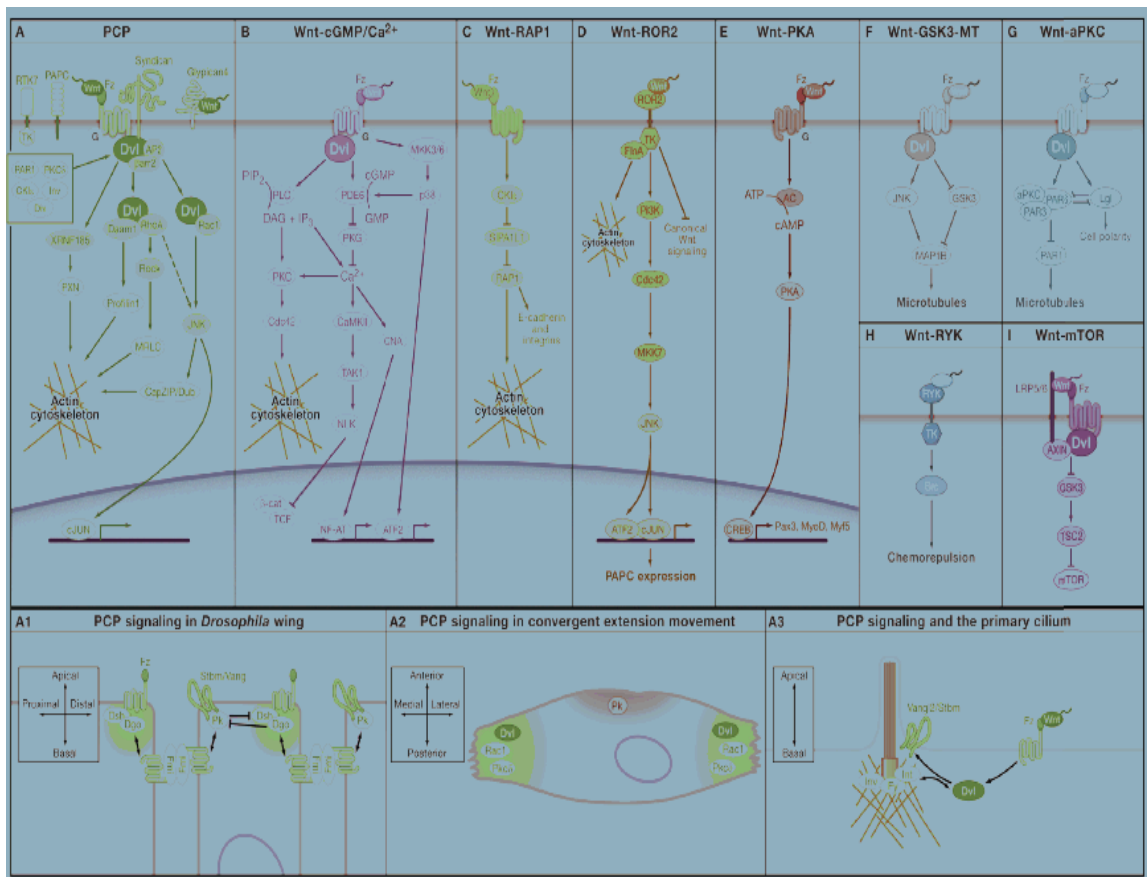


Figure 8. Schéma des voies de signalisation Wnt non-canoniques¹⁶⁸.

3.3. Les acteurs extracellulaires de la signalisation Wnt

Il existe de nombreux agonistes et antagonistes de cette voie de signalisation et les actions de ces derniers peuvent différer selon leur concentration et le contexte cellulaire en pensant notamment aux récepteurs présents à la membrane cellulaire. La surexpression d'un certain agoniste n'engendrera donc pas nécessairement une activation de la signalisation Wnt car celle-ci pourra engendrer l'expression d'un antagoniste potentiellement plus puissant dans le contexte cellulaire. La balance entre agonistes et antagonistes semble donc très importante dans cette signalisation.

3.3.1. Les agonistes

Malgré le nom que porte cette voie de signalisation, il n'y a pas que les ligands Wnt qui puissent activer la cellule via les récepteurs Fz et LRP. Outre les protéines Wnt, on retrouve notamment la protéine de la maladie de Norrie, norrin ainsi que les R-spondines qui peuvent se lier à ces récepteurs et activer la cellule. Les R-spondines agiraient toutefois en synergie avec les protéines Wnt¹⁷⁰. Bien que ces protéines puissent avoir un certain rôle dans le métabolisme osseux, on se concentrera dans cette partie sur certaines protéines Wnt qui sont l'objet de cette étude.

La famille des protéines Wnt est composée de 19 membres connus à ce jour¹⁶⁷. Il s'agit de glycoprotéines de 350 à 400 acides aminés riches en cystéines^{160,167}. Ces glycoprotéines sont palmitoylées avant d'être sécrétées. Cette palmitoylation semble être essentielle à leurs fonctions et rend ces protéines peu solubles¹⁶⁰. En effet, une absence de palmitoylation empêcherait l'activation de leurs récepteurs. Les modèles de souris KO de ces glycoprotéines ont montré que Wnt7b, Wnt10b et Wnt5a sont impliquées dans l'homéostasie osseuse¹⁶². Wnt7b est exprimé par les ostéoblastes et son inhibition mène à des anomalies dans la chondrogenèse et l'ostéoblastogenèse chez la souris. Il ne favoriserait toutefois pas la voie de signalisation canonique. Wnt10b promouvait la différenciation osseuse en induisant notamment les facteurs de transcription Runx2 et osx. La souris KO en Wnt10b présente un phénotype avec moins d'os trabéculaire et avec une formation osseuse diminuée¹⁶². La souris hétérozygote en Wnt5a présente quant à elle une faible masse osseuse avec une adipogenèse augmentée et une

ostéoblastogenèse diminuée. Comme Wnt7b, Wnt5a signalerait préférentiellement via des voies non-canoniques.

3.3.2. Les antagonistes

Il existe de nombreux antagonistes extracellulaires de la signalisation Wnt mais ces derniers peuvent toutefois agir à différents niveaux et certains d'entre eux, dépendamment de leur concentration et du contexte cellulaire, peuvent aussi agir comme agonistes. Ces antagonistes de la signalisation Wnt peuvent être classés dans 3 catégories différentes selon leur mode d'inhibition.

La première catégorie comporte la famille de protéines sécrétées DKK et leur récepteur Kremen. Ils agissent ensemble pour internaliser les co-récepteurs LRP5/6 pour qu'ils soient ainsi dégradés. La famille des DKKs est composée de 4 membres DKK1-4. Les DKKs sont des glycoprotéines de 255 à 350 acides aminés. DKK3, bien que faisant partie de cette famille, n'agirait pas sur la signalisation Wnt¹⁷¹. DKK1 et DKK2 auraient un rôle important au sein du tissu osseux comme le démontre les modèles de souris KO et un modèle de souris transgénique surexprimant Dkk1. DKK1 joue un rôle primordial dans le remodelage osseux¹⁷². Les souris transgéniques surexprimant Dkk1 sont ostéopéniques. Cela supporterait son rôle d'inhibition de la signalisation Wnt dans l'ostéogenèse. Notons aussi que les souris KO en Dkk1 sont non-viables et présentent des altérations majeures aux niveaux de différents organes. DKK2 jouerait quant à lui un rôle important dans la différenciation terminale des ostéoblastes comme le démontre notamment la souris KO en Dkk2. Cette souris est viable et présente étonnement des os à faible densité minérale osseuse et une ostéopénie due à des défauts de minéralisation¹⁷³. Les os de cette souris, bien qu'ils contiennent beaucoup de matrice ostéoïde, sont mal minéralisés¹⁷³. Lors de la différenciation terminale des ostéoblastes, Wnt7b induirait l'expression de DKK2 qui serait responsable de la minéralisation de la matrice¹⁷⁴. DKK2 a montré pouvoir agir aussi en tant qu'activateur de la signalisation Wnt, toutefois cela dépendrait du modèle cellulaire, du stade de différenciation des cellules ainsi que du contexte cellulaire.

La seconde catégorie comporte la sclérostine (SOST) ainsi que Wise qui se lient directement aux co-récepteurs LRP5/6 pour inhiber la signalisation Wnt. Ils pourraient faire cela en compétition ou pas avec ces co-récepteurs¹⁷⁴. SOST serait exprimé en stade tardif de différenciation par les ostéocytes pris dans leur matrice extracellulaire. Il régulerait le remodelage osseux en agissant sur la prolifération et la différenciation des pré-ostéoblastes ainsi que des ostéoblastes matures notamment en diminuant l'activité des BMPs¹⁷⁴.

La dernière catégorie inclue les *Secreted frizzled-related proteins* (sFRPs) ainsi que les *Wnt inhibitory factor* (Wif). Ces protéines se lient directement aux ligands Wnt. Notons que les sFRPs sont exprimés par les ostéoblastes. Ils possèdent des séquences similaires aux récepteurs Fz et pourraient également réguler l'ostéoclastogenèse en se liant à RANKL.

3.4. Les « *cross-talk* » de la signalisation Wnt

Plusieurs autres voies de signalisation ont montré interagir avec des éléments de la signalisation Wnt. Deux « *cross-talk* » pouvant jouer un rôle important dans les ostéoblastes seront décrits.

Il a été démontré dans des cellules de carcinome colorectal que la sous-unité G_s libérée suite à l'activation des récepteurs EPs des PGE₂ pouvait interagir avec le domaine GRS de l'Axin⁹⁵. L'Axin, étant une protéine d'échafaudage du complexe de dégradation de la β -caténine, se voyait donc recrutée à la membrane entraînant de ce fait la dissociation du complexe de dégradation. Cela contribuerait donc à l'accumulation de β -caténine non-phosphorylée au sein de cytosol. Les PGE₂ favoriseraient donc indirectement l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine en agissant sur le complexe de dégradation de la β -caténine.

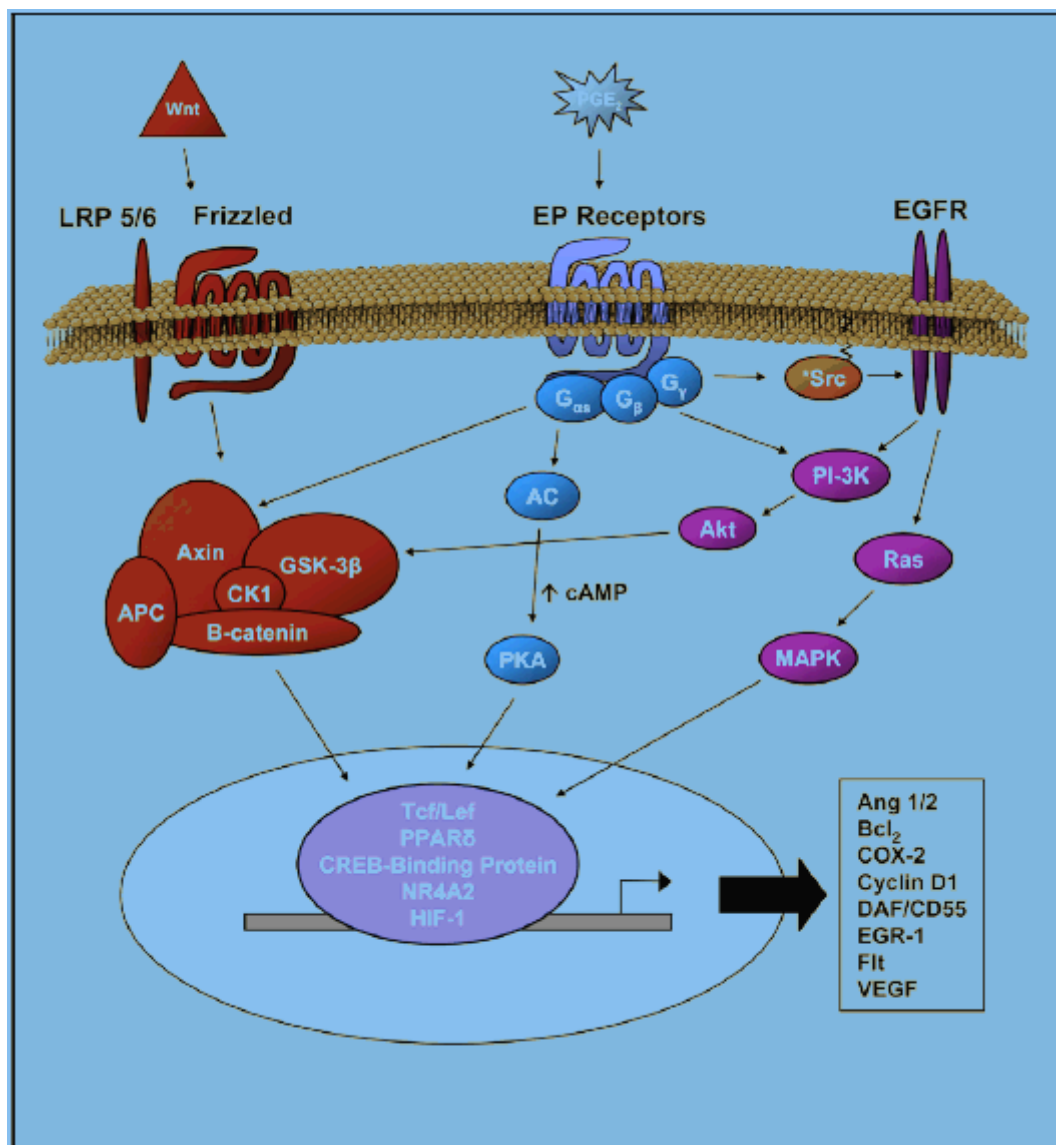


Figure 9. **Lien entre la signalisation canonique Wnt et celle des PGE2 via les récepteurs EPs⁹⁵.** L'unité G α s suite à l'activation d'un récepteur EP va interagir avec l'Axin pour déstabiliser le complexe de dégradation de la β -caténine. Ce lien a été démontré dans un modèle cellulaire de carcinome de cancer colorectal.

Dans les cellules C3H10T1/2, une lignée de cellules de souris embryonnaire, l'ajout de BMP-2 permet de différencier ces cellules en ostéoblastes en augmentant notamment le niveau intracellulaire de β -caténine. Les mécanismes reliés à cela sont encore mal compris bien qu'une relation entre certains SMADs à l'intérieur du noyau soit démontrée^{175,176}. Cette relation entre des membres BMPs de la famille des TGFs et la signalisation canonique Wnt/ β -caténine existe également dans d'autres types

cellulaires¹⁷⁵. Il est toutefois important de noter que ces BMPs n'affectent pas toujours la β -caténine. Ils peuvent agir sur la différenciation cellulaire via des voies qui n'interfèrent pas avec la signalisation canonique Wnt/ β -caténine¹⁷⁶.

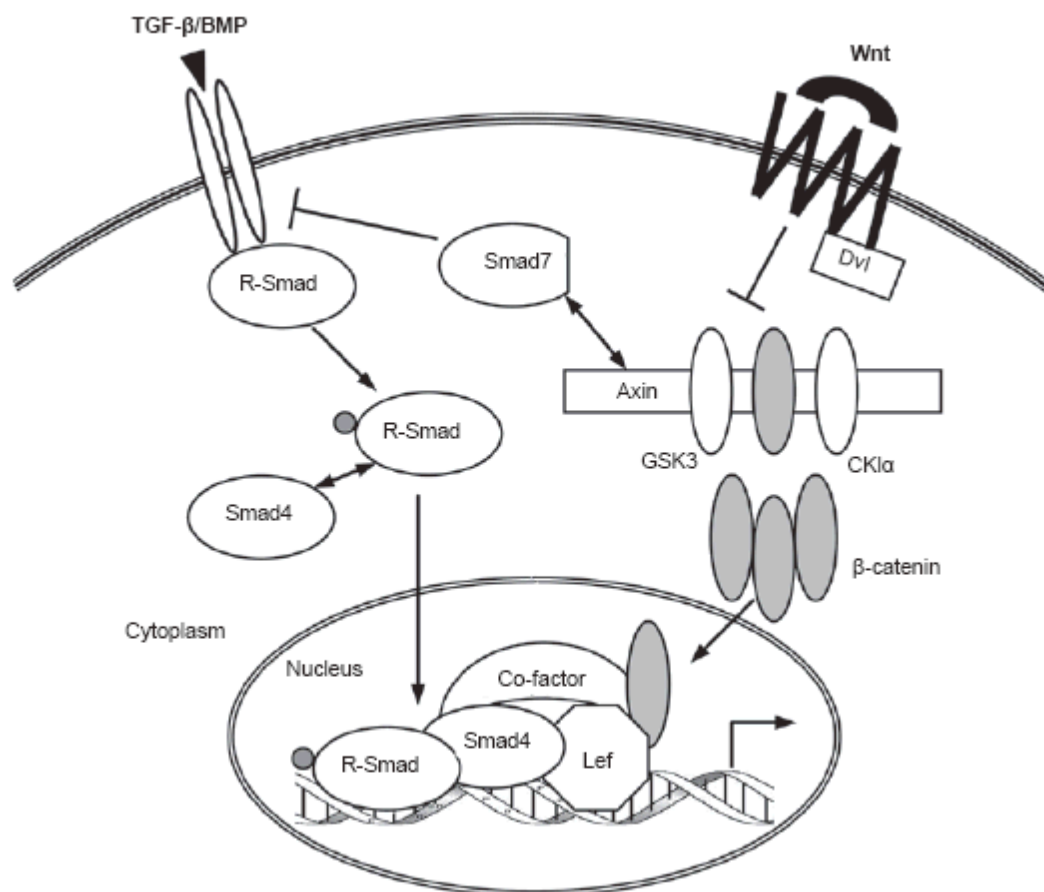


Figure 10. **Lien entre la signalisation des membres de la famille des TGF- β /BMP et la signalisation canonique Wnt¹⁷⁷.**

3.5. Évidence d'un rôle de la signalisation Wnt dans l'OA

La voie de signalisation Wnt est bien connue pour sa grande implication dans le développement embryonnaire et notamment pour ses rôles importants dans la prolifération, la différenciation de divers types cellulaires ainsi que dans la polarisation des organes. Au stade adulte, cette voie contrôle diverses fonctions métaboliques importantes. C'est notamment le cas de l'ostéoblastogenèse et de la chondrogenèse où le

rôle primordial de la signalisation Wnt est de mieux en mieux décrit. Beaucoup d'altérations dans cette voie et de mutations au sein d'éléments composant cette voie de signalisation sont décrites dans de nombreux types de cancers. Ces dernières années, les démonstrations de liens entre la signalisation Wnt et les maladies osseuses dont l'OA sont de plus en plus nombreuses.

La signalisation Wnt a montré pouvoir jouer un rôle important dans l'OA. En effet, les souris dans lesquelles la signalisation Wnt/ β -caténine a été inhibée spécifiquement dans leurs chondrocytes, voyaient leur cartilage être dégradé¹⁷⁸. L'apoptose des chondrocytes au niveau de leurs articulations était également présente. Cette étude a donc démontré que la signalisation Wnt/ β -caténine avait un rôle anti-apoptotique et protecteur au sein du cartilage articulaire. Le même groupe de recherche a par la suite montré que la sur-activation de la signalisation Wnt/ β -caténine spécifiquement dans les chondrocytes de souris adulte menait à une différenciation prématurée de leurs chondrocytes en plus de présenter un phénotype similaire à celui de l'OA¹⁷⁹. Bien que cette étude semble démontrer que la sur-activation de la signalisation Wnt/ β -caténine pouvait mener au développement de l'OA, aucune altération au niveau des autres tissus de l'articulation n'a été exposé. De plus, cette sur-activation effectuée de la signalisation Wnt/ β -caténine pourrait être exagérée par rapport aux conditions physiologiques réelles. Ces deux études bien que démontrant des phénomènes relativement opposés relié à l'activation de la signalisation Wnt/ β -caténine, nous démontre toutefois l'importance de cette signalisation dans l'OA.

Une étude utilisant comme modèle d'étude des cultures primaires de chondrocytes humains OA, a démontré que DKK1 serait surexprimé au sein de ces cellules¹⁸⁰. La surexpression de cet antagoniste de la signalisation Wnt/ β -caténine corrèlerait avec la surexpression de gènes pro-apoptotiques et pro-inflammatoires. L'inhibition par anticorps de DKK1 contribuerait à diminuer l'expression de ces derniers gènes. Cette étude suggérerait également qu'une altération dans la signalisation Wnt/ β -caténine serait présente dans l'OA et qu'elle serait responsable des altérations observées au niveau du cartilage articulaire.

Bien qu'il y ait des évidences de l'altération de cette signalisation dans les chondrocytes OA, son altération au niveau des ostéoblastes OA serait aussi présente. Il

serait aussi important de noter que les modulateurs de cette signalisation pourraient agir différemment dans les chondrocytes et dans les ostéoblastes. Cela serait notamment dû aux différents types de récepteurs présents à la surface de chacune de ces cellules.

4. Hypothèse de recherche

L'OA est caractérisée par une dégradation progressive du cartilage articulaire et une sclérose de l'os sous-chondral. Les causes exactes de l'OA ne sont toujours pas connues. Le rôle de l'os est désormais considéré comme incontestable dans le développement de l'OA. Les ostéoblastes (Ob) humains OA ont un phénotype cellulaire altéré et leur matrice extracellulaire est sous-minéralisée comparativement aux Ob normaux. Comme la minéralisation apparaît à la fin de la différenciation des Ob, le problème serait à ce niveau. Les causes de ces altérations ne sont toujours pas connues mais on soupçonne que TGF- β 1 et une altération de la signalisation Wnt, voie signalétique impliquée dans l'ostéoblastogenèse, pourraient être responsable de ces altérations. TGF- β 1 est un facteur agissant entre autre dans le remodelage osseux, la différenciation et la prolifération des Ob et il est surexprimé dans les Ob OA. Dickkopf-2 (DKK2), un antagoniste de la signalisation Wnt/ β -caténine, agit dans la différenciation terminale des Ob. La prostaglandine E₂ (PGE₂), dans le cadre d'études sur le cancer du colon a montré moduler positivement la signalisation Wnt/ β -caténine. Le rôle des PGE₂ sur la signalisation Wnt/ β -caténine des Ob serait donc aussi important à considérer.

Notre hypothèse de travail est que l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine est diminuée dans les Ob OA. Cette diminution est responsable de la sous-minéralisation et de l'altération du phénotype des Ob humains OA. Par ailleurs, DKK2, dont l'expression est contrôlée par TGF- β 1, est responsable de la diminution de l'activité Wnt/ β -caténine et les PGE₂ peuvent en partie corriger cette situation.

Cette étude serait la première à démontrer une altération de la signalisation Wnt/ β -caténine dans les ostéoblastes OA et à identifier certains facteurs responsable de cette altération. Ainsi, ces facteurs pourraient être la cible de traitements visant à moduler leurs effets. Aussi, cette étude remettrait en cause l'utilisation de certains NSAIDs, en proposant un rôle protecteur des PGE₂ dans l'OA.

CHAPITRE 2

MANUSCRIT

Transforming growth factor β -1 mediated upregulation of Dickkopf-2 is responsible for the abnormal phenotype of human osteoarthritic osteoblasts

Thomas F. Chan^{1*}, Denis Couchourel^{1*}, Aline Delalandre¹, Nicolas Duval² & Daniel Lajeunesse¹.

¹Unité de recherche en arthrose, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM), Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1 & ²Duval Clinique Orthopédique, Le Pavillon des Charmilles, Laval, Québec, Canada, H7M 2Y3

*Both authors should be considered as first authors having contributed equally to these studies

Running title: Role of abnormal Dickkopf-2 production in human OA subchondral osteoblasts

Reprint request: Daniel Lajeunesse Ph.D.,
Unité de recherche en arthrose,
CRCHUM, Hôpital Notre-Dame,

Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1

Tel : [REDACTED]

Email : [REDACTED]

ABSTRACT

The Wnt signaling pathway is crucial for osteogenesis and regulates terminal osteoblast differentiation. Although Osteoarthritic (OA) Osteoblasts (Ob) show an abnormal phenotype and poor in vitro mineralization, the mechanism leading to it still remains unknown. Recent evidence indicates that Wnt signaling may be altered in OA osteoblasts. In this study we determined if an alteration of the Wnt/ β -catenin signaling pathway is responsible for the abnormal phenotype of OA Ob. The expression of the Wnt signaling antagonist Dickkopf-1 (DKK1) was similar in normal and OA Ob whereas DKK2 expression was higher in OA Ob compared to normal. OA Ob showed a decrease of Wnt3a-dependent Wnt/ β -catenin signaling, measured by the TOPflash reporter assay and by Western blot analysis, compared to normal Ob. Correcting DKK2 levels in OA Ob by siRNA techniques enhanced Wnt/ β -catenin signaling. Elevated DKK2 levels could be explained by elevated transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in OA Ob, and exogenous TGF- β 1 increased DKK2 expression in normal Ob whereas ablating TGF- β 1 expression in OA Ob reduced DKK2 expression. Inhibiting TGF- β 1 or DKK2 expression corrected the abnormal phenotype of OA Ob. In vitro mineralization of OA Ob was also increased by DKK2 siRNA. We conclude that elevated TGF- β 1 levels in OA Ob can stimulate DKK2 expression which in turn is responsible, at least in part, for their abnormal phenotype.

INTRODUCTION

Osteoarthritis (OA) is the most common form of joint disease and represents a major cause of disability, particularly among the aging population. OA is a multifactorial disease characterized by loss of articular cartilage, synovial inflammation and subchondral bone plate sclerosis (1). Bone sclerosis in OA is now believed to be due to abnormal tissue remodeling and/or abnormal tissue growth (2-4). Indeed, biochemical analyses of subchondral bone tissue in OA have shown modifications of cell markers, differentiation, mineralization, and cell growth (5-8). Although OA osteoblasts (Ob) present characteristics of enhanced anabolic activity, they fail to mineralize normally *in vitro* (9) as *in vivo* (5,7) suggesting abnormal progression through their terminal differentiation pathway. Indeed, an increase in cell proliferation such as we reported in OA Ob vs normal Ob via Erk1/2 signaling (10) along with an increase in biomarkers such as alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OC) and type 1 collagen (11-13), an enhanced release of growth factors such as Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) (11,13) and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) (13), and incomplete mineralization (9) reflect inappropriate osteogenesis. The increased remodeling in OA bone tissue could possibly account for the observation of hypomineralization of the subchondral bone tissues in established OA (14). This could also explain why an increased subchondral bone activity can predict cartilage loss (15,16). *In vitro* OA Ob show a reduced capacity to mineralize, regardless of their initial sub-group of low or high endogenous production of prostaglandin E₂ (PGE₂) (9). Indeed, the production of endogenous PGE₂ by OA Ob can discriminate two groups of patients which could not be discriminated based on classical clinical criteria of the

American College of Rheumatology (13), and their capacity to mineralize is blunted compared to normal (9).

Wnts are a conserved family of growth factors involved in numerous processes in development, in the adult and in disease (17,18). The family of Wnt ligands is large, however, Wnt3a and Wnt7b are among the most potent in bone tissue (18,19). Wnt ligands act as stem cell growth factors (20), hence could potentiate the recruitment of mesenchymal stem cells to the osteogenic pathway. Wnts signal via the canonical pathway and at least two non-canonical pathways, the Ca^{2+} /PKC pathway and the planar cell polarity pathway (17,21,22). However, the canonical pathway is considered the most important for osteoblast differentiation (21,22). Following Wnt ligand binding to Frizzled (Fz)/LDL-receptor-related proteins (LRP), the canonical signaling pathway is activated to mediate downstream activation of β -catenin. At this stage, stable non-phosphorylated β -catenin accumulates in the cytosol and can translocate to the nucleus to perform its activities via its binding to the N terminus of LEF/TCF transcription factors to activate the transcription of Wnt target genes (23,24). Among the antagonists of Wnt signaling, DKK1 and DKK2 play key roles in Ob proliferation, differentiation and mineralization. DKK1 is a master regulator of osteogenesis (25,26) whereas DKK2 acts as a fine tuning regulator of terminal differentiation and mineralization (27).

As the Wnt pathway is crucial for osteogenesis and increasing evidence indicate a key role of the subchondral bone tissue in OA, this suggested an abnormal function of the Wnt pathway in OA Ob. Hence, we studied if the Wnt signaling pathway is altered in OA Ob, and more specifically if an alteration of Dickkopf family members may explain the abnormal differentiation and mineralization of OA Ob.

MATERIEL AND METHOD

Patients and clinical parameters

Tibial plateaus were obtained from OA patients undergoing total knee replacement surgery and prepared as previously described (9,11,12,28). A total of 51 patients (68.9 ± 8.4 years, mean \pm SD; 20 males/31 females) classified had OA according to the recognized clinical criteria of the American College of Rheumatology were included (29). No patients had received medication that would interfere with bone metabolism, including corticosteroids, for six months before surgery. A total of 11 subchondral bone specimens from normal individuals (63 ± 17.5 years; 5 males/6 females) were collected at autopsy within 12 h of death. They had not been on any medication that could interfere with bone metabolism or had any bone metabolic disease nor abnormal cartilage macroscopic changes. All human material was acquired following a signed agreement by patients undergoing knee surgery or their relatives for the autopsy specimens following the CHUM ethical committee guidelines.

Preparation of primary subchondral bone cell culture

Isolation of the subchondral bone plate and the cell cultures were prepared as previously described using medial tibial plateaus where bone sclerosis is observed (9). At confluence, cells were passaged once at $25,000$ cells/cm² and grown for 5 days in Ham F12/DMEM media (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) containing 10% FBS. Confluent cells were then incubated in the presence or absence of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (50 nM) for 48 hours for the determination of biomarkers or in presence of 0.5% bovine serum albumin (BSA) for the determination of prostaglandin E₂ (PGE₂) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). Supernatants were collected at the end of the incubation

and kept at -80°C prior to assays. Cells were prepared either in ALPase buffer for phenotypic determinations or in TRIzol for RT-PCR experiments. Protein determination was performed by the bicinchoninic acid method (30).

Phenotypic characterization of human subchondral Ob cell cultures

We evaluated $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -dependent alkaline phosphatase activity by substrate hydrolysis using p-nitrophenylphosphate, and osteocalcin was determined in cell supernatants using an EIA as previously described (11-13). TGF- β 1 levels were determined using highly specific Quantikine ELISA assays from R&D Systems (Minneapolis, MN). The sensitivity of the assay was 7 pg/ml. PGE₂ was determined using a highly specific ELISA assay from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI) and the sensitivity was 15 pg/ml. Determinations were performed in triplicate for each cell culture preparation.

Preparation of Wnt3a conditioned media (Wnt3a-CM)

Murine L cell lines transfected with either an empty vector (CRL-2648) or Wnt3a (CRL-2647) were obtained from the American Culture Type Collection (Cedarlane Laboratories Ltd, Burlington, Ontario). Control (L-CM) and Wnt3a-conditioned media (Wnt3a-CM) were prepared using these cells. Briefly, the cells were grown in BGJb media for 48 hours after which conditioned medium (CM) was collected. CM were filtered sterilized, aliquoted and stored at -80°C prior to use. CM were added to normal and OA Ob at a 20% final concentration.

RT-PCR assays

For RT-PCR assays, total cellular RNA was extracted with the TRIzol™ reagent (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) according to the manufacturer's specifications and treated with the DNA-free™ Dnase Treatment and Removal kit (Ambion, Austin, TX) to ensure complete removal of chromosomal DNA. The RNA was quantitated using the RiboGreen RNA quantification kit (Molecular Probes, Eugene, OR). The RT reactions were primed with random hexamers with 1 µg of total RNA in a 100 µl final reaction volume followed by PCR amplification with the Rotor-Gene 6® RG-3000A (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia) as previously described (10,28,31) using 20 pmol of each specific PCR primers. Gene specific primers were: TGF-β1, F: GCGTGCTAATGGTGGAAAC, R: GCTGAGGTATCGCCAGGAA; DKK1, F: CAGGCGTGCAAATCTGTCTC, R: CCTGAGGCACAGTCTGATGAC; DKK2, F: AGGAGTGTGAAGTTGGGAGGTA, R: GGTTTGAGTAATGACCGTGGTT; Fz1, F: CTCCTGTGACAACGAGTTG, R: TGAGGAAGTGGTGGCTGAG; LRP5, F: GCCATCGACTATGACCCACT, R: CAGAACAGTGTCCGGCTGTA; LRP6, F: CCCATGCACCTGGTTCTACT, R: CTGGAAGTGGACTCTGAGC; Wnt3a, F: ACGTCAGCTCGCACGG, R: GACGTAGCAGCACCCTGG; GAPDH, F: CAGAACATCATCCCTGCCTCT, R: GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG, added at a final concentration of 200 nM. The data were collected and processed with the GeneAmp 5700 SDS software and given as threshold cycle (Ct). Ct values were converted to number of molecules using standard curves for each target gene and values were expressed as the ratio of the number of molecules of the target gene to GAPDH.

Evaluation of mineralization

Confluent cells were incubated in BGJb media containing 10% FBS, 50 µg/ml ascorbic acid, 50 µg/ml β-glycerophosphate. This medium was changed every two days until day 28. Normal and OA Ob were treated or not with 10 ng/ml BMP-2 (R&D Systems) beginning at day 2 until day 30. Mineralization of cell cultures was evaluated by quantification of alizarin red staining performed following the extraction procedure of Gregory (32).

Inhibition of TGF-β1 and DKK2 in OA osteoblasts by siRNA

We used a siRNA technique to transiently inhibit TGF-β1 or DKK2 expression in OA Ob. Briefly, OA Ob were split at 100,000 cells/ml. TGF-β1 or DKK2 siRNA preparations (4 different siRNA constructs are provided by the manufacturer in the same sample for each element tested) were obtained at Dharmacon (Lafayette, CO) as well as scramble RNA, and they were added to OA Ob at a final concentration of 100 ng/ml with 6 µl Hi-perfect (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) per 100 µl total volume in BGJb media without serum for 1 hour on day 0 and day 3. On day 5, cells were treated with 1,25(OH)₂D₃ and two days later samples were collected for the determination of alkaline phosphatase and osteocalcin release. The inhibition of TGF-β1 and DKK2 expression was followed using qRT-PCR.

Western immunoblotting

Cell extracts were loaded on polyacrylamide gels and separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing condition as previously described (10,31). Loading of the protein was adjusted according to the cellular protein concentration of each specimen. The proteins were then electrophoretically transferred onto nitrocellulose membranes (Boehringer Mannheim,

Penzberg, Germany), and immunoblotting was performed as described in the ECL Plus Western blotting detection system's manual (Amersham pharmacia biotech, UK, England). Rabbit anti-DKK2 was used at a dilution of 1:1,000 (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA), rabbit anti- β -catenin and rabbit anti-phosphorylated β -catenin at dilutions of 1:2000 and 1:1000 respectively (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), and rabbit anti-human actin at a dilution of 1:10,000 (Sigma-Aldrich) as primary antibodies, whereas goat anti-rabbit IgG as secondary antibodies were used at a dilution of 1:20,000 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) for the assays. Densitometry analysis of western blot films was performed using the public domain NIH Image program developed with the Scion Image 1.63 program (33).

Transfection experiments

Transient transfection of human OA Ob was carried out using the Nucleofector system (AMAXA Inc., Gaithersburg, MD) and a protocol modified for transfecting osteoblasts. Briefly, cells were trypsinized and 1×10^6 cells per reaction were centrifuged at 1,000 rpm for 10 min. After re-suspension in the provided transfection solution, 1 μ g DNA was subjected to electroporation using the provided cuvettes and the D-24 program. Cells were recovered in pre-warmed low calcium culture media (without serum) and left to recover at 37°C for 15 min. Cells were then replated in 35 mm dishes with BGJb media containing 10% FBS. Optimal conditions were first determined using a construct containing Green Fluorescent Protein (GFP, basal condition) such that 60-80% transfection efficiency was obtained for at least 72 hours (data not shown). Using the optimized conditions for transfection, two shDKK2 constructs (Origen, Rockville, MD) were tested for their effect on mineralization in OA Ob treated or not with 10

ng/ml BMP-2 as described above. In parallel experiments, cells treated with the empty vector or shDKK2 were stopped at specific time points and extracted with the TRIzol™ reagent to prepare for qRT-PCR of DKK2 and GAPDH.

TOPflash dual-luciferase reporter assays

Primary normal and OA Ob were plated in 6-well plates at a density of 1.5×10^5 cells/well containing 10%FBS in BGJb media and left to recover overnight. Plasmid mixtures containing 2 μ g TOPflash luciferase construct (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) and 0.05 μ g Renilla luciferase driven by the SV40 promoter (Promega, Madison, WI) were transfected into cells using the Transfectine (BioRad) transfection Reagent according to the manufacturer's protocol. After 24 hr transfection, cells were incubated for another 24 hours with either human recombinant Wnt3a for the dose-response experiments, or Wnt3a-CM or L-CM, in presence or not of 5 nM PGE₂, or 10 μ M NS-398. To determine the effect of DKK2 in OA Ob, cells were treated or not with a mixture of 4 siRNA for DKK2 on the day they were split as previously described. Cells were then left overnight to recover and transfected with TOPflash and renilla as described above. These cells were then treated for 24 hours with Wnt3a-CM or L-CM. After their last 24 hours of incubation, the cells were lysed and luciferase activity was evaluated using the dual luciferase assay kit (Promega). Values for TOPflash luciferase activity were normalized to those of renilla activity.

Statistical analysis

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

RESULTS

We first assessed that OA Ob showed an altered phenotype compared to normal Ob as previously reported (11-13,28). We also determined that Ob prepared from OA patients can discriminate two sub-groups of patients, low and high PGE₂ producers, based on their endogenous production of PGE₂ as also previously reported (10,12,13). Typically, alkaline phosphatase activity (1029.2 ± 144.9 , 975.1 ± 131.1 vs 410.9 ± 87.7 $\mu\text{mol/mg protein/30 min}$) and osteocalcin release (390.7 ± 79.4 , 397.5 ± 66.1 vs 130.6 ± 27.4 $\text{ng/mg protein/48 h}$) were higher for low and high OA Ob respectively compared to normal ($p < 0.005$ for both markers), and similar in OA Ob regardless of their low PGE₂ or high PGE₂ levels: 651.9 ± 73.6 , 6048.0 ± 1006.3 for OA Ob vs 799.9 ± 155.9 pg/mg protein for normal Ob. In all OA Ob, TGF- β 1 release was about 3-fold higher than for normal Ob reaching values of 4357.2 ± 402.0 pg/mg protein in low OA Ob ($p < 0.01$ vs normal), 4293.1 ± 625.4 in high OA Ob ($p < 0.01$ vs normal) and 1598.0 ± 263.9 in normal Ob.

Using three different sets of primers, Wnt3a was not detectable (data not illustrated) in Ob preparations. The Wnt antagonist DKK1 was highly expressed in all Ob and was similar in normal and OA Ob (Figure 1A). In contrast, the expression of the Wnt antagonist DKK2 was three- to four-fold higher in OA Ob compared to normal (Figure 1B). No differences were noted between the two OA Ob subgroups for DKK1 and DKK2. Since OA Ob had higher DKK2 levels, we next determined if OA Ob had reduced Wnt signaling capacity. Normal OA Ob showed about a 20-fold increase in TOPflash signal with increasing doses of Wnt3a (Figure 2A) whereas two behaviors were observed in OA Ob. OA Ob with low endogenous PGE₂ synthesis had a

significantly blunted response to Wnt3a at all concentrations tested compared to normal Ob whereas OA Ob producing high endogenous PGE₂ levels had a similar response as normal Ob (Figure 2A). As PGE₂ levels separate low from high OA Ob, we then assessed if the Wnt canonical pathway could be restored in low OA Ob by exogenous addition of PGE₂, and conversely if lowering PGE₂ levels in high OA Ob would reduce Wnt signaling. Indeed, the addition of 5 nM PGE₂ in low OA Ob stimulated Wnt3a-dependent β -catenin transcriptional activity (Figure 2B) whereas it did not in high OA Ob. In contrast, inhibition of endogenous PGE₂ formation by NS-398 in high OA Ob reduced their Wnt3a-dependent response (Figure 2B) yet failed to modify the response of low OA Ob. NS-398 also had limited effects in normal Ob while exogenous PGE₂ stimulated their Wnt3a-dependent β -catenin signaling to values above those observed in all OA Ob (Figure 2B). These data suggested that the overall Wnt canonical signaling is blunted in OA Ob even if endogenous PGE₂ production could stimulate this pathway. This could not be due to altered receptor levels of Wnt signaling since LRP5, LRP6 and Fz1 had similar expression levels in OA Ob as in normal (Figure 1C). However, regardless of their Wnt3a-dependent TOPflash response, these OA Ob showing low and high endogenous PGE₂ levels all showed similar high DKK2 expression and TGF- β 1 levels compared to normal Ob. We therefore tried to determine if the blunted Wnt signaling in OA Ob was due to the elevated DKK2 levels observed in these cells. Using siRNA techniques to inhibit DKK2 levels in OA Ob promoted Wnt3a-dependent β -catenin signaling about 5-fold as assessed by the TOPflash reporter assay (Figure 2C), whereas it failed to significantly modify basal TCF/Lef expression. Moreover, this response was observed in both low or high OA Ob yet the overall TOPflash production

in high OA Ob remained higher compared to that of low OA Ob, possibly due to their endogenous PGE₂ levels (Figure 2C).

The canonical Wnt signaling pathway involves an alteration in the levels of phospho β -catenin and a shift of β -catenin to the nucleus to promote TCF/Lef gene expression. Since we observed altered TOPflash responses in OA Ob, we next determined the levels of β -catenin in response to Wnt3a stimulation. Figure 3A shows Wnt3a stimulated the levels of free β -catenin in normal Ob and that this response was blunted in low OA Ob while it was almost normal in high OA Ob. PGE₂ increased the levels of β -catenin detected in low OA Ob but not for high OA Ob (Figure 3A and 3B). Moreover, Wnt3a treatment reduced phosphorylated β -catenin levels in normal Ob whereas this effect was blunted in OA Ob (Figure 3C).

Inasmuch as DKK2 levels were elevated in all OA Ob compared to normal and given that DKK2 can regulate terminal differentiation of osteoblasts (27), we next questioned if this could explain their abnormal phenotype of OA Ob. Figure 4A shows that a mixture of 4 different siRNA constructs for DKK2 inhibited significantly its expression to about 35% of control values, hence reducing levels to that of normal Ob (see Figure 1B). Under these conditions, the alkaline phosphatase activity and osteocalcin release of OA Ob were reduced to values similar to normal Ob (Figure 4B). Since all OA Ob have both elevated DKK2 and TGF- β 1 levels, we hypothesized that TGF- β 1 may also be influencing these biomarkers. siRNA for TGF- β 1 significantly reduced TGF- β 1 expression about 10-fold in OA Ob (Figure 4C), and also inhibited their biomarkers (Figure 4D). Last, Western blot analysis of DKK2 levels revealed that siDKK2 and siTGF- β 1 could both reduce DKK2 production. siDKK2 treatment reduced

DKK2 levels to 40.9 ± 5.6 % of controls with scrambled siRNA whereas siTGF- β 1 reduced it to 70.9 ± 8.2 % of controls (Figure 4E).

Several lines of evidence indicated that TGF- β 1 could drive DKK2 expression. First, DKK2 expression is elevated in all OA Ob and these cells all have elevated TGF- β 1 levels (see above) (13). siTGF- β 1 treatments reduced DKK2 expression to similar levels as siDKK2 (Figure 5A). Moreover, exogenous addition of TGF- β 1 stimulated the expression of DKK2 in normal Ob (Figure 5B, left panel) to similar levels as those observed in OA Ob, whereas addition of TGF- β 1 to OA Ob did not have additional effect on these cells (Figure 5B, right panel). In contrast, siDKK2 treatments failed to modify TGF- β 1 expression in OA Ob (Figure 5C).

We previously reported that OA Ob show a reduced mineralization potential due to elevated TGF- β 1 levels (9,13). Since we observed that TGF- β 1 drives DKK2 expression in OA Ob, we tested if their abnormal DKK2 expression could also be responsible for the alteration in mineralization. Figure 6A shows that DKK2 expression remained low in presence of shDKK2 even after 28 days of treatment when we measured *in vitro* mineralization. shDKK2 initially inhibited DKK2 expression more than 95% at day 3. This inhibition remained significant between 40 to 50% at days 14 and 28. Under these conditions, shDKK2 treatments stimulated about 2-fold BMP-2 induced mineralization by OA Ob as assessed by Alizarin red staining (Figure 6B, top) and quantification (Figure 6B, bottom). This alteration in *in vitro* mineralization was linked with a partial correction of the expression of type 1 collagen in OA Ob. Indeed, an elevated expression of type 1 collagen α 1 chains over α 2 chains is responsible for altered mineralization as we previously reported (9). Here, inhibiting DKK2 levels

reduced the expression of COL1A1 whereas it did not modify significantly COL1A2 expression resulting in a decrease of the COL1A1 to COL1A2 ratio (Figure 6C).

DISCUSSION

The Wnt signaling pathway is crucial for normal bone tissue homeostasis and for normal osteoblast function. Osteoarthritis is characterized by cartilage damage, loss and failure to repair damages. It was believed this was restricted to abnormal chondrocyte function yet recent studies, both clinical and with animal models, have underlined the crucial role played by the subchondral bone in this process. Indeed, subchondral bone tissue is abnormal in OA patients (5-8) and this is due to altered osteoblast functions (9,11). Interestingly, these osteoblast functions have all been shown to be regulated by the Wnt signaling pathway. This is the first study clearly indicating that Wnts are involved in the abnormal function of OA Ob, namely their abnormal expression of phenotypic markers and reduced mineralization. Moreover, our studies linked this abnormal behavior of OA Ob with their endogenous production of TGF- β 1, a situation that we previously identified to also alter collagen type 1 production and mineralization (9). In addition, we showed that the secreted Wnt antagonist DKK2 is the most affected in these cells and perturbed the function of OA Ob.

A direct assessment of the role of Wnts in OA pathogenesis at the cellular level has not been attempted yet. Here, we failed to demonstrate an alteration of either LRP5, LRP6 or Fz1 expression in OA Ob compared to normal which could therefore not account for our observed downstream inhibition of Wnt signaling. In contrast, an alteration of either antagonists or agonists of Wnt signaling could explain abnormal Wnt signaling. Wnt3a was not detectable in both normal and OA Ob yet antagonists of Wnt signaling were readily detectable.

The Wnt antagonist DKK1 is considered as a master regulator of osteoblast function (25). Not surprisingly, DKK1 expression was similar in OA Ob as in normal Ob. In contrast, DKK2 expression was several fold elevated in OA Ob compared to normal which is consistent with the reduced Wnt signaling and abnormal function of OA Ob we observed herein since DKK2 is a regulator of terminal differentiation and mineralization (27). Inasmuch as DKK2 would regulate the phenotypic markers of OA Ob, its inactivation did rescue alkaline phosphatase activity and osteocalcin release, and improved the mineralization potential of these cells. In support of our observations, Olivares-Navarrete et al recently reported that reducing DKK2 by shRNA techniques reduced alkaline phosphatase activity and osteocalcin release in the human osteosarcoma cell model MG-63 (34). Increasing DKK1 or DKK2 levels also inhibits the terminal osteoblast differentiation of KS483 cells (35) whereas elevated DKK1-mediated Wnt signaling inhibition leads to osteopenia (36). The observed effect of DKK2 in OA Ob could also be linked with their endogenous elevated TGF- β 1 levels. Indeed, silencing TGF- β 1 in OA Ob reduced DKK2 levels about 65%, and this also lead to a decrease in alkaline phosphatase activity and osteocalcin release (this study), while it leads to an increase in *in vitro* mineralization (9). Conversely, inhibiting DKK2 expression did not lead to any significant changes in TGF- β 1 expression, indicating that DKK2 is a downstream effector of TGF- β 1 in these cells.

DKK1 and DKK2, but not DKK3 and DKK4, have been shown to inhibit β -catenin signaling by as much as 50% in L cells (18). In the low OA Ob sub-group, TCF/lef reporter assays were reduced about half compared to normal, however, levels were similar in high OA Ob and normal Ob. This suggested that endogenous levels of

PGE₂ in OA Ob could be responsible for this. Indeed, the addition of PGE₂ to low OA Ob stimulated their response to exogenous Wnt3a increasing their TCF/lef response to near normal, while the COX-2 inhibitor NS-398 failed to significantly affect their response. In sharp contrast, in high OA Ob, PGE₂ could not further stimulate their Wnt3a-dependent TCF/lef response while NS-398 reduced it to similar levels as in low OA Ob and below that of normal Ob. These results suggest that the Wnt/β-catenin canonical pathway in OA Ob is reduced compared to normal but that endogenous PGE₂, via as yet an unknown pathway, partly rescues it in the high OA Ob group. A similar role for PGE₂ has been described in colon cancer cells via EP2 receptor coupled to phosphoinositide 3-kinase and the protein kinase Akt activation leading to an alteration of GSK-3β dependent β-catenin phosphorylation and degradation thereof (37). NSAIDs such as aspirin that reduce PGE₂ levels have been shown to reduce the Wnt/β-catenin signaling pathway via stabilisation of phospho β-catenin (38). Moreover, DKK1 and DKK2 can both inhibit Wnt3a-induced osteoprotegerin production in osteoprogenitor cells (39) and interestingly we previously reported that osteoprotegerin production was reduced in low OA Ob (40) hence in the cells with the lowest Wnt/β-catenin signaling capacities. Regardless of the exact mechanism involved in the PGE₂-dependent activation of Wnt/β-catenin in OA Ob, we observed similar alterations of β-catenin and phospho β-catenin levels in OA Ob as for the TCF/lef reporter assays in response to Wnt3a compared to normal Ob. Hence, the intracellular machinery of the Wnt signaling pathway seems functional in OA Ob as in normal Ob, and responds to intrinsic abnormal signals present in OA Ob. However, further studies will be needed to unravel which pathways are involved in OA Ob.

In conclusion, the present study demonstrates that DKK2 is a major player in the abnormal phenotypic expression of OA osteoblasts and that the abnormal expression of DKK2 is, at least, under the control of TGF- β 1. The cascade of events leading to TGF- β 1 induced DKK2 up-regulation and increased phenotypic expression in OA Ob will require further studies.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Expression of Wnt antagonists and receptors in normal and OA Ob by real-time PCR. Confluent Ob were lysed in TRIzol and RNA extracted as described in Material and Methods. RNA was reverse transcribed followed by PCR amplification of cDNA using specific primers. Plasmid DNAs containing the target gene sequences were used to generate the standard curves for LRP5, LRP6, Fz1, DKK1, DKK2 and GAPDH. The value for each sample was calculated as the ratio of the number of molecules of the target gene/number of molecules of GAPDH. A) Expression of DKK1 under basal condition; B) Expression of DKK2 under basal condition; C) Expression of LRP5, LRP6 and Fz1 under basal condition. Results are the mean \pm SEM for n=4-9 normal Ob, n=4-13 low OA Ob and n=4-11 for high OA Ob preparations.

Figure 2: Transcriptional activity of β -catenin in normal and OA Ob: effect of PGE₂ and DKK2. A) TCF-dependent transcription in normal, low and high OA Ob. Ob in 6-wells plate were transiently transfected with TOPflash and renilla plasmids. Twenty four hours later cells were treated with increasing doses of recombinant human Wnt3a. Data are the mean \pm Sem of n=3-7 normal Ob, n=6 low OA Ob and n=3 high OA Ob. B) Normal, low and high OA Ob were transiently transfected with TOPflash and renilla. Twenty four hours later cells were incubated with 20% L-CM or Wnt3a-CM containing or not 5 nM PGE₂ or 10 μ M NS-398. Data are the mean \pm SEM of n=5 normal Ob, n=13 low Ob and n=6 high OA Ob. C) Low and high OA Ob were treated with a mixture of 4 siRNA for DKK2 the day they were split. Twenty four hours later cells were transiently transfected with TOPflash and renilla. Again, twenty four hours

later cells were incubated with 20% L-CM or Wnt3a-CM. Data are the mean \pm SEM of n=6 low OA Ob and n=3 high OA Ob.

Figure 3: Modulation of β -catenin accumulation in normal and OA Ob. Confluent normal and OA Ob were preincubated with 5 nM PGE₂ or 10 μ M NS-398 for twenty four hours followed by an incubation with 20% L-CM or Wnt3a-CM for 4 hours. Cells were then lysed in RIPA buffer and prepared for Western blot analysis of β -catenin and phospho β -catenin using selective antibodies. **A)** Representative immunoblot analysis of β -catenin in normal, low and high OA Ob. Actin was revealed to assess similar loadings. The illustration is representative of at least 3 separate preparations of Ob. **B)** Results of immunoblots for β -catenin in normal Ob, low and high OA Ob are expressed as arbitrary scanning units and presented as the mean \pm SEM. **C)** Representative immunoblot analysis of phospho β -catenin in normal (n=2) and OA Ob (n=2).

Figure 4: Effect of siDKK2 and siTGF- β 1 inhibition on alkaline phosphatase activity and osteocalcin release by OA Ob. OA Ob were treated with a mixture of 4 siRNA for either DKK2 or TGF- β 1 or a scrambled RNA as described in Material and Methods. Cells were then used to determine alkaline phosphatase activity and osteocalcin release. **A)** DKK2 expression in response to siRNA. **B)** Results of alkaline phosphatase activity (left panel) and osteocalcin (right panel) in response to DKK2 siRNA treatments. **C)** TGF- β 1 expression in response to siRNA. **D)** Results of alkaline phosphatase activity (left panel) and osteocalcin (right panel) in response to TGF- β 1 siRNA treatments. Horizontal bars in Figure B and D represent the mean value for

normal Ob for alkaline phosphatase activity and osteocalcin release. Results are the mean \pm SEM of n=10-14 OA Ob preparations. E) Confluent Ob were treated at day 0 and at day 3 with or without a mixture of 4 siRNA for DKK2 or TGF- β 1, or a scrambled RNA. The cells were then lysed in RIPA buffer prior to separation using SDS-PAGE and Western blotting using specific antibodies to DKK2.

Figure 5: Relationship between TGF- β 1 and DKK2 expression in normal and OA

Ob. Confluent normal and OA Ob were treated with either 10 ng/ml TGF- β 1, a mixture of 4 siRNA for TGF- β 1 or DKK2, or a scrambled RNA as described in Material and Methods. A) DKK2 expression was determined in cells treated or not with siTGF- β 1; B) Normal and OA Ob were incubated with TGF- β 1 and DKK2 expression determined. C) TGF- β 1 expression was determined in cells treated or not with si DKK2. Results are the mean \pm SEM of n=4 normal Ob and n=8-12 OA Ob preparations.

Figure 6: Effect of DKK2 on BMP-2 induced alizarin red staining. A: DKK2

mRNA levels determined by qPCR under basal condition and following inhibition of DKK2 expression by shRNA as a function of time post-confluence. Values are the mean \pm SEM of n=4 OA Ob preparations. B. Top: Representative alizarin red staining of OA Ob treated or not with shRNA for DKK2; Bottom: quantification of ARS following BMP-2 treatment in OA Ob treated or not with shRNA for DKK2. Values are the mean \pm SEM of n=7 preparations. C) Expression of type 1 collagen α 1 and α 2 chains in n=4 OA Ob treated or not with siDKK2.

REFERENCES

1. Poole AR. Cartilage in health and disease. In: edited by Koopman WJ. Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology. 13th ,Williams & Wilkins, Baltimore, 1997; pp 255-308
2. Moskowitz RW. Bone remodeling in osteoarthritis: subchondral and osteophytic responses. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:323-324.
3. Hunter DJ, Hart D, Snieder H, Bettica P, Swaminathan R, Spector TD. Evidence of altered bone turnover, vitamin D and calcium regulation with knee osteoarthritis in female twins. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:1311-1316.
4. Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, McLane J, Bone A, Destefano J, Rodan GA, Duong le T. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum* 2004;50:1193-1206.
5. Li B, Aspden RM. Composition and mechanical properties of cancellous bone from the femoral head of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *J Bone Miner Res* 1997; 12:641-651.
6. Li B, Aspden RM. Mechanical and material properties of the subchondral bone plate from the femoral head of patients with osteoarthritis or osteoporosis. *Ann Rheum Dis* 1997;56:247-254.
7. Mansell JP, Bailey AJ. Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J Clin Invest* 1998;101:1596-1603.
8. Mansell JP, Tarlton JF, Bailey AJ. Biochemical evidence for altered subchondral bone collagen metabolism in osteoarthritis of the hip. *Br J Rheumatol* 1997; 36:16-19.
9. Couchourel D, Aubry I, Delalandre A, Lavigne M, Martel-Pelletier J, Pelletier J-P, Lajeunesse D. Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is due to abnormal collagen type 1 production. *Arthritis Rheum* 2009; 60:1438-1450.
10. Massicotte F, Aubry I, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fernandes J, Lajeunesse D. Abnormal insulin-like growth factor 1 signaling in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Arthritis Res Ther* 2006; 8:R177.
11. Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P, Lajeunesse D. Osteoblast-like

cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype *in vitro*: Possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis Rheum* 1998; 41:891-899.

12. Paredes Y, Massicotte F, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S, Lajeunesse D. Study of role of leukotriene B4 in abnormal function of human subchondral osteoarthritic osteoblasts. Effects of cyclooxygenase and/or 5-lipoxygenase inhibition. *Arthritis Rheum* 2002;46:1804-1812.
13. Massicotte F, Lajeunesse D, Benderdour M, Pelletier J-P, Hilal G, Duval N, Martel-Pelletier J. Can altered production of interleukin 1 β , interleukin-6, transforming growth factor- β and prostaglandin E2 by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10: 491-500.
14. Grynblas MD, Alpert B, Katz I, Lieberman I, Pritzker KPH. Subchondral bone in osteoarthritis. *Calcif Tissue Int* 1991;49:20-26.
15. Buckland-Wright JC, Lynch JA, Macfarlane DG. Fractal signature analysis measures cancellous bone organisation in macroradiographs of patients with knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1996;55:749-755.
16. Buckland-Wright C. Subchondral bone changes in hand and knee osteoarthritis detected by radiography. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12 Suppl A:S10-19.
17. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 2004;5:691-701.
18. Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* 2006;25:7469-7481.
19. Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* 2006;281:22429-22433.
20. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003;423:448-452.
21. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006;127: 469-480.
22. Hartmann C. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol.* 2006;16:151-158. Epub 2006 Feb 7.

23. Brunner E, Peter O, Schweizer L, Basler K. Pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in *Drosophila*. *Nature* 1997;385:829-833.
24. van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J, Ypma A, Hursh D, Jones T, Bejsovec A, Peifer M, Mortin M, Clevers H. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* 1997;88:789-799.
25. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M, Scheinecker C, van der Heide D, Landewe R, Lacey D, Richards WG, Schett G. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 2007;13:156-163.
26. Morvan F, Boulukos K, Clement-Lacroix P, Roman Roman S, Suc-Royer I, Vayssiere B, Ammann P, Martin P, Pinho S, Pognonec P, Mollat P, Niehrs C, Baron R, Rawadi G. Deletion of a single allele of the *Dkk1* gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res* 2006;21:934-945.
27. Li X, Liu P, Liu W, Maye P, Zhang J, Zhang Y, Hurley M, Guo C, Boskey A, Sun L, Harris SE, Rowe DW, Ke HZ, Wu D. *Dkk2* has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. *Nat Genet* 2005;37:945-952.
28. Hilal G, Massicotte F, Martel-Pelletier J, Fernandes JC, Pelletier JP, Lajeunesse D. Endogenous prostaglandin E2 and insulin-like growth factor 1 can modulate the levels of parathyroid hormone receptor in human osteoarthritic osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2001;16:713-721.
29. Altman RD, Asch E, Bloch DA, Bole G, Borenstein D, Brandt KD, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, Howell DS, Kaplan D, Koopman W, Longley SI, Mankin HJ, McShane DJ, Medsger TAJr, Meehan R, Mikkelsen W, Moskowitz RW, Murphy W, Rothschild B, Segal L, Sokoloff L, Wolfe F. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 1986;29:1039-1049.
30. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* 1985;150:76-85.
31. Mutabaruka MS, Aoulad Aissa M, Delalandre A, Lavigne M, Lajeunesse D. Local leptin production in osteoarthritis subchondral osteoblasts may be responsible for their abnormal phenotypic expression. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R20.

32. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* 2004;329:77-84.
33. Research Services Branch (RSB) Public domain NIH Image program (developed at the U.S. National Institutes of Health). <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>
34. Olivares-Navarrete R, Hyzy S, Wieland M, Boyan BD, Schwartz Z. The roles of Wnt signaling modulators Dickkopf-1 (Dkk1) and Dickkopf-2 (Dkk2) and cell maturation state in osteogenesis on microstructured titanium surfaces. *Biomaterials* 2010;31:2015-2024.
35. van der Horst G, van der Werf SM, Farih-Sips H, van Bezooijen RL, Lowik CW, Karperien M. Downregulation of Wnt signaling by increased expression of Dickkopf-1 and -2 is a prerequisite for late-stage osteoblast differentiation of KS483 cells. *J Bone Miner Res* 2005;20:1867-1877.
36. Li J, Sarosi I, Cattley RC, Pretorius J, Asuncion F, Grisanti M, Morony S, Adamu S, Geng Z, Qiu W, Kostenuik P, Lacey DL, Simonet WS, Bolon B, Qian X, Shalhoub V, Ominsky MS, Zhu Ke H, Li X, Richards WG. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone* 2006;39:754-766.
37. Castellone MD, Teramoto H, Williams BO, Druey KM, Gutkind JS. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science* 2005;310:1504-1510.
38. Dihlmann S, Klein S, Doeberitz Mv MK. Reduction of beta-catenin/T-cell transcription factor signaling by aspirin and indomethacin is caused by an increased stabilization of phosphorylated beta-catenin. *Mol Cancer Ther* 2003;2:509-516.
39. Fujita K, Janz S. Attenuation of WNT signaling by DKK-1 and -2 regulates BMP2-induced osteoblast differentiation and expression of OPG, RANKL and M-CSF. *Mol Cancer* 2007;6:71.
40. Kwan Tat S, Pelletier JP, Lajeunesse D, Fahmi H, Lavigne M, Martel-Pelletier J. The differential expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts is an indicator of the metabolic state of these disease cells. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26:295-304.

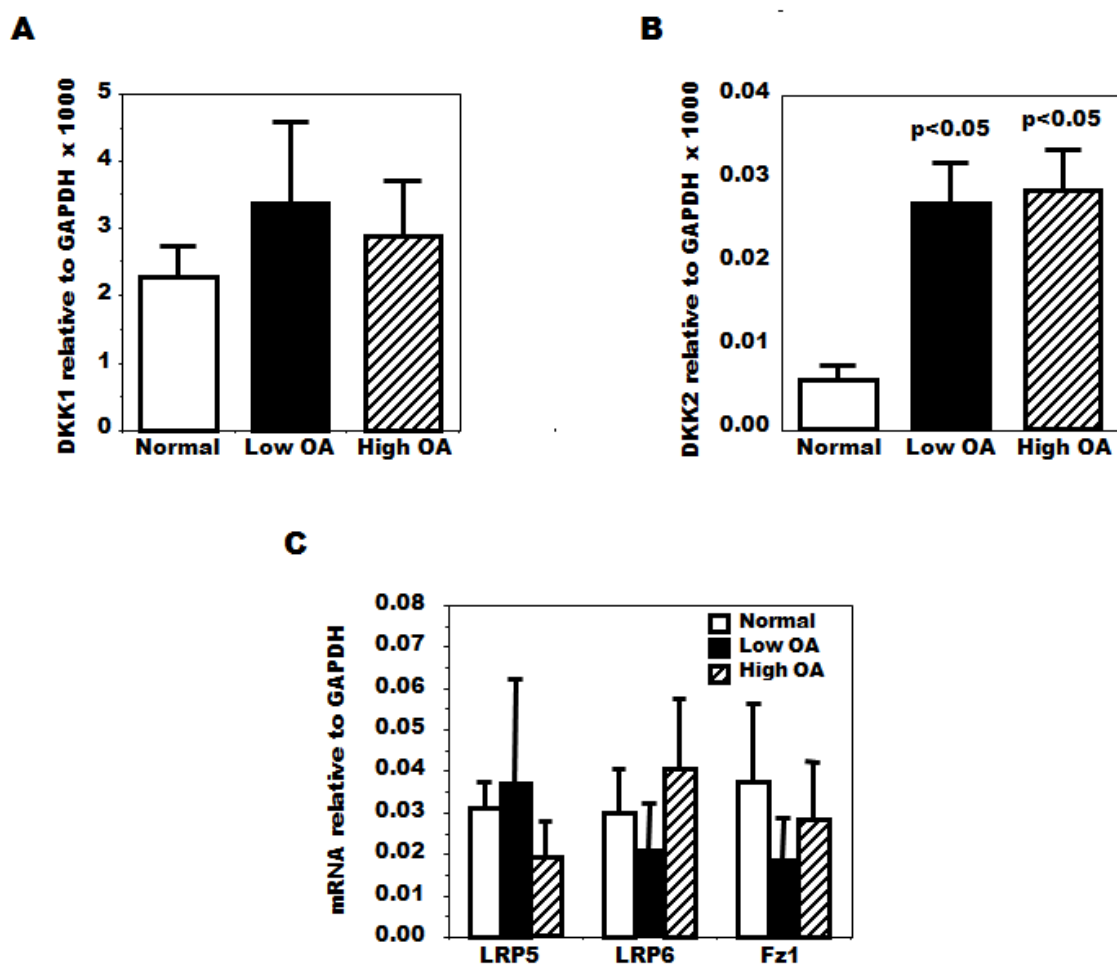


Figure 1.

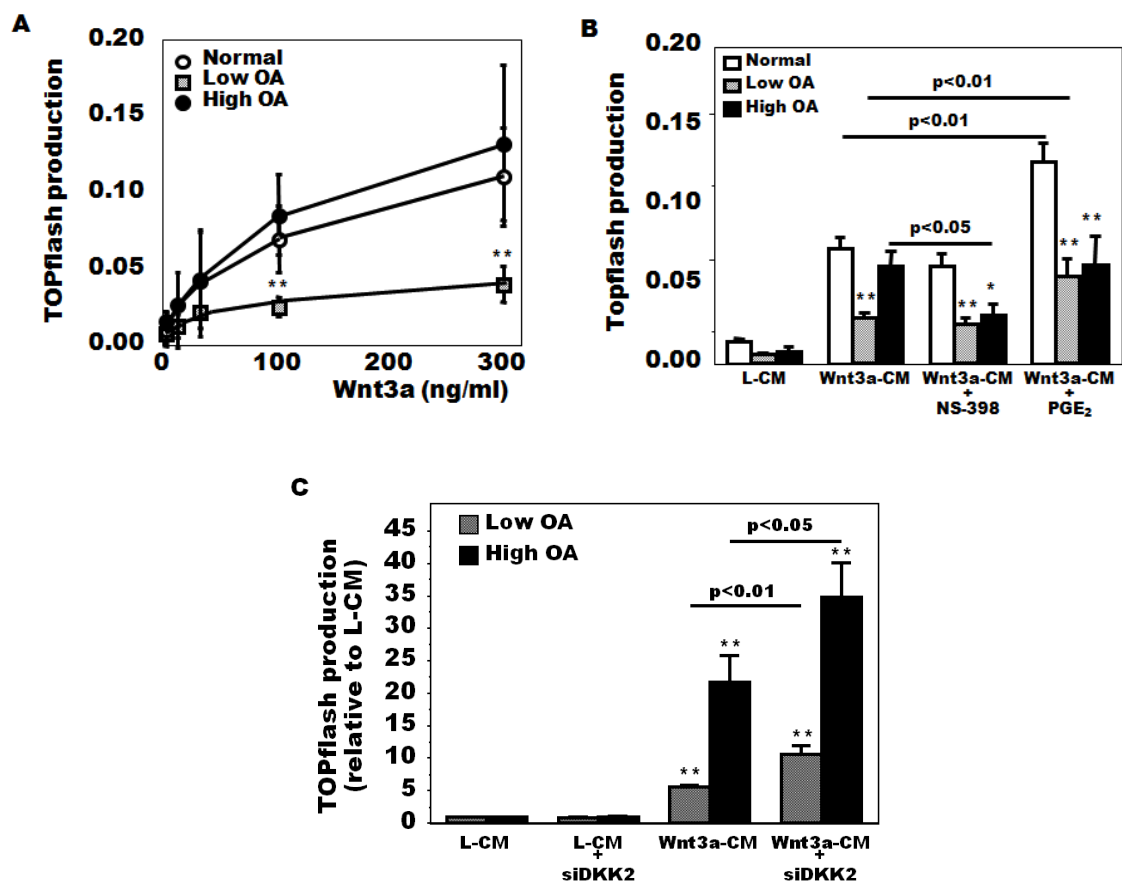


Figure 2.

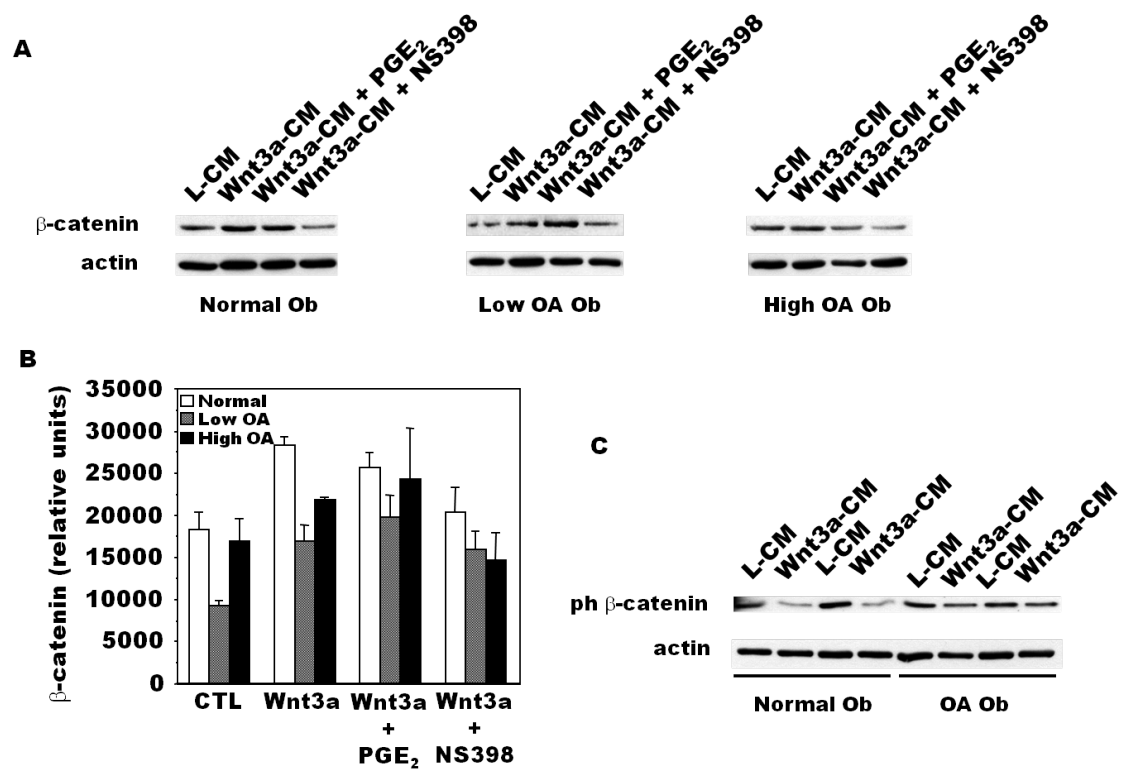


Figure 3.

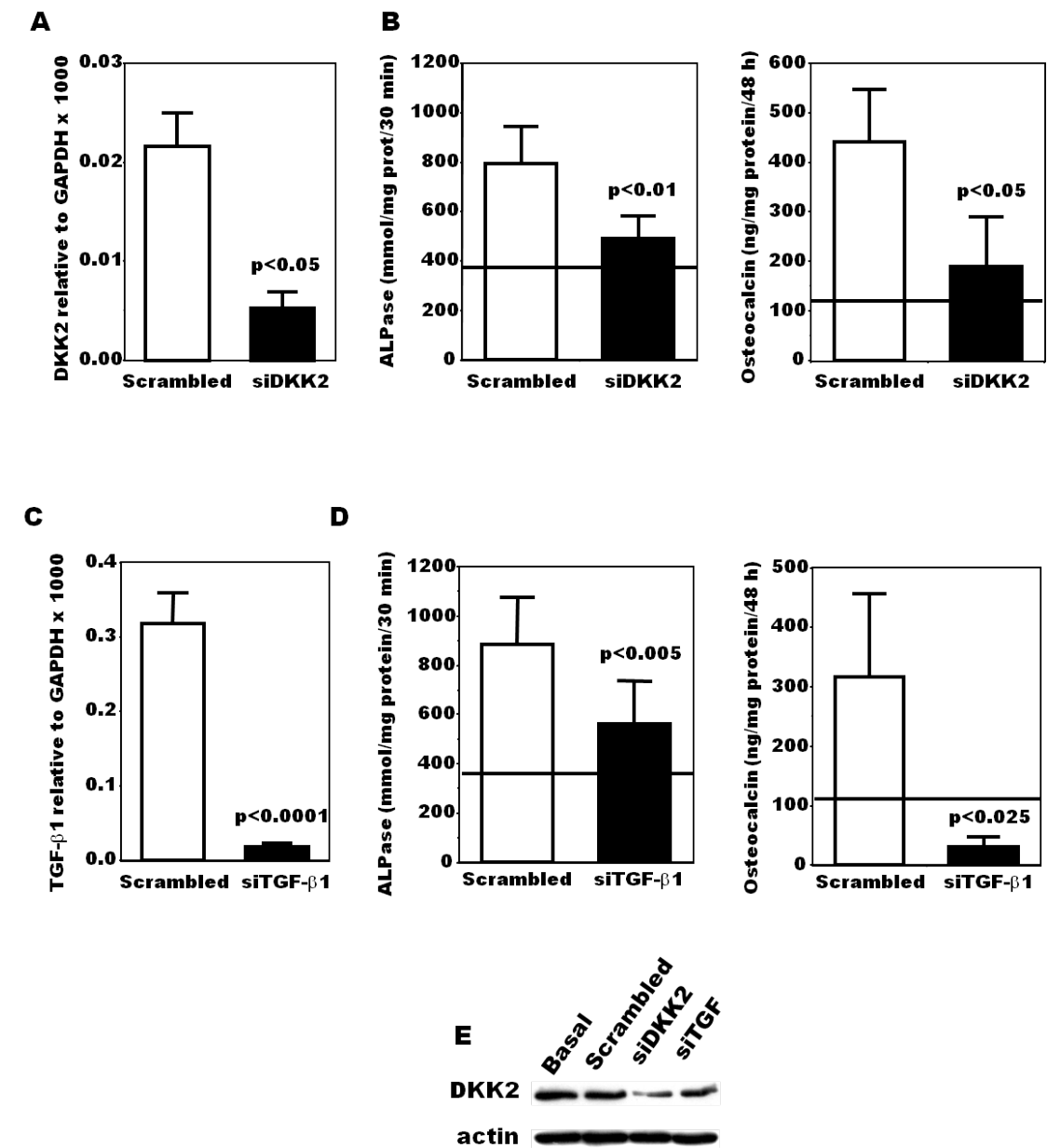


Figure 4.

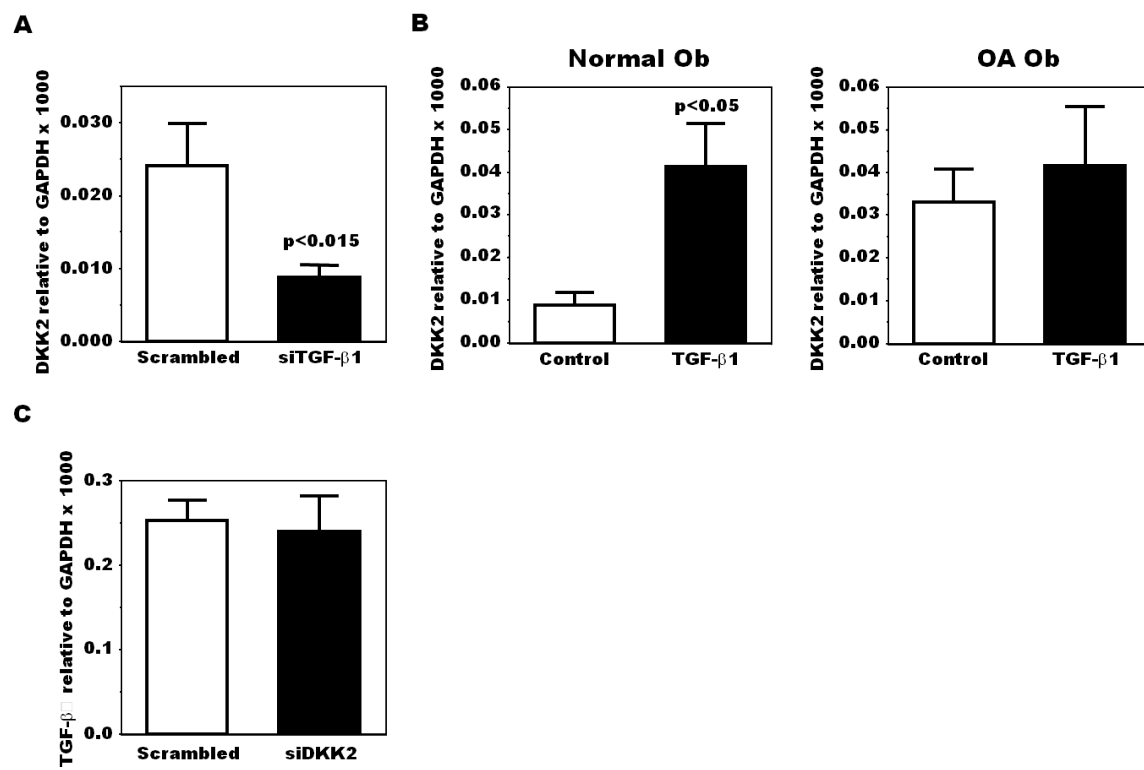


Figure 5.

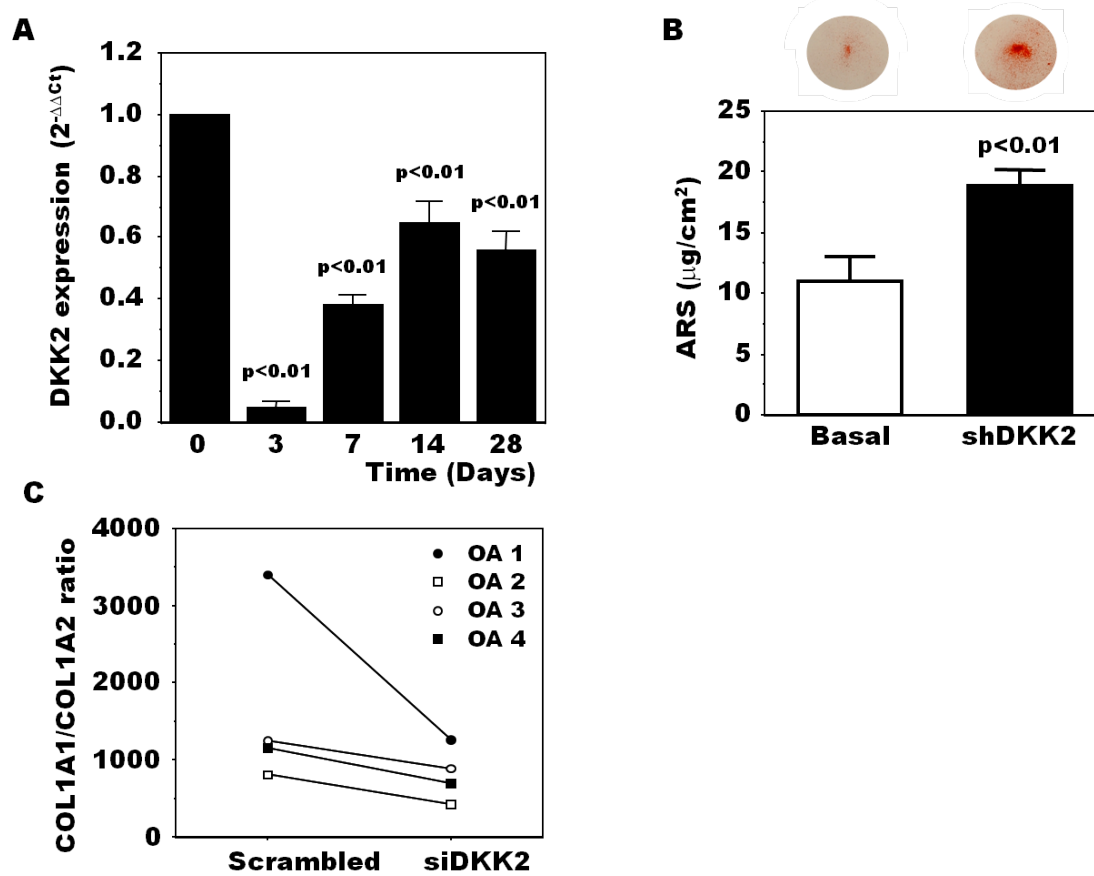


Figure 6.

CHAPITRE 3

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Patients OA et paramètres cliniques

Tout le matériel humain a été acquis suivant un accord signé à des fins de recherche par des patients subissant une chirurgie au genou ou alors par des proches, pour les spécimens collectés en salle d'autopsie. Tout cela a été réalisé avec le consentement des patients, l'approbation du comité d'éthique du CHUM et en suivant les directives du comité d'éthique du CHUM. L'os sous-chondral du plateau tibial des patients OA qui ont subi une chirurgie pour un remplacement intégral du genou, a été disséqué dans des conditions stériles. Les patients OA ont été diagnostiqués selon les critères cliniques de l'ACR (Collège Américain de Rhumatologie). Aucun des patients n'a reçu de médication ayant pu interférer avec le métabolisme des os, incluant les corticostéroïdes, pour une période de 6 mois avant l'intervention chirurgicale. Les spécimens d'os sous-chondral des patients normaux ont été récoltés à l'autopsie dans les 12 heures suivant la mort. Les spécimens normaux proviennent de patients n'ayant reçu aucune médication pouvant interférer avec le métabolisme osseux ou n'ayant pas souffert de maladie métabolique osseuse. Les individus démontrant une détérioration du cartilage n'ont pas été inclus dans le groupe des patients normaux. Voir la section *Patients and clinical parameters* du manuscrit pour les détails concernant le nombre, le sexe et l'âge des patients.

Préparation des cultures primaires d'ostéoblastes (Ob) humains

Suite à la réception des coupes de plateaux tibiaux, le cartilage articulaire est enlevé à l'aide d'une scie à dissection et d'un scalpel. À l'aide de cette même scie une lamelle rectangulaire d'os sous-chondral cortical est prélevée. Notons que l'ensemble de cette procédure se fait dans des conditions stériles. Cette lamelle d'os sous-chondral est ensuite découpée en petits morceaux puis digérée avec du milieu BGJ_b (Gibco) sans sérum contenant de la collagénase type I (1.25mg/ml) (Sigma, St. Louis, MO), de la trypsine (5mg/ml) (Sigma, St-Louis, MO) et de l'EDTA, pendant un total de 4 heures à 37°C sous agitation avec 3 changements du même milieu. Ensuite, ces morceaux d'os digérés sont mis en culture dans des flacons F75 (75 cm²) stériles supplémenté avec du milieu DMEM/HAM-F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma-Aldrich,

Oakville, Ontario, Canada) avec 20% de FBS (Sérum Fœtal de Bovin) (Wisent, St.Bruno, Québec, Canada) pour une période d'une à 2 semaines. Le milieu est ensuite remplacé par du DMEM/HAM-F12 supplémenté par 10% de FBS jusqu'à obtention de la confluence totale des cellules soit pour une durée variable de 3 à 4 semaines. Notons que le milieu est changé à tous les 2 jours et que les cellules sont placées dans un incubateur à 37°C et avec un taux de CO₂ constant de 5%. Suite à l'atteinte de leur confluence, les cellules ont été trypsinisées et ensemencées à raison de 25000 cellules/cm² dans des pétris de différentes tailles selon le nombre de cellules nécessaire pour les expériences. Du milieu DMEM/HAM-F12 contenant 10% de FBS est ajouté à chacun de ces pétris. Lorsqu'arrivées à confluence, après environ 5 jours, les cellules sont supplémentées avec du milieu BGJb (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) contenant 10% de FBS, 50 µg/ml de β-glycérophosphate et 5 µg/ml d'acide ascorbique, ce milieu est le milieu de différenciation des ostéoblastes. Notons que ce jour de changement de milieu représentera le temps zéro (T₀) pour les expérimentations. Il est important de noter que le β-glycérophosphate contenu dans le milieu est la source d'ions PO₄²⁻ indispensables pour la minéralisation des cellules. Les cellules sont ainsi placées dans l'incubateur. La récolte des ARN s'est faite avec 1mL de TRIzol (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) par pétri de 35mm de diamètre. Pour la caractérisation phénotypique, les protéines produites par les cellules sont quant à elles lysées et solubilisées dans du tampon Alpase (100 mM glycine, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, 1% Triton X-100, pH 10.5). Les milieux recueillis sont conservés à -80 °C.

Caractérisation phénotypique des cultures primaires d'Ob humains

Suite à l'atteinte de leur confluence, pour chaque cas (culture cellulaire provenant d'un patient), les cellules ont été ensemencées dans des puits de 2 cm² de diamètre et que tous les traitements sont exécutés en duplicata pour chaque condition testée. Une partie des cellules a reçu un milieu DMEM/F12 contenant 1% d'ITS (Insulin Transferrin Selenium) (Sigma-Aldrich) et l'autre partie a reçu un milieu contenant de la 1,25(OH)₂D₃ 50nM diluée dans du DMEM/F12, 2% FBS préalablement passé au charcoai, pour 48 heures. Notons que le passage du FBS au charcoai permet d'éliminer

les stéroïdes présents initialement dans le sérum, de cette manière la concentration de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ restera constante pour tous les échantillons. Les surnageants recueillis sont conservés à -80°C et seront utilisés pour le dosage de PGE_2 pour les échantillons dont les cellules ont été traitées à l'ITS. Les cellules ayant reçues le traitement à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vont servir à la mesure de l'activité de la phosphatase alcaline (extraits cellulaires) et pour le dosage d'ostéocalcine (surnageants). L'activité de la phosphatase alcaline a été mesurée en détectant l'hydrolyse du p-nitrophenyl phosphate (concentration finale de $12,5\text{mM}$) en p-nitrophenol pendant 30min à 37°C . La production d'ostéocalcine a été déterminée en utilisant le kit EIA (Biomedical Technologies, Inc, Stoughton, MA, USA). Celle de PGE_2 a été mesurée avec le kit ELISA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Plus de détails au sujet de ces méthodes sont indiqués par Qin Shi et al¹⁸¹.

Préparation du milieu conditionné Wnt3a

Le milieu conditionné Wnt3a (Wnt3a-CM) a été produit à partir d'une lignée cellulaire fibroblastique murine transfectée avec un vecteur exprimant Wnt3a (CRL-2647) et un milieu conditionné control (L-CM) a également été produit à partir de ces mêmes cellules mais possédant un vecteur d'expression vide (CRL-2648). Ces lignées cellulaires ont été obtenues du fabricant *American Culture Type Collection* (Cedarlane Laboratories Ltd, Burlington, Ontario). Ces cellules ont été mise en culture dans un T75 avec du milieu BGJb contenant 10% de FBS durant environ 4 jours soit jusqu'à leur confluence. Ces cellules ont ensuite été trypsinisées et réparties également dans dix T75 contenant du milieu BGJb 10% FBS. Après environ 3 jours, soit à l'atteinte de leur confluence, le milieu surnageant contenant le Wnt3a ou des cellules avec vecteur vide a été récupéré et mis de côté (milieu #1). Du nouveau milieu BGJb 10% FBS a été ajouté à ces mêmes cellules durant 3 jours après lesquelles ce milieu a été récolté (milieu #2). Les milieux #1 et #2 ont par la suite été mélangés avec un ratio de 1 pour 1 pour donner Wnt3a-CM ou L-CM. Ces milieux ont été aliquotés et congelés à -80°C avant d'être utilisés. Différentes dilutions de ce milieu conditionné ont été utilisées.

Préparation des ADN complémentaires (ADNc)

Les ARN nécessaire pour l'obtention d'ADNc ont été extrait avec du TRIzol (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada). Pour ce faire, 200 μ L de chloroforme, 500 μ L d'isopropanol (par cas donc par mL de TRIzol) ainsi que des centrifugations permettent d'isoler le matériel génétique des autres composants cellulaires. Le culot obtenu et à l'ajout d'isopropanol est isolé et lavé avec de l'éthanol 75%. Après centrifugation le culot contenant les ARN est traité avec le kit RNA-free DNase (Ambion, Austin, TX) afin d'éliminer toutes traces d'ADN génomique présentes dans le culot. La quantification de l'ARN est réalisée à l'aide du kit de dosage ARN RiboGreen (Molecular Probes, Eugene, OR). Cette quantification nous permettra d'avoir le volume nécessaire pour faire la RT-PCR (Reverse Transcriptase) soit pour avoir 1 μ g d'ARN. Ce volume est complété avec de l'eau stérile pour un volume total de 50 μ L. Puis le mélange de RT-PCR (reverse transcriptase PCR) est ajouté : tampon PCR (1X), MgCl₂ (5mM), dNTP mix (1mM A, T, G et C), hexamères aléatoires (2.5 μ M), inhibiteur ARNase (0.4u/ μ l) et la Reverse Transcriptase (2.5u/ μ l) pour avoir un volume réactionnel final de 100 μ l. La transformation des ARN en ADNc par RT-PCR s'est faite en 3 étapes : incubation des hexamères durant 10min à la température pièce, la transcription inverse pendant 15min à 42 °C et finalement l'inactivation de la transcription inverse durant 5min à 95°C.

PCR quantitative à temps réel (qRT-PCR)

Les ADNc des cas OA et normaux provenant de la réaction de RT-PCR (obtenus comme décrit précédemment) sont dilués (1/2) dans de l'eau stérile. Chaque tube réactionnel de PCR contient un volume total de 25 μ L dont 50ng d'échantillon dilué dans de l'eau stérile et 15 μ L de mélange mastermix (QuantitectTM SYBR[®] Green PCR Kit, Qiagen, Hilden, Allemagne). Le mélange total comporte le mélange de polymérase (2X), de l'Uracile-N-Glycosylase (UNG, Invitrogen, Burlington, ON, Canada) (1U/ μ L), les amorces spécifiques sens et anti-sens (200nM) ainsi que de l'eau stérile. Les tubes

contenant le mélange subissent alors 40 cycles thermiques. Chaque cycle est composé de 4 phases : dénaturation des brins à 95°C durant 15sec, fixation des amorces à 60°C durant 45sec, polymérisation des brins à 72°C durant 45sec et acquisition des données à 77°C durant 15sec. L'appareil de PCR à temps réel utilisé est le Rotor-Gene 3000 series V.6 (Corbett Research, Australia). Notons que cet appareil permet de détecter en temps réel les produits d'amplification des ADNc grâce à la détection et la quantification de fluorescence émise lors de l'étape de dénaturation. Notons également que toutes les mesures sont faites en duplicata. Les séquences des amorces pour les gènes GAPDH, Wnt3a, DKK1, DKK2, Fz1, LRP5, LRP6 et TGF- β 1 sont décrites dans le manuscrit et voici celles de Wnt7b :

S: TCAACGAGTGCCAGTACCAG

AS: CCCTCGGCTTGGTTGTAGTA

Évaluation de la minéralisation

Voir le manuscrit pour les détails concernant la culture des cellules précédant l'évaluation de leur minéralisation. L'utilisation de la coloration au rouge alizarine permet d'observer la minéralisation des ostéoblastes. Le colorant se fixe sur les dépôts cristallins de phosphates de calcium présents dans la matrice extracellulaire des ostéoblastes. Tout d'abord le milieu de culture est aspiré, puis les des boîtes de culture 35 mm sont lavées au PBS (Phosphate-Buffered Saline pH 7,4). Elles sont ensuite fixées dans du formaldéhyde 10% à température ambiante durant 15min puis lavées une fois avec de l'eau. 1mL de rouge alizarine 40mM à pH 4,1 est ensuite ajouté à chaque boîte de pétri, la fixation dure 20min à température ambiante. Le rouge non fixé est aspiré et les boîtes de pétri sont lavées doucement une fois avec de l'eau. Une fois les boîtes de pétri séchées, une photo est prise et on peut donc procéder à la quantification du marquage. Cette dernière consiste à dissoudre les pigments rouges dans une solution et à les doser avec des solutions de concentrations connues de rouge alizarine. Cette méthode est inspirée de celle de Gregory CA et al¹⁸². Premièrement 800 μ L d'acide acétique 10% sont ajoutés à chaque boîte de pétri qui est ensuite agitée pendant 30min. Le contenu des boîtes est ensuite placé dans des eppendorfs pour être chauffé 10min à 85°C. Les

ependorfs sont ensuite transférés sur glace 5min, centrifugés 15min à 20000g. Les surnageants contenant la coloration dissoute sont prélevés. À ces derniers on ajoute de l'hydroxyde d'ammonium 10% de manière à neutraliser l'acide. La lecture au spectrophotomètre se fait à 550nm en duplicata. On peut ainsi quantifier la coloration avec une courbe standard réalisée avec des solutions contenant différentes concentrations connues de rouge alizarine.

Transfection et inhibition par siRNA de l'expression de TGF β 1 et de DKK2 dans les Ob OA

Des siRNA (small interfering RNA) ont été utilisés pour inhiber l'expression de TGF β 1 et de DKK2. Ces siRNA provenant de Dharmacon (Lafayette, CO) sont composés d'un mélange de 4 séquences différentes visant l'inhibition du même gène pour siDKK2 et siTGF- β 1 et un siCONTROL a également été utilisé comme control. Étant donné que la transfection de ces siRNA engendre une mortalité cellulaire, suite à la trypsinisation des cellules, ces dernières ont étéensemencées à 50000 cellules par cm² soit au double de la densité habituelle. Un mélange de transfection composé de siRNA, d'un agent de transfection et de BGJb sans sérum et sans antibiotique à préalablement été préparé et incubé à la température pièce pendant 15min avant la transfection pour la formation de complexes entre l'agent de transfection et les siRNA. L'agent de transfection utilisé est le HiPerFect qui provient de Qiagen (Hilden, Allemagne). Une concentration finale de 100nM de siRNA a été utilisée pour la transfection. Cette transfection a été réalisée au jour 0 et au jour 3 suivant la transfection pour l'expérience de la caractérisation phénotypique et uniquement au jour 0 pour l'expérience TOPflash.

Western-blot

Les lysats cellulaires contenant les protéines ont été chargés dans un gel de polyacrylamide et séparé par SDS-PAGE. Les protéines vont donc migrer uniquement en fonction de leur poids moléculaire. Les volumes de chargement des lysats cellulaires ont été ajustés pour avoir la même quantité de protéines dans chaque puits. Suite à la

migration, les protéines ont été transférées par électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). La membrane contenant les protéines a été bloquée avec du Twin TBS (TTBS) 1X (Cedarline laboratories limited, Hornby, ON, Canada) 5% lait pendant un minimum de 12 heures. Suite au blocage, l'anticorps primaire dilué dans du TTBS 1% lait est incubé au contact de la membrane pendant au moins 12 heures à 4°C. La membrane est ensuite lavée 3 fois 5min et une fois 15min au TTBS 1X. L'anticorps secondaire dilué dans du TTBS 1% lait est ajouté durant 2 heures. La membrane est ensuite révélée avec le substrat SuperSignal[®] West Dura Extended Duration Substrate (Pierce, USA) pendant 5min. Elle est ensuite scellée et développée. Les concentrations des anticorps utilisées sont indiquées dans le manuscrit.

Expérience TOPflash pour l'étude la signalisation canonique Wnt

Le vecteur TOPflash a été obtenu de Upstate (Upstate Biotechnology). Il s'agit d'un vecteur contenant plusieurs sites LEF/TCF sur lesquels la β -caténine peut indirectement se lier et ainsi induire la transcription de la luciférase dont le gène est contenu dans le vecteur. Le vecteur Rénilla pRL-SV40 a été obtenu de Promega (Madison, WI, USA), et ce vecteur est co-transfecté avec le vecteur TOPflash. Il sert à normaliser l'activité TOPflash luciférase. La transfection du vecteur TOPflash et du vecteur rapporteur Rénilla entraîne une grande mortalité cellulaire. Les cellules ont donc étéensemencées à une densité de 75 000 cellules par cm^2 . La transfection se fait le lendemain. Le jour de la transfection, les cellules ont été incubées 1 heure à 37°C avec un milieu sans sérum et sans antibiotique pour une transfection efficace. Un mélange constitué du vecteur TOPflash, du vecteur rapporteur Rénilla, d'un agent de transfection et de milieu sans sérum et sans antibiotique a préalablement été préparé et incubé à la température pièce pendant 20min avant la transfection pour la formation de complexes entre l'agent de transfection et les vecteurs. L'agent de transfection utilisé est la Transfectine (BioRad) qui s'est montré être efficace. La concentration finale du vecteur TOPflash été de 500ng/mL et celle du vecteur Rénilla de 8,3ng/mL. La transfection dure 6 heures après lesquelles le milieu contenant le mélange de transfection et remplacé

par du BGJb 10% FBS durant 24 heures afin de laisser les cellules récupérer de la transfection. Les cellules ont par la suite été stimulées avec du Wnt3a-CM ou avec le milieu control L-CM également durant 24 heures. Suite à cela, l'activité de la signalisation Wnt a pu être évaluée à l'aide du kit de dual-luciférase reporter assay system (Proméga, Madison, WI, USA) selon les instructions du fabricant. L'activité TOPflash luciférase a été normalisée avec celle de Rénilla.

Transfection et inhibition à long terme par shRNA de DKK2

Les shRNA (*short hairpin RNA*) permettent une inhibition continue d'un gène spécifique suite à sa transfection dans les cellules. Le shDKK2 et son vecteur control ont été obtenus de ORIGENE (Origene Technologies Inc, Rockville, CA). La transfection s'est faite par électroporation des cellules à l'aide de la machine AMAXA et de son kit de transfection Cell line Nucleofector® Kit V (AMAXA Biosystems, Gaithersburg, MD) selon les directives du fabricant et adapté aux cultures primaires d'ostéoblastes. Suite à la trypsinisation des cellules, 1 million de cellules ont été placées dans une cuvette fournie par AMAXA spécialement conçue pour l'électroporation, à ces cellules 100µL de la solution de transfection *Nucleofactor Solution V* et 2 µg de shRNA ont été ajoutés. Le programme D-24 de la machine AMAXA conçue pour les cultures cellulaires primaires a été utilisé pour l'électroporation. Suite à celle-ci, les cellules ont récupéré 15min dans du milieu BGJb sans sérum et sans antibiotique. Les cellules transfectées ont ensuite été réparties dans 4 pétris de 35mm de diamètre avec du milieu BGJb 10% FBS supplémenté avec 10 ng/mL BMP2. Le même milieu a été changé à tous les deux jours durant 28 jours pour l'étude de la minéralisation tel que décrit dans le manuscrit.

Analyse statistique

Voir manuscrit.

CHAPITRE 4

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

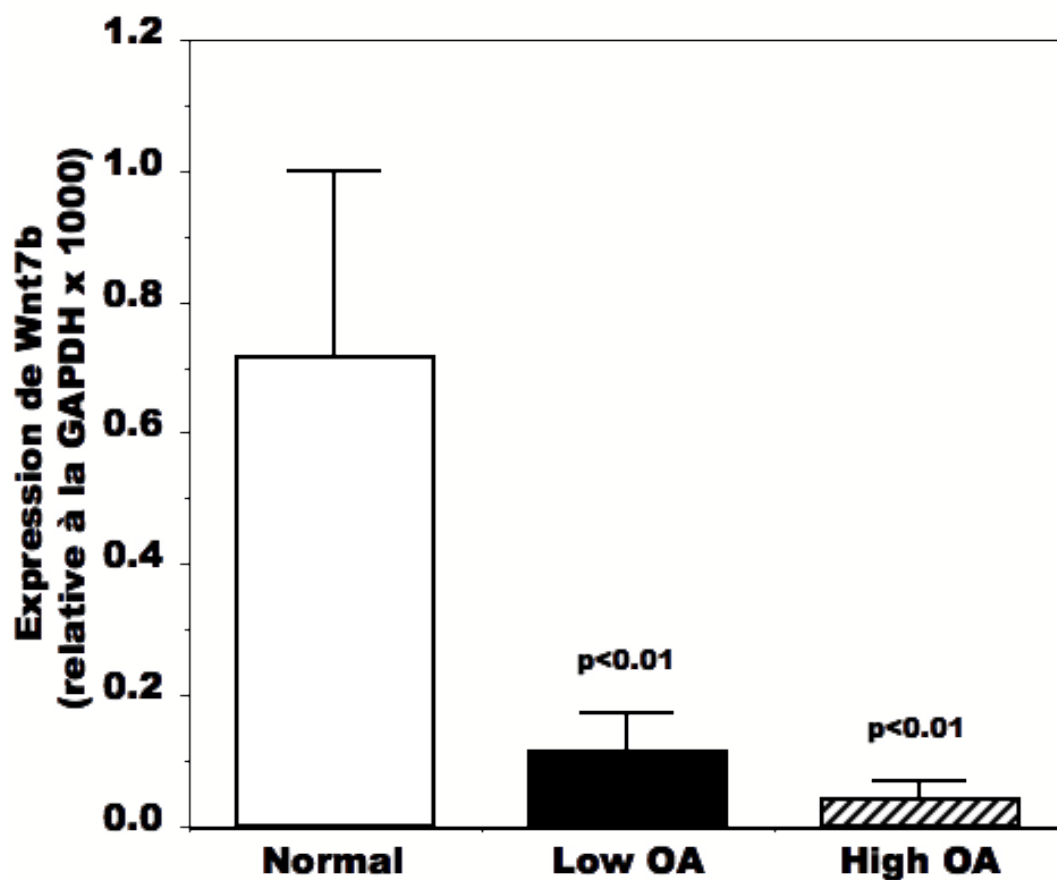


Figure S1. **Expression de Wnt7B dans les ostéoblastes normaux et OA.** Les ARN des ostéoblastes confluents ont été récoltés à l'aide du TRIZol et transcrits en ADNc comme décrit dans la section MATÉRIEL ET MÉTHODES. La valeur relative de l'expression de Wnt7b a été obtenue en faisant le ratio entre son expression relative et celle de la GAPDH. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de $n=4$ Ob normaux, $n=13$ *low* OA et $n=11$ *high* OA.

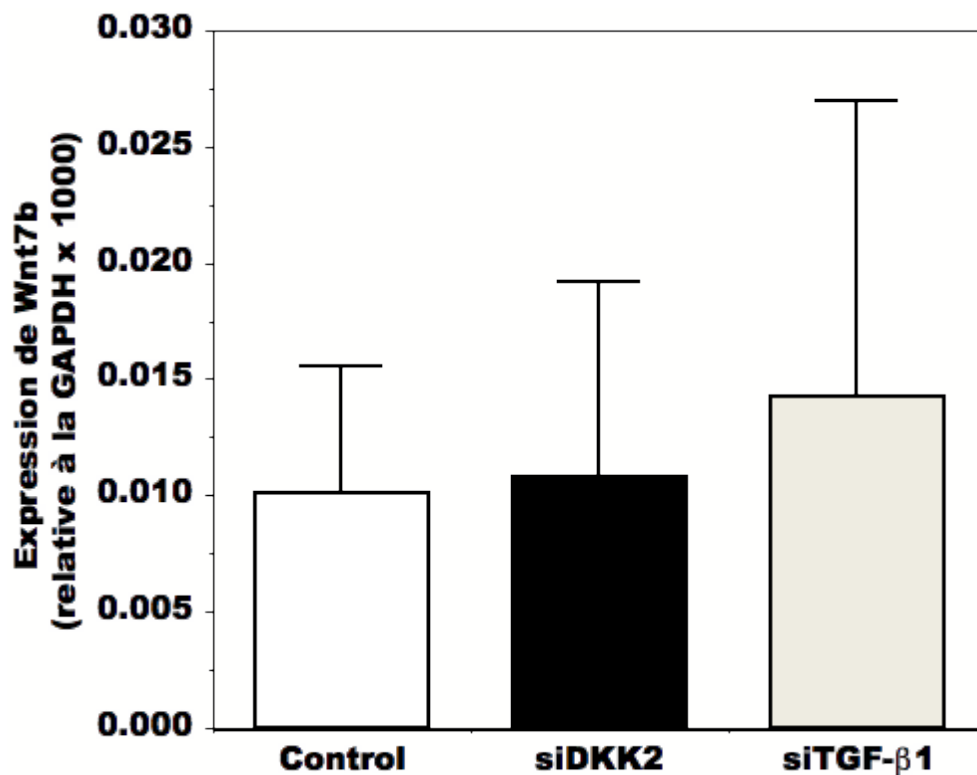


Figure S2. Effet de l'inhibition de DKK2 et de TGF- β 1 sur l'expression de Wnt7B dans les ostéoblastes OA. Les ostéoblastes ont été traitées par des siRNA dirigés respectivement contre rien (control), DKK2 et TGF- β 1, et les ARN des ostéoblastes confluents ont été récoltés à l'aide du TRIzol et transcrits en ADNc comme décrit dans la section MATÉRIEL ET MÉTHODES. La valeur relative de l'expression de Wnt7b a été obtenue en faisant le ratio entre son expression relative et celle de la GAPDH. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de n=4 Ob normaux et n=8-12 préparations d'Ob OA.

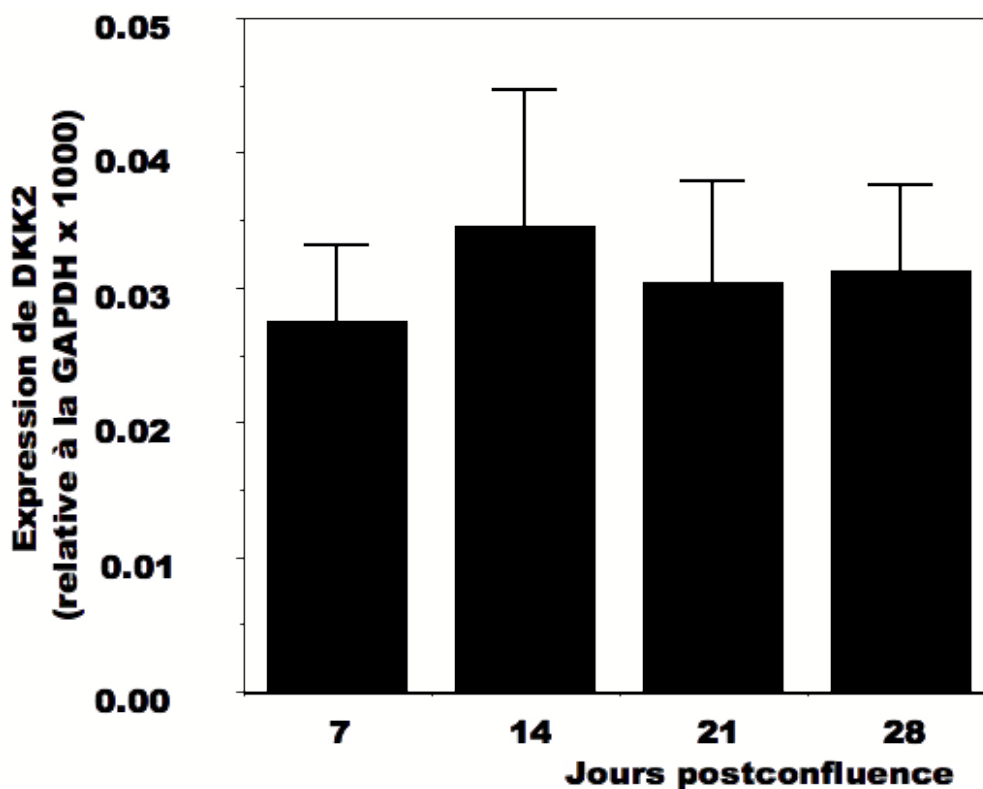


Figure S3. **Expression temporelle de DKK2 dans les ostéoblastes OA.** Les ARN des ostéoblastes confluent ont été récoltés à l'aide du TRIzol et transcrits en ADNc comme décrit dans la section MATÉRIEL ET MÉTHODES aux jours 7, 14, 21 et 28. La valeur relative de l'expression de DKK2 a été obtenue en faisant le ratio entre son expression relative et celle de la GAPDH. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de n=7-8 préparations d'Ob OA.

CHAPITRE 5

DISCUSSION

L'ostéoarthrose est une pathologie multifactorielle caractérisée principalement par une dégradation progressive du cartilage articulaire et une sclérose de l'os sous-chondral. Tous les tissus composants l'articulation pourraient être affectés¹⁹, cependant la majorité des études sur l'OA se sont concentrées sur le rôle du cartilage dans le développement de l'OA. Pourtant, le rôle de l'os dans l'OA s'avère être très important dans l'apparition et la progression de l'OA, notamment à cause des altérations de ses propriétés mécaniques¹³⁹. En effet, divers modèles animaux soulignent l'importance des altérations de l'os-sous-chondral en début d'OA^{141,143}. De plus, récemment, grâce aux avancés technologiques, des lésions de la moëlle osseuse ont été observées par imagerie par résonance magnétique (MRI) chez un grand nombre de patients OA et ces dernières étaient fortement corrélées avec la présence de douleur chez ces patients²⁶. Cela témoigne donc de l'importance d'étudier le tissu osseux et en particulier l'os sous-chondral dans l'OA.

Une altération dans le remodelage osseux est présente chez les patients OA comme le démontre l'altération des marqueurs de résorption et de formation osseuse au sein du liquide synovial et du sérum des patients OA¹⁴⁹. Cette altération serait en faveur de la résorption en début d'OA et de la formation en phase tardive de l'OA. Cela expliquerait notamment le développement de la sclérose osseuse observée et témoignerait donc d'une altération dans le métabolisme des cellules osseuses. Celle-ci a été démontrée au sein des ostéoblastes composant l'os sous-chondral sclérosé des patients OA autant *ex vivo*¹⁸³ qu'*in vitro*¹⁴⁵ par des cultures cellulaires primaires¹⁴⁵. Des altérations au niveau du phénotype des ostéoblastes ainsi qu'au niveau de leur minéralisation ont été observés^{85,145}. L'altération au niveau de la minéralisation des ostéoblastes concorderait avec l'hypominéralisation observée au sein du tissu osseux des patients OA¹⁸⁴. Ce problème de minéralisation supporterait également les observations macroscopiques obtenues par micro-CT démontrant un problème au niveau de la micro-structure des os des patients OA¹⁴⁸.

La voie de signalisation Wnt, à l'origine connue pour ses fonctions dans l'embryogenèse et dans le développement tumoral, a montré être grandement impliquée dans les phénomènes d'ostéogenèse ainsi que d'ostéoblastogenèse¹⁷⁴. De récentes

évidences ont montré qu'elle était aussi altérée dans les chondrocytes OA¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Dans cette présente étude, on démontre pour la première fois son altération dans les ostéoblastes OA ainsi que son rôle dans l'altération de leur phénotype et de leur minéralisation.

Les ligands Wnts peuvent activer la cellule par différentes voies signalétiques, de récentes études génétiques démontrent toutefois que la voie privilégiée dans l'os serait la voie canonique Wnt/ β -caténine^{160,185}. Cependant, il est important de préciser que les voies non-canoniques sont peu étudiées car pour la plupart, elles sont encore mal comprises. Ces voies pourraient donc se révéler d'une certaine importance.

Altération de la signalisation canonique Wnt dans les ostéoblastes OA

Il existe de nombreux agonistes et antagonistes de la signalisation canonique Wnt, pourtant c'est uniquement certains de ces derniers qui ont montré avoir de l'importance dans l'ostéogenèse et l'ostéoblastogenèse. Les modèles de souris KO ont permis de montrer que les antagonistes DKK1 et DKK2 et que l'agoniste Wnt7B étaient importants pour ces phénomènes^{172,173,186}. Précisons que cette étude n'a montrée aucune différence significative dans l'expression de DKK1 entre les ostéoblastes OA et normaux (Figure 1A). Cela n'est pas très surprenant étant donné qu'il s'agit d'un gène « *master regulator* », et que la souris délétée (KO) en *Dkk1* est non-viable¹⁷². Une altération importante dans l'expression de ce gène aurait sûrement mené à des altérations au niveau du tissu osseux plus marquées que celles observées chez les patients OA. Dans cette étude on a aussi montré que dans les ostéoblastes OA, DKK2 été surexprimé (Figure 1B) tandis que l'expression de Wnt7B est diminuée (Figure S1). Ce déséquilibre dans l'expression de ces 2 importants acteurs de la signalisation canonique Wnt favoriserait son inactivation. Ce n'est toutefois pas tout à fait ce qui a été observé dans tous les ostéoblastes OA malgré que l'ensemble des résultats indiquent une inhibition générale de la signalisation Wnt dans ces cellules.

Les principaux récepteur Fz1 et co-récepteurs LRP5/6 des ligands Wnt ne sembleraient pas être en cause dans l'altération de la signalisation canonique Wnt observée dans les ostéoblastes OA. Étant donné que les agonistes et les antagonistes de

la signalisation Wnt peuvent se lier à ces récepteurs, même une altération éventuelle dans l'expression d'un récepteur n'influencerait pas nécessairement l'activité de la signalisation canonique Wnt. Cette altération éventuelle de l'expression d'un de ces récepteurs aurait toutefois un impact potentiel sur les autres voies de signalisation Wnt puisqu'elle attirerait ou pas ces acteurs au détriment ou en faveur des autres voies. Dans cette étude aucune différence significative de ces récepteurs n'a été observée dans les ostéoblastes OA et normaux (Figure 1C).

Rôle des PGE₂ dans la signalisation canonique Wnt

Des études antérieures ont démontré la présence de 2 populations de patients OA qui pouvaient être discriminées par la production de PGE₂ de leurs ostéoblastes¹⁴⁷. Bien que dans les ostéoblastes *low* OA, présentant des niveaux similaires de PGE₂ que dans les ostéoblastes normaux, l'activité de la signalisation canonique Wnt soit diminuée, ce ne fût pas le cas dans les ostéoblastes *high* OA. Étonnement, dans les ostéoblastes *high* OA, donc sécrétant des niveaux élevés de PGE₂, l'activité de la signalisation canonique Wnt était comparable à celle des ostéoblastes normaux (Figure 2A). Les PGE₂ auraient donc un impact relativement important dans la cascade de signalisation canonique Wnt. En effet, un « *cross-talk* » entre la signalisation des PGE₂ et la signalisation Wnt a été montré dans une étude portant sur le cancer colorectal. Dans un modèle cellulaire de carcinome, les PGE₂, via leur récepteur EP₂, activent la signalisation canonique Wnt suite à la déstabilisation du complexe de dégradation de la β -caténine. Outre leur rôle important dans l'inflammation¹⁸⁷, les PGE₂ ont montré jouer un rôle dans le remodelage osseux, cependant, dépendamment du contexte cellulaire, ces derniers pourraient favoriser la résorption ou la formation osseuse. Notons également qu'il existe plusieurs récepteurs de PGE₂ et que l'activation de chacun de ces récepteurs peut mener à une réponse différente de la cellule^{188,189}. Ce rôle des PGE₂ dans le remodelage osseux pourrait être indirect et passer par l'activation de la signalisation canonique Wnt. Pour revenir à la présente étude, l'ajout de PGE₂ exogène a mené d'une part, à l'augmentation de l'activation de la signalisation canonique Wnt dans les ostéoblastes *low* OA et normaux contrairement aux ostéoblastes *high* OA pour lesquels cette addition n'a pas eu d'effet significatif (Figure 2B). D'autre part, l'inhibition de la production de PGE₂ par le

NS-398, un inhibiteur spécifique de COX-2, a montré une diminution de l'activité de la signalisation Wnt uniquement dans les ostéoblastes *high* OA (Figure 2B). Cela témoignerait donc de l'atteinte d'un certain plateau de stimulation au PGE₂ dans les ostéoblastes *high* OA et l'absence d'effet de l'inhibiteur NS-398 dans les ostéoblastes *low* OA et normaux pourrait être expliqué par leur niveau basal de PGE₂ déjà faible. Il est toutefois important de noter que le potentiel d'activation de la signalisation canonique dans les ostéoblastes normaux reste significativement plus élevé que dans les ostéoblastes *high* OA (Figure 2B). Vu du côté opposé, une augmentation des PGE₂ dans les ostéoblastes *high* OA n'aurait plus d'effet sur l'activation de la signalisation canonique Wnt. Dans les ostéoblastes *high* OA, les PGE₂ semblent avoir un effet positif en augmentant l'activité de la signalisation canonique Wnt à un niveau relativement normal. Cela pourrait donc remettre en question les effets bénéfiques des NSAID visant les COX-2 chez certains patients OA.

DKK2 et TGF-β1 sont responsables de l'altération du phénotype et de la minéralisation anormale des ostéoblastes OA et lien hiérarchique entre TGF-β1 et DKK2

Les ostéoblastes se différencient des autres types cellulaires par leur activité phosphatase alcaline ainsi que par leur production d'ostéocalcine. Il a précédemment été observé que les ostéoblastes OA avaient un phénotype altéré¹⁴⁵, leur activité phosphatase alcaline ainsi que leur production d'ostéocalcine s'avéraient être significativement plus élevées vis-à-vis des ostéoblastes normaux¹⁴⁵. Ces deux molécules joueraient un rôle relativement important dans le remodelage osseux et dans la minéralisation. Il a également été démontré que les ostéoblastes OA minéralisaient moins bien que les ostéoblastes normaux et que cela serait dû à une altération dans le ratio des chaînes α1/α2 du collagène de type I⁸⁵. Ce ratio, débalancé en faveur des chaînes α1, mènerait à la formation d'homotrimères de chaîne α1 modifiant ainsi certaines propriétés du tissu osseux. En effet, *in vitro*, une surexpression de la chaîne α1 a été observée dans les ostéoblastes OA alors que la chaîne α2 demeurerait similaire entre les ostéoblastes normaux et OA⁸⁵. Comme la minéralisation progressive des ostéoblastes suivait la

diminution du ratio d'expression des chaînes $\alpha 1/\alpha 2$ ⁸⁵, une altération de ce ratio pouvait expliquer, du moins en partie, une minéralisation anormale des ostéoblastes. Cette observation s'avère intéressante puisque la minéralisation autant *in vivo* qu'*in vitro*, a lieu en phase tardive de la différenciation des ostéoblastes. Or le fait que les ostéoblastes OA minéralisent moins bien *in vitro* pourrait révéler la présence d'une différenciation incomplète de ces ostéoblastes⁸⁵.

Bien que la signalisation canonique Wnt non-stimulée avec les PGE₂ soit relativement similaire entre les ostéoblastes *high* OA et normaux, le phénotype des ostéoblastes OA reste altéré dans tous les ostéoblastes OA. Il en est de même pour l'expression de DKK2 qui est élevée dans tous les ostéoblastes OA. Notre étude a montré que l'inhibition de DKK2 dans les ostéoblastes OA menait d'une part, à une diminution de l'activité phosphatase alcaline et de la production d'ostéocalcine à des niveaux proches de ceux des ostéoblastes normaux (Figure 4B), et d'autre part, lors d'une inhibition à long terme, à une augmentation de la minéralisation (Figure 6B). Ces résultats soulignent donc le rôle important de DKK2 dans la différenciation des ostéoblastes et en particulier dans sa phase terminale. Cela concorde avec les observations *in vivo*, chez la souris KO en *Dkk2* qui présente une baisse des marqueurs ostéogéniques¹⁷³. Dans le cas des ostéoblastes OA, DKK2 est surexprimé et les marqueurs sont également augmentés. En ce qui a trait à la minéralisation, les mêmes défauts semblent exister lorsque DKK2 est inhibé ou surexprimé. La souris KO en *Dkk2* présente beaucoup de matrice ostéoïde au sein de ses os, pourtant celle-ci se révèle peu minéralisée. Dans la présente étude, l'inhibition de DKK2 en utilisant la technique des shRNA dans les ostéoblastes OA améliore leur minéralisation.

Une altération de la signalisation Wnt dans les ostéoblastes OA pourrait donc mener à une altération du tissu osseux chez ces patients. De fait, les os des patients OA présentent des altérations dans leur structure osseuse^{148,190} et en particulier l'étude de Ding et al¹⁴⁸ a montré que l'os trabéculaire sous-chondral du plateau tibial de patients OA, bien que plus épais que celui des normaux, présentait des problèmes structuraux. Étonnement, ces problèmes au niveau de la microstructure osseuse sont également présents au niveau de la partie latérale du plateau où il n'y a que peu ou pas de

dégradation du cartilage. Ces problèmes structuraux seraient liés à une perte des fonctions mécaniques de l'os ou à un défaut métabolique qui mènerait à cette perte de fonction. Cela pourrait donc être expliqué par une phase de formation osseuse incomplète lors du remodelage osseux. En effet, la minéralisation de la matrice ostéoïde a lieu suite à sa déposition et non en même temps. L'idée d'un défaut métabolique non-seulement de l'os mais de l'ensemble des tissus musculo-squelettique de l'articulation a bien été exposé par Aspden²⁰. Il propose que dans l'OA, les différents tissus composants l'articulation présenteraient un phénotype apparenté à un stade de différenciation plus précoce. Au niveau osseux, cela aurait comme conséquence un remodelage osseux anormal pouvant ainsi résulter en une morphologie anormale du tissu osseux qui mènerait au développement de l'OA. Cela pourrait notamment expliquer le fait que les ostéoblastes OA ne parviennent pas à bien minéraliser et qu'ils seraient donc bloqués à un stade de différenciation « antérieure » ne leur permettant pas de minéraliser adéquatement. On reviendra sur le point de vue d'Aspden en conclusion.

Comme mentionné précédemment, le ratio anormal $\alpha1/\alpha2$ des chaînes de collagène de type I pourrait expliquer la minéralisation anormale des ostéoblastes OA. Or, dans une étude précédente⁸⁵, il a été démontré que TGF- $\beta1$, surexprimé dans les ostéoblastes OA, était en partie responsable de l'altération de ce ratio ainsi que de la sous-minéralisation observée dans les ostéoblastes OA. TGF- $\beta1$ est grandement présent dans les ostéoblastes comme le démontre son expression relative (Figure 4). Ce facteur de croissance possède un rôle important dans le remodelage osseux et il favoriserait entre autre la prolifération des ostéoblastes en début de différenciation. Dans notre étude, il a été montré que DKK2, aussi surexprimé dans les ostéoblastes OA, serait aussi responsable de la sous-minéralisation et de l'altération du ratio $\alpha1/\alpha2$ du collagène de type 1 dans les ostéoblastes OA. L'inhibition de TGF- $\beta1$ a également permis de corriger partiellement le phénotype altéré des ostéoblastes OA (Figure 4D). TGF- $\beta1$ semble toutefois affecter grandement la production d'ostéocalcine puisque son inhibition mène à une production d'ostéocalcine en deçà de ceux des ostéoblastes normaux. Cependant l'inhibition par siRNA de TGF- $\beta1$ était plus efficace que celle de DKK2 (Figure 4A et 4C). Ceci pourrait expliquer, en partie du moins, son efficacité plus grande

sur le phénotype si cet effet n'était dû qu'à l'inhibition de DKK2 par siTGF- β 1 mais il ne faut pas oublier que TGF- β 1 a des effets sur le phénotype osseux qui lui sont propres^{127,191}. Étant donné que TGF- β 1 et DKK2 sont tous les deux surexprimés dans les ostéoblastes OA et que leur inhibition entraîne des effets similaires sur le phénotype et la minéralisation des ostéoblastes OA, un lien hiérarchique entre ces deux molécules a pu être démontré (Figure 5). Cependant bien que l'on montre que TGF- β 1 agit en amont de DKK2 et contrôle son expression, on ne sait pas si cela se fait de manière directe ou indirecte. Il semblerait toutefois que ce lien se fasse indirectement au niveau du noyau en impliquant SMAD4 et la β -caténine¹⁷⁷.

Les « *cross-talk* » entre la signalisation Wnt/ β -caténine et les membres de la famille des TGF/BMP ont montré être très importants dans le noyau¹⁷⁷. Dans l'ostéoblastogenèse, BMP-2 semble agir en synergie avec la signalisation Wnt/ β -caténine pour médier la différenciation des ostéoblastes¹⁷⁶. En fin de différenciation des ostéoblastes, BMP-2 agit sur ces derniers sans impliquer la β -caténine et cela démontre donc qu'il peut aussi agir indépendamment selon le contexte cellulaire. Le TGF- β 1 active la cellule via les récepteurs serine/thréonine kinases de type I et II. L'activation de ces récepteurs va mener à la phosphorylation des SMAD2/3 qui vont se lier et activer le co-SMAD4 pour ainsi pénétrer dans le noyau et réguler la transcription de gènes spécifiques. Dans le noyau, SMAD4 se lie au facteur de transcription LEF, facteur qui se lie également à la β -caténine. Cela pourrait expliquer en partie le lien entre TGF- β 1 et DKK2.

Lien potentiel entre la leptine, TGF- β 1 et DKK2, et un autre régulateur potentiel de DKK2

La surexpression de TGF- β 1 semble donc être responsable ou du moins en partie, de celle de DKK2. L'inhibition de l'un ou l'autre de ces facteurs amène à un rétablissement du phénotype et de la minéralisation. La leptine, une adipokine sécrétée en grande partie par les adipocytes, outre son rôle systémique au niveau de l'hypothalamus, peut aussi agir localement. Les ostéoblastes, comme les adipocytes, proviennent de la différenciation des cellules mésenchymateuses. Les ostéoblastes

secrètent également la leptine et celle-ci jouerait un rôle relativement important dans le métabolisme osseux¹⁹². La leptine, également surexprimée dans les ostéoblastes OA, a également montré être responsable, du moins en partie, de l'altération du phénotype des ostéoblastes OA¹⁵⁰. Son inhibition a mené d'une part, à la réduction de l'activité phosphatase alcaline et de la production d'ostéocalcine, et d'autre part, à celle du niveau protéique de TGF- β 1. Cela laisserait donc croire que la leptine agirait en amont de TGF- β 1 et de DKK2. Bien que ceci puisse être le cas, notre présente étude a montré que l'inhibition de DKK2 résultante de celle de TGF- β 1 n'a été que d'environ 60% alors que l'inhibition de TGF- β 1 était presque complète soit à plus de 90%. Ceci suggérerait que d'autres facteurs puissent réguler l'expression de DKK2 bien que TGF- β 1 soit un de ces facteurs. Un facteur de transcription ayant démontré contrôler étroitement l'expression de DKK2 est Pitx2¹⁹³. Ce facteur agirait en faveur de l'expression de DKK2. En effet, dans les souris KO en DKK2, les niveaux de Pitx2 sont très élevés¹⁹³. De plus, il a été montré que lors de l'embryogenèse, au niveau de la crête neurale, Dkk2 serait une cible directe ou indirecte de Pitx2¹⁹³. Ce facteur a montré être important au niveau de l'œil où DKK2 serait également important. Ces 2 facteurs se retrouvent souvent associés. Les myocytes, cellules musculaires, et les ostéoblastes proviennent également de la différenciation des cellules mésenchymateuses. Il est donc également intéressant de noter que Pitx2 protégerait les myoblastes de leur transdifférenciation en ostéoblastes, médiée par les BMPs¹⁹⁴. Une mutation au niveau de Pitx2 chez la souris a entraîné des défauts osseux et musculaires au niveau de ses pattes antérieures¹⁹⁵, cela pourrait être relié, du moins en partie, à une altération de l'expression de Dkk2. Peu d'étude portant sur le rôle de Pitx2 dans le tissu osseux ont été réalisées, toutefois, Pitx2 jouerait un rôle clé dans le développement cranio-facial et dans la morphogenèse des dents notamment en modulant la signalisation de BMP-4¹⁹⁶. Bien qu'un membre proche de Pitx2, Pitx1, semble jouer un rôle plus important dans le métabolisme osseux¹⁹⁷ et pourrait être impliqué dans l'OA¹⁶⁶, aucune étude n'a démontré son impact probable sur la signalisation Wnt.

Altération de Wnt7B, un autre régulateur potentiel de la signalisation canonique Wnt et altération potentielle d'une signalisation non-canonique Wnt dans les ostéoblastes OA

Notons qu'outre DKK2, d'autres acteurs de la signalisation Wnt seraient impliqués dans l'altération de la signalisation canonique Wnt. En effet, notre étude a montré des niveaux d'expression de Wnt7B faibles dans les ostéoblastes OA *low* et *high* comparativement à celui des normaux. Wnt7B semble jouer un rôle important dans l'ostéogenèse et l'ostéoblastogenèse comme le démontre notamment les souris mutantes en Wnt7B ainsi que des modèles cellulaires d'ostéoblastes¹⁸⁶. Ces souris mutantes présentent une ossification moindre par rapport aux souris normale. Ces souris présenteraient également des défauts de minéralisation de leur crâne. Wnt7B a favorisé la différenciation des lignées cellulaires mésenchymateuses C3H10T1/2 et ST2 en ostéoblastes témoignant donc de son rôle dans l'ostéoblastogenèse. L'inhibition de DKK2 et de TGF- β 1 n'a pas eu d'effet significatif sur l'expression de Wnt7B (Figure S2) démontrant ainsi que son altération est indépendante de celle de ces deux facteurs. Malheureusement, outre Wnt3A, il n'existe actuellement que peu de protéines recombinantes de la famille des Wnt sur le marché. Il aurait été intéressant, étant donné que les niveaux d'expression de Wnt7B sont faibles dans les ostéoblastes OA, de vérifier si l'ajout de protéine recombinante Wnt7B pouvait potentialiser l'activité de la signalisation Wnt. Si cela avait été le cas, il serait probable que cet ajout puisse rétablir partiellement le phénotype et la minéralisation anormaux des ostéoblastes OA de manière similaire à l'inhibition de TGF- β 1 et DKK2. Toutefois, Wnt7B ne semblerait pas agir dans la signalisation canonique Wnt ; il emprunterait plutôt la voie non-canonique Wnt-PKC δ dans la lignée cellulaire de cellules stromales ST2¹⁸⁶. Toutefois comme l'activation de ces voies de signalisation Wnt pourrait dépendre des récepteurs présents à la surface des cellules étudiées¹⁶⁹, il se pourrait que Wnt7B active la voie canonique à un certain stade de différenciation ou dans un autre type cellulaire. Cela montre cependant qu'il pourrait y avoir potentiellement une altération dans la signalisation non-canonique Wnt-PKC δ dans l'OA. Il existerait également des « *cross-talk* » entre la voie canonique et les voies non-canoniques Wnt. Ces « *cross-talk* »

impliqueraient généralement les protéines du complexe de dégradation de la β -caténine. Des modulations de la signalisation canonique Wnt pourraient se faire via GSK-3 β . Cette protéine fait partie du complexe de dégradation de la β -caténine dans le cytosol et elle est responsable de phosphoryler la β -caténine pour induire sa dégradation. En effet, GSK-3 β serait souvent impliquée dans ces « *cross-talk* » étant donné que le rôle principal de cette protéine ne serait pas restreint à la dégradation de la β -caténine¹⁹⁸. L'altération de la signalisation Wnt dans les ostéoblastes OA pourrait donc être en partie due à GSK-3 β .

Altération de la signalisation Wnt et son impact sur le phénotype anormal des ostéoblastes OA

Notre étude a montré d'un côté, que l'expression d'un antagoniste, DKK2, de la signalisation Wnt était augmentée et que d'un autre côté, que l'expression d'un agoniste, Wnt7B, était diminuée. La signalisation canonique Wnt semble être la plus importante dans le tissu osseux et son activité a montré être diminué dans cette étude. Pourtant dans un groupe de patients OA, les *high* OA, cette signalisation était moins diminuée comparativement à l'autre groupe de patients OA, les *low* OA. Cela serait dû aux PGE₂ qui ont montré potentialiser l'activité de la signalisation canonique Wnt, fait qui a déjà été décrit dans le cadre d'une étude sur le cancer du colon⁹⁵. Les récepteurs principaux de la signalisation canonique Wnt ne serait pas responsable de la diminution de son activité étant donné leur expression similaire entre ostéoblastes OA et normaux. L'inhibition de la signalisation Wnt a pu être partiellement rétablie par l'inhibition par siRNA de l'antagoniste DKK2. Cette inhibition a aussi permise de rétablir partiellement le phénotype altéré et la minéralisation des ostéoblastes OA. Parallèlement, l'inhibition de TGF- β 1 aussi surexprimé dans les ostéoblastes OA a montré entraîner les mêmes effets sur le phénotype des ostéoblastes OA. Dans une étude précédente⁸⁵, l'inhibition de TGF- β 1 a également entraîné le rétablissement partiel de la minéralisation anormale ainsi qu'une correction dans le ratio de l'expression des chaîne α 1/ α 2 du collagène de type I des ostéoblastes OA. Étant donné les effets similaires de ces deux facteurs, un lien hiérarchique a pu être établi en observant l'effet de leur inhibition respective sur

l'expression de chacun. TGF- β 1 a montré réguler en amont DKK2, on ne sait toutefois pas de quel manière ce lien est réalisé. Cependant, il semblerait que TGF- β 1 ne soit pas l'unique régulateur de DKK2. Le facteur transcriptionnel Pitx2 a montré influencer l'expression de Dkk2 dans différent modèle, cela pourrait être aussi le cas dans les ostéoblastes. L'altération de l'expression de Wnt7B dans les ostéoblastes OA n'est pas reliée à celle de DKK2 et de TGF- β 1. Cela démontre donc que DKK2 pourrait ne pas être le seul médiateur de la signalisation Wnt responsable de l'altération du phénotype des ostéoblastes OA. De plus, il semblerait que Wnt7B agisse principalement dans la voie de signalisation non-canonique Wnt-PKC δ d'après l'étude de Tu et al¹⁸⁶. Cela indiquerait donc que cette voie non-canonique pourrait aussi être altérée dans les ostéoblastes OA. Les altérations de médiateurs de la signalisation Wnt dans les ostéoblastes pourraient donc être responsables du développement de la sclérose de l'os sous-chondral ainsi que des altérations de la microstructure osseuse des patients OA.

CHAPITRE 6

CONCLUSION

L'ostéoarthrose est une pathologie handicapante affectant environ 10% de la population en Amérique du Nord et touche majoritairement la population âgée. Le vieillissement de la population contribuera à l'augmentation de l'incidence de cette pathologie qui représente déjà un problème socioéconomique important. Malgré les récentes avancées dans la recherche sur l'OA, outre la chirurgie très dispendieuse, aucun traitement curatif n'existe présentement. La découverte d'un traitement curatif efficace permettant de ralentir la progression de l'OA contribuerait à diminuer significativement les dépenses croissantes reliées à cette pathologie populaire. Tout cela démontre l'importance de la recherche sur l'OA.

Les avancées technologiques en imagerie, telles le MRI et la microCT, ont permis de mieux caractériser l'OA. Ces nouvelles observations étaient grandement axées sur les altérations au niveau de l'os puis au niveau des autres tissus. Plusieurs de ces altérations, bien que présentes ne pouvaient être observées par les anciennes méthodes d'imageries telle la radiographie classique. Les lésions de la moëlle osseuse comptent parmi ces nouvelles observations de grande importance, celle-ci étant intimement associées à l'OA et à la douleur. Bien que la dégradation du cartilage soit un phénomène important dans l'OA, la sclérose de l'os cortical sous-chondral ainsi que les altérations dans la microstructure de l'os trabéculaire sous-jacents sont deux phénomènes aussi important voir plus important dans le développement de l'OA. Bien que le tissu où apparaîtraient les premières altérations reste encore un sujet à débat, le tissu osseux se révèle être une cible très intéressante pour les traitements étant donné son rôle primordial dans la résistance aux chocs mécaniques. Pourtant, malgré ces nouvelles avancées, le cartilage reste encore l'objet d'étude principal de la recherche sur l'OA.

Dans notre présente étude, l'importance du rôle de l'os sous-chondral dans l'OA a été montrée par l'étude de l'altération de la signalisation canonique Wnt dans les ostéoblastes OA, signalisation importante dans l'ostéogenèse. De plus, le rôle des PGE₂ dans la modulation de la signalisation canonique Wnt a pour la première fois était montrée dans les ostéoblastes.

La surexpression de l'antagoniste DKK2 dans les ostéoblastes OA a menée à la diminution de l'activité de la signalisation canonique Wnt tandis que les PGE₂ ont

potentialisé son activité. Toutefois, l'effet des PGE₂ sur l'activité de la signalisation canonique Wnt n'a pu être observé que dans les ostéoblastes sécrétant des niveaux faibles de PGE₂. La surexpression de DKK2 dans les ostéoblastes OA a aussi montré être responsable, du moins en partie, de l'altération de leur phénotype et de leur minéralisation. L'inhibition de DKK2 et de TGF-β1, aussi surexprimé dans les ostéoblastes OA, a permis de corriger partiellement le phénotype anormal de ces cellules. L'inhibition de DKK2 a aussi permis d'augmenter la minéralisation des ostéoblastes OA, tout comme celle de TGF-β1 dans une étude précédente. Suite à ces observations montrant des rôles similaires de DKK2 et de TGF-β1, une relation entre ces deux facteurs a été démontrée. TGF-β1 régulait positivement l'expression de DKK2. Cependant le mécanisme de cette régulation n'a pas été démontré.

Les résultats de cette étude remettent donc en question l'utilisation des NSAIDs anti-COX-2 chez certains patients à cause des effets bénéfiques que les PGE₂ pourraient présenter. Aussi, elle propose que des traitements visant à augmenter, au niveau de l'os, l'activité de la signalisation Wnt pourraient s'avérer bénéfiques pour rétablir partiellement les altérations au niveau de l'os sous-chondral. Cependant, la conception éventuelle d'un traitement visant la signalisation Wnt devra être faite avec beaucoup de précautions étant donné que cette signalisation est aussi impliquée dans le développement tumoral.

Perspectives sur la recherche sur l'ostéoartrrose

Voies non-canoniques de la signalisation Wnt et régulation des facteurs intracellulaires

En ce qui a trait à la signalisation Wnt, la régulation de cette dernière s'avère être très complexe. Outre la signalisation canonique, des signalisations non-canoniques pourraient être altérées comme le suggère l'altération de Wnt7B dans les ostéoblastes OA, et pourraient avoir leur importance dans le développement de l'OA. De plus, la régulation des facteurs intracellulaires de cette signalisation sont aussi à considérer car ils ont, tout comme les facteurs extracellulaires, un potentiel pour moduler cette signalisation.

Existerait-il différentes formes d'OA ?

Les cultures primaires d'ostéoblastes humains sont un modèle d'étude présentant plusieurs avantages intéressants ; elles permettent entre autre de bien représenter l'hétérogénéité métabolique présente au sein de la population. Ainsi, les études antérieures ont permis de différencier deux catégories de patients OA par la production de PGE₂ de leurs ostéoblastes. Or, l'OA ne s'exprime pas de la même façon chez toutes les personnes atteintes. Chez certains individus, l'OA progresse plus rapidement que chez d'autres et les patients répondent souvent différemment aux traitements. Ainsi, comme il a été rapporté dans la littérature, l'OA pourrait être divisée en sous-catégories. Des altérations différentes au niveau des cultures primaires pourraient permettre de faire des liens avec les différents phénotypes des patients et cela permettrait potentiellement une intervention plus juste en ce qui à trait aux traitements. Toutefois, cette stratégie suggérerait plusieurs réflexions de nature éthique.

Quelles sont les altérations métaboliques au sein des tissus composants l'articulation outre le tissu osseux et cartilagineux chez les patients OA et comment sont-elles reliées ?

Bien que beaucoup s'entende pour dire que tous les tissus composant l'articulation peuvent être altérés dans l'OA et mener au développement de l'OA, peu d'études portent sur tous ces tissus²⁰. Ces différents tissus ont pour la plupart une origine mésenchymateuse. Des altérations ont été démontrées au sein de tous ces tissus chez les patients OA. Ainsi, Aspden propose que dans l'OA, du moins dans sa forme primaire et générale, tous les tissus d'origine mésenchymateuse seraient altérés et que l'OA serait dans ce cas une maladie métabolique générale²⁰. Pour relier cette hypothèse à notre étude, la signalisation Wnt a montré jouer un rôle important dans le contrôle de l'avenir des cellules mésenchymateuses¹⁹⁹. Une altération de cette dernière pourrait favoriser le développement d'un type cellulaire au détriment d'un autre. Cela a été observé chez les patients OA et la signalisation Wnt a aussi montré être altérée dans les chondrocytes OA. Dans la majorité des cas, l'OA se développe tardivement dans la vie et de manière relativement lente. Dans le cas d'un problème métabolique tel que décrit par Aspden, est-ce que ce problème apparaîtrait à un certain moment dans la vie ou est-ce qu'il serait présent à l'origine ?

Comment expliquer le lien entre les lésions osseuses et les lésions ligamentaires avec le développement de l'OA, ce lien serait-il en partie métabolique ?

Les lésions de moëlle osseuse²⁵ ainsi que les lésions ligamentaires¹⁸ sont deux facteurs de risques importants dans l'OA. La moëlle osseuse ainsi que les ligaments²⁰⁰ contiennent des cellules mésenchymateuses, un traumatisme important à leur niveau pourrait affecter le métabolisme de ces dernières.

CHAPITRE 7

RÉFÉRENCES

1. Dequeker, J. & Luyten, F.P. The history of osteoarthritis-osteoarthrosis. *Ann Rheum Dis* **67**, 5-10 (2008).
2. Mazières, B. & Tressol-Verrouil, E. Généralités sur l'arthrose. *Biclet P, Chaine C, Chaine G et coll., rédacteurs. Encyclopédie Médico-Chirurgicale. Paris: Elsevier* (1997).
3. Meulenbelt, I., *et al.* Investigation of the association of the CRTM and CTRL1 genes with radiographically evident osteoarthritis in subjects from the Rotterdam study. *Arthritis Rheum* **40**, 1760-1765 (1997).
4. Chaisson, C.E., *et al.* Radiographic hand osteoarthritis: incidence, patterns, and influence of pre-existing disease in a population based sample. *J Rheumatol* **24**, 1337-1343 (1997).
5. Felson, D.T., *et al.* Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med* **133**, 635-646 (2000).
6. Altman, R., *et al.* Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* **29**, 1039-1049 (1986).
7. Altman, R., *et al.* The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand. *Arthritis Rheum* **33**, 1601-1610 (1990).
8. Altman, R., *et al.* The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* **34**, 505-514 (1991).
9. Felson, D.T., *et al.* The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* **30**, 914-918 (1987).
10. Felson, D.T. An update on the pathogenesis and epidemiology of osteoarthritis. *Radiol Clin North Am* **42**, 1-9, v (2004).
11. Jones, G., Ding, C., Scott, F., Glisson, M. & Cicuttini, F. Early radiographic osteoarthritis is associated with substantial changes in cartilage volume and tibial bone surface area in both males and females. *Osteoarthritis Cartilage* **12**, 169-174 (2004).
12. Kijowski, R., Blankenbaker, D., Stanton, P., Fine, J. & De Smet, A. Arthroscopic validation of radiographic grading scales of osteoarthritis of the tibiofemoral joint. *AJR Am J Roentgenol* **187**, 794-799 (2006).
13. Kean, W.F., Kean, R. & Buchanan, W.W. Osteoarthritis: symptoms, signs and source of pain. *Inflammopharmacology* **12**, 3-31 (2004).
14. Das, S.K. & Farooqi, A. Osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **22**, 657-675 (2008).
15. Hart, D.J. & Spector, T.D. The classification and assessment of osteoarthritis. *Baillieres Clin Rheumatol* **9**, 407-432 (1995).
16. Herrero-Beaumont, G., Roman-Blas, J.A., Castaneda, S. & Jimenez, S.A. Primary osteoarthritis no longer primary: three subsets with distinct etiological, clinical, and therapeutic characteristics. *Semin Arthritis Rheum* **39**, 71-80 (2009).
17. Brandt, K.D., Dieppe, P. & Radin, E.L. Commentary: is it useful to subset "primary" osteoarthritis? A critique based on evidence regarding the etiopathogenesis of osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* **39**, 81-95 (2009).
18. Lohmander, L.S., Englund, P.M., Dahl, L.L. & Roos, E.M. The long-term consequence of anterior cruciate ligament and meniscus injuries: osteoarthritis. *Am J Sports Med* **35**, 1756-1769 (2007).
19. Brandt, K.D., Dieppe, P. & Radin, E.L. Etiopathogenesis of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* **34**, 531-559 (2008).
20. Aspden, R.M. Osteoarthritis: a problem of growth not decay? *Rheumatology (Oxford)* **47**, 1452-1460 (2008).

21. Fautrel, B., *et al.* Impact of osteoarthritis: results of a nationwide survey of 10 000 patients consulting for OA. *Revue du rhumatisme* **72**, 404-410 (2005).
22. Garstang, S.V. & Stitik, T.P. Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *Am J Phys Med Rehabil* **85**, S2-11; quiz S12-14 (2006).
23. Abramson, S.B. & Attur, M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* **11**, 227 (2009).
24. Zhang, Y. & Jordan, J.M. Epidemiology of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* **34**, 515-529 (2008).
25. Hernandez-Molina, G., *et al.* Central bone marrow lesions in symptomatic knee osteoarthritis and their relationship to anterior cruciate ligament tears and cartilage loss. *Arthritis Rheum* **58**, 130-136 (2008).
26. Felson, D.T., *et al.* The association of bone marrow lesions with pain in knee osteoarthritis. *Ann Intern Med* **134**, 541-549 (2001).
27. Felson, D.T., *et al.* Correlation of the development of knee pain with enlarging bone marrow lesions on magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum* **56**, 2986-2992 (2007).
28. Spector, T.D., Cicuttini, F., Baker, J., Loughlin, J. & Hart, D. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ* **312**, 940-943 (1996).
29. Chitnavis, J., *et al.* Genetic influences in end-stage osteoarthritis. Sibling risks of hip and knee replacement for idiopathic osteoarthritis. *J Bone Joint Surg Br* **79**, 660-664 (1997).
30. Ikegawa, S. New gene associations in osteoarthritis: what do they provide, and where are we going? *Curr Opin Rheumatol* **19**, 429-434 (2007).
31. Valdes, A.M., *et al.* Genome-wide association scan identifies a prostaglandin-endoperoxide synthase 2 variant involved in risk of knee osteoarthritis. *Am J Hum Genet* **82**, 1231-1240 (2008).
32. Loughlin, J., *et al.* Association analysis of the vitamin D receptor gene, the type I collagen gene COL1A1, and the estrogen receptor gene in idiopathic osteoarthritis. *J Rheumatol* **27**, 779-784 (2000).
33. Zhai, G., *et al.* Insulin-like growth factor I gene promoter polymorphism, collagen type II alpha1 (COL2A1) gene, and the prevalence of radiographic osteoarthritis: the Rotterdam Study. *Ann Rheum Dis* **63**, 544-548 (2004).
34. Dabovic, B., *et al.* Bone defects in latent TGF-beta binding protein (Ltbp)-3 null mice; a role for Ltbp in TGF-beta presentation. *J Endocrinol* **175**, 129-141 (2002).
35. Blair-Levy, J.M., *et al.* A type I collagen defect leads to rapidly progressive osteoarthritis in a mouse model. *Arthritis Rheum* **58**, 1096-1106 (2008).
36. Adams, J.E. Injury to the Throwing Arm. A Study of Traumatic Changes in the Elbow Joints of Boy Baseball Players. *Calif Med* **102**, 127-132 (1965).
37. Slemenda, C., *et al.* Quadriceps weakness and osteoarthritis of the knee. *Ann Intern Med* **127**, 97-104 (1997).
38. Felson, D.T., Anderson, J.J., Naimark, A., Walker, A.M. & Meenan, R.F. Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Ann Intern Med* **109**, 18-24 (1988).
39. Anderson, J.J. & Felson, D.T. Factors associated with osteoarthritis of the knee in the first national Health and Nutrition Examination Survey (HANES I). Evidence for an association with overweight, race, and physical demands of work. *Am J Epidemiol* **128**, 179-189 (1988).
40. Cicuttini, F.M., *et al.* The relationship between body composition and knee cartilage volume in healthy, middle-aged subjects. *Arthritis Rheum* **52**, 461-467 (2005).
41. Saville, P.D. & Dickson, J. Age and weight in osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* **11**, 635-644 (1968).

42. Carman, W.J., Sowers, M., Hawthorne, V.M. & Weissfeld, L.A. Obesity as a risk factor for osteoarthritis of the hand and wrist: a prospective study. *Am J Epidemiol* **139**, 119-129 (1994).
43. Loeser, R.F. & Shaker, N. Aging or osteoarthritis: which is the problem? *Rheum Dis Clin North Am* **29**, 653-673 (2003).
44. Leboy, P.S., *et al.* Ascorbic acid induces alkaline phosphatase, type X collagen, and calcium deposition in cultured chick chondrocytes. *J Biol Chem* **264**, 17281-17286 (1989).
45. Cimmino, M.A. & Parodi, M. Risk factors for osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* **34**, 29-34 (2005).
46. McAlindon, T.E. & Biggee, B.A. Nutritional factors and osteoarthritis: recent developments. *Curr Opin Rheumatol* **17**, 647-652 (2005).
47. Hunter, D.J. & Eckstein, F. Exercise and osteoarthritis. *J Anat* **214**, 197-207 (2009).
48. Riecke, B.F., *et al.* Comparing two low-energy diets for the treatment of knee osteoarthritis symptoms in obese patients: a pragmatic randomized clinical trial. *Osteoarthritis Cartilage* (2010).
49. Felson, D.T. & Chaisson, C.E. Understanding the relationship between body weight and osteoarthritis. *Baillieres Clin Rheumatol* **11**, 671-681 (1997).
50. Kwan Tat, S., Lajeunesse, D., Pelletier, J.P. & Martel-Pelletier, J. Targeting subchondral bone for treating osteoarthritis: what is the evidence? *Best Pract Res Clin Rheumatol* **24**, 51-70 (2010).
51. Singh, G., *et al.* Gastrointestinal tract complications of nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment in rheumatoid arthritis. A prospective observational cohort study. *Arch Intern Med* **156**, 1530-1536 (1996).
52. Pitt, B., Pepine, C. & Willerson, J.T. Cyclooxygenase-2 inhibition and cardiovascular events. *Circulation* **106**, 167-169 (2002).
53. Grassel, S. & Ahmed, N. Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation. *Front Biosci* **12**, 4946-4956 (2007).
54. Poole, C.A. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat* **191 (Pt 1)**, 1-13 (1997).
55. Hall, B.K. & Miyake, T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* **22**, 138-147 (2000).
56. Pan, J., *et al.* In situ measurement of transport between subchondral bone and articular cartilage. *J Orthop Res* **27**, 1347-1352 (2009).
57. Lyons, T.J., McClure, S.F., Stoddart, R.W. & McClure, J. The normal human chondro-osseous junctional region: evidence for contact of uncalcified cartilage with subchondral bone and marrow spaces. *BMC Musculoskelet Disord* **7**, 52 (2006).
58. Madry, H., van Dijk, C.N. & Mueller-Gerbl, M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **18**, 419-433 (2010).
59. Cohen, N.P., Foster, R.J. & Mow, V.C. Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function, and maintaining healthy state. *J Orthop Sports Phys Ther* **28**, 203-215 (1998).
60. Poole, A.R., *et al.* Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res*, S26-33 (2001).
61. Little, C.B., *et al.* Aggrecanase versus matrix metalloproteinases in the catabolism of the interglobular domain of aggrecan in vitro. *Biochem J* **344 Pt 1**, 61-68 (1999).
62. Aigner, T. & McKenna, L. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci* **59**, 5-18 (2002).

63. Aigner, T., Bertling, W., Stoss, H., Weseloh, G. & von der Mark, K. Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* **91**, 829-837 (1993).
64. Eyre, D.R., McDevitt, C.A., Billingham, M.E. & Muir, H. Biosynthesis of collagen and other matrix proteins by articular cartilage in experimental osteoarthritis. *Biochem J* **188**, 823-837 (1980).
65. Rothwell, A.G. & Bentley, G. Chondrocyte multiplication in osteoarthritic articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br* **55**, 588-594 (1973).
66. Sofat, N. Analysing the role of endogenous matrix molecules in the development of osteoarthritis. *Int J Exp Pathol* **90**, 463-479 (2009).
67. Lippiello, L., Kaye, C., Neumata, T. & Mankin, H.J. In vitro metabolic response of articular cartilage segments to low levels of hydrostatic pressure. *Connect Tissue Res* **13**, 99-107 (1985).
68. Girkontaite, I., *et al.* Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies. *Matrix Biol* **15**, 231-238 (1996).
69. Matyas, J.R., Adams, M.E., Huang, D. & Sandell, L.J. Discoordinate gene expression of aggrecan and type II collagen in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **38**, 420-425 (1995).
70. Wotton, S.F. & Duance, V.C. Type III collagen in normal human articular cartilage. *Histochem J* **26**, 412-416 (1994).
71. Morrison, E.H., Ferguson, M.W., Bayliss, M.T. & Archer, C.W. The development of articular cartilage: I. The spatial and temporal patterns of collagen types. *J Anat* **189 (Pt 1)**, 9-22 (1996).
72. Martel-Pelletier, J. & Pelletier, J.P. Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? *Ekleml Hastalik Cerrahisi* **21**, 2-14 (2010).
73. Moldovan, F., Pelletier, J.P., Hambor, J., Cloutier, J.M. & Martel-Pelletier, J. Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum* **40**, 1653-1661 (1997).
74. Fernandes, J.C., *et al.* Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in normal and early experimental osteoarthritic canine cartilage: an immunohistochemical study. *J Rheumatol* **25**, 1585-1594 (1998).
75. Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J.P. & Roughley, P.J. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **22**, 351-384 (2008).
76. Tardif, G., Hum, D., Pelletier, J.P., Duval, N. & Martel-Pelletier, J. Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes. *BMC Musculoskelet Disord* **10**, 148 (2009).
77. Pelletier, J.P., *et al.* Risk factors associated with the loss of cartilage volume on weight-bearing areas in knee osteoarthritis patients assessed by quantitative magnetic resonance imaging: a longitudinal study. *Arthritis Res Ther* **9**, R74 (2007).
78. Raynauld, J.P., *et al.* Correlation between bone lesion changes and cartilage volume loss in patients with osteoarthritis of the knee as assessed by quantitative magnetic resonance imaging over a 24-month period. *Ann Rheum Dis* **67**, 683-688 (2008).
79. Clarke, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* **3 Suppl 3**, S131-139 (2008).
80. Boivin, G. & Meunier, P.J. The mineralization of bone tissue: a forgotten dimension in osteoporosis research. *Osteoporos Int* **14 Suppl 3**, S19-24 (2003).

81. Doyle, M.E. & Jan de Beur, S.M. The skeleton: endocrine regulator of phosphate homeostasis. *Curr Osteoporos Rep* **6**, 134-141 (2008).
82. Cortet, B. & Marchandise, X. Microarchitecture et résistance mécanique osseuse: Bone microarchitecture and mechanical resistance. *Revue du rhumatisme* **68**, 584-594 (2001).
83. Bussard, K.M., Gay, C.V. & Mastro, A.M. The bone microenvironment in metastasis; what is special about bone? *Cancer Metastasis Rev* **27**, 41-55 (2008).
84. McBride, D.J., Jr., Choe, V., Shapiro, J.R. & Brodsky, B. Altered collagen structure in mouse tail tendon lacking the alpha 2(I) chain. *J Mol Biol* **270**, 275-284 (1997).
85. Couchourel, D., *et al.* Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is attributable to abnormal type I collagen production. *Arthritis Rheum* **60**, 1438-1450 (2009).
86. Beresford, J.N., Gallagher, J.A., Poser, J.W. & Russell, R.G. Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of 1,25(OH)2D3, 24,25(OH)2D3, parathyroid hormone, and glucocorticoids. *Metab Bone Dis Relat Res* **5**, 229-234 (1984).
87. Price, P.A. & Baukol, S.A. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *J Biol Chem* **255**, 11660-11663 (1980).
88. Ducy, P., *et al.* Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* **382**, 448-452 (1996).
89. Binkley, N.C. & Suttie, J.W. Vitamin K nutrition and osteoporosis. *J Nutr* **125**, 1812-1821 (1995).
90. Stenner, D., Tracy, R., Riggs, B. & Mann, K. Human platelets contain and secrete osteonectin, a major protein of mineralized bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 6892 (1986).
91. Sakagami, M. Role of osteopontin in the rodent inner ear as revealed by in situ hybridization. *Med Electron Microsc* **33**, 3-10 (2000).
92. Bianco, P., Fisher, L.W., Young, M.F., Termine, J.D. & Robey, P.G. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int* **49**, 421-426 (1991).
93. Zhou, H.Y., Takita, H., Fujisawa, R., Mizuno, M. & Kuboki, Y. Stimulation by bone sialoprotein of calcification in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Calcif Tissue Int* **56**, 403-407 (1995).
94. Chellaiah, M.A., *et al.* Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression. *Mol Biol Cell* **14**, 173-189 (2003).
95. Buchanan, F.G. & DuBois, R.N. Connecting COX-2 and Wnt in cancer. *Cancer Cell* **9**, 6-8 (2006).
96. Pagani, F., Francucci, C.M. & Moro, L. Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives. *J Endocrinol Invest* **28**, 8-13 (2005).
97. Posner, A.S. Crystal chemistry of bone mineral. *Physiol Rev* **49**, 760-792 (1969).
98. BILTZ, R. & PELLEGRINO, E. The chemical anatomy of bone: I. A comparative study of bone composition in sixteen vertebrates. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **51**, 456 (1969).
99. Toppets, V., *et al.* Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Ann. Méd. Vét* **148**, 1-13 (2004).
100. Robling, A., Castillo, A. & Turner, C. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. (2006).

101. Oguro, I. & Ozawa, H. Cytochemical studies of the cellular events sequence in bone remodeling: Cytological evidence for a coupling mechanism. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* **7**, 30-36 (1989).
102. Roholl, P., Blauw, E., Zurcher, C., Dormans, J. & Theuns, H. Evidence for a diminished maturation of preosteoblasts into osteoblasts during aging in rats: an ultrastructural analysis. *Journal of Bone and Mineral Research* **9**, 355-366 (1994).
103. Hoshi, K., Komori, T. & Ozawa, H. Morphological characterization of skeletal cells in Cbfa1-deficient mice. *Bone* **25**, 639-651 (1999).
104. Enomoto, H., *et al.* Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem* **275**, 8695-8702 (2000).
105. Kobayashi, H., Gao, Y., Ueta, C., Yamaguchi, A. & Komori, T. Multilineage differentiation of Cbfa1-deficient calvarial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 630-636 (2000).
106. Komori, T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* **99**, 1233-1239 (2006).
107. Boyden, L.M., *et al.* High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* **346**, 1513-1521 (2002).
108. Gong, Y., *et al.* LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* **107**, 513-523 (2001).
109. Manolagas, S. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine reviews* **21**, 115 (2000).
110. Mullender, M.G. & Huiskes, R. Osteocytes and bone lining cells: which are the best candidates for mechano-sensors in cancellous bone? *Bone* **20**, 527-532 (1997).
111. Poole, K.E., *et al.* Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J* **19**, 1842-1844 (2005).
112. Bar-Shavit, Z. The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J Cell Biochem* **102**, 1130-1139 (2007).
113. Boyle, W.J., Simonet, W.S. & Lacey, D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**, 337-342 (2003).
114. Lacey, D.L., *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 165-176 (1998).
115. Rodan, G.A. & Martin, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* **289**, 1508-1514 (2000).
116. Henriksen, K., Neutzsky-Wulff, A.V., Bonewald, L.F. & Karsdal, M.A. Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone* **44**, 1026-1033 (2009).
117. Chambers, T.J. The cellular basis of bone resorption. *Clin Orthop Relat Res*, 283-293 (1980).
118. Lajeunesse, D. The role of bone in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **12 Suppl A**, S34-38 (2004).
119. Hadjidakis, D.J. & Androulakis, I.I. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* **1092**, 385-396 (2006).
120. Manolagas, S. & Jilka, R. Bone Marrow, Cytokines, and Bone Remodeling--Emerging Insights into the Pathophysiology of Osteoporosis. *New England Journal of Medicine* **332**, 305 (1995).
121. Graul, A.I., Sorbera, L.A. & Prous, J.R. Osteoporosis. *Drugs Today (Barc)* **37**, 703-727 (2001).

122. Michael Parfitt, A. Misconceptions V--Activation of osteoclasts is the first step in the bone remodeling cycle. *Bone* **39**, 1170-1172 (2006).
123. Teitelbaum, S.L., Tondravi, M.M. & Ross, F.P. Osteoclasts, macrophages, and the molecular mechanisms of bone resorption. *J Leukoc Biol* **61**, 381-388 (1997).
124. Hill, P.A. Bone remodelling. *Br J Orthod* **25**, 101-107 (1998).
125. Meunier, P.J. & Boivin, G. Bone mineral density reflects bone mass but also the degree of mineralization of bone: therapeutic implications. *Bone* **21**, 373-377 (1997).
126. Yee, J.A., Yan, L., Dominguez, J.C., Allan, E.H. & Martin, T.J. Plasminogen-dependent activation of latent transforming growth factor beta (TGF beta) by growing cultures of osteoblast-like cells. *J Cell Physiol* **157**, 528-534 (1993).
127. Janssens, K., ten Dijke, P., Janssens, S. & Van Hul, W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev* **26**, 743-774 (2005).
128. Noda, M. & Camilliere, J.J. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology* **124**, 2991-2994 (1989).
129. Satija, N.K., et al. Mesenchymal stem cells: molecular targets for tissue engineering. *Stem Cells Dev* **16**, 7-23 (2007).
130. Massicotte, F., Fernandes, J.C., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P. & Lajeunesse, D. Modulation of insulin-like growth factor 1 levels in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Bone* **38**, 333-341 (2006).
131. Martel-Pelletier, J., Di Battista, J.A., Lajeunesse, D. & Pelletier, J.P. IGF/IGFBP axis in cartilage and bone in osteoarthritis pathogenesis. *Inflamm Res* **47**, 90-100 (1998).
132. Bertolini, D.R., Nedwin, G.E., Bringman, T.S., Smith, D.D. & Mundy, G.R. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* **319**, 516-518 (1986).
133. Silve, C.M., Hradek, G.T., Jones, A.L. & Arnaud, C.D. Parathyroid hormone receptor in intact embryonic chicken bone: characterization and cellular localization. *J Cell Biol* **94**, 379-386 (1982).
134. Keller, H. & Kneissel, M. SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone* **37**, 148-158 (2005).
135. Raisz, L.G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem* **45**, 1353-1358 (1999).
136. Anderson, P.H., et al. Vitamin D depletion induces RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone loss in a rodent model. *J Bone Miner Res* **23**, 1789-1797 (2008).
137. Li, Y.C., et al. Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice. *Endocrinology* **139**, 4391-4396 (1998).
138. Frenkel, B., et al. Regulation of adult bone turnover by sex steroids. *J Cell Physiol* **224**, 305-310 (2010).
139. Radin, E.L. & Rose, R.M. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop Relat Res*, 34-40 (1986).
140. Burr, D.B. & Radin, E.L. Microfractures and microcracks in subchondral bone: are they relevant to osteoarthritis? *Rheum Dis Clin North Am* **29**, 675-685 (2003).
141. Carlson, C.S., et al. Osteoarthritis in cynomolgus macaques: a primate model of naturally occurring disease. *J Orthop Res* **12**, 331-339 (1994).
142. Carlson, C.S., Loeser, R.F., Purser, C.B., Gardin, J.F. & Jerome, C.P. Osteoarthritis in cynomolgus macaques. III: Effects of age, gender, and subchondral bone thickness on the severity of disease. *J Bone Miner Res* **11**, 1209-1217 (1996).

143. Radin, E.L., *et al.* Effects of mechanical loading on the tissues of the rabbit knee. *J Orthop Res* **2**, 221-234 (1984).
144. Lajeunesse, D., Hilal, G., Pelletier, J.P. & Martel-Pelletier, J. Subchondral bone morphological and biochemical alterations in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **7**, 321-322 (1999).
145. Hilal, G., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Ranger, P. & Lajeunesse, D. Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis Rheum* **41**, 891-899 (1998).
146. Hilal, G., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Duval, N. & Lajeunesse, D. Abnormal regulation of urokinase plasminogen activator by insulin-like growth factor 1 in human osteoarthritic subchondral osteoblasts. *Arthritis Rheum* **42**, 2112-2122 (1999).
147. Massicotte, F., *et al.* Can altered production of interleukin-1beta, interleukin-6, transforming growth factor-beta and prostaglandin E(2) by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis Cartilage* **10**, 491-500 (2002).
148. Ding, M., Odgaard, A. & Hvid, I. Changes in the three-dimensional microstructure of human tibial cancellous bone in early osteoarthritis. *J Bone Joint Surg Br* **85**, 906-912 (2003).
149. Sharif, M., George, E. & Dieppe, P.A. Correlation between synovial fluid markers of cartilage and bone turnover and scintigraphic scan abnormalities in osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* **38**, 78-81 (1995).
150. Mutabaruka, M.S., Aoulad Aissa, M., Delalandre, A., Lavigne, M. & Lajeunesse, D. Local leptin production in osteoarthritis subchondral osteoblasts may be responsible for their abnormal phenotypic expression. *Arthritis Res Ther* **12**, R20 (2010).
151. Massicotte, F., *et al.* Abnormal insulin-like growth factor 1 signaling in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Arthritis Res Ther* **8**, R177 (2006).
152. Bailey, A.J., Sims, T.J. & Knott, L. Phenotypic expression of osteoblast collagen in osteoarthritic bone: production of type I homotrimer. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 176-182 (2002).
153. Paredes, Y., *et al.* Study of the role of leukotriene B(4) in abnormal function of human subchondral osteoarthritis osteoblasts: effects of cyclooxygenase and/or 5-lipoxygenase inhibition. *Arthritis Rheum* **46**, 1804-1812 (2002).
154. Maxis, K., *et al.* The shunt from the cyclooxygenase to lipoxygenase pathway in human osteoarthritic subchondral osteoblasts is linked with a variable expression of the 5-lipoxygenase-activating protein. *Arthritis Res Ther* **8**, R181 (2006).
155. Anderson-MacKenzie, J.M., Billingham, M.E. & Bailey, A.J. Collagen remodeling in the anterior cruciate ligament associated with developing spontaneous murine osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun* **258**, 763-767 (1999).
156. Sun, Y., *et al.* Calcium deposition in osteoarthritic meniscus and meniscal cell culture. *Arthritis Res Ther* **12**, R56 (2010).
157. Machner, A., *et al.* Higher susceptibility to Fas ligand induced apoptosis and altered modulation of cell death by tumor necrosis factor-alpha in periarticular tenocytes from patients with knee joint osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* **5**, R253-261 (2003).
158. Rijsewijk, F., *et al.* The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* **50**, 649-657 (1987).
159. McMahon, A.P. & Moon, R.T. Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in Xenopus embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell* **58**, 1075-1084 (1989).

160. Clevers, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469-480 (2006).
161. Little, R.D., *et al.* A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet* **70**, 11-19 (2002).
162. Kubota, T., Michigami, T. & Ozono, K. Wnt signaling in bone metabolism. *J Bone Miner Metab* **27**, 265-271 (2009).
163. Gaur, T., *et al.* Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* **280**, 33132-33140 (2005).
164. Gordon, M.D. & Nusse, R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* **281**, 22429-22433 (2006).
165. Logan, C.Y. & Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 781-810 (2004).
166. Picard, C., Azeddine, B., Moldovan, F., Martel-Pelletier, J. & Moreau, A. New emerging role of pitx1 transcription factor in osteoarthritis pathogenesis. *Clin Orthop Relat Res* **462**, 59-66 (2007).
167. MacDonald, B.T., Tamai, K. & He, X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* **17**, 9-26 (2009).
168. Semenov, M.V., Habas, R., Macdonald, B.T. & He, X. SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways. *Cell* **131**, 1378 (2007).
169. van Amerongen, R., Mikels, A. & Nusse, R. Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signal* **1**, re9 (2008).
170. Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V. & Kaykas, A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* **5**, 691-701 (2004).
171. Niehrs, C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* **25**, 7469-7481 (2006).
172. Diarra, D., *et al.* Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* **13**, 156-163 (2007).
173. Li, X., *et al.* Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. *Nat Genet* **37**, 945-952 (2005).
174. Yavropoulou, M.P. & Yovos, J.G. The role of the Wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation. *Hormones (Athens)* **6**, 279-294 (2007).
175. Itasaki, N. & Hoppler, S. Crosstalk between Wnt and bone morphogenic protein signaling: a turbulent relationship. *Dev Dyn* **239**, 16-33 (2010).
176. Bain, G., Muller, T., Wang, X. & Papkoff, J. Activated beta-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* **301**, 84-91 (2003).
177. Guo, X. & Wang, X.F. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res* **19**, 71-88 (2009).
178. Zhu, M., *et al.* Inhibition of beta-catenin signaling in articular chondrocytes results in articular cartilage destruction. *Arthritis Rheum* **58**, 2053-2064 (2008).
179. Zhu, M., *et al.* Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice. *J Bone Miner Res* **24**, 12-21 (2009).
180. Weng, L.H., *et al.* Inflammation induction of Dickkopf-1 mediates chondrocyte apoptosis in osteoarthritic joint. *Osteoarthritis Cartilage* **17**, 933-943 (2009).
181. Shi, Q., *et al.* Metabolic activity of osteoblasts from periprosthetic trabecular bone in failed total hip arthroplasties and osteoarthritis as markers of osteolysis and loosening. *J Rheumatol* **29**, 1437-1445 (2002).

182. Gregory, C.A., Gunn, W.G., Peister, A. & Prockop, D.J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* **329**, 77-84 (2004).
183. Mansell, J.P. & Bailey, A.J. Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J Clin Invest* **101**, 1596-1603 (1998).
184. Burr, D.B. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **12 Suppl A**, S20-30 (2004).
185. Yan, Y., *et al.* Axin2 controls bone remodeling through the beta-catenin-BMP signaling pathway in adult mice. *J Cell Sci* **122**, 3566-3578 (2009).
186. Tu, X., *et al.* Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKCdelta activation promotes bone formation. *Dev Cell* **12**, 113-127 (2007).
187. Van Miert, A.S. Present concepts on the inflammatory modulators with special reference to cytokines. *Vet Res Commun* **26**, 111-126 (2002).
188. Sugimoto, Y. & Narumiya, S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* **282**, 11613-11617 (2007).
189. Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P. & Fahmi, H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum* **33**, 155-167 (2003).
190. Reeve, J. Bone structural changes and hip osteoarthritis: comment on the article by Javaid *et al.* *Arthritis Rheum* **62**, 909-910; author reply 910 (2010).
191. Kanaan, R.A. & Kanaan, L.A. Transforming growth factor beta1, bone connection. *Med Sci Monit* **12**, RA164-169 (2006).
192. Whitfield, J.F. Leptin: brains and bones. *Expert Opin Investig Drugs* **10**, 1617-1622 (2001).
193. Gage, P.J., Qian, M., Wu, D. & Rosenberg, K.I. The canonical Wnt signaling antagonist DKK2 is an essential effector of PITX2 function during normal eye development. *Dev Biol* **317**, 310-324 (2008).
194. Hayashi, M., *et al.* Pitx2 prevents osteoblastic transdifferentiation of myoblasts by bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem* **283**, 565-571 (2008).
195. Holmberg, J., Ingner, G., Johansson, C., Leander, P. & Hjalt, T.A. PITX2 gain-of-function induced defects in mouse forelimb development. *BMC Dev Biol* **8**, 25 (2008).
196. Liu, W., Selever, J., Lu, M.F. & Martin, J.F. Genetic dissection of Pitx2 in craniofacial development uncovers new functions in branchial arch morphogenesis, late aspects of tooth morphogenesis and cell migration. *Development* **130**, 6375-6385 (2003).
197. DeLaurier, A., Schweitzer, R. & Logan, M. Pitx1 determines the morphology of muscle, tendon, and bones of the hindlimb. *Dev Biol* **299**, 22-34 (2006).
198. Wu, D. & Pan, W. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem Sci* **35**, 161-168 (2010).
199. Ling, L., Nurcombe, V. & Cool, S.M. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene* **433**, 1-7 (2009).
200. Cheng, M.T., Yang, H.W., Chen, T.H. & Lee, O.K. Isolation and characterization of multipotent stem cells from human cruciate ligaments. *Cell Prolif* **42**, 448-460 (2009).