

Université de Montréal

**Rôle du récepteur REG/EXTL3 dans l'inflammation et
son implication possible dans l'ostéoarthrose (OA)**

par

Mamadou Samba Boiro

Département de biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures et postdoctorales

en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en biochimie

juillet, 2010

© Mamadou Samba Boiro, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Rôle du récepteur REG/EXTL3 dans l'inflammation et son implication possible dans
l'ostéoarthrose (OA)

Présenté par :

Mamadou samba Boiro

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Philippe Crine, président-rapporteur

Alain Moreau, directeur de recherche

Nikolaus Heveker, membre du jury

Résumé

L'ostéoarthrose (OA) est une maladie articulaire dont l'incidence augmente avec le vieillissement de la population. Elle se caractérise par une détérioration progressive du cartilage articulaire accompagnée du remodelage de l'os sous-chondral et du changement des tissus mous de l'articulation. La douleur et le dysfonctionnement de l'articulation affectée sont généralement attribués à l'inflammation et l'épanchement de la synovie. Plusieurs évidences indiquent que l'inflammation de la membrane synoviale contribue grandement à la pathogenèse de l'OA. En effet, la synthèse et l'expression des enzymes protéolytiques qui dégradent la matrice cartilagineuse sont régulées par de nombreuses cytokines retrouvées au sein de ce foyer inflammatoire. Deux d'entre elles, l'interleukine-1 beta (IL-1 β) et le «tumor necrosis factor» alpha (TNF- α), jouent un rôle majeur dans le déclenchement de l'inflammation associée à l'OA. Ces cytokines pro-inflammatoires agissent notamment sur les synoviocytes et les chondrocytes en activant NF- κ B qui, à son tour, active les gènes de cytokines. Cette boucle de régulation positive amplifie et perpétue la réponse inflammatoire. Récemment, il a été rapporté que l'activation de NF- κ B par TNF- α peut être potentialisée par EXTL3, un récepteur transmembranaire ; mais le mécanisme sous-jacent de cet effet demeure inconnu. Toutefois, les niveaux important d'EXTL3 et de son ligand Reg1B chez les patients arthrosiques, laissent croire que ces protéines jouent un rôle dans le développement de l'OA.

Notre objectif était d'étudier le mécanisme par lequel EXTL3 amplifie l'activation de NF- κ B par TNF- α et d'examiner si ce phénomène se produit aussi avec l'IL-1 β . Nous avons utilisé les cellules C28/I2, une lignée cellulaire de chondrocytes, comme modèle d'étude. Les transfections transitoires avec un vecteur d'expression, les techniques d'immunofluorescence (IF), d'immunoprécipitation (IP) et d'immunobuvardage de type Western (IB); ont été utilisées dans le cadre de diverses approches expérimentales. Les résultats obtenus par transfection ont révélé que la protéine EXTL3 potentialisait l'activation de NF- κ B aussi bien par IL-1 β que par TNF- α . Ce résultat signifie que la

potentialisation de l'activité NF- κ B par EXTL3 n'est pas spécifique à TNF- α . D'autre part, l'IP avec TNFRI et TRAF2 a révélé la présence d'EXTL3 dans le complexe TNF- α /TNFRI/TRAF2 qui se forme au niveau de la membrane plasmique. De plus, ceci a été confirmé *in vivo* par microscopie confocale montrant la co-localisation de TNFRI-TRAF2-EXTL3 dans la membrane nucléaire, suggérant ainsi la formation d'un complexe identique au niveau des membranes plasmique et nucléaires. Toutefois, la présence du ligand Reg1B et/ou de la glucosamine inhibait la formation de ce complexe au niveau de la membrane plasmique, tout comme ils abolissaient la potentialisation de l'activité NF- κ B par EXTL3. Ces résultats suggèrent non seulement que le recrutement d'EXTL3 libre dans le complexe TNF- α /TNFR1 est requis pour amplifier l'activation de NF- κ B par TNF- α , mais aussi la capacité du ligand Reg1B et de la glucosamine à moduler cette activation à travers la baisse ou l'inhibition de l'interaction EXTL3-TNFR1.

Les données de cette étude constituent une avancée majeure dans la compréhension des événements moléculaires qui contrôlent l'activation de NF- κ B par les cytokines pro-inflammatoires. Ces résultats pourraient conduire au développement de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement de l'inflammation associée à l'OA et impliquant une activation incessante de NF- κ B.

Mots-clés : Ostéoarthrose, inflammation, NF- κ B, EXTL3, REG, glucosamine.

Abstract

Osteoarthritis (OA) is an articular disease with a particularly high incidence in the elderly. This disease is characterized by the progressive degeneration of the cartilage followed by subchondral bone remodelling and a change in the soft tissues of the joint. Local chronic pain and joint malfunction are generally attributed to the inflammation of the synovial membrane, which in itself has been shown to significantly contribute to the pathogenesis of OA. In fact, the synthesis and expression of many proteolytic enzymes which degrade cartilage matrix are regulated by numerous cytokines originating from these inflammation sites. Two pro-inflammatory cytokines, the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and the interleukine-1 β (IL-1 β), play a major role in triggering inflammation associated with OA. These cytokines act on synoviocytes and chondrocytes by activating the transcription factor NF- κ B, which in turn activates the cytokines' genes. This positive regulating loop amplifies and maintains inflammatory responses. Recently, studies have shown that the over-expression of the REG receptor/EXTL3, a transmembranous receptor, enhances the activity of cytokine TNF- α in the activation of NF- κ B. Unfortunately the mechanism involved in this process is still unknown. In addition, levels of EXTL3 and its ligand REG1B observed in OA patients suggest their possible involvement in the development of OA.

Our goal was to study and elucidated the mechanisms used by EXTL3 to amplify NF- κ B activation by TNF- α , as well as to examine whether the same phenomenon is occurring with IL- β . A human chondrocytes cell line called C28/I2 as experimental model. The techniques used for the current study were transfection assays, immunoflorescence (IF), immunoprecipitation (IP), and Western blotting (WB). Our transfection data have shown that EXTL3 was able to enhance NF- κ B activity induced by TNF- α as well as by IL-1 β . This result suggests that the enhanced NF- κ B activity by EXTL3 is not specific to TNF- α . The IP experiments with TNFR1 and TRAF2 revealed the presence of EXTL3 in TNF- α /TNFR1 complex which is formed in the plasma membrane. Also, IF assay in combination with confocal microscopy allowed us to detect TNFR1/TRAF2/EXTL3 co-localisation on

the nuclear membrane, suggesting the formation of TNF- α /TNFR1 complex on both the nuclear and plasma membranes. Somehow, REG1B, an EXTL3 ligand, and glucosamine were able to inhibit the formation of this complex at the plasma membrane. They were also able to abolish NF- κ B activity enhanced by EXTL3. These results suggest that not only EXTL3 recruitment in the TNF- α /TNFR1 complex is required to amplify NF- κ B activation by TNF- α , but also that REG1B ligand and glucosamine have the ability to modulate this activation by reducing or inhibiting EXTL3 and TNFR1 interactions.

This study's data represents a major advance in the understanding of molecular events controlling NF- κ B activation by pro-inflammatory cytokines. These results could lead to the development of new therapeutics targets, in the treatment of disorders associated to OA and involving recurrent activation of NF- κ B.

Keywords: Osteoarthritis, Inflammation, NF- κ B, EXTL3, REG, Glucosamine.

Table des matières

Page titre	i
Identification du jury	ii
Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Liste des sigles et abréviations	xiv
Remerciements	xix
CHAPITRE 1 : Introduction	1
1.1. L'OSTÉOARTHROSE (OA).....	2
1.1.1. Vue générale.....	2
1.1.2. Incidence et facteurs de risque.....	3
1.1.2.1. Facteurs génétiques et héréditaires.....	3
1.1.2.2. Facteurs constitutionnels.....	3
1.1.2.2.1. Le désordre congénital et développemental.....	3
1.1.2.2.2. L'âge	4
1.1.2.2.3. Le sexe	4
1.1.2.3. Les facteurs locaux.....	5
1.1.2.3.1. L'obésité.....	5
1.1.2.3.2. Occupation et blessures.....	5
1.1.2.3.3. Alignement des articulations	5
1.1.3. Pathogenèse de l'OA.....	6
1.1.3.1. Cartilage articulaire	7
1.1.3.1.1. Structure et fonction.....	7
1.1.3.1.2. Homéostasie du cartilage	7
1.1.3.1.3. Facteurs anaboliques et cataboliques.....	10

1.1.3.2.	L'os sous-chondral	11
1.1.3.3.	La membrane synoviale	12
1.1.4.	Diagnostic et traitements	13
1.2.	L'inflammation de la membrane synoviale	14
1.2.1.	Rôle dans l'ostéoarthrose (OA)	14
1.2.2.	Les molécules impliquées dans l'inflammation	15
1.2.2.1.	Cytokines pro-inflammatoires	16
1.2.2.1.1.	IL-1 β et TNF- α	17
1.2.2.2.	Voie de signalisation de NF- κ B	20
1.3.	La signalisation par TNF- α	22
1.3.1.	Biologie de TNF- α	22
1.3.2.	Superfamille des récepteurs TNF (TNFR)	23
1.3.2.1.	Récepteur TNFR I	25
1.3.2.2.	Récepteur TNFR II	26
1.3.2.3.	TRADD	26
1.3.2.4.	FADD	27
1.3.2.5.	TRAF2	27
1.3.2.6.	RIP	28
1.4.	EXTL3: le récepteur REG	29
1.4.1.	Membre de la famille EXTL3	29
1.4.2.	Structure et localisation cellulaire des EXT/EXTL	30
1.4.3.	Rôle des membres EXT/EXTL	32
1.4.3.1.	Synthèse des chaînes d'héparane sulfate	32
1.4.3.2.	Autres rôles des EXT/EXTL	33
1.4.4.	Contribution des EXT/EXTL dans certaines pathologies Humaines	38
1.5.	Membres de la famille REG	40
1.5.1.	Généralités	40
1.5.2.	Structure et localisation	42
1.5.3.	REG et pathologies humaines	44

1.5.3.1.	Reg dans la réponse inflammatoire et en conditions traumatiques	44
1.5.3.2.	Reg et diabète.....	45
1.5.3.3.	Reg et cancers	45
1.6.	Problématique	48
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		50
2.1.	Matériel.....	51
2.1.1.	Lignées cellulaires	51
2.1.2.	Plasmides.....	51
2.1.3.	Solutions et matériel de transfection.....	52
2.1.4.	Amorces	53
2.1.5.	Protéines recombinantes et drogues.....	53
2.1.6.	Anticorps	54
2.1.7.	Microscope à fluorescence et microscope confocal	54
2.2.	Méthodes.....	55
2.2.1.	Transfection, essais luciférase et de β -galactosidase	55
2.2.2.	Extraction d'ARN, RT-PCR et qPCR.....	55
2.2.3.	Extraction des protéines totales	56
2.2.4.	Séparation des protéines nucléaires et cytoplasmiques.....	56
2.2.5.	Extraction des protéines membranaires	57
2.2.6.	Essais d'immunoprécipitation	59
2.2.7.	Immunobuvardage de type Western	60
2.2.8.	Essais d'immunofluorescence	60
CHAPITRE 3 : RESULTATS		62
3.1.	Effet de la protéine EXTL3 sur l'activité NF- κ B.....	63
3.2.	Caractérisation du mécanisme d'activation de la voie NF- κ B dans les C28/I2.	66
3.3.	Effet de la cytokine TNF- α sur le complexe TNFR1/EXTL3.....	69
3.4.	Distribution cellulaire des protéines EXTL3, TNFR1 et TRAF2.....	71
3.5.	Formation d'un complexe constitué des protéines EXTL3, TRAF2 et TNFR1 dans la région périnucléaire.....	72

3.6.	La cytokine TNF- α induit une translocation des récepteurs EXTL3 et TNFR1 dans le temps.	74
3.7.	Le ligand Reg1B module l'activité NF- κ B induite par TNF- α dans les cellules C28/I2 surexprimant le récepteur Reg/EXTL3.	76
3.8.	La glucosamine inhibe l'activation de NF- κ B par TNF- α dans les cellules C28/I2 surexprimant EXTL3.	78
3.9.	Effet de la glucosamine sur le niveau d'expression du gène EXTL3.....	80
	CHAPITRE 4 : Discussion.....	82
4.1.	Le récepteur REG/EXTL3 amplifie l'activité NF- κ B induite par les cytokines pro-inflammatoire TNF- α et IL- β	83
4.2.	Caractérisation du mécanisme d'activation de la voie NF- κ B dans les C28/I2.	84
4.3.	Effet de la cytokine TNF- α sur la formation du complexe TNFR1/EXTL3 au cours du temps.....	86
4.4.	Distribution cellulaire des protéines EXTL3, TNFR1 et TRAF2.	88
4.5.	Formation du complexe protéique : EXTL3/TRAF2/TNFR1 dans la région périnucléaire.	88
4.6.	La cytokine TNF- α induit une translocation des récepteurs EXTL3 et TNFR1 dans le temps.	90
4.7.	Le ligand Reg1B module l'activité NF- κ B induite par TNF- α dans les cellules C28/I2 surexprimant le récepteur Reg/EXTL3.	91
4.8.	La glucosamine inhibe l'activation de NF- κ B par TNF α dans les cellules C28/I2 surexprimant EXTL3.	92
4.9.	Effet de la glucosamine sur le niveau d'expression du gène EXTL3.....	93
	CHAPITRE 5 : Conclusion ET perspectives.....	95
5.1.	Conclusion	96
5.2.	Perspectives.....	97
	BIBLIOGRAPHIE	98
	ANNEXE	117

Liste des tableaux

Tableau I :	Cytokines pro-inflammatoires impliquées dans l'OA.	19
Tableau II :	Comparaison des cinq membres de la famille de gènes EXT/EXTL	38
Tableau III :	Contribution des EXT/EXTL dans certaines pathologies Humaines	39
Tableau IV :	Membres Important de la famille REG.....	43
Tableau V :	Implication des protéines Reg dans les maladies humaines.....	47
Tableau VI :	Plasmides utilisés pour la transfection	52
Tableau VII :	Amorces utilisées pour l'analyse d'expression génique.	53
Tableau VIII :	Anticorps utilisés pour les immunobuvardages de type Western et les immunofluorescences.....	54

Liste des figures

Figure 1 :	Mécanismes moléculaires et acteurs impliqués dans la pathogenèse de l'OA.	9
Figure 2 :	Diagramme de NF- κ B comme régulateur inflammatoire.	22
Figure 3 :	Analyse immunohistochimique des protéines EXTL3, REG1B dans le cartilage humain.....	35
Figure 4 :	Signalisation de la voie Reg et son rôle postulé dans l'inflammation.	36
Figure 5 :	Le récepteur Reg/EXTL3 contient un domaine de liaison à TRAF2.	37
Figure 6 :	Hypothèse de la signalisation TNF/TNFR1-EXTL3 dans l'activation de NF- κ B.....	49
Figure 7 :	Activation du rapporteur NF- κ B induite par les cytokines pro-inflammatoires dans les C28/I2 surexprimant EXTL3.	65
Figure 8 :	Analyse d'expression des protéines EXTL3, TNFR1 et TRAF2 dans les cellules C28/I2.....	67
Figure 9 :	TNF- α entraîne la formation d'un complexe protéique EXTL3- TRAF2- TNFR1 au niveau de la membranaire plasmique.	68
Figure 10 :	Compartmentalisation du récepteur Reg/EXTL3 au cours du temps en réponse à la cytokine TNF- α	70
Figure 11 :	Localisation cellulaire des protéines EXTL3, TNFR1 et TRAF2.	71
Figure 12 :	Co-localisation des protéines EXTL3, TNFR1 et TRAF2 dans la membrane ou enveloppe nucléaire.....	73
Figure 13 :	Distribution cellulaire des protéines EXTL3 et TNFR1 en fonction du temps dans les chondrocytes traités au TNF- α	75
Figure 14 :	Reg1B module l'activité du rapporteur NF- κ B induite par TNF- α dans les cellules C28/I2 surexprimant le récepteur Reg ou EXTL3.....	77
Figure 15 :	La glucosamine inhibe l'activation de NF- κ B par TNF- α dans les cellules C28/I2 surexprimant EXTL3.....	79
Figure 16 :	Effet de la glucosamine sur le niveau d'expression du gène EXTL3.....	81

Liste des sigles et abréviations

aa :	Acides aminés
ADAM :	A Disintegrin and Metalloprotease
ADNc :	ADN complémentaire
BIR :	Baculovirus IAP repeat domains
BMPs :	Bone morphogenetic proteins
C. elegans :	Caenorhabditis elegans
CD :	Domaine cytoplasmique
CDMPs :	Cartilage-derived morphogenic proteins
cIAP :	cellular Inhibitor of apoptosis protein
COX :	Cyclooxygenase
COX IV:	Cytochrome c Oxidase IV
CRC :	Cancer colorectal
CRF :	Corticotropin-releasing factor
C-term :	Carboxyl-terminale
CTLD :	C-type lectin-like domain
CTRL :	Contrôle
D melanogaster :	Drosophila melanogaster
DD :	Death domain
ECD :	Domaine extracellulaire
ECL :	Enterochromaffin-like
ERK :	Extracellular Signal-Regulated Kinase
EXT :	Exostose gene
EXTL :	EXT-Like genes
FADD :	Fas associated death domain protein
Fas :	Apoptosis Stimulating Fragment
FasL :	Fas Ligand
FGFR :	FGF receptor

FGFs :	Fibroblast growth factors
FN :	Fibronectine
GAGs :	Glycosaminoglycans
Gal :	Galactose
GalNAc :	N-acétylgalactosamine
GlcA :	Acide glucoronique
GlcN :	Glucosamine
GlcNAc :	N-acetylglucosamine
HA :	Acide hyaluronique
HIP :	Hepatocarcinoma-intestine-pancreas
HME :	Syndrome d'exostose héréditaire multiple
HS :	Héparane sulfate
HSPG :	Héparanes sulfates protéoglycan
IB :	Immunobuvardage
IGF-1 :	Insulin-like growth factor
Ihh :	Indian Hedgehog
IKK :	Serines/Threonines Kinases I κ B Kinase
IL-17 :	Interleukin-17
IL-18 :	Interleukin -18
IL-1Ra :	Interleukin receptor a
IL-1 β :	Interleukin-1 beta
IL-6 :	Interleukin-6
IL-8 :	Interleukin-8
iNOS :	Oxyde nitrique synthétase
IP :	Immunoprécipitation
IRM :	Imagerie par résonance magnétique
I κ B :	Inhibitory κ B protein
JNK :	c-Jun N-terminal kinase
LAC :	Ligament antérieur croisé

LGS :	Syndrome de Langer Giedion
LIF :	Leukemia inhibitory factor
Luc :	Luciférase
MAPK :	Mitogen Activated Protein Kinase
MEC :	Matrice extracellulaire du cartilage
memTNF :	Membranous TNF
MK :	MAPK kinases
MKK :	MAPK kinases kinases
MMPs :	Matrix Metalloproteinase Proteins
MPS :	Mucopolysaccharidose
MSI :	Microsatellite instability
NF- κ B :	Nuclear Factor Kappa B
NO :	Oxyde nitrique
N-term :	Amino-terminale
OA :	Ostéoarthrose
ORF :	Pen reading frame
PAP :	Pancreatic associated protein
PARP :	Poly (ADP-ribose) synthetase/polymerase
PGE2 :	Prostaglandines-2
PSP :	pancreatic stone protein
PTHrP :	Parathyroid Hormone related-Protein
PTP :	Pancreatic thread protein
RA :	Arthrite rhumatoïde
RE :	Réticulum endoplasmique
Reg :	Regenerating
RIP :	Receptor interacting protein
RNAi :	RNA inhibitor
shRNA :	small hairpin RNA
SDT :	Suppresseur de tumeur

Ser :	Sérine
sTNF :	Soluble TNF
TACE :	TNF alpha converting enzyme
TGF- β :	Tumor growth factor- β
TIM :	TRAF interaction motif
TM :	Domaine transmembranaire
TNFR1 :	TNF receptor type 1
TNFR2 :	TNF receptor type 2
TNFR :	TNF receptor
TNF- α :	Tumour necrosis factor
TRADD :	TNFR associated death domain
TRAF2 :	TNF receptor-associated factor 2
TRAF :	TNF receptor-associated factor
VCAM :	Vascular cell adhesion molecule
VEGF :	Vascular endothelial growth factor
VIP :	Vasoactive intestinal peptide
Wg :	Wnt-Wingless
X-C :	Extraits cytosoliques
X-MP :	Extraits membranaires plasmique
Xyl :	Xylose

Je voudrais dédier ce mémoire à ma mère et à mon père. Je me sens privilégié d'avoir des parents comme vous. Tout le mérite vous revient indéniablement, car vous m'avez toujours mis dans les meilleures dispositions possibles. Merci pour votre soutien moral et financier. Merci surtout d'avoir guidé et encadré mes pas depuis ma tendre enfance, jusqu'à ma vie d'adulte. Aujourd'hui, j'espère que vous êtes fiers de moi, plus que je ne le suis moi-même. De la part de votre fils qui vous aime plus que tout. Hadji!

Remerciements

Je voudrais remercier mon directeur de recherche le Dr Alain Moreau à qui, je dois une grande partie de ma réussite scolaire. Je le remercie d'avoir toujours cru en moi dans les bons et dans les moins bons moments. Je le remercie également de m'avoir donné l'opportunité d'être dans un laboratoire aussi dynamique que convivial, et surtout d'avoir éclairé mes pas tout au long de mon stage et de mon projet de maitrise. Il a su me communiquer l'envie et la passion, qui sont deux éléments fondamentaux à la réussite. Finalement, je dirais qu'il a sans conteste fait de moi une meilleure personne, tant sur le plan humain que scientifique.

Merci... tantie Néné Amy Barry de vos judicieux conseils et pour tout le soutien moral et psychologique.

Merci... au Dr Marie-Yvonne Akoumé pour l'ensemble de son œuvre! Support scientifique et psychologique. Marie-Yvonne est dotée d'une patience incroyable! Merci d'avoir pris le peu de temps dont tu disposais pour m'écouter et me guider! Merci pour ta contribution et ton aide dans l'écriture de ce mémoire! Je te suis infiniment reconnaissant!

Merci... au Dr Maryam Taheri de m'avoir si bien supervisé durant mon projet de maitrise. Merci à Roxanne Doucet et à Cynthia Picard pour votre contribution et vos discussions passionnantes. Merci aussi aux autres membres du laboratoire qui m'ont rendu la vie si agréable !

Merci... à Isabelle Turgeon qui même si elle n'est plus dans le laboratoire, a grandement contribué à ma formation. Un merci spécial à Anita Franco qui occupe une place particulière dans mon cœur. Anita je te remercie d'avoir toujours été là pour moi et d'avoir eu autant de patience à mon égard. Pour moi, tu resteras une amie à jamais quoiqu'il arrive.

Finalement, je voudrais remercier mes autres amies de Sainte-Justine, sans qui la vie n'aurait jamais été pareille; avec une mention spéciale à Nancy Karam, Khalil Miloudi, Thierry Mintya, Dominika Kozubska, Charlotte Zaouter, Michelle Dion et Mohamed El Bakry.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1. L'OSTÉOARTHROSE (OA)

1.1.1. Vue générale

L'arthrose ou ostéoarthrose (OA) est une pathologie fréquente qui affecte la majorité des articulations incluant les genoux, les mains et pieds, les hanches, les épaules, le cou et la colonne vertébrale. L'OA se caractérise principalement par une dégénérescence progressive du cartilage articulaire. Toutefois au cours de sa progression, l'OA affecte l'articulation toute entière incluant : l'os sous-chondral dont la condensation et le remodelage aboutit le plus souvent à la formation d'ostéophytes (excroissances osseuses). On observe aussi un degré variable d'inflammation de la membrane synoviale, voire même une destruction de cette dernière dans le temps (Sharma and Berenbaum 2007). Les personnes atteintes d'arthrose souffrent de douleurs chroniques liées à l'inflammation de la membrane synoviale; d'une déformation, d'une perte ou diminution des fonctions articulaires (Bird 2003).

La définition moderne classe l'OA de deux façons: l'arthrose primaire et secondaire. Le premier cas est un phénomène idiopathique avec une composante génétique, c'est-à-dire dont l'étiologie est inconnue. Il se produit au fil du temps au niveau des articulations normales, ce, sans facteurs de risque apparents tels les blessures ou les anomalies développementales. L'OA primaire semble de toute évidence associée à l'âge, bien que ce dernier n'en soit pas la cause directe. La pathologie est caractérisée par une fibrillation du cartilage, qui s'accompagne d'une sclérose de l'os sous-chondral servant de support au cartilage articulaire. La formation de kystes osseux, et d'excroissances osseuses sont aussi observées (Dieppe and Kirwan 1994; Valdes and Spector 2009). En ce qui concerne l'OA secondaire, celle-ci implique la combinaison de facteurs diverse, mais les symptômes de la pathologie sont identiques à ceux observés dans l'OA primaire (Simon, Grierson et al. 2009). Les facteurs de risque pour l'OA secondaire sont entre autres le désordre congénital, le diabète, les maladies inflammatoires, les blessures articulaires liées aux accidents, les changements hormonaux, l'instabilité ou la détérioration ligamentaire, la faiblesse

musculaire, l'obésité, les blessures sportive, les grossesses, la maladie de Wilson (Weinstein 1997; Simon, Grierson et al. 2009).

1.1.2. Incidence et facteurs de risque

L'incidence de l'arthrose augmente avec le vieillissement de la population, et un tiers des personnes âgées de 65 ans et plus en sont atteintes (Conrozier and Flipo 2003). Ce nombre dans les pays industrialisés devrait augmenter de 71% d'ici 2020. On estime aussi que l'incidence des personnes atteintes d'OA sera plus grande que celles atteintes du VIH dans les années à venir (Murray and Lopez 1997). L'OA représente de ce fait un défi socio-économique important. Bien que l'étiologie de la maladie soit encore inconnue, l'OA est considérée comme une maladie multifactorielle.

1.1.2.1. Facteurs génétiques et héréditaires

Des études effectuées sur des jumeaux et des familles montrent que l'OA chez les femmes, présentait un taux d'hérédité de 40-65%. Les mêmes études suggèrent l'existence de prédispositions génétiques au développement de l'OA (Spector, Cicuttini et al. 1996). Plusieurs gènes de susceptibilité à l'OA ont été identifiés au cours des dernières années, toutefois leur rôles dans le développement, ou la progression de l'arthrose reste à prouver (Zhang and Jordan 2008).

1.1.2.2. Facteurs constitutionnels

1.1.2.2.1. Le désordre congénital et développemental

Certaines anomalies congénitales ou développementales ont été identifiées comme ayant un rôle dans le développement de l'arthrose. Par exemple, la maladie de «Legg-Calvé-Perthes» est un désordre se traduisant par la malformation de la tête fémorale et de

l'acetabulum, qui mèneront éventuellement au développement précoce de l'arthrose des hanches (Weinstein 1997).

1.1.2.2.2. L'âge

L'âge constitue le facteur de risque le plus important dans le développement de l'OA. L'augmentation de l'incidence et de la prévalence de l'arthrose chez les personnes âgées, est une conséquence de l'exposition à plusieurs facteurs de risques, et des changements biologiques survenant dans la structure et dans la composition du cartilage au cours du vieillissement (Felson, Lawrence et al. 2000). Ces modifications affectent d'une part, les propriétés biomécaniques de la matrice extracellulaire du cartilage (MEC), et d'autre part sa capacité de régénération; le rendant susceptible au développement de l'OA (Ding, Cicuttini et al. 2005). Bien que l'arthrose soit fréquente dans la population de personnes âgées, ce dernier n'est pas un processus normal du vieillissement pour autant.

1.1.2.2.3. Le sexe

Des études réalisées récemment indiquent que les femmes sont plus susceptibles à développer l'arthrose que les hommes, et qu'elles sont aussi plus sévèrement touchées (Srikanth, Fryer et al. 2005). L'augmentation drastique de l'OA chez les femmes ménopausées a conduit à établir un lien entre les facteurs hormonaux (les œstrogènes) et la progression de l'arthrose (Wluka, Cicuttini et al. 2000). Les résultats qui découlent de ces études sont très contradictoires. Certains mentionnent un rôle protecteur des œstrogènes dans la prévalence de l'OA (Hannan, Felson et al. 1990; Nevitt, Cummings et al. 1996), alors que d'autres sont persuadés du contraire (Nevitt, Felson et al. 2001).

1.1.2.3. Les facteurs locaux

1.1.2.3.1. L'obésité

L'obésité est reconnue comme étant un facteur de risque potentiel dans l'arthrose des hanches et des genoux (Felson, Lawrence et al. 2000). Une étude en particulier montre que la perte de poids réduisait fortement les risques de développer l'arthrose des genoux (Felson, Zhang et al. 1992). L'augmentation des forces mécaniques exercées sur les articulations, est un des mécanismes par lequel l'obésité contribue au développement de l'OA. La surcharge biomécanique des genoux et des hanches pourrait ainsi favoriser la dégradation prématurée du cartilage et éventuellement la perte du support structural de l'articulation (Zhang and Jordan 2008).

1.1.2.3.2. Occupation et blessures

L'utilisation accrue de l'articulation par des mouvements répétitifs est connue pour être associée aux risques de développer l'OA. Différentes études soulignent que les fermiers, les sportifs de haut niveau, tout comme les personnes dont le travail requiert de porter des charges, de s'accroupir, et de s'agenouiller; ont une prévalence élevée d'arthrose des hanches et des genoux (Lawrence 1961; Hadler, Gillings et al. 1978; Felson, Hannan et al. 1991). Dans le cas des sportifs de haut niveau comme les joueurs de soccer, le risque accru de blessure articulaire ou de déchirure du ligament antérieur croisé (LAC), les rend plus susceptible au développement de l'OA (Roos, Lindberg et al. 1994; Kujala, Kettunen et al. 1995).

1.1.2.3.3. Alignement des articulations

L'association entre l'incidence de l'OA et le mauvais alignement des joints articulaires reste peu documentée. Toutefois on sait qu'une articulation saine constitue un élément clé dans la distribution des charges et forces mécaniques subies par le cartilage (Zhang and

Jordan 2008). C'est donc en toute logique qu'on associe le mauvais alignement des articulations à la prévalence, et à la progression de l'arthrose.

1.1.3. Pathogenèse de l'OA

Comme les premiers symptômes de l'OA se traduisent par des changements importants au niveau du cartilage articulaire, on a longtemps considéré la destruction de ce dernier comme étant le mécanisme initiateur dans la pathogenèse de l'OA. La plupart des études se sont ainsi focalisées sur les mécanismes impliqués dans la destruction du cartilage (Sharma et Berenbaum 2007). Les avancées récentes dans le domaine de l'OA, suggèrent une implication globale des tissus majeurs de l'articulation dans la pathogenèse de la maladie. Les travaux de Radin et al. (1972) sont les premiers à mentionner un rôle de l'os sous-chondral dans le processus de l'OA. Toutefois, ceux-ci sont fort controversés. Certains groupes affirment que les changements dans le métabolisme de l'os sous-chondral précèdent les lésions du cartilage (Radin and Rose 1986; Carlson, Loeser et al. 1996). D'autres à l'inverse, pensent que le remodelage de l'os sous-chondral a lieu simultanément, voire même après les lésions du cartilage articulaire et par conséquent ne serait qu'une conséquence de la dégradation de ce dernier (Brandt 1994; Pastoureau, Chomel et al. 1999). Finalement, l'inflammation de la membrane synoviale contribue aussi dans la pathogenèse de l'arthrose, bien qu'étant considérée comme un évènement secondaire dans son déclenchement.

1.1.3.1. Cartilage articulaire

1.1.3.1.1. Structure et fonction

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif hyalin, avasculaire, aneural qui recouvre l'extrémité des jointures formant l'articulation. Il permet d'absorber et de disperser les chocs et forces mécaniques exercés sur l'articulation, tout en assurant l'intégrité et la souplesse de mouvement de celle-ci. La propriété unique du cartilage est liée à la composition et à la structure de sa matrice extracellulaire. Le cartilage est également composé d'un type unique de cellules nommées chondrocytes dont le rôle est d'assurer la synthèse et le maintien des constituants de la MEC (Ulrich-Vinther, Maloney et al. 2003). La MEC est formée d'un vaste réseau de fibres de collagène de types II, mais aussi des types VI, IX, et XI en quantité plus faible. Les protéoglycans, en particuliers les agrécans, constituent la seconde portion de la MEC. Ce sont des protéines incorporées au réseau de collagène, et formées d'un filament central d'acide hyaluronique (HA) sur lequel viennent se greffer plusieurs chaînes de glycosaminoglycans (GAGs). Finalement, l'eau via laquelle le système articulaire est lubrifié, représente le composant principal de la MEC. Elle assure de part sa diffusion, le déplacement des nutriments du fluide synovial jusqu' au cartilage pour nourrir les chondrocytes (Martel-Pelletier, Boileau et al. 2008).

1.1.3.1.2. Homéostasie du cartilage

L'intégrité du cartilage articulaire dépend du remodelage des composants de la MEC par les chondrocytes, constituant 2-5% du tissu total. Les chondrocytes sont des cellules métaboliquement inactives à cause de l'absence d'innervation et de vascularisation dans le cartilage (Goldring 2006). Cependant, la présence de récepteurs au niveau de la surface cellulaire leur permet de répondre et de réagir à différents stimulus (mécaniques, facteurs de croissance, cytokines). Chez l'adulte, les chondrocytes articulaires sont totalement différenciés avec une faible activité de synthèse, associée au ralentissement de la

production des composants de la MEC, tels le collagène de type II dont la demi-vie est estimée à 100 ans (Verzijl, DeGroot et al. 2000), et les aggrécanes avec une demi-vie de 24 ans (Maroudas, Bayliss et al. 1998). Dans les conditions physiologiques, les chondrocytes assurent un état d'équilibre entre les facteurs anaboliques et cataboliques, permettant ainsi le maintien de la structure et de la fonction de la matrice extracellulaire du cartilage.

Toutefois dans l'OA, l'équilibre homéostatique du cartilage est perturbé par un comportement aberrant des chondrocytes, suite aux changements structuraux dans l'environnement de la MEC. Ce débalancement stimule non seulement, la production d'enzymes protéolytiques de la MEC, mais entraîne aussi l'inhibition des mécanismes de réparation. En effet, des études démontrent que les stades précoces de l'OA sont marqués par une tentative de régénération de la matrice, se traduisant par une prolifération accrue des chondrocytes. Cette augmentation est associée à la synthèse de quantités importantes de collagène de type II, IX, X, et d'aggrécanes (Aigner, Gluckert et al. 1997). A mesure que les dommages s'intensifient, les chondrocytes deviennent incapables de restaurer fidèlement l'architecture de la matrice. Les mécanismes cataboliques prennent dans ce cas le dessus sur les processus anaboliques. Enfin, les stades avancés de la maladie se caractérisent par une perte de la MEC combinée à une fibrillation importante de la surface articulaire, et à une diminution majeure de l'épaisseur du cartilage (Pritzker, Gay et al. 2006). Cela est dû en partie à l'hypertrophie, à la sénescence et à l'apoptose des chondrocytes qui représentent l'unique source de synthèse des composants de la matrice extracellulaire du cartilage (Sandell and Aigner 2001).

La figure 1 résume les principaux événements et les acteurs impliqués dans la pathogenèse de l'ostéoarthrose.

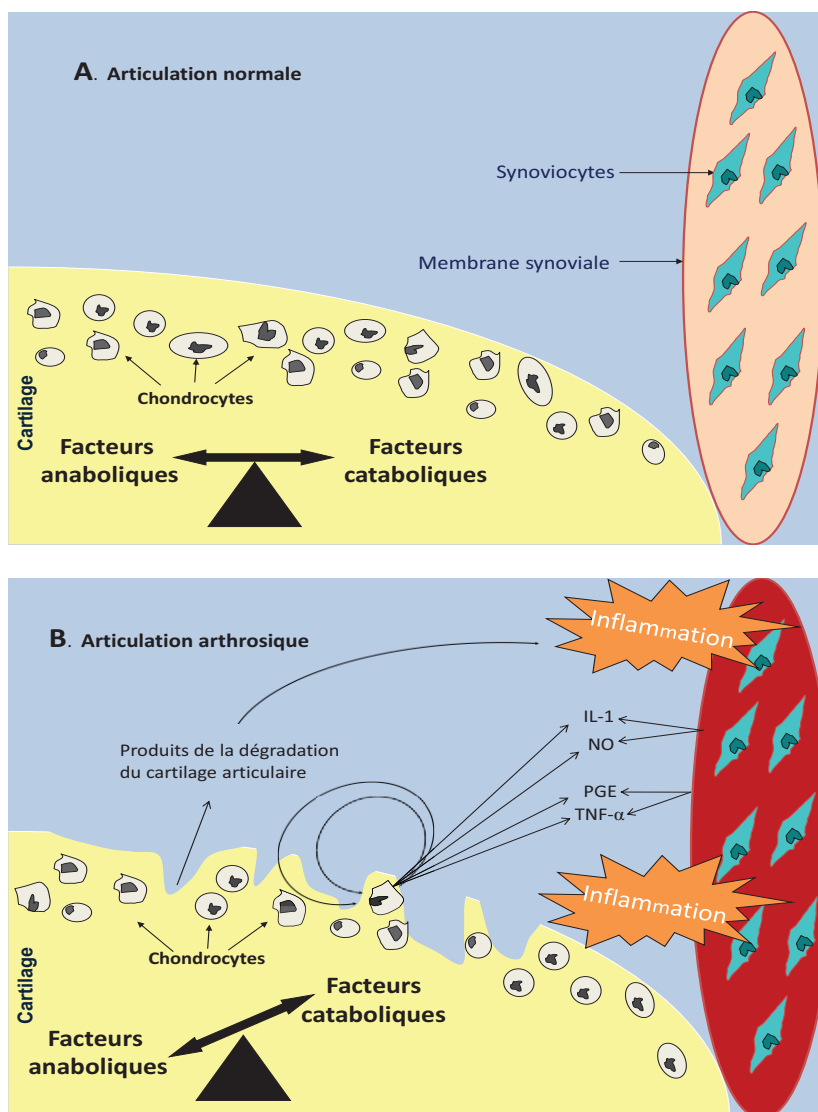


Figure 1 : Mécanismes moléculaires et acteurs impliqués dans la pathogenèse de l'OA.

Adaptation faite à partir de Krasnokutsky et al, 2007. **A)** Dans l'articulation normale, un équilibre homéostatique est établi entre les facteurs de dégradation du cartilage (cataboliques) et les facteurs de synthèse (anaboliques). **B)** Au niveau de l'articulation arthrosique, des signaux métaboliques et de dégradation sont générés par les médiateurs pro-inflammatoires issus de la membrane synoviale à majorité, mais aussi du cartilage et de l'os. Comme conséquence, l'équilibre homéostatique est perturbé en faveur des facteurs cataboliques.

1.1.3.1.3. Facteurs anaboliques et cataboliques

Les facteurs anaboliques considérés comme des régulateurs positifs de l'homéostasie du cartilage articulaire mature, sont impliqués dans la production des composants de la MEC. Ils regroupent les facteurs de croissance et de différenciation, capables de moduler de façon paracrine ou autocrine, l'activité anabolique des chondrocytes, qui est associée à la synthèse des composants de la MEC. Dans certains cas, les facteurs anaboliques sont capables d'inhiber l'activité catabolique. Des études ont montré que TGF- β (Tumor growth factor-Beta) était capable de stimuler la synthèse de collagène et de protéoglycans, tout en inhibant la dégénérescence de la matrice cartilagineuse (Trippel 1995). De plus, le niveau d'expression ou d'activité de la plupart des facteurs anaboliques diminue avec l'âge. Les mieux caractérisés sont: IGF-1 (insulin-like growth factor), BMPs (bone morphogenetic proteins), OP-1 (osteogenic protein-1), CDMPs (cartilage-derived morphogenic proteins), TGF- β (Tumor growth factor-Beta), et FGFs (fibroblast growth factors) (Loeser, 2004; Denko, 2005).

Les événements majeurs du catabolisme impliqués dans la pathogenèse de l'OA se situent au niveau du cartilage en soi. Les chondrocytes contribuent aussi au processus de destruction de la matrice. D'une part, en réagissant aux signaux des cytokines cataboliques provenant des tissus avoisinants, et d'autre part, via des mécanismes autocrines ou paracrines qui entraînent la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et d'enzymes protéolytiques responsables de la perte de la MEC (Goldring et Goldring, 2004; Goldring et Berenbaum, 2004). Les enzymes de dégradation les plus exprimées lors du processus cataboliques sont les MMPs (matrix metalloproteinase proteins), et les aggrecanases. Les cytokines les plus étudiées dans la pathogenèse de l'OA sont l'IL-1 β (interleukin-1 beta) et le TNF- α (tumeur necrosis factor). Ces deux cytokines stimulent la synthèse des PGE2 (prostaglandin E2), du NO (nitric oxide), mais également d'autres cytokines pro-inflammatoires comme IL-6, IL-8, IL-17, IL-18, et les chemokines (Goldring and

Berenbaum 2004; Goldring and Goldring 2004). Il existe aussi d'autres facteurs cataboliques de moindre importance comme la fibronectine, la leptine et les neuropeptides.

1.1.3.2. L'os sous-chondral

L'os sous-chondral est une structure corticale osseuse dont l'extrémité possède une surface irrégulière sur laquelle repose le cartilage articulaire. Étant plus dur, l'os sous-chondral absorbe mieux cependant les chocs que le cartilage, protégeant de surcroît celui-ci des dommages causés par les forces mécaniques. Contrairement au cartilage, l'os sous-chondral est un tissu vascularisé et bien irrigué. Dans les conditions physiologiques, son métabolisme dépend de l'équilibre entre l'activité de synthèse liée aux ostéoblastes, et l'activité de dégradation dépendante des ostéoclastes. Toutefois durant les phases de l'OA, on observe un débalancement de l'équilibre homéostatique qui se traduit par un changement de l'architecture et des propriétés de l'os sous-chondral (Burr 2004; Martin, Miot et al. 2007). Durant les stades précoces, on observe un amincissement de l'os sous-chondral lié aux ostéoclastes. Ce phénomène précède la fibrillation et l'érosion du cartilage, tout en contribuant à la réduction de l'épaisseur de celui-ci (Radin and Rose 1986). Les stades avancés de la maladie sont caractérisés par la présence d'ostéophytes au niveau de l'extrémité des jointures articulaires, mais surtout par des lésions sévères du cartilage. La formation d'excroissances osseuses (ostéophytes) serait liée à une prolifération anormale d'ostéoblastes différenciés, via le processus d'ossification endochondrale. Elle constituerait aussi un mécanisme compensatoire de la redistribution des forces biomécaniques dans le but de protéger le cartilage (van der Kraan and van den Berg 2007). Les études effectuées sur des modèles animaux spontanés de l'OA, suggèrent que les changements dans la forme et le contour de l'os sous-chondral, affecteraient directement la capacité du cartilage articulaire adjacent à s'ajuster aux forces mécaniques (Buckland-Wright 2004). Finalement, l'hypothèse de la vascularisation de l'os sous-chondral combinée à la présence de microfissures dans le cartilage des patients arthrosiques, serait un moyen supplémentaire

d'induire un changement dans le métabolisme du cartilage. En effet, les cytokines, facteurs croissances, et eicosanoides produits localement par l'os sous-chondral diffuseraient à travers l'interface osseuse du cartilage pour moduler ce dernier (Martel-Pelletier, Boileau et al. 2008). Cependant, bien que les altérations de l'os sous-chondral soient intimement liées à la pathogenèse de l'arthrose, une question mérite d'être éclairée: à savoir si les changements dans l'os sous-chondral induisent ou participent à la progression de l'OA.

1.1.3.3. La membrane synoviale

La membrane synoviale est un tissu vascularisé et innervé, délimitant l'intérieur de la capsule des articulations. Elle est constituée d'une enveloppe de nature fibreuse qui permet, avec les ligaments, de maintenir les deux surfaces articulaires en contact l'une avec l'autre. Cette membrane est composée de trois types de cellules synoviales ou synoviocytes: les macrophages, les fibroblastes et les cellules dendritiques. Dans les conditions physiologiques, la membrane synoviale secrète un liquide qui ressemble à du blanc d'œuf, la synovie ou liquide synovial. Ce liquide transparent et filant, sert de lubrifiant aux surfaces articulaires. Il permet aussi de nourrir l'articulation et d'éliminer les substances indésirables ((Burmester, Dimitriu-Bona et al. 1983; Izumisawa, Yamaguchi et al. 1996).

L'inflammation due à la membrane synoviale, contribue à la progression de l'OA. Cette dernière est fréquemment associée aux signes et symptômes (douleurs, enflure, et raideur) de l'inflammation chronique comme l'arthrite rhumatoïde (RA). De plus, dans les stades précoces et tardifs de l'OA, on observe le plus souvent une infiltration de cellules B et de lymphocytes T, de même qu'une surexpression de médiateurs pro-inflammatoires (Benito, Veale et al. 2005). Toutefois, l'OA n'est pas considérée comme une arthropathie inflammatoire classique, à cause de la présence minimale de neutrophiles dans la synovie, et de l'absence de manifestations systémiques de l'inflammation (Attur, Dave et al. 2002).

Nous détaillerons dans le chapitre 2, les mécanismes par lesquels l'inflammation de la membrane synoviale contribue à la progression et à la sévérité de l'OA.

1.1.4. Diagnostic et traitements

Le diagnostic se fait le plus souvent lors de la visite médicale des patients, c'est-à-dire au moment où ses derniers ressentent de la douleur et de la rigidité au niveau articulaire (Simon, Grierson et al. 2009). À ce moment, le pronostic est basé sur les changements cliniques (évaluation du degré de douleur et du niveau d'inflammation), et sur les changements radiographiques (perte d'espace dans les jointures articulaires, formation d'ostéophytes, épaissement de l'os sous-chondral), grâce aux techniques d'imagerie par résonance magnétique (IRM) et de radiographie par rayon X (Rousseau and Delmas 2007). Cependant vu que ces changements surviennent plus tardivement dans la progression de la maladie, l'étude de bio-marqueurs impliqués dans la progression de l'OA pourrait s'avérer un outil puissant et sensible dans le diagnostic précoce de la maladie.

De nos jours, il n'y a pas de traitement disponible pour l'OA. La plupart des traitements offerts ont pour but de conscientiser les patients sur l'évolution de la pathologie, de soulager les douleurs qui en découlent, d'améliorer la qualité de vie des patients, et de prévenir ou de retarder la progression de la maladie au niveau des tissus atteints (cartilage, os, ligaments, et muscles). Les traitements actuels incluent les traitements non-pharmacologiques, pharmacologiques, chirurgicaux (invasifs), et autres types de traitements (Sharma and Berenbaum, 2007).

1.2. L'inflammation de la membrane synoviale

1.2.1. Rôle dans l'ostéoarthrose (OA)

Contrairement à la RA, l'inflammation de la membrane synoviale est considérée comme un mécanisme secondaire à la dégénérescence du cartilage articulaire, et au remodelage de l'os sous-chondral. Dans le cas de la RA, un désordre au niveau de la régulation du système immunitaire, entraîne la relâche de médiateurs pro-inflammatoires dans le liquide synovial; provoquant ainsi un déséquilibre dans l'homéostasie du cartilage (Otero and Goldring 2007). Dans l'arthrose, c'est plutôt la présence de particules de dégradation du cartilage comme la fibronectine (FN) dans l'espace synovial, qui constitue l'élément déclencheur du processus inflammatoire (Krasnokutsky, Samuels et al. 2007). Toutefois, le rôle de l'inflammation dans les symptômes et la progression de l'OA est reconnu (Spector, Hart et al. 1997; Conrozier, Chappuis-Cellier et al. 1998).

Les synoviocytes synthétisent des cytokines et chemokines pro-inflammatoires, suite à l'inflammation de la membrane synoviale. Ces médiateurs pro-inflammatoires diffusent à travers le liquide synovial, jusqu'au cartilage où ils modulent l'activité des chondrocytes (Bondeson, Wainwright et al. 2006). En réponse aux signaux inflammatoires, les chondrocytes agissent à leur tour de façon autocrine ou paracrine pour diminuer l'activité anabolique et augmenter la production de facteurs cataboliques, entraînant ainsi la perte de la MEC. De plus, les modèles animaux ont mis en évidence le rôle des cytokines de la synoviale, dans la mort cellulaire des chondrocytes par apoptose (Butler, Malfait et al. 1997). Parmi les facteurs cataboliques synthétisés par les chondrocytes, on peut citer les médiateurs pro-inflammatoires comme les prostaglandines (PGE₂) qui sont associées à la douleur, le TNF- α , l'IL-1 β , les chemokines, et le NO (Nitric oxide). On retrouve aussi les protéases comme les MMPs, et les aggrecanases (Goldring and Goldring 2007).

Finalement, l'inflammation de la membrane synoviale s'accompagne souvent d'une synoviotite, qui implique l'infiltration des lymphocytes et monocytes dans le liquide synoviale (Brandt, Dieppe et al. 2009). La synoviotite stimule à son tour l'angiogenèse par la production de facteurs pro-angiogénique tel le VEGF (Vascular endothelial growth factor) (Lingen 2001). L'angiogenèse en plus d'être associée à la douleur, contribue également à l'inflammation en favorisant la production de médiateurs inflammatoires (Bonnet and Walsh 2005).

1.2.2. Les molécules impliquées dans l'inflammation

L'inflammation contribue à la pathogenèse de l'OA par la production de plusieurs facteurs, qui altèrent la fonction des chondrocytes, entraînant ainsi la destruction du cartilage. Les cellules synoviales (synoviocytes) constituent la source principale de ces facteurs, qui regroupent les cytokines, les chemokines et les neuropeptides.

Les cytokines sont classifiées en deux catégories; soit les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Toutefois, ce sont les cytokines pro-inflammatoires qui jouent un rôle clé dans le développement et la progression de l'OA (Sharma eand Berenbaum 2007). Ils perturbent l'équilibre homéostatique du cartilage, en stimulant l'activité catabolique des chondrocytes au dépend de l'anabolisme. Les chondrocytes synthétisent alors, d'avantage de cytokines pro-inflammatoires et enzymes protéolytiques qui détruisent la MEC (Goldring and Goldring 2004). Paradoxalement, les synoviocytes et les chondrocytes produisent aussi des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4, IL-10, IL-13, et IL-1Ra. Cette production est par contre associée aux mécanismes de régénération de la matrice, observés durant les stades précoces de l'OA (Sutton, Clutterbuck et al. 2009).

La contribution des chemokines dans la pathogenèse de l'arthrose est moins importante que celle des cytokines. Cependant, elles permettent le recrutement des leucocytes au niveau

des foyers inflammatoires de l'articulation (Sharma and Berenbaum 2007). Elles augmentent également la production de protéases (MMP-3) par les chondrocytes, tout en inhibant la synthèse des protéoglycans (Borzi, Mazzetti et al. 2004).

Les neuropeptides sont aussi impliqués dans l'OA. La substance P par exemple, est associée à la douleur inflammatoire, en induisant la synthèse de PGE2 par les chondrocytes (Halliday, McNeil et al. 1993). Le CRF (Corticotropin-releasing factor) possède lui deux effets opposés: médiateur inflammatoire systémique, puis agent anti-inflammatoire via la production de glucocorticoïdes (Crofford, Sano et al. 1993). Le VIP (Vasoactive intestinal peptide) est un neuropeptide produit par les cellules du système immunitaire, qui participe à l'inhibition de l'inflammation (Delgado, Pozo et al. 2004).

1.2.2.1. Cytokines pro-inflammatoires

Le rôle joué par l'inflammation dans la pathophysiologie de l'arthrose, est principalement lié à l'activité des cytokines pro-inflammatoire (tableau I) sécrétées par les synoviocytes de la membrane synoviale. C'est donc sans surprise que ces derniers ont fait l'objet de nombreuses investigations dans la recherche de cibles thérapeutiques pour l'OA. En ce sens, les travaux de Chevalier et al. 1998, suggèrent que la neutralisation de l'activité des cytokines pro-inflammatoire pourrait servir à rétablir le niveau d'équilibre entre une synthèse défaillante et une dégradation trop importante (Chevalier 1998). Dans le cadre de ce mémoire nous nous focaliserons sur les cytokines pro-inflammatoires les plus étudiées; à savoir l'IL-1 β et le TNF- α .

1.2.2.1.1. IL-1 β et TNF- α

Les travaux effectués sur les modèles animaux de l'OA furent les premiers à faire mention de la contribution des cytokines IL-1 β et TNF- α dans la progression de l'arthrose. Par exemple, l'injection intra-articulaire des protéines recombinantes IL-1 β et TNF- α dans les articulations des rats, souris et lapins stimule la destruction du cartilage articulaire (Pettipher, Higgs et al. 1986; O'Byrne, Blancuzzi et al. 1990). De même, les résultats obtenus des modèles de chiens arthrosiques, montrent qu'un traitement avec des inhibiteurs spécifiques de TNF- α et IL-1 β , ralentissait fortement la progression de la maladie en les protégeant des mécanismes de dégradation (Caron, Fernandes et al. 1996).

Les effets de TNF- α et IL-1 β dans la destruction du cartilage articulaire sont similaires, et parfois même synergiques (van den Berg 2001). Cependant, TNF- α n'est impliqué que dans les stades précoces de l'OA, tandis que IL-1 β joue un rôle crucial dans tous les stades de la maladie (van de Loo, Joosten et al. 1995; Joosten, Helsen et al. 1996). Les chondrocytes sont la cible cellulaire du mécanisme d'action des cytokines dont les récepteurs se situent dans les régions superficielles du cartilage arthrosique (Tetlow, Adlam et al. 2001). En effet, les chondrocytes articulaires dérivés des patients arthrosiques, expriment fortement les récepteurs d'IL-1 β (IL-1R type I) et de TNF- α (TNF-R55); les rendant ainsi susceptibles à l'action de ces cytokines (Sadouk, Pelletier et al. 1995; Alaaeddine, DiBattista et al. 1997).

Les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β modulent les chondrocytes articulaires de différentes façons. Toutefois, la production des MMPs (1, 3, 9, 13) et des agrécanases (ADAMs) reste le mécanisme de destruction du cartilage le plus important. Les données de co-localisation de TNF- α et IL-1 β avec les MMPs dans la zone superficielle du cartilage des patients OA, supportent ce fait (Tetlow, Adlam et al. 2001). La synthèse des enzymes protéolytiques s'accompagne habituellement de l'inhibition de la synthèse de protéoglycans

et de collagène de type II. Cela entraîne la dédifférenciation des chondrocytes et l'arrêt des mécanismes de réparation du cartilage (Saklatvala 1986). Une apoptose des chondrocytes dictée par $\text{TNF-}\alpha$, semble également précéder la dégradation significative des protéoglycans (Butler, Malfait et al. 1997). Enfin, la synthèse de collagènes de type X, III et VI normalement absents ou peu exprimés dans le cartilage articulaire adulte, reflète aussi l'altération du métabolisme de la MEC (Aigner, Haag et al. 2007).

Les effets secondaires d' $\text{IL-1}\beta$ et $\text{TNF}\alpha$ sur les chondrocytes articulaires, se traduisent par une production accrue de cytokines pro-inflammatoires comme IL-6, LIF (leukemia inhibitory factor), IL-17, IL-18; et de chemokines. La synthèse de PGE_2 via l'expression des COX (cyclooxygénases), et de NO via l'activité de l'oxyde nitrique synthétase (iNOS), fait partie de ce processus (Goldring and Berenbaum 2004; Goldring and Goldring 2004). Paradoxalement, une expression des facteurs $\text{TGF-1}\beta$ et IGF-1 est observée dans les chondrocytes articulaires de patient OA. Ces facteurs de croissance bien qu'associés à l'activité anabolique, peuvent contribuer aux mécanismes pathogéniques à travers la formation d'ostéophytes (Sutton, Clutterbuck et al. 2009).

Plusieurs voies de signalisation sont activées de façon similaire par $\text{IL-1}\beta$ et le $\text{TNF-}\alpha$, bien que les récepteurs situés à la surface cellulaire et les molécules adaptatrices impliquées soient différents. Dans les chondrocytes, les voies JNK, ERK, p38 MAPK et $\text{NF-}\kappa\text{B}$ sont impliquées dans la régulation des gènes induits par $\text{IL-1}\beta$ et $\text{TNF-}\alpha$. Ces voies de signalisation participent aussi à l'inhibition des gènes responsables de la synthèse du collagène (Robbins, Thomas et al. 2000; Seguin and Bernier 2003).

Tableau I : Cytokines pro-inflammatoires impliquées dans l'OA.

Cytokines pro-inflammatoire	Source	Effets
TNF-α (Tumor necrosis factor)	Synoviocytes, chondrocytes	↑ la perte osseuse et cartilagineuse; ↓ la synthèse du collagène et des glycoprotéines, ↑ l'expression des MMPs; stimule les autres cellules à produire des cytokines PI et des facteurs de croissance; ↑ la relâche des facteurs pro-angiogéniques; ↑NO; induit l'apoptose des chondrocytes
IL (Interleukin)-1β	Synoviocytes, chondrocytes, macrophage	↑ la perte osseuse et cartilagineuse; ↓ la synthèse des protéoglycans; ↑ l'expression des MMPs; ↑ la production des enzymes protéolytiques; stimule les autres cellules à produire des cytokines PI; ↑ la relâche des facteurs pro-angiogéniques; ↑NO; induit l'apoptose des chondrocytes
IL-6	Synoviocytes, chondrocytes	↓ la synthèse des protéoglycans; réduit la prolifération des chondrocytes; ↑ l'activité MMP2; ↑ le catabolisme des protéoglycans par les aggrecanases
IL-8	Monocytes, synoviocytes, chondrocytes, ostéoblastes	Recrute les leucocytes; stimule la relâche des cytokines pro-inflammatoires; induit différenciation hypertrophique et la calcification des chondrocytes
IL-17	Lymphocytes-T actifs	Induit la synthèse du NO, MMPs, IL-1 β , IL-6 et IL-8; stimule la relâche des facteurs pro-angiogéniques
IL-18	Macrophages, fibroblastes synoviaux	Stimule la relâche de cytokines PI et l'angiogénese; induit NO; cause hyperplasie de la synoviale et recrutement des cellules inflammatoires; induit apoptose des chondrocyte; ↓ expression des composants de la MEC; dégrade le cartilage via expression de fibronectines
LIF (Leukemia inhibitor factor)	fibroblastes synoviaux, chondrocytes	Stimule expression des cytokines PI; ↑ la synthèse des pro-MMP-2 et des MMP-13; ↑ la perte cartilagineuse, diminue synthèse des protéoglycans; entraîne infiltration des leucocytes dans la synovie; potentialise la dégradation du cartilage par IL-1 et TNF

Adapté de Sutton et al, 2009. Les abréviations ↑, ↓, et PI signifient respectivement augmenter, inhiber, et pro-inflammatoire.

1.2.2.2. Voie de signalisation de NF- κ B

NF- κ B a été identifié pour la première fois dans les lymphocytes B de souris comme régulateur de l'expression des chaînes légères du gène d'immunoglobine kappa (Sen et Baltimore, 1986). C'est un facteur de transcription formant une variété d'homodimères et hétérodimères, capables d'activer chacun un groupe de gènes différents. Chez les mammifères, la famille NF- κ B est constituée de cinq protéines (p65B, c-Rel, RelB, p50/105, et p52/p100) où le dimère p50-p65 est le plus abondant (Baldwin 1996).

NF- κ B est présent dans le cytoplasme sous une forme inactive associée à l'inhibiteur I κ B (inhibitory κ B protein) qui empêche sa translocation dans le noyau. Différents stimuli incluant TNF- α ou IL-1 β , les chemokines, les virus et les radicaux libres, activent le dimère NF- κ B via une cascade signalétique qui conduit à la phosphorylation d'I κ B. Une fois phosphorylé, I κ B est ubiquitiné par l'E3-I κ B ubiquitine ligase, pour finalement être dégradé dans le protéasome 26S. La phosphorylation d'I κ B s'effectue par des sérines/thréonines kinases I κ B kinases (IKK) spécifiques (Roman-Blas and Jimenez 2006). La dégradation d'I κ B expose le signal de localisation nucléaire des protéines NF- κ B, qui peuvent alors entrer dans le noyau et stimuler la transcription des gènes cibles. Plus de 150 gènes régulés par NF- κ B ont été identifiés y compris ceux impliqués dans l'immunité, l'inflammation, la prolifération ou la survie cellulaire, l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire (Barnes and Karin 1997; Yamamoto and Gaynor 2004).

Bien que NF- κ B joue un rôle bénéfique dans les conditions physiologiques normales, une régulation inappropriée de son activité est associée à la pathogenèse de plusieurs maladies inflammatoires chroniques, comme l'asthme ou le RA (Roman-Blas and Jimenez 2006). Dans le cas de l'OA, les évidences portent à croire que le mécanisme inflammatoire requiert le facteur NF- κ B. En effet les dimères p50 et p65 sont abondants dans la synovie des patients OA; toutefois à des concentrations moindres que celles observées chez les

patients RA (Handel, McMorrow et al. 1995). De même les kinases IKK sont abondantes dans les cultures primaires de synoviocytes de patients RA et OA, en plus d'être constitutivement exprimées au niveau de l'ARNm; suggérant une activation constitutive de NF- κ B (Aupperle, Bennett et al. 2001). Finalement les modèles animaux de l'OA, supporte aussi le concept selon lequel NF- κ B joue un rôle actif dans le développement et la progression de l'OA *in vivo* (Makarov 2001; Gomez, Pillinger et al. 2005).

Dans les chondrocytes articulaires, la voie NF- κ B est indispensable au déclenchement des événements responsables de la dégradation progressive de la MEC et de la destruction du cartilage (Berenbaum 2004). Suivant la stimulation au TNF- α ou/et IL-1 β , la voie NF- κ B entraîne l'expression des gènes codants pour les MMPs, les chemokines, les molécules d'adhésion VCAM (Vascular cell adhesion molecules), et les enzymes (COX-2, iNOS) liées à la synthèse de PGE2 et de NO. De plus NF- κ B régule les gènes des cytokines pro-inflammatoires tels TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, INF- γ , qui par rétroaction positive le stimulent en retour (Barnes and Karin 1997) (figure 2). Mis à part son rôle inflammatoire, NF- κ B est également impliqué dans la médiation des effets apoptotiques du NO sur les chondrocytes, contribuant de ce fait à l'inhibition des mécanismes de régénération du cartilage (Kim, Hwang et al. 2002; Kim and Chun 2003).

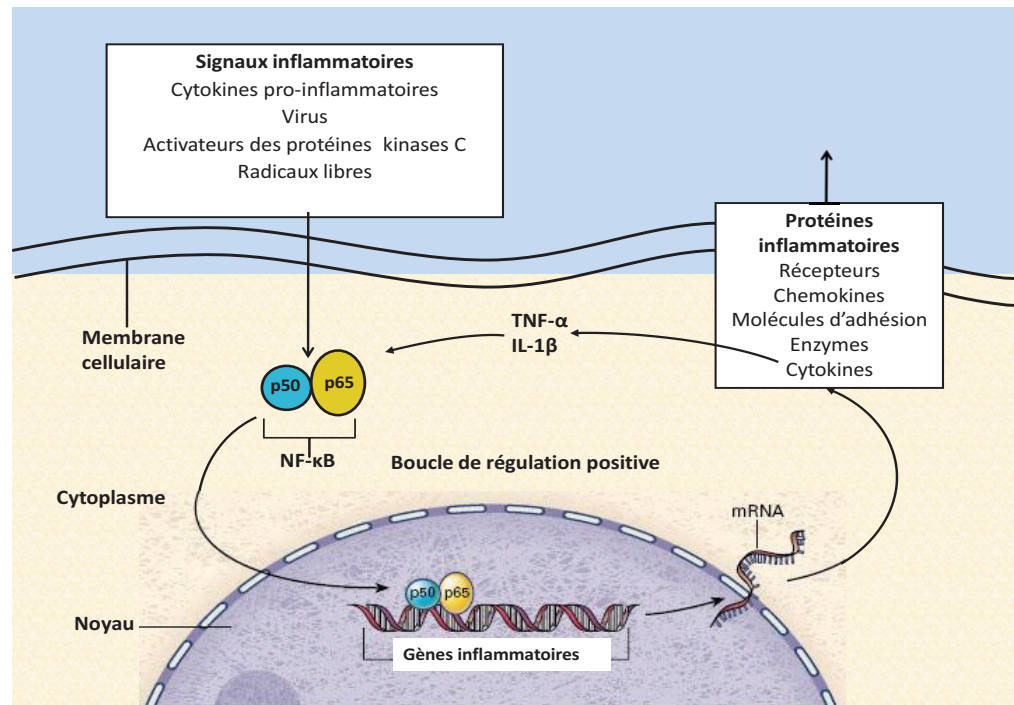


Figure 2 : Diagramme de NF- κ B comme régulateur inflammatoire.

Adaptée de Barnes et al.1997. NF- κ B peut activer une variété de signaux inflammatoires, induisant l'expression coordonnée des gènes de cytokines, chemokines, enzymes de dégradation et molécules d'adhésion. Les cytokines TNF- α et IL-1 β activent, et sont amplifiées à leur tour par NF- κ B, menant à une boucle de régulation positive. L'abréviation mRNA signifie ARN messager.

1.3. La signalisation par TNF

1.3.1. Biologie de TNF

À l'origine le TNF (Tumor Necrosis Factor) a été identifié comme un facteur cytotoxique menant à la nécrose des tumeurs transplantées dans les souris (Carswell, Old et al. 1975). Il s'agit d'une cytokine hautement pléiotropique appartenant à la famille des TNF ligands, et qui existe sous deux formes différentes. TNF est d'abord synthétisé sous la forme d'une protéine transmembranaire (memTNF) de 26 kDa avec une conformation homotrimérique

stable. De la forme transmembranaire est dérivée la forme soluble (sTNF) homotrimérique de 17 kDa, via un clivage protéolytique effectué par la métalloprotéase TACE (TNF alpha converting enzyme) (Locksley, Killeen et al. 2001; Bodmer, Schneider et al. 2002).

TNF exerce son activité biologique par l'intermédiaire d'interactions avec les récepteurs de la superfamille des TNF récepteurs (TNFR). Les membres les plus importants de cette famille sont TNFR1 (TNF receptor type 1; CD120a; p55/60), TNFR2 (TNF receptor type 2; CD120b; p75/80) et Fas (CD95; TNF receptor superfamily, member 6). Les récepteurs TNFR1 et TNFR2 lient tous deux la cytokine TNF- α , tandis que Fas possède son propre ligand (FasL) et ne lie donc pas TNF- α (Mak et Yeh, 2002). Remarquablement sTNF et memTNF stimulent différemment les récepteurs TNFR1 et TNFR2. La signalisation par memTNF nécessite les deux récepteurs, alors que sTNF n'active que TNFR1 et possède peu ou pas d'affinité pour TNFR2 (Grell, Douni et al. 1995).

1.3.2. Superfamille des récepteurs TNF (TNFR)

Les récepteurs de cette famille possèdent un domaine extracellulaire (ECD) similaire. Toutefois le domaine cytoplasmique (CD) diffère, suggérant une transmission de signaux différents et distincts par chaque récepteur. De plus aucun TNFR ne possède d'activité enzymatique. Par conséquent, leur signalisation dépend des effecteurs recrutés au niveau du domaine CD (Darnay and Aggarwal 1997).

Les TNFRs sont classifiés en deux catégories dépendamment des effecteurs recrutés au domaine cytoplasmique. Dans la première catégorie qui regroupe TNFR1 et Fas, la queue cytoplasmique contient un DD (death domain) (Tartaglia, Ayres et al. 1993; Locksley, Killeen et al. 2001). Ce DD par une interaction protéine-protéine, permet le recrutement des protéines adaptatrices intracellulaires possédant elles aussi un DD. La seconde catégorie comprend les récepteurs TNFR2, CD30, CD40 et RANK (Locksley, Killeen et al. 2001).

Cette classe de récepteurs est dépourvue de DD, mais possède à la place un motif ou une séquence permettant l'association avec les TRAFs (TNF receptor-associated factors) (Bradley and Pober 2001; Wajant, Henkler et al. 2001). Le motif des TNFRs de catégorie II se nomme TIMs (TRAF interaction motifs).

1.3.2.1. Récepteur TNFR1

Le récepteur TNFR1 (CD120a; P55/80) aussi appelé «death receptor» (Nagata, 1997), est un récepteur transmembranaire de 55 kDa constitutivement exprimé dans la plupart des types cellulaires (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003). Ce récepteur est considéré comme le médiateur principal de la signalisation par TNF- α . En effet, son DD domaine permet par une interaction protéine-protéine homophile, le recrutement des effecteurs intracellulaires participant à l'activation des voies pro-inflammatoires, de survie cellulaire, et d'apoptose (Rauert, Wicovsky et al. 2010).

Les travaux de Micheau et Tschopp (2003) proposent que TNFR1 médierait les signaux apoptotique et de survie cellulaire à travers la formation de deux complexes de signalisation. Le premier complexe (complexe I) se forme au niveau de la membrane cellulaire par l'interaction des protéines TNFR1, TRADD (TNFR associated death domain), TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2), RIP (receptor interacting protein) et cIAP (cellular inhibitor of apoptosis protein), tandis que le second complexe (complexe II) formé dans le cytosol, regroupe les protéines TRADD, FADD (Fas associated death domain protein) et caspases 8/10. Contrairement au complexe I, le complexe II est dépourvu du récepteur TNFR1.

Le complexe I est responsable de l'activation de NF- κ B et par conséquent de la transmission des signaux de survie cellulaire. Le complexe II par contre est impliqué dans la transmission des signaux apoptotiques, mais seulement si la voie NF- κ B est inhibée. En effet, les voies de survie et de mort cellulaire ont une régulation négative vis-à-vis l'un de l'autre. Par exemple, l'expression des caspases 8 en plus d'induire l'apoptose, inhibe en parallèle la voie de survie médiée par NF- κ B, grâce à la dégradation des RIPs (Lin, Devin et al. 1999; Martinon, Holler et al. 2000). De même, l'activation de NF- κ B entraîne à son tour l'expression des protéines anti-apoptotiques (Micheau and Tschopp 2003).

Finalement, l'implication de TNFRI dans l'inflammation nécessite l'activation de la voie classique ou canonique de NF- κ B. Par contre, ce mécanisme n'est pas bien caractérisé. Toutefois, on sait que les molécules effectrices: TRAF2 et RIP y jouent un rôle crucial (Yeh, Pompa et al. 1998).

1.3.2.2. Récepteur TNFRII

TNFR2 (CD120b; p75/80) comme son nom l'indique, est le second récepteur du ligand TNF- α avec une masse moléculaire d'environ 75 kDa. Contrairement à TNFR1, le récepteur TNFR2 n'est exprimé que dans les cellules immunitaires et endothéliales (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003). Les mécanismes de signalisation de TNFR2 ne sont pas bien connus. Cependant, il semble amplifier l'activité apoptotique de TNFR1 à travers le recrutement des cIAPs (Chan and Lenardo 2000). Les récepteurs TNFR2 bien que dépourvu de DD, peuvent aussi recruter des protéines adaptatrices intracellulaires par l'intermédiaire des motifs TIMs. Les membres de la famille TRAF sont les effecteurs les plus connus de TNFR2 (Arch, Gedrich et al. 1998). Récemment, Rauert et al, (2010) ont montré que la liaison de memTNF à TNFR2 pouvait activer la voie non-canonique de NF- κ B en facilitant la translocation de p52 dans le noyau, grâce au clivage protéolytique de la protéine précurseur p100.

1.3.2.3. TRADD

TRADD est une protéine de 34 kDa exprimée de façon ubiquitaire. Son extrémité C-terminale (C-terminal) contient un DD d'environ 195-305 résidus d'acides aminés (Hsu, Xiong et al. 1995). À l'exception de TNFR1, TRADD ne lie pas les autres membres de la famille TNFR. Grâce à son DD domaine, TRADD sert de plate-forme d'assemblage pour TNFR1. Il lie le DD de ce dernier par des interactions hétérophiliques avec son DD. Ensuite il recrute les effecteurs intracellulaires dans l'ordre suivant: TRAF2, RIP pour

l'activation de NF- κ B, et FADD, plus les caspases 8/10 pour l'apoptose (Hsu, Xiong et al. 1995).

1.3.2.4. FADD

FADD est un cofacteur jouant un rôle central dans la mort cellulaire (Darnay and Aggarwal 1997). FADD est recruté directement par le récepteur Fas via l'interaction de leurs DD respectifs. FADD à son tour procède au recrutement des caspases 8/10 par le biais des DED (death effector domains) situés à l'extrémité N-terminale de chacune des molécules; déclenchant ainsi le processus de mort cellulaire (Boldin, Goncharov et al. 1996; Muzio, Chinnaiyan et al. 1996). Contrairement à Fas, le recrutement de FADD dans le complexe signalétique TNFR1 est indirect et requiert TRADD. Une fois recruté dans le complexe TNFR1/TRADD, FADD peut alors lier les caspases 8/10 et induire l'apoptose (Hsu, Shu et al. 1996). La protéine FADD joue également un rôle important dans le développement embryonnaire (Yeh, Pompa et al. 1998; Zhang, Cado et al. 1998).

1.3.2.5. TRAF2

TRAF2 est une protéine de 56 kDa exprimée de façon ubiquitaire et appartenant à la famille des protéines TRAFs. Cette famille est composée de sept protéines (TRAF1-7) partageant un domaine C-terminal (TRAF domaine) responsable de l'interaction des TRAFs avec les autres protéines effectrices. Les membres TRAF2-7 possèdent en plus, un domaine N-terminal en forme de boucle fonctionnant comme une E3 ubiquitine ligase, via la catalyse du transfère des ubiquitines sur les protéines cibles (Hayden and Ghosh 2008). De toutes les TRAFs, seulement TRAF2, 3 et 6 sont considérés comme régulateurs positifs de la voie NF- κ B (Arch, Gedrich et al. 1998).

La protéine TRAF2 est un cofacteur essentiel à l'activation de NF- κ B par TNFR1 et TNFR2 (Rothe, Sarma et al. 1995; Hsu, Shu et al. 1996). Elle est connue aussi pour interagir et médier les signaux des autres membres de TNFR, soit CD30, CD40, CD27, OX40, ATAR et LMP (Ye, Park et al. 1999). Deux séquences consensus responsables de la liaison à TRAF2 ont été identifiées chez la plupart des co-récepteurs de la famille TNFR. La séquence (P/S/A)_x(Q/E)₂ code pour la séquence majeure tandis que la séquence PxQxxD code pour la séquence mineure (Ye, Park et al. 1999).

Au niveau de la signalisation par TNFR1, TRAF2 est recruté dans le complexe TNF/TNFR1 par l'intermédiaire des interactions entre le domaine C-terminal de TRAF2 et le DD N-terminal de TRADD. Par contre, son recrutement dans le complexe TNF/TNFR2 se fait via TIM (Hsu, Shu et al. 1996). La présence de TRAF2 est cruciale car le recrutement et l'activation du complexe IKK dans la voie signalétique TNFR1, dépend de TRAF2. Le complexe IKK est responsable de la dégradation d'I κ B menant à l'activation de NF- κ B (Devin, Cook et al. 2000).

1.3.2.6. RIP

De nos jours sept RIP kinases (1-7) ont été caractérisées grâce à leur domaine sérine/thréonine kinase conservé. Les RIPs sont impliqués dans la plupart des voies TRAFs-dépendantes (Hayden et Ghosh, 2008). RIP est recruté dans le complexe TNFR1/TRADD via son DD C-terminale. De plus elle est capable d'interagir avec TRAF2, mais cette fois-ci via son domaine kinase N-terminal et son domaine central (Hsu, 1996). RIP à l'instar de TRAF2 est essentielle à l'activation de NF- κ B. Des études montrent que RIP agit comme une protéine adaptatrice et d'échafaudage, facilitant ainsi le recrutement et l'activation d'IKK par TRAF2 (McCarthy, Ni et al. 1998; Lee, Shank et al. 2004).

1.4. EXTL3: le récepteur REG

1.4.1. Membre de la famille EXTL3

EXTL3 appartient à la famille des gènes d'exostoses (EXT), qui doit son nom à l'association de certains membres (EXT1, EXT2) de la famille au syndrome d'exostose héréditaire multiple (HME). La famille EXT est constituée de cinq gènes parmi lesquels EXT1 et EXT2 furent les premiers à être découverts. Ensuite, les gènes EXTL1 et EXTL2 (EXT-Like genes) homologues à EXT1 et EXT2 furent identifiés à leur tour. Récemment, EXTL3 a été désigné comme étant membre de la famille EXT sur la base de l'homologie de séquence avec les gènes EXT1, EXT2, EXTL1, et EXTL2 (Van Hul, Wuyts et al. 1998). La caractéristique principale des gènes EXT réside dans le fait qu'ils codent pour des glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des chaînes d'héparane sulfate (HS).

Les HS sont des glycosaminoglycans (GAG) retrouvés abondamment, sous forme de protéoglycans, au niveau de la surface cellulaire et dans la matrice extracellulaire (ME) de la plupart des tissus (Rodén, 1980). Les HS protéoglycans sont impliquées comme cofacteurs dans une variété de processus biologiques tels l'adhésion cellulaire, la coagulation sanguine, l'angiogenèse, la morphogenèse, en plus de la régulation des facteurs de croissance et des effets des cytokines (Kreuger, Spillmann et al. 2006). La majorité, voire la totalité de leur activité biologique dépend de la liaison de la chaîne d'HS (négativement chargée) à une multitude de ligands protéiques incluant les FGFs, les inhibiteurs de sérine protéases, et les protéines de la matrice extracellulaire (Lindahl, Kusche-Gullberg et al. 1998; Esko and Selleck 2002).

La biosynthèse des HS est un processus très complexe et bien détaillé dans les travaux de Lindahl et Esko (Lindahl, Kusche-Gullberg et al. 1998; Esko and Selleck 2002). Brièvement, ce processus commence par la synthèse d'une région centrale composé d'un glycosaminoglycan tétrasaccharide (région centrale) composée respectivement d'acide

glucoronique-galactose-galactose-xylose-O-serine-(GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl β 1-O-Ser-), où le xylose est attachée à un résidu sérine par une O-glycosylation (Sugahara, 2002). Après l'addition du premier résidu N-acetylglucosamine (GlcNAc) par la GlcNAc transférase I (GlcNA-TI), l'étape d'élongation est initiée par l'activité des glycosyltransférases (GlcNAc-TII et GlcA-TII), qui ajoutent alternativement les résidus β 1,4-GlcA et α 1,4-GlcNAc à l'extrémité non-réductrice du polymère naissant (Lidholt and Lindahl 1992).

1.4.2. Structure et localisation cellulaire des EXT/EXTL

La comparaison des membres de la famille EXT/EXTL (tableau II) et plus particulièrement l'alignement de leurs séquences, indique la présence de plusieurs domaines communs. Ils possèdent tous un domaine carboxyl-terminal (C-terminal) bien conservé, et présentant une grande homologie sur environ 260 acides aminés (aa). Par contre l'identité des acides aminés d'EXTL3 sur cette extrémité, varie entre 26 et 31% par rapport aux autres membres (Van Hul, Wuyts et al. 1998). L'arbre phylogénétique des gènes de la famille EXT/EXTL basé sur l'homologie de la séquence de 260 aa, montre une relation étroite entre les gènes EXT et leurs analogues EXTL. Ainsi il existe une proximité entre les gènes EXTL3 et EXT2, de même qu'EXT1 et EXTL1. Le gène EXTL2 est le plus divergent, tandis que les gènes EXT1 et EXT2 sont les plus proches avec une similarité de séquence d'environ 70% (Wuyts, Ramlakhan et al. 1995; Van Hul, Wuyts et al. 1998). Le domaine amino-terminal (N-terminal) est le plus variable, donnant lieu à un gène EXTL2 très court et un gène EXTL3 beaucoup plus long. La présence d'un domaine transmembranaire (TM) à l'extrémité N-terminale explique la longueur du gène EXTL3. Toutefois le domaine TM n'existe pas chez les autres membres de la famille EXT (Kobayashi, Akiyama et al. 2000). La région N-terminale contient également un peptide signal nécessaire à la sécrétion des protéines EXT/EXTL (Van Hul, Wuyts et al. 1998).

À l'exception d'EXTL1, tous les membres de la famille EXT sont exprimés de façon ubiquitaire, suggérant une analogie aux gènes d'entretien (housekeeping genes) (Stickens, Brown et al. 2000). Cependant, leur patron d'expression varie dans le temps et selon les tissus. Par exemple, la protéine EXTL3 est détectable dans plusieurs tissus chez la souris adulte, mais sa concentration est plus élevée dans la rate et dans le cerveau. De même, la comparaison du profil d'expression de ce gène dans le pancréas lors de l'embryogenèse jusqu'à la vie adulte, révèle une variation selon les étapes de formation du pancréas pour finalement se stabiliser (Osman, Kagohashi et al. 2003). Les expériences *in vitro* montrent qu'EXT 1, et EXT2 ainsi qu'EXTL1 sont localisées dans le réticulum endoplasmique (RE) (Stickens, Brown et al. 2000). Toutefois, EXT1 et EXT2 peuvent former un complexe hétéro-oligomérique *in vivo* qui mène à leur accumulation dans l'appareil de Golgi (McCormick, Duncan et al. 2000). Pour EXTL2, sa localisation cellulaire est inconnue, mais certaines études portent à croire qu'il est également situé au RE (Zak, Crawford et al. 2002). Comme mentionné précédemment, EXTL3 est le seul membre des EXT à posséder un domaine transmembranaire. Les travaux de Mizuno et al, confirment d'ailleurs la présence d'EXTL3 au niveau de la membrane. Toutefois, sa forme tronquée (c'est à dire celle dépourvue du domaine transmembranaire) est localisée dans la région cytoplasmique (Mizuno, Irie et al. 2001).

1.4.3. Rôle des membres EXT/EXTL

1.4.3.1. Synthèse des chaînes d'héparane sulfate

Le rôle principale des gènes EXT/EXTL demeure la synthèse des enzymes impliquées dans la production des HS. Les gènes EXT1 et EXT2 possèdent des activités glycosyltransférases couplées même si la fonction d'EXT2 semble plutôt complémentaire et dépendante d'EXT1. En effet, les études *in vitro* montrent que la simple présence d'EXT1 est capable d'initier la synthèse des chaînes HS. Toutefois, l'ajout de la protéine EXT2 amplifiait l'élongation des chaînes HS (Busse, Feta et al. 2007). EXT1 et EXT2 codent pour les enzymes GlcA-TII et GlcNAc capables d'ajouter les résidus d'acide D-glucoronique (GlcA) et de N-acétylglucosamine (GlcNAc) à la région centrale des HS; suggérant l'implication de ces deux gènes dans les étapes d'initiation et de synthèse des chaînes HS (Busse and Kusche-Gullberg 2003; Kim, Kitagawa et al. 2003).

Contrairement aux autres membres de la famille, EXTL1 ne possède pas de gènes orthologues dans les génomes de *C. elegans* et de *D. melanogaster*, signifiant qu'il n'est pas un élément clé dans la machinerie biosynthétique des HS (Zak, Crawford et al. 2002). Par contre, certaines études *in vitro* lui attribuent une activité GlcNAc transférase, bien que cette dernière soit inférieure à celle des autres EXT/EXTL (Kim, Kitagawa et al. 2001). Quant à EXTL2, il agit comme une $\alpha,1,4$ -N-acétylhexosaminyltransférase, une enzyme capable de transférer à la fois les résidus N-acétylgalactosamine (GalNAc) et N-acétylglucosamine (GlcNAc) à la région central glycosaminoglycan des HS. Par conséquent, le gène EXTL2 joue un rôle crucial dans l'étape d'élongation (synthèse) des HS (Kitagawa, Shimakawa et al. 1999).

Finalement, EXTL3 le dernier membre de la famille est associé aux étapes d'initiation et de synthèse des HS (Busse, Feta et al. 2007). En effet, ce gène code pour l'enzyme GlcNAc transférase qui est dotée à la fois des activités GlcNAc-TI et TII. La GlcNAc transférase

catalyse non seulement le transfert d'un GlcNAc dans le processus de formation de la région centrale, mais également dans la chaîne HS naissante (Kim, Kitagawa et al. 2001).

1.4.3.2. Autres rôles des EXT/EXTL

L'expression des protéines EXT/EXTL dans la majorité des tissus suggère un rôle important des membres de la famille au cours du développement embryonnaire (Osman, 2003). Par exemple, il a été rapporté que les protéines EXT synthétisent les héparanes sulfates protéoglycans (HSPGs) requis pour la diffusion et la liaison d'Indian hedgehog (Ihh) dans la plaque de croissance de l'os en développement (Duncan, McCormick et al. 2001). De plus, il a été montré que la voie de signalisation Ihh/PTHrP (Indian hedgehog/Parathyroid Hormone related-Protein) est un régulateur clé du processus de maturation des chondrocytes (Lanske, Karaplis et al. 1996).

Un autre rôle attribué aux gènes EXT est la fonction «suppresseur de tumeur» (SDT). Dans le cas des membres EXT1 et EXT2, plusieurs arguments avancent le lien entre la perte de EXT1 et/ou EXT2 et la formation tumorale. Par exemple, une mutation intragénique dans les gènes EXT1 et EXT2 a été associée aux cas de chondrosarcomes (Stickens, Clines et al. 1996). La similarité de séquence entre les EXT et les EXTL, suggère une fonction SDT pour les membres EXTL1, EXTL2 et EXTL3. De plus, la région 1p du chromosome humain connue pour porter des gènes suppresseurs de tumeur, contient les gènes EXTL1 et EXTL2 (Bale, Dracopoli et al. 1989; Caron, Peter et al. 1995). La localisation d'EXTL3 dans le chromosome 8p12-p22 renfermant des gènes de susceptibilité au cancer du sein (Seitz, Rohde et al. 1997), fait de lui un gène candidat potentiel pour ce type de cancer (Van Hul, Wuyts et al. 1998).

D'autres fonctions concernant EXTL3 ont été répertoriées au cours des dernières années. Ainsi, le récepteur de la protéine REG des cellules β du pancréas (Reg receptor) est

synthétisé par le gène EXTL3 (Kobayashi, Akiyama et al. 2000). Les travaux préalables menés par l'équipe du Dr Moreau, et récemment ceux de Picard et al. (figure 3), ont mis en évidence la surexpression du récepteur REG nommé aussi EXTL3 et de son ligand Reg1B chez les chondrocytes articulaires des patients atteints d'OA. En 2001, Mizuno avait montré que la surexpression du récepteur REG amplifiait l'activation de NF- κ B induite par la cytokine TNF- α , sans toutefois caractériser le mécanisme moléculaire impliqué (Mizuno, Irie et al. 2001) (figure 4). De plus, V. Landreville dans son mémoire (2005) a identifié la présence dans le gène EXTL3 d'un motif de liaison TRAF2 (TNFR-associated factor) existant chez tous les corécepteurs TNFR1 connus à ce jour (figure 5). Collectivement, ces données suggèrent d'une part le rôle de la protéine EXTL3 comme corécepteur dans la potentialisation de l'activité NF- κ B induite par la cytokine TNF- α , et d'autre part son implication possible dans certaines maladies inflammatoires notamment l'OA.

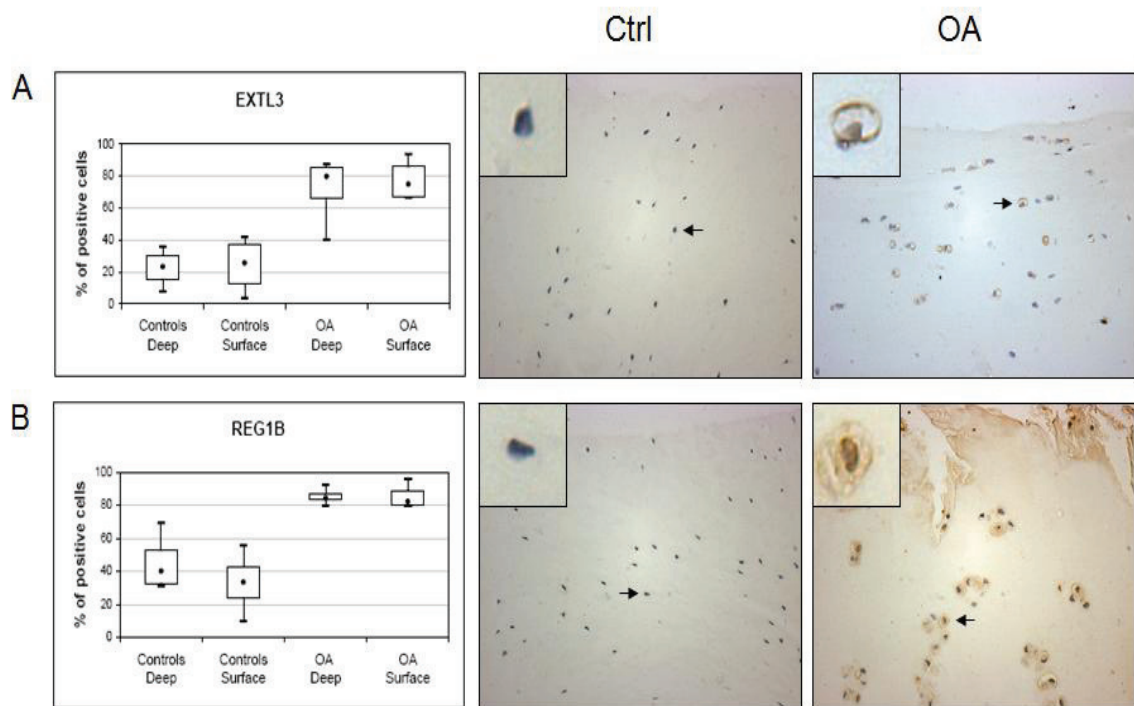


Figure 3 : Analyse immunohistochimique des protéines EXTL3, REG1B dans le cartilage humain.

Panneau gauche A et B : analyse statistique montrant respectivement la distribution des cellules positives pour EXTL3 et Reg1B dans les zones profonde et superficielle du cartilage des patients normaux et OA (exprimée en pourcentage). *Panneau droit A et B* : coupes immunohistochimiques du cartilage des patients OA et normaux avec les anticorps (flèches) EXTL3 et Reg1B, suivi d'une contre-coloration à l'hématoxyline Harris (Grossissement original = 40X). Dans le coin supérieur gauche de chaque panneau, est indiquée la coloration d'une seule cellule. Noter la coloration membranaire d'EXTL3 et extracellulaire de la protéine sécrétrice Reg1B. Figure tirée du manuscrit en préparation de Picard et al, 2010.

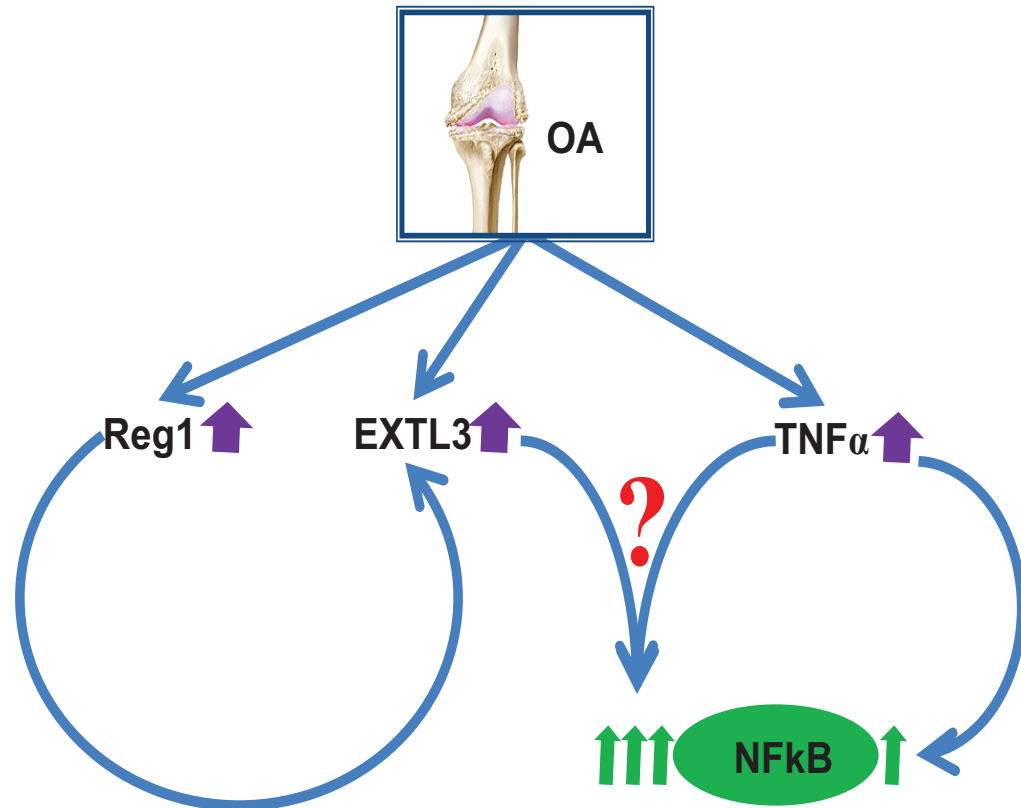


Figure 4 : Signalisation de la voie Reg et son rôle postulé dans l'inflammation.

Chez les patients OA, on note une élévation des protéines EXTL3 et Reg1, ainsi que la cytokine pro-inflammatoire TNF- α . Le facteur TNF- α est connu pour activer la voie de signalisation NF- κ B. Il a été démontré qu'EXTL3 potentialisait l'activation de NF- κ B par TNF- α (Mizuno, 2001). Toutefois le mécanisme impliqué demeure inconnu.



TNFR2 p75	PF SK EECAF R S
CD 30	H Y PE Q ETEP L
CD 40	A A P V Q E TLH G C
CD 27	TI P IQ E DY R K P
ATAR	TV A VE E TIP S F
Ox 40	RT P IQ E EQ A DA
LTBR	SR P H Q ED G K A W
EXTL3	AR S F E E E ME G D

Séquence consensus TRAF2 : (P,S,A,T) x (Q, E) E

Figure 5 : Le récepteur Reg/EXTL3 contient un domaine de liaison à TRAF2.

L'analyse de la séquence codante du gène EXTL3 par MatInspector (www.genomatix.de) a révélé la présence d'un domaine proximal au domaine transmembranaire (TM) situé dans la région N-terminale. Ce nouveau domaine code pour une séquence de liaison à TRAF2 (Rouge), qui est commune à tous les corécepteurs connus de TNFR1 (liste de gauche). Schéma extrait du mémoire de Virginie Landreville, 2005.

1.4.4. Contribution des EXT/EXTL dans certaines pathologies Humaines

La contribution des gènes EXT/EXTL dans certaines maladies humaines est répertoriée dans le tableau III.

Tableau II : Comparaison des cinq membres de la famille de gènes EXT/EXTL

Nom	Localisation	Taille	Taille	Nombre	Profil d'expression	Peptide signal
		ARNm (Kb)	cDNA (bp)			
EXT1	8q24.1	3.4	3166	746	Ubiquitaire	+
EXT2	11p11-p12	3.2	3628	718	Ubiquitaire	+
EXTL1	1p36.1	5.0	4009	676	Muscles squelettiques, cerveau et cœur	+
EXTL2	1p11-p12	2.6	2833	330	Ubiquitaire	+
EXTL3	8p12-p22	6.0	2760	900	Ubiquitaire	+
			(ORF)			

Adapté de Van Hul et al, 1997. Symbole + équivaut à présent; le symbole ? signifie inconnue; ORF (open reading frame);

Tableau III : Contribution des EXT/EXTL dans certaines pathologies Humaines

Maladies	Association chromosomique	Gène EXTL3 impliqué	Conséquence	Référence
Le syndrome d'exostose héréditaire multiple (HME)	8q24.1	Mutation d'EXT1 (60-70%)	Arrêt prématuré de la traduction, et	(Solomon 1964),
	11p11-12	Mutation d'EXT2 (30-40%)	perte de fonction protéique.	(Le Merrer, Legeai-Mallet et al. 1994; Ludecke, Wagner et al. 1995; Wuyts, Ramlakhan et al. 1995)
	19p	-		
Le syndrome de Langer Giedion (LGS)	8q24.1	EXT1	perte d'expression du gène EXT1	(Ludecke, Wagner et al. 1995)
Mucopolysaccharidose (MPS)	1p11-12	EXTL2	Détérioration des fonctions neuronales	(Kaidonis, Liaw et al. 2010)
	8p12-p22	EXTL3		
Le cancer colorectal (CRC)	8p12-p22	Perte d'EXTL3, causée par l'hyperméthylation des ilots CpG de son promoteur.	Différenciation et altération de l'expression des glycoprotéines dans les cellules CRC	(Karibe, Fukui et al. 2008)

Membres de la famille REG

1.4.5. Généralités

Les gènes *reg* (regenerating gene) appartiennent à la super famille des gènes de type C-lectin, possédant tous un domaine CTLD (C-type lectin-like domain) à l'extrémité C-terminale. La famille Reg représente un groupe de petites molécules sécrétrices principalement exprimées dans le pancréas, où elles jouent un rôle crucial dans la régénération des cellules β . Toutefois, elles peuvent avoir d'autres fonctions: facteurs anti-apoptotiques et anti-inflammatoires, facteurs de croissance pour les cellules neurales et les cellules épithéliales du système digestif (Duseti, Frigerio et al. 1994; Broekaert, Eyckerman et al. 2002). Elles sont également utilisées comme marqueur ou outil diagnostique dans les maladies cancéreuses. En dehors du pancréas et du système digestif (gastro-intestinal), les protéines Reg sont faiblement exprimées dans les ovaires, les testicules, et les reins (Laurine, Manival et al. 2005).

Les Reg doivent leur nom aux travaux de Yamamoto et al, qui découvrent en 1984, que l'administration de nicotinamide accélérât la régénération des îlots pancréatiques chez les rats victimes au préalable d'une ablation partielle du pancréas (pancréactomie) (Yonemura, Takashima et al. 1984). Après, le groupe de Terazono procéda au criblage de la banque d'ADNc dérivée de ces îlots pancréatique, et permit l'isolation d'un nouveau gène qui d'une part code pour une protéine de 165 acides aminés pourvue d'un peptide signal N-terminal de 21 aa, et d'autre part est impliqué dans la régénération ou la croissance des cellules β du pancréas (Terazono, Yamamoto et al. 1988). Ce gène fut nommé *regenerating gene* ou Reg, pour ensuite devenir Reg I en 1997. Le même groupe réussit par la suite à cloner l'ADNc Reg I humain homologue au gène Reg I du rat, mais qui à l'opposé code pour une protéine de 166 acides aminés contenant un peptide signal de 22 acides aminés dans sa région N-terminale. De plus, Reg I humain est présent en une seule copie de 3.0 Kb composé de six exons et de cinq introns. L'expression de Reg I chez l'humain est détectée

principalement dans le pancréas, et à un niveau plus faible dans la muqueuse gastrique et les reins (Unno, Yonekura et al. 1993).

Chez l'humain, Reg I est connu sous différentes appellations dans la littérature scientifique soit, lithostathine, PSP (pancreatic stone protein) et PTP (pancreatic thread protein) (De Reggi and Gharib 2001). En effet, Reg I est produit d'abord sous la forme d'une pré-protéine de 166 acides aminés, qui par clivage protéolytique génère deux autres formes dans le jus pancréatique. La première forme est une glycoprotéine soluble de 144 aa nommée lithostathine, possédant trois ponts disulfures et existant sous 11 isoformes différents de 17-22 kDa (De Reggi, Capon et al. 1995). Cette glycoprotéine semble inhiber la croissance des cristaux de calcium, et par conséquent prévient les calculs (pierres) pancréatiques; d'où le nom PSP (Bernard, Adrich et al. 1992). La seconde forme non-glycosylée (45 aa) dérive du clivage de la pré-protéine Reg I par la trypsine entre les acides aminés en position 11 (Arg) et 12 (Ile). Elle fut appelée PTP à cause de son habilité à former des fibrilles dans le pancréas au pH neutre (Patard, Lallemand et al. 2003).

1.4.6. Structure et localisation

La plupart des membres de la famille Reg possèdent une organisation génomique, et des profils d'expression tissulaire similaires. Ceci suggère qu'ils sont issus de la duplication d'un gène ancestral commun (Bartoli, Dagorn et al. 1995; Hartupee, Zhang et al. 2001).

En se basant sur la structure primaire des protéines codées par les différents gènes de la famille Reg, Okamoto groupa les membres de la famille Reg issus des espèces humaine, murine et bovine en trois sous-classes de types I, II, III (Okamoto, 1999). Une quatrième sous-classe (type IV) a été rajoutée par Zhang (Zhang, Ding et al. 2003). Chez l'humain quatre gènes Reg ont été isolés incluant Reg I α , Reg I β , HIP/PAP et Reg IV. Ils sont organisés en tandem dans une région d'ADN de 95 kbp, localisée dans le chromosome 2p12 (Miyashita, Nakagawara et al. 1995).

De nos jours, à travers les espèces humaine, bovine, porcine, et murine, environ 20 membres de la famille Reg ont été identifiés chez les mammifères (Zenilman, Magnuson et al. 1996; Schiesser, Bimmler et al. 2001). Le tableau III contient les membres les plus importants de la famille Reg

Tableau IV : Membres Important de la famille REG.

Sous- classe	Espèces	références	Longueur des acides amines	Localisation Chromosomique
Type I	Reg I α /PSP/PTP humain	Terazono, 1988	166	2p12
	Reg I β humain			
	Reg I souris	Moriizumi, 1993	166	2p12
	Reg I rat	Unno, 1993	165	6
		Terazono, 1988	165	4q33-q34
Type II	Reg II	Unno, 1993	173	6
Type III	RegIII/HIP/PAP humain	Nata, 2004	175	2p12
	Reg III (α , β , γ) souris			
	PAP rat	Okamoto, 2005	175	6
	PTP bovin	Namikawa, 2005	175	4q33-q34
		Lauriane, 2005	175	11
Type IV	Reg IV humain	Zhange, 2003	158	1q12-q21
	Reg IV souri	Abe, 2000	157	3
	Reg IV rat	Namikawa, 2005	157	2q34

PTP: pancreatic thread protein; PSP: pancreatic stone protein; PAP: pancreatic associated protein; HIP: hepatocarcinoma-intestine-pancreas.

1.4.7. REG et pathologies humaines

Le tableau IV est un résumé de la relation qui existe entre les membres de la famille Reg et une variété de maladies humaines. Toutefois, nous avons jugé pertinent de détailler certaines pathologies où le rôle des Reg est bien caractérisé.

1.4.7.1. Reg dans la réponse inflammatoire et en conditions traumatiques

Les membres de la famille Reg sont fortement exprimés dans les tissus victimes de lésions et/ou d'inflammation. La pancréatite (pathologie inflammatoire du pancréas) est le cas le plus fréquemment étudié. L'induction expérimentale de pancréatite aigüe cause une augmentation coordonnée des molécules PSP (Reg I) et PAP (Reg III), ayant des effets anti-apoptotiques et anti-inflammatoires (Dieckgraefe, Crimmins et al. 2002). Parallèlement, Reg I et III ont également été définies comme protéines sécrétrices liées au stress car ce dernier, même à un degré moindre, affecte la régulation de certaines protéines appartenant à la famille Reg (Cavallini, Bovo et al. 1998; Graf, Schiesser et al. 2002; Meili, Graf et al. 2003). De plus, le niveau d'expression de la protéine PSP/Reg I varie selon l'importance de la lésion dans le cas d'un organe donné. Ainsi, une lésion modérée ou moyenne stimule l'expression de PSP, alors qu'une blessure sévère tend à diminuer son expression (Satomura, Sawabu et al. 1993). Par conséquent, le niveau d'expression de Reg sert de marqueur pour les stades précoces de pancréatite, et pourrait même servir d'outil pour évaluer le degré de sévérité des lésions pancréatiques (Satomura, Sawabu et al. 1993). Enfin d'autres évidences supportent le rôle des Reg dans la guérison des lésions de la muqueuse gastro-intestinale (Kawanami, Fukui et al. 1997).

1.4.7.2. Reg et diabète

La capacité de régénération des ilots pancréatiques constitue une alternative crédible pour pallier ou restaurer la destruction des cellules β des patients diabétiques (Yamaoka, 1999). La protéine Reg I est connue pour jouer un rôle important dans la croissance et la régénération des cellules β , constituant donc une cible de choix dans le traitement du diabète. Dans les années 80, Takasawa et ses collaborateurs ont mis au point un modèle animal avec des cellules β endommagées (le modèle d'Okamoto). De là, ils ont démontré la capacité de Reg I à induire la prolifération des cellules β , et à améliorer les cas de diabète expérimental (Takasawa and Okamoto 2002). Les mêmes auteurs ont montré que PARP (Poly (ADP-ribose) polymérase), une enzyme nucléaire impliquée dans la régulation transcriptionnelle du gène Reg I joue un rôle clé dans la régénération des cellules β , dans le maintien de la sécrétion d'insuline, et dans la prévention de la mort des cellules β (Okamoto and Takasawa 2002). Cependant, Reg I ne semble pas être le seul membre de la famille à être impliqué dans les cas de diabète. Des investigations menées dans les ilots pancréatiques de patients morts de diabète de type I, ont permis d'identifier la protéine Reg III (HIP/PAP) (Gurr, Yavari et al. 2002).

1.4.7.3. Reg et cancers

Watanabe et al furent les premiers à établir un lien entre les gènes Reg et le cancer. Ils ont d'abord détecté différents niveaux d'expression de Reg I dans les cancers colorectaux (CRC) et gastrique; alors que dans les conditions normales il n'y a pas d'expression de Reg dans les cellules intestinales humaines (Watanabe, Yonekura et al. 1990).

Concernant le CRC, les modèles de lignées cellulaires humaines démontrent une surexpression des gènes de la famille Reg en phase de croissance et une diminution lors de la différenciation (Bernard-Perrone, Renaud et al. 1999). C'est le cas des protéines Reg I, PAP (Recherche, 1999) et Reg IV (Violette, Festor et al. 2003). De plus la perte

d'expression des protéines Reg à la fin de la croissance et au début de la différenciation cellulaire, suggère leur rôle dans la transformation néoplasique et dans la progression tumorale (Zhang, Ding et al. 2003).

L'autre volet concerne l'implication des membres de la famille Reg dans le cancer gastrique. Des études ont mis en évidence l'expression de la protéine Reg I dans les cellules gastriques ECL (enterochromaffin-like) (Kinoshita, Ishihara et al. 2004). La tumorigénèse des cellules ECL est associée aux mutations de Reg I, indiquant que ce dernier joue un rôle suppresseur de tumeur. En complément, Chiba suggère que l'abolition de la protéine sécrétrice Reg I pourrait résulter en une prolifération accrue des cellules ECL, qui éventuellement mènera à la formation de tumeurs (Chiba 1999).

Les membres de la famille Reg sont aussi associés à d'autres types de tumeurs. Bartoli et al ont trouvé que le gène HIP/PAP/RegIII était faiblement exprimé dans le cas des tumeurs de la glande hypophysaire (Bartoli, Baeza et al. 1998). De même, Zhang et son équipe ont mentionné un rôle potentiel du gène Reg IV dans le cancer de la prostate (Zhang, Ding et al. 2003). Enfin, la présence des protéines Reg dans la plupart des tissus cancéreux combinée à une expression faible dans les tissus normaux, servirait d'un point de vue clinique à la détection précoce et au traitement des cancers.

Tableau V : Implication des protéines Reg dans les maladies humaines.

Maladies	Effet sur Reg	Rôle des Reg	Références
Cardiaques	↑ Reg I et son récepteur (RegR)	Régénération des cellules du ventricule; protection possible contre stress accrue du myocarde (cœur)	(Kiji, Dohi et al. 2005)
Diabète	↑ Reg I ↑PAP	Prolifération et régénération des cellules β; facteur Anti-apoptotique et anti-inflammatoire	(Zhang, Ding et al. 2003)
Cancer lié au MSI	↑ Reg I ↑ Reg IV	Réparation de l'ADN; marqueur de différenciation	(Akiyama, Takasawa et al. 2001; Violette, Festor et al. 2003)
Cancer colorectal	↑ Reg I ↑ PAP ↑ Reg IV	Outil diagnostique; différenciation et progression des cellules tumorales	(Rechreche, Montalto et al. 1999; Violette, Festor et al. 2003; Zhang, Ding et al. 2003)
Cancer gastrique	↑ Reg I	Suppresseur de tumeurs, facteur antiapoptotique	(Kinoshita, Ishihara et al. 2004; Sekikawa, Fukui et al. 2005)
Cancer de la prostate	↑ Reg IV	Marqueur de différenciation et de progression des cellules cancéreuses	(Gu, Rubin et al. 2005)
Pancréatites aiguë	↑ Reg I ↑ Reg III	Facteur mitogénique; facteur Anti-apoptotique et anti-inflammatoire	(Zhang, Ding et al. 2003)
Lésions pancréatique	↑ Reg I	Dédifférenciation des cellules acinaires	(Sanchez, Gmyr et al. 2004)

PAP: pancreatic associated protein; MSI: microsatellite instability

1.5. Problématique

Comme mentionné précédemment, EXTL3 peut agir en tant que facteur pouvant moduler l'activité de NF- κ B en réponse au TNF- α (Mizuno, Irie et al. 2001). De plus, Reg I qui a été le premier ligand identifié pour EXTL3, joue un rôle clé dans plusieurs processus biologiques comme la régénération, l'apoptose et l'inflammation. C'est d'ailleurs son rôle anti-inflammatoire qui fera l'objet d'études pour ce projet de maîtrise.

Notre objectif principal consiste à étudier le mécanisme par lequel EXTL3 amplifie l'activation de NF- κ B par TNF- α et de déterminer si ce mécanisme pourrait s'appliquer aussi à d'autres cytokines pro-inflammatoires; et deuxièmement de caractériser comment la signalisation exercée par Reg I module la fonction du récepteur REG/EXTL3 et son interaction avec TNFR1 et/ou d'autres molécules impliquées dans la signalisation de TNF- α .

Hypothèse: Il est proposé que le récepteur REG/ EXTL3 en présence de TNF- α interagisse avec le récepteur TNFR1 au niveau de la membrane plasmique via le recrutement de la molécule adaptatrice TRAF-2 permettant ainsi de stabiliser l'interaction avec TNFR1. La formation du complexe EXTL3-TNFR1 peut ainsi activer la voie NF- κ B. Cependant, en présence du ligand Reg I cette interaction est modifiée voire inhibée, réduisant considérablement la capacité de TNF- α d'activer le facteur de transcription NF- κ B (figure 6).

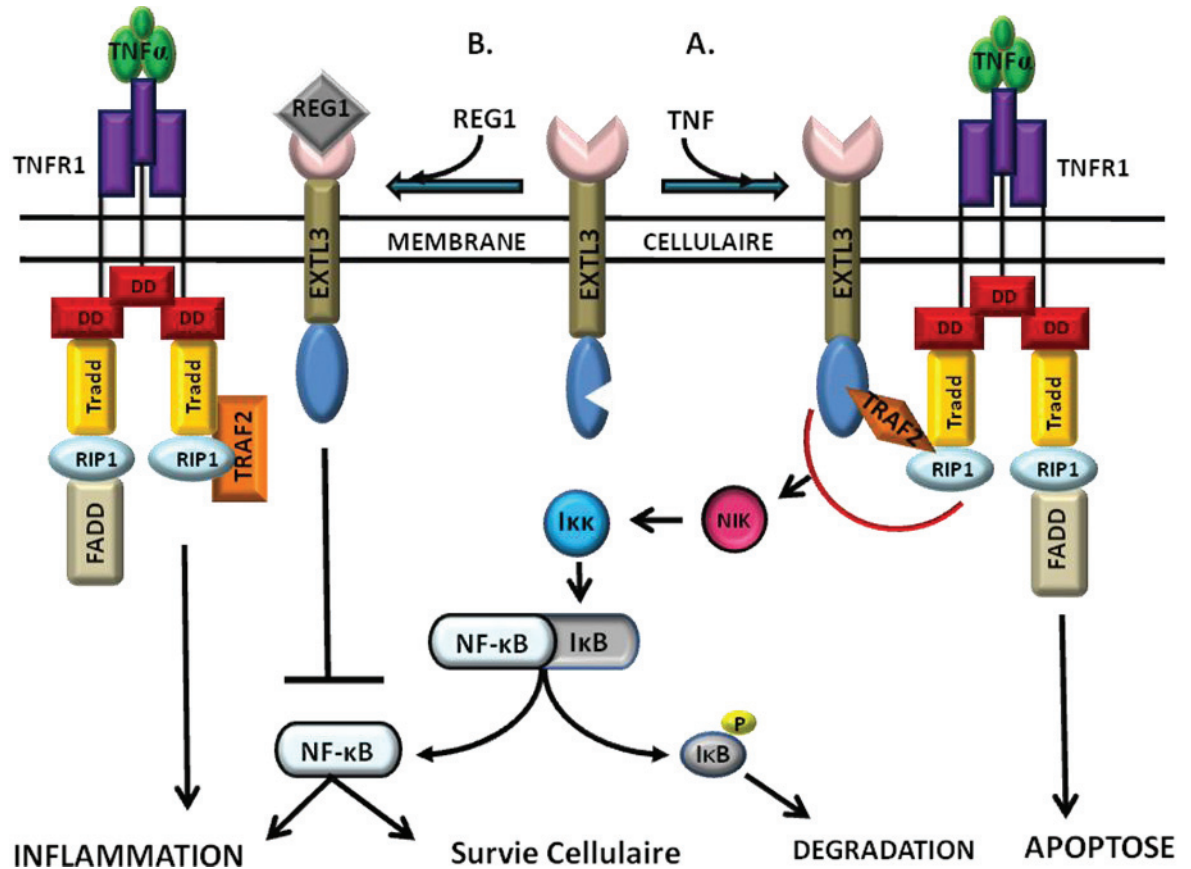


Figure 6 : Hypothèse de la signalisation TNF/TNFR1-EXTL3 dans l'activation de NF-κB.

A) La liaison de TNF- α avec son récepteur TNFR1 permet le recrutement du récepteur Reg/EXTL3 via TRAF2 menant ainsi à l'activation de la voie NF- κ B et éventuellement au déclenchement du processus inflammatoire. B) Toutefois, la présence du ligand Reg1, empêche le recrutement du récepteur EXTL3 dans le complexe TNF- α /TNFR1; entrainant par conséquent l'inhibition ou la baisse d'activité de NF- κ B.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel

2.1.1. Lignées cellulaires

Dans le cadre du présent mémoire, deux lignées cellulaires ont servi de modèle expérimental, soit les HEK293T et les C28/I2.

Les HEK293T représentent une lignée immortalisée de cellules embryonnaires de rein ayant la propriété d'être hautement transfectables. Les HEK293T ont été cultivés dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, du fabricant GIBCO BRL, ON, Canada) enrichi de 10% de sérum fœtal de bœuf (FBS) (GIBCO-BRL) et d'un cocktail d'antibiotiques (1% pénicilline and streptomycine; GIBCO) dans un environnement à 37°C et sous une atmosphère de 5% CO₂ dans l'air.

La lignée C28/I2, représente des chondrocytes humains immortalisés et provient du laboratoire du Dr Mary J Goldring. Les cellules C28/I2 ont été cultivées dans un milieu contenant un mélange de D-MEM et de F12 (GIBCO BRL, ON, Canada) selon un ratio 1:1. En plus du FBS et du cocktail d'antibiotiques, de la L-glutamine 1% (Fisher Scientific, NJ, USA) a été ajouté à au milieu de culture. L'incubation des cellules a été faite à 37°C et sous une atmosphère de 5% CO₂ dans l'air.

2.1.2. Plasmides

À l'exception de pCI-EXTL3, les plasmides utilisés pour les expériences de transfection ont été obtenus commercialement pour ensuite être transformés dans des bactéries compétentes *E. coli*. Le tableau VI résume l'ensemble des plasmides utilisés durant ce projet. La construction de pCI-EXTL3 a été effectuée en clonant le cDNA (NM_001440) de la région codante du gène EXTL3 (ORF) dans le plasmide pCI (Promega, Madison-USA). Les différents plasmides ont été transformés dans la souche BL21 d'*E. coli* par un choc thermique de 45 secondes à 42 °C, suivi d'une incubation durant 16-18 heures à 37°C avec agitation des bactéries dans 500 ml de milieu LB (12,5g extraits de levures; 12,5g

bacto-tryptone/Litre d'eau). Les différents plasmides ont ensuite été isolés et purifiés par la technique de gradients de césium.

2.1.3. Solutions et matériel de transfection

Les pétris 10cm (Corning, NY, USA) ont été utilisés pour la mise en culture des cellules C28/I2. La transfection a été effectuée dans des plaques de 12 puits (Corning, NY, USA). La lipofectamine TM 2000 (Invitrogen, #11668-019; Carlsbad, CA, USA) a été utilisée comme agent de transfection dans du Opti-MEM (GIBCO BRL, ON, Canada).

Tableau VI : Plasmides utilisés pour la transfection

Plasmide	Compagnie	No Catalogue
pCI-EXTL3	Promega	# Q5021
pCMV-Reg1B (Myc/DDK tag)	ORIGENE	# RC202773
(5x)-pNF- κ B-Luc	Stratagene	#219078
pLPC-NEP	Dr Gerardo Ferbeyre, Université de Montréal	
pCMV- β -Gal	Clontech	#631719

B-Gal : β -galactosidase

2.1.4. Amorces

Les amorces ayant servi à l'analyse d'expression des différents gènes par RT-PCR sont répertoriées dans le tableau VII.

Tableau VII : Amorces utilisées pour l'analyse d'expression génique.

Gènes	Amorce sens	Amorce anti-sens	Taille de l'amplification (bp)
EXTL3	TGCAGAGGACTCATGACAGG	GCTGCCCCTAGATGAACTTG	2700
B-actine	GGAAATCGTGCGTGACAT	TCATGATGGAGTTGAAGGTAG	233
TNF-α	AGGCGGTGCTTGTCCTCAG	CTCTCAGCTCCACGCCATTG	280
IL-6	AAGCGCCTTCGGTCCAGTTG	AGGCTGGACTGCAGGAACTC	560
P65	CAGTACCTGCCAGATACAGA	GTCACTAGGCGAGTTATAGC	656

2.1.5. Protéines recombinantes et drogues

La protéine recombinante TNF- α (Invitrogen; PHC3015) a été reconstituée dans de l'eau double distillée à une concentration de 0,1mg/mL, filtrée et aliquotée à -20°C ; la protéine recombinante IL-1 β (Invitrogen; PHC0815) a été reconstituée dans de l'eau double distillée à une concentration de 0,1mg/mL, filtrée et aliquotée à -20°C; La protéine recombinante Reg1B (Biovendor; RD172078100 et RD172084100) a été reconstituée dans de l'eau double distillée (ddH₂O) à une concentration de 0,1mg/mL, filtrée et aliquotée à -80°C; la poudre de glucosamine (Sigma-Aldrich; St-Louis, MO, USA) a été diluée à une concentration stock de 20mg/mL dans de l'eau double distillée (ddH₂O) et aliquotée à -20°C.

2.1.6. Anticorps

Les anticorps utilisés pour l'immunobuvardage de type Western et pour l'immunofluorescence sont répertoriés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Anticorps utilisés pour les immunobuvardages de type Western et les immunofluorescences.

Immunobuvardage Western		
Anticorps primaires	Origine	Compagnie
(No catalogue)		
anti-EXTL3 (10588-1-AP)	Polyclonal, lapin	Protein Tech Group
anti-TNFR1 (LS-C18910)	Polyclonal, lapin	LifeSpan
anti-TRAF2 (HM1378)	Polyclonal, lapin	Hypromatrix
anti-GAPDH (V-18)	Polyclonal, chèvre	Santa Cruz
anti-Lamine A/C (2032)	Polyclonal, lapin	Cell Signaling
anti-NaK/ATPase (3010)	Polyclonal, lapin	Cell Signaling
Immunofluorescence		
anti-EXTL3 (10588-1-AP)	Polyclonal, lapin	Protein Tech Group
anti-TNFR1(MAB3216)	Monoclonal, souris	Millipore
anti-TRAF2 (Sc-7346)	Monoclonal, souris	Santa Cruz

2.1.7. Microscope à fluorescence et microscope confocal

Les lames marquées avec un seul anticorps ont été visualisées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leica DMR; Germany) avec un grossissement de 40X. Les lames marquées avec deux anticorps, ont été observées à l'aide d'un microscope confocal de type Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada) doté d'un objectif à huile dont le grossissement est de 63X. Les images ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Zeiss LSM Image Browser.

2.2. Méthodes

2.2.1. Transfection, essais luciférase et de β -galactosidase

Toutes les transfections plasmidiques présentées dans le cadre de ce projet ont été effectuées par la méthode de la lipofectamine 2000 (Invitrogen, #11668-019; Carlsbad, CA, USA), et en triplicata pour chaque condition expérimentale. Brièvement, 135 000 cellules C28/I2 ont été mises en culture dans des plaques de 12 puits, 24h avant la transfection. Le milieu de culture a ensuite été remplacé par un milieu sans sérum (Opti-MEM; GIBCO BRL, ON, Canada) 1h avant la transfection. Chaque puits de la plaque de 12 puits a été transfecté avec 4 μ L de LipoTM2000 diluée dans 100 μ L d'Opti-MEM et 700ng d'ADN plasmidique total aussi dilué dans 100 μ L d'Opti-MEM, pour 4-6 h. La transfection inclut aussi 200ng de plasmide β -gal (Clontech), servant à évaluer l'efficacité de transfection et 400 ng de plasmide pNF- κ B-Luc (Stratagene), servant de gène rapporteur. Les cellules ont été lavées avec du Opti-MEM et mis en présence de DMEM/F12 enrichi de FBS pour 16h, pour qu'elles récupèrent. Elles ont ensuite été mises en présence de milieu DMEM/F12 sans FBS pour 2h, qui a ensuite été remplacé par un le milieu de culture standard juste avant le traitement au TNF- α (10ng/mL; Invitrogen), ou à l'IL-1 β (10ng/mL; Invitrogen), ou à la glucosamine (1mg/mL; Sigma Aldrich) pendant 8h. Enfin, les cellules ont été lavées deux fois au PBS 1X (10,1 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl) à 4°C, lysées avec le buffer de lyse : Glo1x Lysis Buffer (Promega; Madison, WI, USA), et finalement soumises aux essais luciférase et de β -galactosidase. Les données sont exprimées en activité relative de la luciférase en réponses aux divers traitements, tel qu'indiqué. Les valeurs mesurées de la luciférase ont été normalisées d'un part par rapport aux lectures de β -galactosidase et de l'autre par rapport aux valeurs du vecteur vide pCI.

2.2.2. Extraction d'ARN, RT-PCR et qPCR

L'ARN total a été extrait directement des cellules en culture grâce au Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Pour la RT-PCR, 2 μ g d'ARN total ont été retranscrits en ADNc à

l'aide de la ThermoScript reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Environ 0.1µg d'ADNc ont été utilisés pour les réactions de PCR, effectuées dans un volume final de 25µl contenant 200 µmol de dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 10 pM de chaque amorce (Tableau VII), plus 1U d'ADN polymérase Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les réactions ont été effectuées avec 34 cycles à l'aide du Thermocycler T3000 (Biometra, Germany). Les produits d'amplification de la PCR ont été séparés sur un gel d'agarose de 1,2% et visualisés au bromure d'éthidium. Les réactions de qPCR ont été réalisées avec les mêmes ADNc à la plate-forme génomique de l'IRIC (Institut de recherche en immunologie et en oncologie; Montréal, QC, Canada).

2.2.3. Extraction des protéines totales

Un pétri de cellules confluentes par condition a été lavé deux fois dans du PBS 1X (10,1 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl) à 4°C, puis récoltées et lysées dans un tampon de lyse (20mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1mM EGTA; 1% triton X-100; 2,5 mM Sodium pyrophosphate; 1mM β-glycérolphosphate) contenant en plus un cocktail d'inhibiteur de protéases 1X (Roche, Indianapolis, IN, USA). Après 30 à 60 minutes d'incubation à 4°C avec agitation, les lysats protéiques ont été récoltés suite à une centrifugation de 15 minutes à 11200 x g.

2.2.4. Séparation des protéines nucléaires et cytoplasmiques

Entre deux et trois pétris de cellules confluentes (5x10⁶ cellules /pétri) par condition, ont été lavées deux fois dans du PBS 1X (10,1 mM Na₂HPO₄; 1,8mM KH₂PO₄; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl) à 4°C, grattées et transférées dans des tubes de 1,5 ml. Après, une centrifugation de 5 minutes à 100 x g, les culots de cellules ont été resuspendus dans 300 µl de tampon de lyse hypotonique (10 mM Hepes pH7, 9; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 1% NP-40; 0,5 mM DTT) complété avec un cocktail 1X d'inhibiteurs de protéases (Roche, Indianapolis, IN, USA), incubées sur glace durant 25 minutes en vortexant tous les 3 à 4

minutes. Les lysats ont été centrifugés à 4 °C durant 5 minutes à 1200 x g, afin d'obtenir un culot contenant les noyaux cellulaires. Les surnageants, contenant les protéines cytoplasmiques ont été transférées dans de nouveaux tubes de 1,5 ml, puis recentrifugés une deuxième fois à 4 °C durant 10 minutes à 1200 x g pour enlever les débris restants et minimiser la contamination par les protéines nucléaires. Les surnageants ont été retransférés dans de nouveaux tubes 1,5 ml. Les culots de noyaux ont été resuspendus dans 8 ml de tampon de lyse nucléaire (50 mM Tris-HCl pH7,6; 2 mM EDTA; 2 mM EGTA; 1 mM DTT; cocktail d'inhibiteurs de protéases 1X (Roche, Indianapolis, IN, USA) contenant 0.1% triton 100-X et déposés sur 2 ml de coussin de sucrose (tampon de Lyse nucléaire contenant 30% p/v de sucrose) dans des tubes de 15 ml. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 4 °C durant 50 minutes à 3500 x g dans une centrifugeuse de type Sorvall legend RT centrifuge. Le tampon a été décanté pour ne laisser au fond des tubes que les culots de noyaux purifiés. Ces derniers ont été resuspendus dans 50 à 100µl de tampon Laemmli 4X (0,52M Tris-HCl pH6,8; 6,85% SDS; 3,3% β-mercaptoethanol; 20% glycerol) et bouillis durant 5 minutes. Après dosage des protéines par un essai de type Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 30µg de protéines cytoplasmiques et nucléaires ont été séparées par SDS-PAGE sur gel d'acrylamide et analysées par immunobuvardage de type Western. De plus, la pureté des fractions protéiques obtenues a été évaluée à la fois avec les marqueurs de fractions nucléaires (Lamine) et cytoplasmiques (GAPDH).

2.2.5. Extraction des protéines membranaires

Entre 5 à 10 pétris de cellules confluentes par condition expérimentale, ont été lavées trois fois avec un tampon PM (0,25 M Sucrose; 1mM EDTA; 20 mM Tricine) à 4 °C, grattées et transférées dans des tubes de 15mL. Après, une centrifugation de 5 minutes à 1000 x g, les culots de cellules ont été résuspendus dans 1mL de tampon de lyse PMC (0,25 M Sucrose; 1mM EDTA; 20 mM Tricine; 1 mM PMSF; 0,4 mM Sodium Orthovanadate) contenant en plus un cocktail 1X d'inhibiteurs de protéases (Roche, Indianapolis, IN, USA). Ensuite, elles ont été homogénéisées avec des billes de céramiques (Bertin Technologie; Montigny,

France) à l'aide de l'homogénéiseur Precellys (Bertin Technologie; Montigny, France) 3x à 5500 x g pour 90 secondes avec une pause de 2 minutes entre chaque cycle, et elles ont ensuite été centrifugées à 1000 x g pour 10 minutes à 4°C. Les surnageants ont par la suite été transférés dans des tubes de 1,5mL, tandis que les culots restant ont été résuspendus dans 300µl de tampon de lyse PMC à 4 °C pour recommencer les étapes d'homogénéisation et de centrifugation. Suivant le dosage des protéines par un essai de type Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), les surnageants contenant 4 mg de protéines ont été déposés sur 15mL de coussin de Percoll (tampon de lyse PMC contenant 30% de Percoll : GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) contenu dans des tubes de centrifugation (Beckman, CA, USA) de dimensions (25 x 89 mm). Dans l'étape suivante, une centrifugation a été effectuée à l'aide d'une ultracentrifugeuse (L8-70M Ultracentrifugeuse Beckman; CA, USA) dans un rotor (50.2 Ti) à angle fixe à 84 000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Les fractions de membrane plasmique (PM) visibles sous forme d'un anneau situé à une distance de 5.7 cm du fond du tube, ont été prélevées avec précaution pour éviter toute contamination par les autres fractions présentes (RE, Golgi, mitochondrie), et transférées dans des tubes de centrifugation de 1,5mL (Beckman; CA, USA). Ces fractions ont ensuite été centrifugées à 105 000 x g durant 90 minutes dans un rotor TLA 100.4 (Beckman, CA, USA) à l'aide d'une micro-ultracentrifugeuse (Baby Beckman Optima™ Max ultracentrifugeuse, CA, USA). Finalement, les fractions PM sous la forme d'une bande blanche, ont été prélevées soigneusement afin de ne pas toucher au Percoll situé dans le fond du tube. Elles ont été diluées dans un tampon de lyse PMC avant de faire l'objet d'un dosage protéique par un essai de type Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), suivi immédiatement des expériences d'immunoprécipitations ou d'immunobuvardages. La pureté des protéines membranaires a été évaluée par SDS-PAGE sur gel d'acrylamide, et analysée par immunobuvardage de type Western, avec le marqueur Na⁺K⁺ATPase. Pour éviter aussi toute contamination de la fraction membranaire par d'autres organelles (Golgi, mitochondrie, RE); nous avons analysé chaque fraction membranaire obtenue (données non présentées) par immunobuvardage de type Western, en présence de marqueurs

mitochondriaux (Cox IV), de Golgi (Syntaxine 6), de RE (Calnexine) et nucléaire (Lamine).

2.2.6. Essais d'immunoprécipitation

Des cellules C28/I2 (1×10^6 cellules /pétris) ont été mises en culture pour 24 h. Elles ont ensuite été incubée pendant 2h dans un milieu sans FBS, qui a été remplacé par un milieu de culture standard (DMEM/F12 avec un ratio 1:1; 10% FBS; 1% de cocktail d'antibiotiques; 1% L-glutamine). Les cellules ont par la suite été traitées ou non au TNF- α (10ng/mL; Invitrogen), ou à l'IL-1 β (10ng/mL; Invitrogen), ou à la glucosamine (1mg/mL; Sigma-Aldrich) pendant 8h. Après, elles ont été lavées deux fois dans du PBS froid, puis récoltées et lysées dans un tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 1mM PMSF; 0,4 mM Sodium Orthovanadate, 1% Nonidet P-40 (NP-40), 2 mM EDTA) contenant en plus un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche, Indianapolis, IN, USA). Après 30 à 60 minutes d'incubation à 4°C avec agitation, les lysats protéiques ont été récoltés suite à une centrifugation de 20 min à 11 200 x g. Les immunoprécipitations ont été réalisées toute une nuit à 4°C, en présence de 1 mg de protéines totales et de l'anticorps primaire. Les anticorps primaires suivants ont été utilisés: anti-EXTL3 (10588-1-AP; 10 μ g/mL; Protein Tech Group), anti-TNFR1 (LS-C18910; 10 μ g/mL; LifeSpan), anti-TRAF2 (HM1378; 10 μ g/mL; Hypromatrix). Les immunoprécipitats ont été récoltés après 4 heures d'incubation à 4°C en présence de protéines A/G Sépharose (Amersham Biosciences Corp., QC, Canada) selon l'espèce, et lavés 3 fois au tampon de lyse, 1 fois au PBS 1X et 1 fois avec de l'eau. Finalement, les précipitats ont été élués dans 60 μ l de tampon Laemmli 3X, bouillis pendant 5 minutes et utilisés pour l'analyse par immunobuvardage de type Western.

2.2.7. Immunobuvardage de type Western

Les extraits protéiques ont été séparés par SDS-PAGE sur gel d'acrylamide à l'aide du système Mini-protean II (BioRad, Hercules, Californie). Les gels étaient constitués d'un gel de concentration composé de 4% d'acrylamide (v/v) dans un tampon Tris 0,5M pH 6,8 et d'un gel de résolution formé de 8-12% d'acrylamide (v/v) dans du tampon Tris 1,5 M pH 8,8. La migration des protéines a été effectuée à 4°C sous une tension de 120 volts. Les protéines ont été transférées ensuite sur une membrane de PVDF (Millipore) durant 90 minutes sous une tension de 100 volts. Une fois le transfert terminé, les membranes ont été prétraitées pour quelques secondes dans du méthanol, puis ont été incubées pendant 1 heure dans une solution de blocage (PBS 1X; 0.02% Tween-20; 10% lait non gras). Après trois lavages de 15 minutes avec du PBST (PBS 1X; 0.02% Tween-20), les membranes ont été incubées pour toute la nuit en présence de l'anticorps primaire (Tableau VIII) qui a été dilué dans une solution de PBST contenant 3% de BSA (Serum d'albumine bovin; Bioshop) et 0.02% d'azoture de sodium (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA). Le jour suivant, les membranes ont été incubées en présence des anticorps secondaires couplés à la peroxydase (Thermo Scientific, Rockford, USA) et dilués dans une solution de PBST contenant 5% de lait non gras, pour une période d'une heure à température pièce. Après 1heure de lavage dans du PBST (avec changement de la solution de lavage toutes les 15 minutes), les signaux ont été révélés à l'aide du réactif ECL (Enhanced chemiluminescence substrate; PerkinElmer, Watlham, MA, USA) et détectés sur un film autoradiographique (Amersham Biosciences Corp., QC, Canada).

2.2.8. Essais d'immunofluorescences

Des cellules C28/I2 (15 000 cellules/ puits) ont été cultivées dans des labtek à huit puits pour une période de 24 heures. Après 2 heures de privation dans un milieu de culture dépourvu de sérum, les cellules ont été traitées ou non au TNF- α (10ng/mL; Invitrogen). Par la suite, elles ont été lavées 2 fois dans du PBS 1X et fixées dans une solution de

paraformaldéhyde 3,7% et perméabilisées dans du PBS 1X contenant 0,1% Triton 100-X durant 10 minutes. Les cellules après deux lavages au PBS 1X, ont ensuite été incubées durant 20 minutes dans une solution de blocage (PBSA) contenant du PBS 1X supplémenté de 1% de sérum d'albumine bovin (BSA; BioShop, Burlington, ON, Canada). L'étape d'après, les cellules ont été incubées en présence des anticorps primaires (tableau VII) dilués dans du PBSA, pendant 2 heures à 37°C. Elles ont été lavées 4 fois au PBSA et finalement incubées en présence des anticorps secondaires (Alexa fluor; Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) dilués dans du PBSA, pendant 1 heure à 37°C. Après 3 lavages au PBS 1X, les lames ont été montées à l'aide d'une colle contenant du DAPI (Prolong Gold; Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), puis observées en microscopie à fluorescence et/ou confocale.

CHAPITRE 3 : RESULTATS

3.1. Effet de la protéine EXTL3 sur l'activité de NF- κ B.

Le facteur de transcription NF- κ B est un élément clé du processus inflammatoire. Pour étudier l'effet de la protéine EXTL3 sur l'activité NF- κ B, on a choisi comme approche des transfections transitoires avec un gène rapporteur luciférase et comme modèle expérimental la lignée de chondrocytes articulaires humain immortalisés: C28/I2. L'utilisation de cette lignée se justifie par le fait que les chondrocytes articulaires constituent avec les synoviocytes la cible principale du mécanisme d'action des cytokines dans le processus inflammatoire survenant au cours de la pathogenèse de l'arthrose (Tetlow, Adlam et al. 2001). De plus, contrairement aux chondrocytes articulaires des patients OA, les C28/I2 conservent leur phénotype après plusieurs passages cellulaires.

Les cellules C28/I2 ont été transfectées avec le plasmide pCI-EXTL3 et les rapporteurs pCMV- β -gal, et pNF- κ B-Luc5x. Ce dernier est pourvu de cinq éléments activateurs (enhancers) NF- κ B alignés en tandem et précédant le gène rapporteur de la luciférase. Par la suite, les cellules ont été traitées avec 10ng/mL de TNF- α ou IL-1 β pendant huit heures, et soumises aux essais luciférase et de β -galactosidase. Les résultats de la figure 7A montrent une augmentation de l'activité NF- κ B induite par TNF- α d'un facteur 5X par rapport au témoin (CTRL). Cette activité NF- κ B est amplifiée d'un facteur 20X en présence d'EXTL3 comparativement aux cellules transfectées avec le vecteur vide, et d'un facteur 5X par rapport à l'activité induite par TNF- α . Nous avons ensuite examiné si EXTL3 était capable de moduler l'activité NF- κ B pour d'autres cytokines pro-inflammatoires. Pour ce faire, nous avons choisi IL-1 β , qui est connu pour avoir des effets similaires à TNF- α sur la voie pro-inflammatoire NF- κ B. Les résultats de la figure 7B indiquent qu'en absence d'IL-1 β , les cellules surexprimant EXTL3 montrent une activité basale de NF- κ B, qui est augmentée d'un facteur en 5X en présence d'IL-1 β . Ceci suggère qu'EXTL3 potentialise également l'activité NF- κ B induite par IL-1 β . Nous avons ensuite vérifié si l'effet de la surexpression d'EXTL3 sur l'activité NF- κ B, se reflétait au niveau de son expression et de celle de ses gènes cibles (TNF- α et IL-6). Nous avons donc procédé à une analyse d'expression par RT-PCR via l'ARN extrait des cellules C28/I2 surexprimant EXTL3, et traitées ou non en présence de TNF- α . Les résultats de la figure 7C montrent une faible

expression du gène EXTL3 dans les cellules où EXTL3 n'est pas surexprimée. Ce niveau d'expression augmente évidemment dans les conditions de surexpression d'EXTL3, et demeure constant dans les conditions de surexpression et de traitement au TNF- α . Ces résultats suggèrent une bonne efficacité de transfection. Dans le cas du gène TNF- α , il n'y a pas d'expression en absence de surexpression d'EXTL3. Celle-ci survient par contre, après avoir surexprimé EXTL3 et demeure stable en combinant TNF- α et EXTL3. Pour l'IL-6 les mêmes tendances sont observées, signifiant que la surexpression d'EXTL3 augmente le niveau d'expression d'IL-6. Enfin, l'analyse d'expression de la sous-unité p65 de NF- κ B montre une faible expression en absence de traitement et de surexpression d'EXTL3, alors que la surexpression d'EXTL3 et la présence de protéines recombinantes TNF- α , augmentent nettement son niveau d'expression. La β -actine est un gène d'entretien utilisé comme contrôle, afin de vérifier que des quantités égales d'ARN ont été utilisées pour chaque condition expérimentale. Ces résultats suggèrent que même en absence du ligand TNF- α , un niveau basal d'EXTL3 affecte l'expression du facteur de transcription NF- κ B et par conséquent l'expression de ses gènes cible. De plus, cet effet pourrait s'expliquer par une rétroaction positive (feedback positif).

Pris globalement, les résultats suggèrent un rôle de la protéine EXTL3 comme médiateur important des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β dans l'activation de la voie NF- κ B.

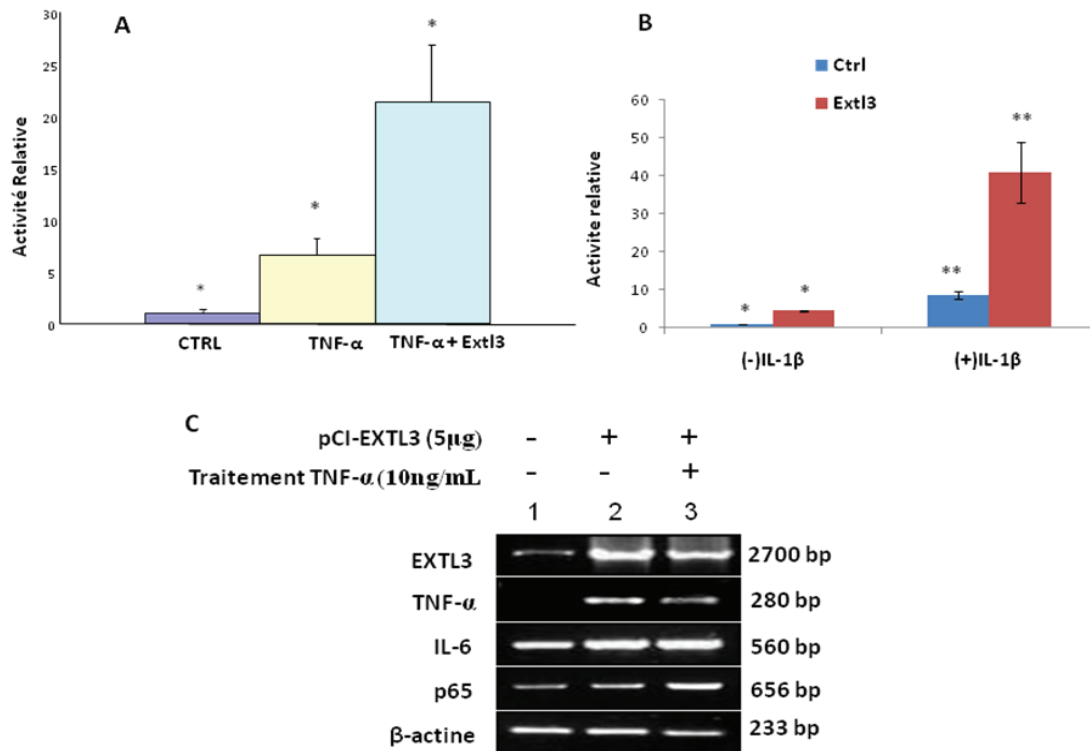


Figure 7 : Activation du rapporteur NF- κ B induite par les cytokines pro-inflammatoires dans les C28/I2 surexprimant EXTL3.

A) 20ng de pCI-EXTL3 ont été transfectés dans les cellules C28/I2 avec 400ng de plasmide pNF- κ B-Luc5x, 200ng de pCMV β -Gal et 80ng de pLPC-NEP pour 4h. La quantité du vecteur vide pCI a été ajustée à 700ng d'ADN totale avec le vecteur pLPC-NEP. Après 16h d'incubation à 37°C; 5 % CO₂, les cellules ont été incubées environ 2h dans du DMEM/F12 dépourvu de FBS, puis traitées ou non au TNF- α (10ng/mL) pendant 8h de temps. Ensuite, elles ont été lysées et soumises aux essais luciférase et de β -galactosidase. Toutes les valeurs ont été normalisées par rapport aux lectures de la β -galactosidase et du vecteur vide pCI. Statistiques * $P \leq 0.05$. **B)** Même procédure appliquée à l'IL-1 β (10ng/mL). Statistique * P value ≤ 0.01 ; ** P value ≤ 0.05 ; (-) i.e absence; (+) signifie (i.e) présence. Le terme Ctrl fait référence aux C28/I2 ne surexprimant pas EXTL3. **C)** RT-PCR sur ARN des cellules C28/I2 surexprimant EXTL3 et traitées ou non au TNF- α (10ng/mL), pour examiner si l'effet de la surexpression d'EXTL3 sur l'activité NF- κ B affectait le niveau d'expression de ce dernier et de celui des gènes cibles NF- κ B. La β -actine est un contrôle pour s'assurer que la même quantité d'ARN a été utilisée partout dans l'expérience.

3.2. Caractérisation du mécanisme d'activation de la voie NF- κ B dans les C28/I2.

Avant de caractériser le mécanisme par lequel EXTL3 potentialise l'activation de NF- κ B par TNF- α , nous avons évalué le niveau endogène des protéines EXTL3, TNFR1 et TRAF2 dans les cellules C28/I2. Les analyses par immunobuvardage de type Western (figure 8) réalisées sur les extraits totaux de lignées C28/I2 non traitées, révèle une présence endogène suffisante des protéines EXTL3, TNFR1 et TRAF2.

La protéine EXTL3 possède un domaine transmembranaire (TM) à l'extrémité N-terminale qui la prédestine à un ancrage membranaire (Kobayashi, Akiyama et al. 2000). De plus, la découverte d'un domaine de liaison TRAF2 au niveau de la séquence codante (ORF) du gène EXTL3, et qui est présent chez tous les corécepteurs de TNFR1 (Landreville, 2005), suggère une possible interaction entre EXTL3 et le récepteur transmembranaire TNFR1. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué des expériences d'immunoprecipitation (IP), suivies d'immunobuvardage (IB) sur des extraits membranaires de C28/I2 traitées ou non pendant huit heures par le TNF- α (10ng/mL). Les données de la figure 9 ne révèlent une interaction entre les protéines EXTL3 et TNFR1 qu'en présence de TNF- α (figure 9A et B). La protéine TRAF2, elle interagit à la fois avec TNFR1 et EXTL3 (figure 9A, B et C), quelles que soit les conditions expérimentales. Toutefois, cette interaction est plus forte en présence de TNF- α (figures 9A et C).

Collectivement, les résultats suggèrent la formation d'un complexe protéique membranaire TNFR1-EXTL3 par l'intermédiaire de la protéine TRAF2, en réponse au TNF- α .

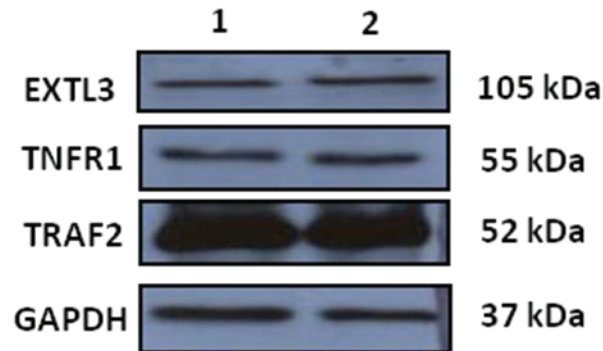


Figure 8 : Analyse d'expression des protéines EXTL3, TNFR1 et TRAF2 dans les cellules C28/I2.

Analyse par immunobuvardage de type western dirigée contre EXTL3, TNFR1 et TRAF2 sur 30 μ g d'extraits totaux provenant des lignées de chondrocytes articulaires humain (C28/I2). Le lysat cellulaire a été migré sur un gel SDS-PAGE à 120V, puis transféré sur une membrane PVDF afin d'être analysé par immunobuvardage de type Western. Les bandes protéiques ont été révélées à l'aide du réactif ECL. Le marqueur GAPDH est un control positif, indiquant que des quantités égales d'échantillons ont été chargées dans chaque puits du gel SDS-PAGE. Les chiffres 1 et 2 représentent des duplicatas du même échantillon.

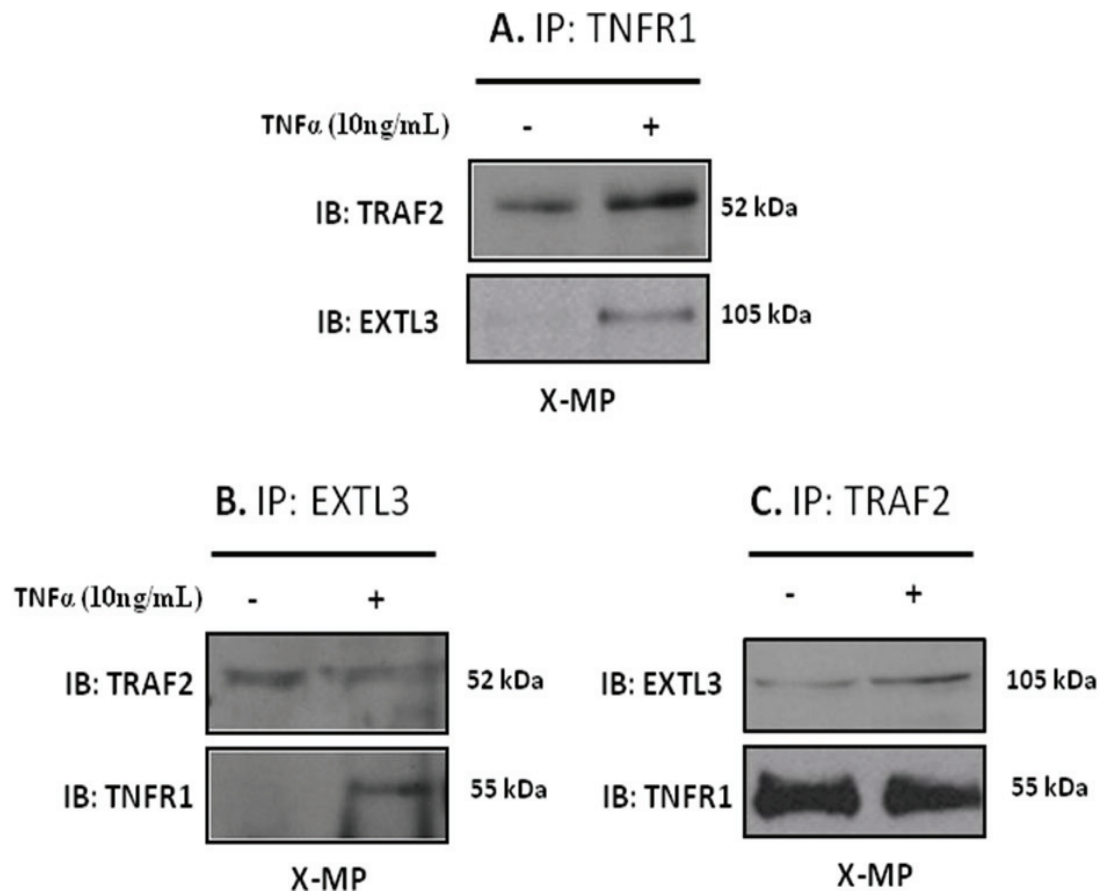


Figure 9 : TNF- α entraîne la formation d'un complexe protéique EXTL3- TRAF2- TNFR1 au niveau de la membranaire plasmique.

Des expériences d'immunoprécipitation (IP) et d'immunobuvardage (IB) ont été réalisées sur un total de 1mg d'extraits membranaires plasmique (X-MP) issus des cellules C28/I2 traitées ou non au TNF- α (10ng/mL). Le lysat cellulaire a été analysé sur un gel SDS-PAGE à 120V, puis transféré sur une membrane PVDF afin d'être analysé par immunobuvardage de type Western. Les bandes protéiques ont été révélées à l'aide du réactif ECL. **A)** Une immunoprécipitation dirigée contre TNFR1, suivie d'un immunobuvardage contre TRAF2 et EXTL3 a été effectué. **B)** Une IP dirigée contre EXTL3, suivie d'un IB contre TRAF2 et TNFR1 a été effectué. **C)** Une IP dirigée contre TRAF2, suivie d'un IB contre TNFR1 et EXTL3 a été réalisé. Les symboles - et + signifient respectivement absence et ajout ou addition.

3.3. Effet de la cytokine TNF- α sur le complexe TNFR1/EXTL3.

Nous avons aussi étudié la formation du complexe EXTL3-TNFR1 induite par TNF- α en fonction du temps. Pour ce faire, nous avons effectué une immunoprécipitation dirigée contre TNFR1, suivi d'un immunobuvardage contre EXTL3 sur des extraits de protéines membranaires de cellules C28/I2 traitées en présence de TNF- α à différentes périodes de temps. Les résultats de la figure 10A montrent une absence ou une faible interaction de la protéine EXTL3 avec TNFR1 durant les premières périodes de traitement (0 à 45 minutes). Cependant, cette dernière est visible à 60 minutes, et optimale après huit heures de traitement. Ces résultats suggèrent que le temps de traitement de huit heures avec 10ng/mL de TNF- α est idéal pour la formation du complexe membranaire TNFR1-EXTL3. Néanmoins, pour comprendre la perte de l'interaction EXTL3/TNFR1 dans l'intervalle 0 à 45 minutes, nous avons procédé à des analyses d'immunobuvardage avec un anticorps dirigé contre EXTL3 sur des extraits de protéines membranaires (Figure 10B) et cytoplasmiques (figure 10C), provenant des cellules C28/I2 et traitées dans des conditions similaires à la figure 9A. Les résultats montrent une perte ou diminution progressive d'EXTL3 dans la membrane plasmique pour les intervalles de temps 5 à 45 minutes (figure 10B). Toutefois au niveau des extraits cytosoliques, le niveau d'EXTL3 est constant à l'exception des temps 30 min et 45 min pour lesquels une perte est également observée. Cette observation suggère une dégradation de la protéine EXTL3 en réponse au TNF- α , plutôt que sa translocation. Cependant pour vérifier qu'EXTL3 n'était pas localisée dans un autre compartiment cellulaire, nous avons refait la même expérience, mais avec des extraits nucléaires (données non présentées). Les résultats obtenus étaient négatifs parce qu'aucune trace de la protéine EXTL3 n'était visible dans les extraits nucléaires après l'immunobuvardage avec un anticorps dirigé contre EXTL3; suggérant que la protéine EXTL3 ne s'accumulait pas dans le noyau.

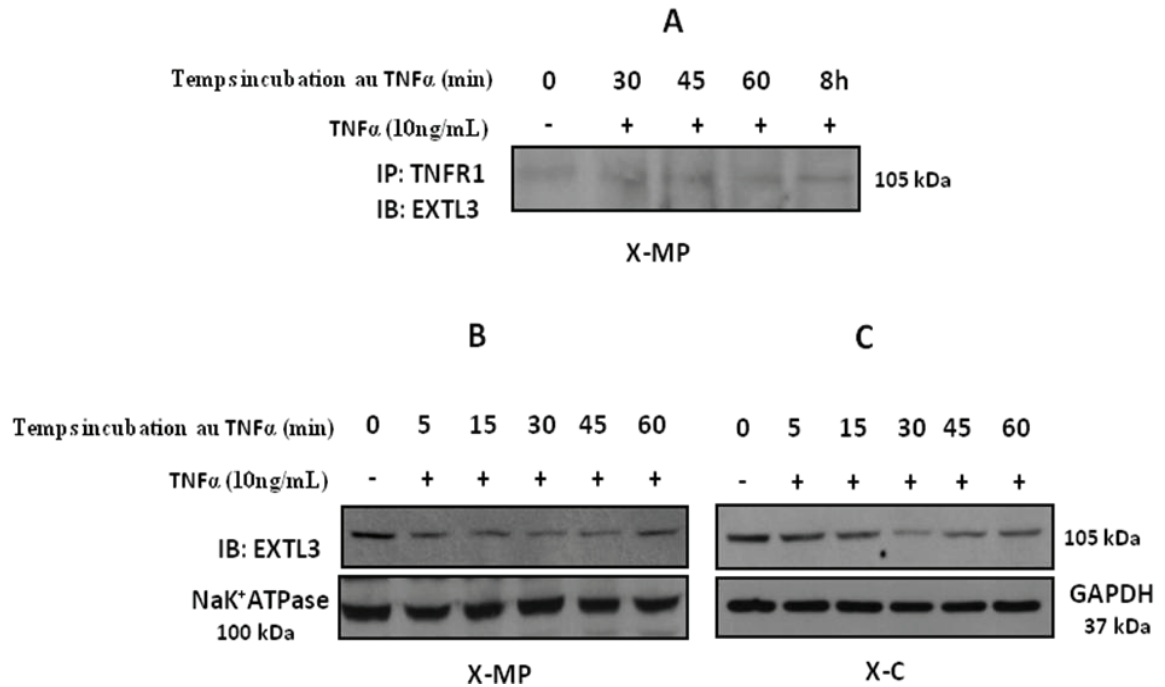


Figure 10 : Compartimentalisation du récepteur Reg/EXTL3 au cours du temps en réponse à la cytokine TNF- α .

A) Analyse par immunoprécipitation dirigée contre TNFR1, suivi d'un immunobuvardage contre EXTL3 sur 1mg d'extraits de protéines membranaires (X-MP) de cellules C28/I2, afin d'évaluer l'interaction EXTL3-TNFR1 à différents temps de traitement au TNF- α (10ng/mL). **B)** Analyse de la présence d'EXTL3 dans la membrane et le cytosol, par immunobuvardage dirigée contre EXTL3 sur 30 μ g d'extraits de protéines membranaires (X-MP) et **C)** cytoplasmiques (X-C), provenant des cellules C28/I2. Le lysat cellulaire a été analysé sur un gel SDS-PAGE à 120V, puis transféré sur une membrane PVDF afin d'être analysé par immunobuvardage de type Western. Les bandes protéiques ont été révélées à l'aide du réactif ECL. Les deux marqueurs: NaK⁺ATPase (membrane) et GAPDH (cytoplasme) démontrent qu'une quantité égale d'échantillons a été chargée dans chaque puits. Les symboles - et + signifient respectivement absence et ajout ou addition.

3.4. Distribution cellulaire des protéines EXTL3, TNFR1 et TRAF2.

Par étudier la distribution cellulaire des protéines EXTL3, TNFR1 et TRAF2, nous avons visualisé par immunofluorescence les protéines EXTL3, TNFR1 et TRAF2 dans des lignées cellulaires C28/I2 fixées au PFA 3.7% et perméabilisées avec 0.1% Triton-100X. Les résultats de la figure 11 montrent une localisation périnucléaire pour les protéines EXTL3 et TNFR1, et une localisation à la fois cytosolique et périnucléaire pour TRAF2.

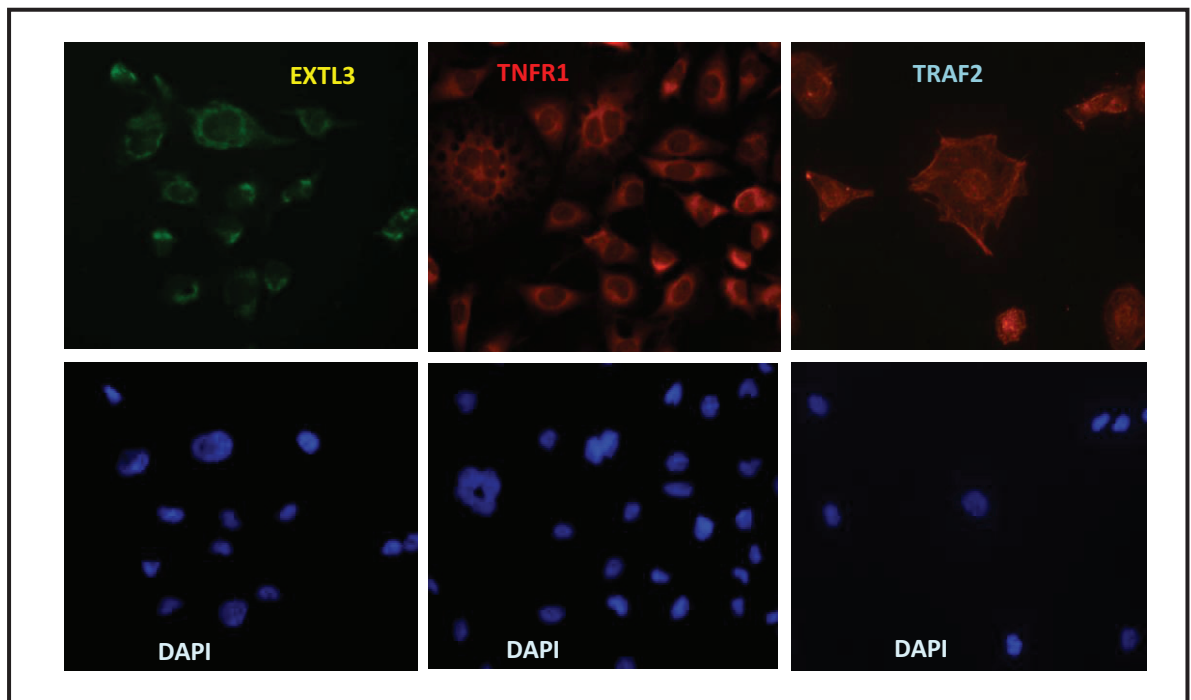


Figure 11 : Localisation cellulaire des protéines EXTL3, TNFR1 et TRAF2.

Les lignées C28/I2 ont été mises en culture dans des « Labtek ». Après 24h, les cellules ont été fixées dans 3.7% de PFA, puis traitées avec 0.1% Triton-100X. Ensuite on a révélé par immunofluorescence les protéines EXTL3 (Vert), TNFR1 (rouge) et TRAF2 (rouge). Les images ont été prises à l'aide d'un microscope à fluorescence avec un grossissement de 40X. Le DAPI (coloration bleue) a servi à la coloration des noyaux cellulaires.

3.5. Formation d'un complexe constitué des protéines EXTL3, TRAF2 et TNFR1 dans la région périnucléaire.

Pour déterminer si un complexe protéique EXTL3/TRAF2/TNFR1 pouvait se former dans l'enveloppe nucléaire, nous avons procédé à des analyses par double immunofluorescence en utilisant des anticorps dirigés contre EXTL3, TNFR1 et TRAF2, sur des cellules C28/I2 traitées ou non au TNF- α pendant 8 heures, fixées au PFA 3.7%, et perméabilisées avec 0.1% Triton-100X. Les images des figures 12 et 13 révèlent qu'en absence de traitement au TNF- α , les protéines EXTL3 et TNFR1 ne co-localisent pas. À l'inverse, TRAF2 et TNFR1 co-localisent parfaitement dans la région périnucléaire. En présence de TNF- α , une co-localisation périnucléaire est observée entre EXTL3 et TNFR1, de même que TRAF2 et TNFR1 avec cependant une co-localisation plus forte par rapport aux cellules non-traitées.

Collectivement, ces observations suggèrent la formation d'un complexe par les protéines EXTL3, TNFR1 et TRAF2 au niveau de la membrane nucléaire qui pourrait être semblable à celui de la membrane plasmique.

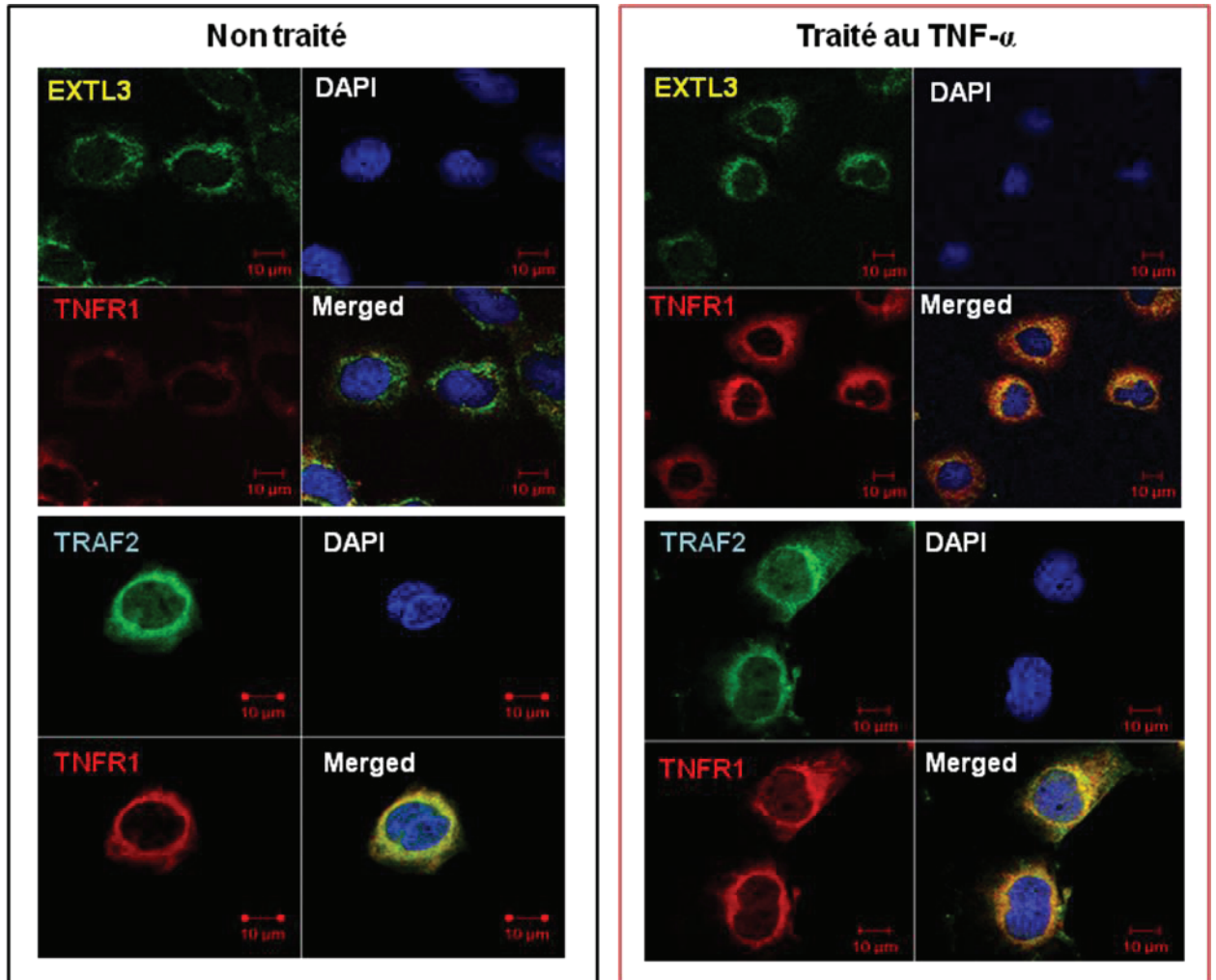


Figure 12 : Co-localisation des protéines EXTL3, TNFR1 et TRAF2 dans la membrane ou enveloppe nucléaire.

Les lignées C28/I2 ont été mises en culture dans des « Labtek » pour 24h. Par la suite les cellules ont été incubées environ 2h dans du DMEM/F12 dépourvu de FBS, puis traitées ou non au TNF- α (10ng/mL) pendant 8h, et fixées dans 3.7% de PFA. Après, elles ont été perméabilisées avec 0.1% de Triton-100X, et on a procédé à une double coloration par immunofluorescence en utilisant des anticorps dirigés contre EXTL3 (vert), TNFR1 (rouge) et TRAF2 (rouge). Les images fluorescentes ont été prises grâce au microscope Confocal Zeiss LSM 510 muni d'un objectif 63X/1.4 à huile. Le DAPI (bleu) a servi au marquage des noyaux cellulaires. La superposition des images (merged) confirme la co-localisation des protéines (coloration jaune).

3.6. La cytokine TNF- α induit une translocation des récepteurs EXTL3 et TNFR1.

Nous avons aussi étudié les effets du TNF- α sur la co-localisation EXTL3-TNFR1 en fonction du temps. Pour ce faire, nous avons eu recours à l'analyse par immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre EXTL3, TNFR1, sur des cellules C28/I2 traitées au TNF- α pendant 8 heures, fixées au PFA 3.7%, et perméabilisées avec 0.1% Triton-100X. Les images présentées à la figure 13 montre une absence de co-localisation des protéines EXTL3 et TNFR1 dans les cellules non traitées, et une co-localisation progressive de ces deux protéines aux temps 5 à 60 minutes de traitement. De plus, après 30 minutes, on observe une forte co-localisation nucléaire entre EXTL3 et TNFR1 qui est visible à 45 minutes aussi. Après 60 minutes la co-localisation redevient péri-nucléaire.

Ces résultats suggèrent une formation et une translocation du complexe EXTL3-TNFR1 en réponse au TNF- α .

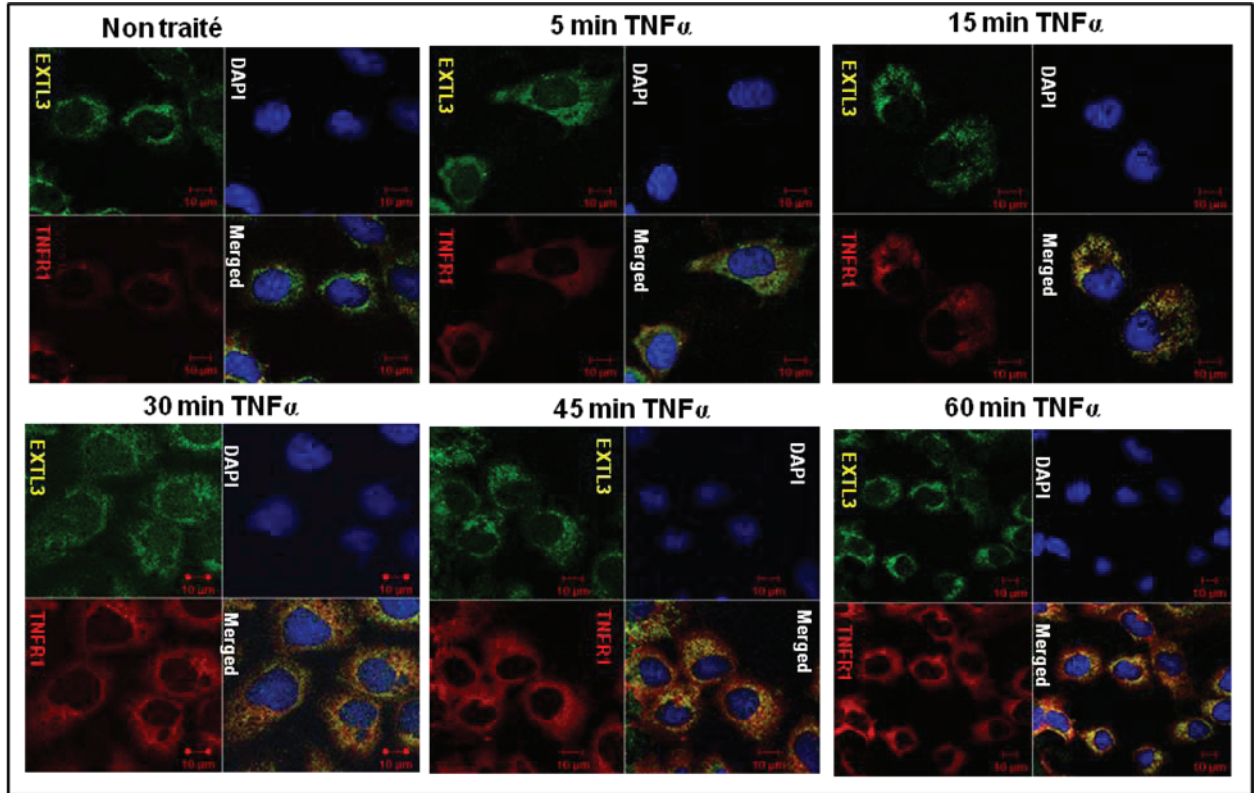


Figure 13 : Distribution cellulaire des protéines EXTL3 et TNFR1 en fonction du temps dans les chondrocytes traités au TNF- α .

Les lignées C28/I2 ont été mises en culture dans des « Labtek » pour 24h. Les cellules ont été incubées environ 2h dans du DMEM/F12 dépourvu de FBS, puis traitées ou non au TNF- α (10ng/mL) pour un intervalle de temps de 0 à 60 minutes (min). Elles ont été fixées dans 3.7% de PFA, perméabilisées avec 0.1% Triton-100X et colorées par double immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre EXTL3 (vert), TNFR1 (rouge) et TRAF2 (rouge). Les images fluorescentes ont été prises grâce au microscope Confocal Zeiss LSM 510 doté d'un objectif 63X/1.4 à huile. Le DAPI (bleu) a servi au marquage des noyaux. La superposition de des images (merged) confirme la co-localisation des protéines (coloration jaune). Un grossissement de cette image est disponible en annexe.

3.7. Le ligand Reg1B module l'activité NF- κ B induite par TNF- α dans les cellules C28/I2 surexprimant le récepteur Reg/EXTL3.

Le second objectif de ce projet de maîtrise consistait à étudier l'effet du ligand REG I sur l'activation de la voie NF- κ B par TNF- α . La protéine Reg1 humaine existe sous deux isoformes, soit Reg1A et Reg1B dont l'effet a été testé en transfection transitoire. Ainsi, des cellules C28/I2 ont été transfectées avec les plasmides pCI-EXTL3, pCMV-REG1B, et les rapporteurs pNF- κ B-Luc5x et pCMV- β -gal. Ensuite, les cellules ont été traitées ou non avec 10ng/mL de TNF- α pendant huit heures, et soumises par la suite aux essais luciférase et de β -galactosidase. La figure 14A montre qu'EXTL3 amplifie l'activité NF- κ B induite par TNF- α d'un facteur 5X par rapport aux cellules témoins traitées au TNF- α . Cette activité NF- κ B est ensuite inhibée à des concentrations croissantes de Reg1B dans les C28/I2 surexprimant EXTL3 et traitées au TNF- α . Ces résultats suggèrent que le ligand Reg1B est capable de moduler l'activité NF- κ B. Nous avons également examiné l'effet de la protéines Reg1B sur la formation du complexe membranaire EXTL3-TNFR1 par une approche d'immunoprécipitation dirigée contre TNFR1, suivi d'un immunobuvardage contre EXTL3 sur des extraits de protéines membranaires de cellules C28/I2 traitées ou non au TNF- α et au recombinant Reg1B. Les résultats de la figure 14B montrent l'interaction d'EXTL3 avec TNFR1 après le traitement au TNF- α . Cette interaction est sensiblement diminuée avec une dose équivalente de Reg1B (10ng/mL). Par contre, une augmentation de la concentration de Reg1B (60ng/mL) ne change pas l'effet observé avec 10 ng/mL de Reg1B.

Collectivement, ces résultats suggèrent un rôle du ligand Reg1B dans l'inhibition de la formation du complexe TNFR1-EXTL3 au niveau de la membrane plasmique.

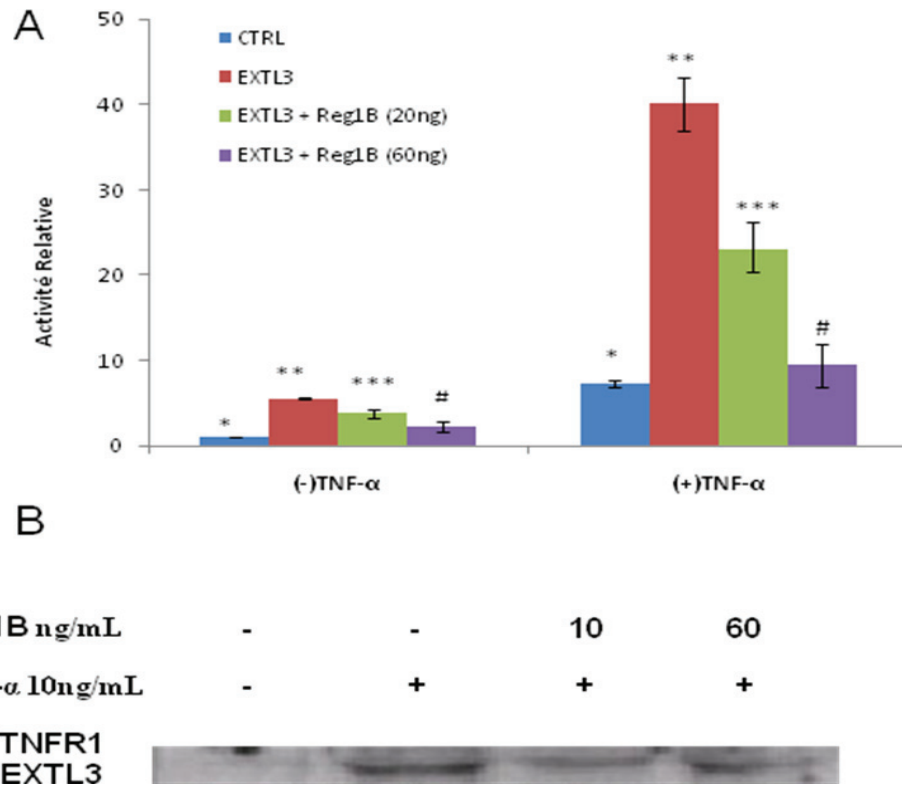


Figure 14 : Reg1B module l'activité du rapporteur NF- κ B induite par TNF- α dans les cellules C28/I2 surexprimant le récepteur Reg ou EXTL3.

A) 20ng de pCI-EXTL3 combine à 20 ou 60ng de pCMV-Reg1B ont été transfectés dans les cellules C28/I2, avec 400ng de plasmide rapporteur pNF- κ B-Luc 5x, 200ng de pCMV- β -Gal et 60 ou 20ng de pLPC-NEP, pour 4h. La quantité du vecteur vide pCI a été ajustée à 700ng d'ADN totale avec le vecteur pLPC-NEP. Après 16h d'incubation à 37°C; 5 % CO₂, les cellules ont été incubées environ 2h dans du DMEM/F12 dépourvu de FBS, puis traitées ou non au TNF- α (10ng/mL) pendant 8h. Ensuite, elles ont été lysées, et soumises aux essais luciférase et de β -galactosidase. Toutes les valeurs ont été normalisées par rapport aux lectures de la β -galactosidase et du vecteur vide pCI. Statistiques: toutes les valeurs $p \leq 0.5$; (-) i.e absence; (+) i.e présence. Le terme Ctrl signifie que les C28/I2 ne surexpriment pas EXTL3. **B)** Analyse par IP dirigée contre TNFR1, suivi d'un IB contre EXTL3 sur des extraits de protéines membranaires de cellules C28/I2 traitées ou non au TNF- α (10ng/mL) et Reg1B. Le lysat cellulaire a été analysé sur un gel SDS-PAGE à 120V, puis transféré sur une membrane PVDF afin d'être analysé par immunobuvardage de type Western. Les bandes protéiques ont été révélées à l'aide du réactif ECL.

3.8. La glucosamine inhibe l'activation de NF- κ B par TNF- α dans les cellules C28/I2 surexprimant EXTL3.

La glucosamine est fréquemment utilisée dans le traitement de l'inflammation chez les personnes atteintes d'arthrite rhumatoïde ou d'arthrose avancée. Ainsi, parallèlement aux études menées sur le ligand Reg1B, nous avons étudié les effets de la glucosamine sur l'activité NF- κ B induite par TNF- α . Ce faisant, des cellules C28/I2 ont été transfectées avec le plasmide pCI-EXTL3, et les plasmides rapporteurs pNF- κ B-Luc5x et pCMV- β -gal. Ensuite, les cellules ont été traitées ou non avec du TNF- α et de la glucosamine pendant huit heures, avant d'être soumises aux essais luciférase et de β -galactosidase. Les résultats de la figure 15A montrent que la surexpression de la protéine EXTL3 augmente l'activité NF- κ B induite par TNF- α par rapport aux cellules témoins. Toutefois, le traitement à la glucosamine inhibe cette augmentation jusqu'à son niveau basal, suggérant un rôle inhibiteur de la glucosamine dans l'activation de NF- κ B induite par EXTL3. Pour confirmer cette hypothèse, des expériences d'immunoprécipitation dirigée contre TNFR1 suivi d'un immunobuvardage contre EXTL3, ont été effectuées sur des extraits de protéines membranaires de cellules C28/I2 traitées ou non avec du TNF- α et de la glucosamine. Les résultats de la figure 15B montrent que la glucosamine seule ou en compétition avec TNF- α diminue, voire inhibe complètement la formation du complexe EXTL3-TNFR1.

Collectivement, ces résultats suggèrent que la glucosamine préviendrait la formation du complexe EXTL3-TNFR1 et ainsi la baisse de l'activité NF- κ B induite par TNF- α .

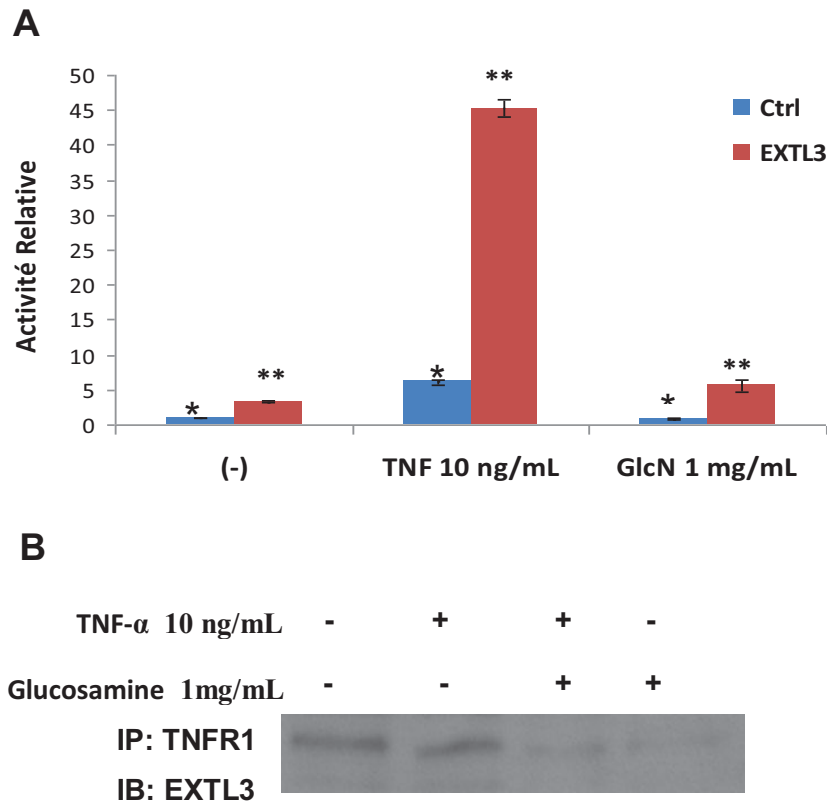


Figure 15 : La glucosamine inhibe l'activation de NF- κ B par TNF- α dans les cellules C28/I2 surexprimant EXTL3.

A) 20ng de pCI-EXTL3 ont été transfectés dans les cellules C28/I2 avec 400ng de plasmide rapporteur pNF- κ B-Luc5x, 200ng de pCMV β -Gal et 80ng de pLPC-NEP pour 4h. La quantité du vecteur vide pCI a été ajustée à 700ng d'ADN totale avec le vecteur pLPC-NEP. Après 16h d'incubation à 37 °C; 5 % CO₂, les cellules ont été incubées environ 2h dans du DMEM/F12 dépourvu de FBS, puis traitées ou non au TNF- α (10ng/mL) et à la glucosamine (1mg/mL) pendant 8h. Ensuite elles ont été lysées et soumises aux essais luciférase et de β -galactosidase. Toutes les valeurs ont été normalisées par rapport aux lectures de la β -galactosidase et du vecteur vide pCI. Statistique : *P \leq 0.01, **P \leq 0.001; (-) i.e pas traitées; GlcN i.e glucosamine. **B)** Analyse par immunoprécipitation dirigée contre TNFR1, suivi d'un immunobuvardage contre EXTL3 sur des extraits de protéines membranaires de cellules C28/I2 traitées ou non avec du TNF α (10ng/mL) et de la glucosamine (1mg/mL). Le lysat cellulaire a été analysé sur un gel SDS-PAGE à 120V, puis transféré sur une membrane PVDF afin d'être analysé par immunobuvardage de type Western. Les bandes protéiques ont été révélées à l'aide du réactif ECL

3.9. Effet de la glucosamine sur le niveau d'expression du gène EXTL3.

Pour terminer, on a étudié l'effet de la glucosamine sur le niveau d'expression du gène EXTL3. Pour ce faire, nous avons eu recours à une analyse RT-PCR réalisée sur l'ARN extrait de cellules C28/I2, qui ont été préalablement traitées ou non à la glucosamine (1mg/mL). La figure 16A montre une augmentation de l'expression du gène EXTL3 qui est proportionnelle au temps de traitement à la glucosamine. Pour examiner si l'augmentation observée dépendait de la glucosamine, nous avons examiné l'expression d'EXTL3 par RT-PCR sur l'ARN de C28/I2 non traitées. Les résultats de la figure 16B indiquent une constance dans l'expression du gène EXTL3, suggérant ainsi que l'effet observé en 16A était bien lié à la glucosamine. Nous avons refait les mêmes expériences par une analyse qPCR, qui est une méthode plus quantitative. Les données de la figure 16 C montrent une augmentation de l'expression du gène EXTL3 en fonction du temps de traitement à la glucosamine, alors que son expression est constante dans les cellules non traitées suggérant une corrélation parfaite avec les observations des figures 16A et 16B.

Collectivement, les résultats suggèrent que la glucosamine a la capacité de stimuler l'expression du gène EXTL3.

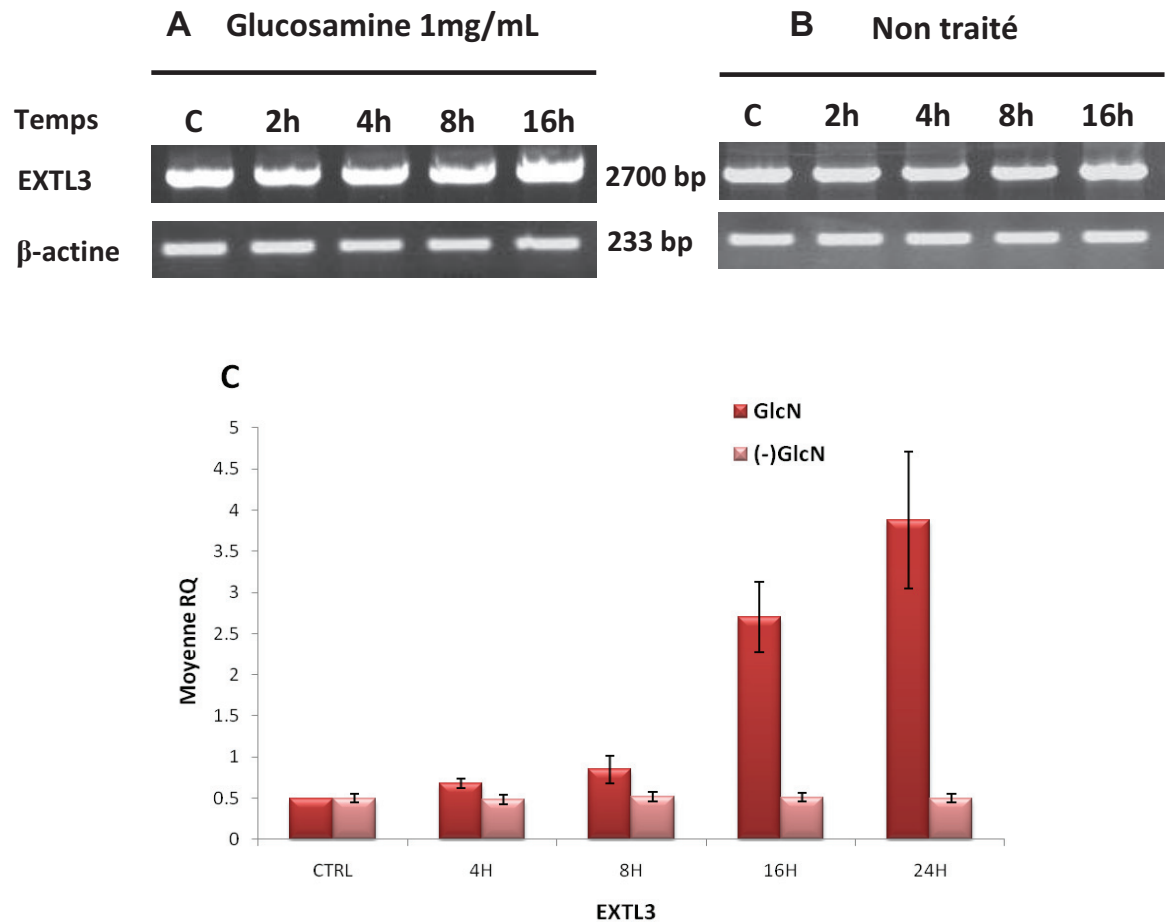


Figure 16 : Effet de la glucosamine sur le niveau d'expression du gène EXT3.

Les cellules C28/I2 ont été mises en culture pour 24h. Ensuite elles ont été incubées environ 2h dans du DMEM/F12 dépourvu de FBS, avant d'être traitées ou non en présence de la glucosamine (1mg/mL) à différents temps. L'ARN a été extrait des cellules pour des analyses par RT-PCR semi-quantitatif **A)** et **B)** et par qPCR quantitatif **C)** afin d'évaluer l'expression du gène EXT3 dans les chondrocytes humain (C28/I2). La β -actine est un contrôle positif pour s'assurer que la même quantité d'ARN a été utilisée dans chaque condition expérimentale.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Au cours des dernières années, plusieurs études ont caractérisé le rôle du processus inflammatoire dans la pathogenèse de l'OA. En effet, la synthèse et l'expression des facteurs de dégradation de la matrice cartilagineuse sont régulées par de nombreuses cytokines dérivées du foyer inflammatoire de la membrane synoviale. L'interleukine-1 beta (IL-1 β) et le «tumor necrosis factor alpha» (TNF- α), font partie de ces cytokines qui jouent un rôle majeur dans le déclenchement de l'inflammation associée à l'OA, grâce à l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui, à son tour, active les gènes de cytokines. Cette boucle de régulation positive amplifie et perpétue les réponses inflammatoires. Les travaux de Mizuno ont mis en évidence que l'activation de NF- κ B par TNF- α pouvait être potentialisée par EXTL3 (Mizuno, Irie et al. 2001) un récepteur transmembranaire pouvant agir comme récepteur des facteurs de croissance de la famille REG. Cependant, les mécanismes sous-jacents cet effet ne sont pas connus. De plus, les niveaux important d'EXTL3 et de son ligand Reg I chez les patients arthrosiques, suggèrent un rôle de ces protéines dans le développement de l'OA. Dans le présent mémoire, nous avons montré *in vitro* qu'en plus du TNF- α , la protéine EXTL3 pouvait aussi amplifier l'activité NF- κ B induite par IL-1 β , suggérant un rôle plus élargi d'EXTL3 dans la potentialisation de l'inflammation. De plus, nous avons mis en évidence le mécanisme moléculaire responsable de ce processus. Enfin, nous avons testé différentes molécules susceptibles d'inhiber l'activation de la voie NF- κ B dans le processus inflammatoire et mis en évidence leur rôle anti-inflammatoire.

4.1. Le récepteur REG/EXTL3 amplifie l'activité NF- κ B induite par les cytokines pro-inflammatoire TNF- α et IL- β .

Nos résultats ont montré par des essais luciférase que la protéine EXTL3 amplifiait l'activité NF- κ B induite par TNF- α dans les cellules C28/I2 (figure 7A). Cette observation confirme les études précédentes (Mizuno, Irie et al. 2001), mais dans un contexte cellulaire différent, suggérant ainsi un mécanisme général d'induction de la voie NF- κ B par TNF- α . La réalisation d'expériences du même type sur divers types cellulaires, nous permettra de confirmer cette idée. Nous avons également montré qu'en plus de TNF- α , EXTL3 amplifiait aussi l'activité NF- κ B induite par l'IL-1 β . Ceci suggère l'implication d'un

mécanisme identique dans la médiation des effets de TNF- α ou d'IL-1 β par EXTL3, dans l'activation de la voie NF- κ B. En effet, ces deux cytokines sont connues pour avoir des effets similaires et parfois même synergétiques dans la destruction du cartilage articulaire (van den Berg 2001), malgré la différence de leurs récepteurs intracellulaires. Il se pourrait aussi dans le cas de l'interleukine-1 β (figure 7B), que l'effet observé soit causé par une production endogène de TNF- α via une boucle d'autorégulation positive à la suite de l'activation du facteur de transcription NF- κ B induite par IL-1 β (Martel-Pelletier, Alaaeddine et al. 1999).

Par ailleurs, nous avons remarqué qu'une surexpression du récepteur Reg/EXTL3 était suffisante pour induire une activité basale de NF- κ B (figure 7A et B). Cet effet pourrait s'expliquer par le fait qu'EXTL3 puisse activer NF- κ B et mener ainsi à une production endogène de ses gènes cibles incluant TNF- α et IL-1 β , comme le suggère d'ailleurs la figure 7C. De plus, cet effet pourrait contribuer aux potentialisations observées (effet de dose) en présence des protéines recombinantes TNF- α et IL-1 β . Pour vérifier cette hypothèse, un knockdown en aval de la voie NF- κ B (ou une inhibition des sous-unités p50/p65) suivi de la surexpression d'EXTL3, serait nécessaire.

EXTL3 semble donc jouer un rôle important dans la médiation de la réponse inflammatoire induite par les cytokines TNF- α et IL-1 β .

4.2. Caractérisation du mécanisme d'activation de la voie NF- κ B dans les C28/I2.

Deux hypothèses ont été émises sur la manière dont EXTL3 pourrait moduler l'activité NF- κ B induite par TNF- α . La première suggère que la surexpression de la protéine EXTL3 contribuerait à augmenter la quantité d'héparanes sulfates protéoglycans (HSPGs). Cette augmentation pourrait à son tour, moduler la réponse cellulaire au TNF- α en facilitant la dimérisation ou l'oligodimérisation ligand-récepteur afin d'initier la signalisation cellulaire.

La signalisation par FGF/FGFR constitue un exemple de ce mécanisme (Ornitz 2000). Toujours dans la même optique, il se pourrait que les HSPGs lient le ligand via les chaînes HS-GAG, assurant la stabilité et la rétention de ce dernier au niveau de la surface cellulaire. Ainsi, une accumulation de ligands à la surface cellulaire permettrait de promouvoir une signalisation maximale par l'intermédiaire de ses récepteurs membranaires. La signalisation par Wnt-Wingless (Wg) en est un autre exemple (Hacker, Lin et al. 1997; Lin and Perrimon 2002). La deuxième hypothèse émise, serait que la protéine EXTL3 participe directement à la transmission du signal induit par TNF- α pour activer NF- κ B, puisqu'EXTL3 lui-même est un récepteur membranaire (Mizuno, Irie et al. 2001). Nos résultats expérimentaux corrélerent plus avec cette deuxième hypothèse. En effet, l'analyse de la séquence du gène EXTL3 (figure 5) a permis d'identifier un domaine de liaison TRAF2. Ce domaine TRAF2 code pour une séquence commune à tous les corécepteurs de TNFR1 (Ye, Park et al. 1999). Par conséquent, il est plausible qu'EXTL3 potentialise l'activation de NF- κ B par TNF- α suite à la formation d'un complexe membranaire, en interagissant avec TNFR1 grâce au recrutement de la protéine TRAF2. De plus le niveau endogène de ces trois protéines dans les lignées C28/I2 (figure 8) tend à soutenir cette hypothèse. Nos expériences d'immunoprécipitation et d'immunobuvardage réalisées sur des extraits membranaires plasmiques ont mis en évidence la co-localisation des protéines EXTL3, TNFR1 et TRAF2 dans le même complexe protéique, en réponse au TNF- α (figure 9). De plus, la co-localisation simultanée de TRAF2 avec TNFR1 d'une part et avec EXTL3 de l'autre, en présence ou en absence de TNF- α , suggère un assemblage du complexe EXTL3-TNFR1 via la protéine TRAF2. En effet les membres de la famille TRAF dont TRAF2 possèdent tous un domaine C-terminal (TRAF domaine) responsable de l'homodimérisation et de l'hétérodimérisation des TRAFs, mais aussi de l'interaction avec les autres protéines effectrices de TNFR1 (Takeuchi, Rothe et al. 1996; Arch, Gedrich et al. 1998). Cependant, la présence de TRAF2 dans le complexe TNFR1 en absence de TNF- α va à l'encontre des observations faites sur la signalisation par TNF- α . La protéine TRAF2 est connue pour être recrutée dans le complexe TNFR1 par TRADD, après liaison du ligand TNF- α (Hsu, Shu et al. 1996). Il se pourrait toutefois, que la présence de TRAF2 en absence de traitement, soit due à un délai

court (2h) ou insuffisant d'incubation des cellules dans un milieu dépourvu de FBS. Ainsi, une activité basale induite par le sérum fœtal bovin (FBS) du milieu de culture des cellules pourrait causer le recrutement de TRAF2 dans le complexe TNFR1 (Takeda, Akagi et al. 2002). En effet, un TNFR1 non désensibilisé c'est à dire encore phosphorylé, peut recruter les molécules effectrices (TRAF2 y compris) indispensables à sa signalisation. Une augmentation de TRAF2 après traitement au TNF- α tend d'ailleurs à supporter cet argument.

Les résultats de l'étude suggèrent qu'en réponse au TNF- α , le récepteur TNFR1 recrute TRAF2 qui à son tour homodimérise avec le TRAF2 lié à EXTL3 permettant ainsi le recrutement du récepteur EXTL3 dans le complexe TNF/TNFR1. La formation du complexe TNFR1-TRAF2-EXTL3, pourrait ainsi promouvoir l'activation de la voie NF- κ B induite par la cytokine TNF- α . Des expériences de knockdown de TRAF2 par siRNA pourraient clarifier si le recrutement d'EXTL3 au récepteur TNFR1 est dépendant de la présence de TRAF2.

4.3. Effet de la cytokine TNF- α sur la formation du complexe TNFR1/EXTL3 au cours du temps.

Les études effectuées sur les chondrocytes articulaires humains démontrent une grande variabilité dans les temps de réponse aux cytokines pro-inflammatoires. Les effets des cytokines peuvent être rapides soit entre 0 et 1h (Largo, Alvarez-Soria et al. 2003; Boileau, Amiable et al. 2007), tout comme ils peuvent se prolonger sur une longue période, soit entre 24h et 48h (Shi, Schmitt-Talbot et al. 2004; Shikhman, Brinson et al. 2009). Dans notre cas, les conditions optimales de réponse au TNF- α pour les C28/I2 déterminé par des expériences doses-réponse, correspondent à huit heures de traitement pour une concentration de 10ng/mL. De là, nous avons examiné l'impact d'un traitement au TNF- α dans le temps, sur la formation du complexe EXTL3-TNFR1. Nos analyses d'immunoprécipitation et d'immunobuvardage effectuées sur des fractions membranaires

extraites de cellules C28/I2 traitées au TNF- α à différents intervalles de temps (figure 10), indiquent la présence graduelle de la protéine EXTL3 dans le complexe TNFR1, de 0 à 60 minutes. Cette présence est optimale après 8h de traitement au TNF- α , suggérant une régulation transcriptionnelle. En effet, la synthèse des composants nécessaires à l'assemblage du complexe EXTL3-TNFR1 au niveau de la membrane plasmique se ferait dans un délai de 8h de temps, après induction au TNF- α . Il se pourrait aussi qu'il y ait une endocytose du récepteur TNFR1, survenant entre 0 et 45 minutes, et initiée par la liaison du ligand TNF- α (Schneider-Brachert, Tchikov et al. 2004). Après 60 minutes, le récepteur serait ainsi recyclé à la membrane plasmique. Par conséquent, étant donné l'interaction entre les protéines TNFR1 et EXTL3, il se pourrait donc que cette dernière soit transloquée en compagnie de TNFR1, d'où l'absence d'EXTL3 dans les extraits membranaires plasmiques aux temps 0 à 45 minutes (figure 10A). Toutefois, l'absence de corrélation entre la perte d'EXTL3 dans la membrane plasmique et son accumulation dans les fractions cytosoliques (figures 10B et C) tend à réfuter cette hypothèse. De plus, la perte d'EXTL3 observée aux temps 30 et 45 minutes dans les fractions cytosoliques (figure 9C), suggère également, une dégradation ou une translocation de la protéine EXTL3 dans un autre compartiment cellulaire. Des études antérieures ont déjà démontré une translocation du récepteur Reg/EXTL3 initiée de la membrane plasmique jusqu'au noyau, où il médie la signalisation induite par HIP au moment de la néogenèse des îlots pancréatiques (Levetan, Upham et al. 2008). Nous avons donc procédé à une analyse par immunobuvardage dirigée contre EXTL3 sur des extraits nucléaires de cellules C28/I2 traitées au TNF- α à des intervalles de temps identiques (données non présentées). Les résultats se sont avérés négatifs, réfutant l'idée d'une accumulation nucléaire de la protéine EXTL3. Cependant, l'isolement des différents compartiments cellulaires et organelles suivi d'un immunobuvardage contre EXTL3 pourrait nous apporter plus d'indications sur une possible translocation du récepteur Reg. La suivie de la cinétique d'internalisation du récepteur EXTL3 à l'aide d'un microscope confocal à fluorescence ou l'analyse ultrastructurale par l'intermédiaire d'un microscope électronique, pourrait également constituer une alternative crédible.

4.4. Distribution cellulaire des protéines EXTL3, TNFR1 et TRAF2.

Nos études portant sur la localisation cellulaire des protéines EXTL3, TRAF2 et TNFR1 dans des cellules C28/I2 non traitées, montrent une localisation périnucléaire des protéines EXTL3 et TNFR1, et une localisation cytosolique et périnucléaire de TRAF2 (figure 11). Nous nous attendions toutefois à un marquage fluorescent au niveau de la membrane plasmique. Un tel phénotype pourrait s'expliquer par la perméabilisation des cellules avant leur traitement, facilitant ainsi la pénétration de l'anticorps dans les compartiments intracellulaires. De plus, le réticulum endoplasmique (RE) entourant le noyau, constitue le site de repliement des protéines. Donc des protéines mal repliées peuvent s'y accumuler et éventuellement être marquées par un anticorps spécifique. D'un autre côté, le rôle joué par le domaine transmembranaire (TM) dans l'ancrage membranaire de la protéine EXTL3, a été mis en évidence (Mizuno, Irie et al. 2001). Dans les conditions normales, EXTL3 se localisait dans la région périnucléaire, mais l'ablation de ce dernier résultait à une localisation cytoplasmique diffuse de la protéine EXTL3 (Mizuno, Irie et al. 2001). La localisation périnucléaire (RE) des protéines TNFR1 et TRAF2, indépendamment du ligand TNF- α , a elle aussi été mentionnée dans le cadre de l'activation de la voie JNK, suite à un stress dans le RE (Yang, Kim et al. 2006).

4.5. Formation du complexe protéique : EXTL3/TRAF2/TNFR1 dans la région périnucléaire.

La localisation périnucléaire des protéines EXTL3, TNFR1, et TRAF2 nous a conduit à examiner la possibilité de formation du complexe EXTL3-TNFR1 au niveau de l'enveloppe nucléaire. En tenant compte de l'échec rencontré lors de la tentative d'identification d'EXTL3 dans le noyau, par immunobuvardage de type Western, nous avons utilisé une approche différente: la microscopie confocale à fluorescence. Nous avons ainsi mis en évidence la co-localisation des protéines EXTL3 et TNFR1. Cette dernière ne survient qu'en présence de TNF- α (figure 12), même si la faiblesse du signal de TNFR1 pour les

cellules non traitées au TNF- α , tend à biaiser cette interprétation. En effet, il se pourrait bien qu'en absence de traitement au TNF- α , qu'il y ait co-localisation entre les protéines EXTL3 et TNFR1 contrairement à ce qui a été mentionné. Toutefois, par rapport aux cellules traitées au TNF- α la co-localisation des protéines EXTL3 et TNFR1 est nettement plus visible et évidente. Cette observation confirme d'ailleurs les résultats préalables d'immunoprécipitation (figure 9), suggérant ainsi la formation d'un complexe protéique EXTL3-TNFR1 en réponse au TNF- α . De plus, les protéines TRAF2 et TNFR1 co-localisent en tout temps, avec cependant, une co-localisation plus intense en présence de TNF- α . Ces résultats corréleront également avec ceux obtenus dans les expériences de co-IP (figure 9), suggérant de ce fait, la formation d'un complexe EXTL3-TRAF2-TNFR1 périnucléaire, qui serait identique à celui formé dans la membrane plasmique. Notons toutefois, que même si ces deux complexes sont identiques, et que leur assemblage est induit par une cytokine commune, il demeure peu probable qu'ils induisent des effets similaires au vu de leur localisation subcellulaire. De plus, l'activation de la voie NF- κ B nécessite la translocation nucléaire des sous-unités p65/p50 situées dans le cytosol à l'intérieur du noyau. La plupart du temps, cette translocation est effectuée par cascade de phosphorylation initiée par l'activation du récepteur de la membrane plasmique suivant la liaison du ligand (Bonizzi and Karin 2004; Hayden and Ghosh 2004); suggérant ainsi une probabilité minime qu'un tel processus soit médié par un récepteur nucléaire. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour investiguer ces hypothèses. L'isolation des vésicules de transports et des endosomes, qui représentent des éléments clés du mécanisme d'internalisation et de recyclage (Pearse and Robinson 1990; Trowbridge, Collawn et al. 1993), pourrait également lever toute ambiguïté sur la nature exacte des complexes plasmiques et nucléaires; c'est à dire de savoir si le complexe nucléaire dérive de la membrane plasmique et s'il est recyclé par la suite.

4.6. La cytokine TNF- α induit une translocation des récepteurs EXTL3 et TNFR1.

L'analyse par immunofluorescence s'étant avérée concluante, nous avons examiné l'effet d'un traitement au TNF- α au cours du temps sur la formation du complexe EXTL3-TRAF2-TNFR1 au niveau de la membrane nucléaire. Nous avons ainsi mis en évidence une co-localisation périnucléaire, mais aussi nucléaire du complexe EXTL3-TNFR1 (figure 13). Ce phénomène signifierait qu'en réponse au TNF- α , l'assemblage du complexe EXTL3-TNFR1 via TRAF2, serait initié dans l'enveloppe nucléaire, pour ensuite être transloqué dans le noyau afin d'y induire la transcription des gènes cibles. Toutefois, la perte du complexe EXTL3-TNFR1 dans le noyau, accompagnée de la formation de ce dernier dans le compartiment périnucléaire après 60 minutes, sous-entendrait une dégradation ou un démantèlement du complexe EXTL3-TNFR1 dans le noyau pour mettre fin au signal médié par ce complexe récepteur. Suivant la dégradation du complexe, une synthèse de *novo* des récepteurs TNFR1 et EXTL3 surviendrait dans la région périnucléaire, menant ainsi à l'assemblage d'un nouveau complexe signalétique EXTL3-TNFR1 qui serait éventuellement transloqué dans le noyau. Cette boucle de régulation se poursuivrait tant et aussi longtemps que perdurerait l'effet de la cytokine TNF- α . Pour vérifier cette possibilité, la réalisation d'expériences additionnelles de ce type, effectuées sur des intervalles de temps courts et prolongés (par exemple de 0, 15, 30, 45, 60, 75, 80 min etc..., jusqu'à 4 heures environ) s'imposent. Le suivi de la translocation du complexe EXTL3-TNFR1 marqué par des anticorps fluorescents biotinylés, par la technique de « Live imaging » directement dans le modèle cellulaire concerné, serait aussi une alternative intéressante.

4.7. Le ligand Reg1B module l'activité NF- κ B induite par TNF- α dans les cellules C28/I2 surexprimant le récepteur Reg/EXTL3.

La famille Reg représente un groupe de petites molécules sécrétrices agissant comme facteurs anti-apoptotiques ou facteurs de croissances pour les cellules β du pancréas, les cellules neurales et les cellules épithéliales du système digestif (Okamoto 1999). Certains membres de la famille Reg exhibent également une propriété anti-inflammatoire, surtout dans les cas de pancréatite aiguë (Zhang, Ding et al. 2003). Le gène Reg1 est un prototype de la famille initialement découvert dans le pancréas où il induit la prolifération des cellules β par l'intermédiaire de son récepteur EXTL3, connu aussi comme le récepteur Reg (Kobayashi, Akiyama et al. 2000). Le gène Reg1 est aussi reconnu pour être mitogénique à des bas niveaux d'expression, tandis qu'il déclenche l'apoptose à des niveaux plus élevés (Zenilman, Chen et al. 1998; Levine, Patel et al. 2000). Chez l'humain, Reg1 existe sous deux isoformes (Terazono, Yamamoto et al. 1988) Reg1A et Reg1B. L'isoforme Reg1B est fortement exprimé dans les chondrocytes articulaires des patients OA (Picard, et al. 2010). Toutefois, aucune indication sur son rôle dans l'arthrose n'est disponible. Dans ce projet de maîtrise, nous avons examiné le rôle que pourrait jouer l'isoforme Reg1B dans l'activation de la voie NF- κ B induite par TNF- α en présence du récepteur REG/EXTL3. Les expériences de transfection transitoire réalisées (figure 14A) ont mis en évidence la capacité du ligand Reg1B à réprimer jusqu'à un niveau presque basal l'activité NF- κ B induite par TNF- α dans les C28/I2 surexprimant EXTL3. Cette répression pourrait s'expliquer par une mort cellulaire accrue, puisque des concentrations élevées de Reg1 sont connues pour induire l'apoptose (Zenilman, Chen et al. 1998). L'observation des cellules au microscope durant toutes les phases expérimentales, nous a permis de réfuter cette hypothèse, car les cellules étaient parfaitement viables. Par contre, nos analyses d'immunoprécipitation et d'immunobuvardage ont mis en évidence le mécanisme potentiel par lequel Reg1B pourrait moduler l'activité NF- κ B. En effet, une concentration équimolaire de TNF- α et de Reg1B, induit une diminution significative de la protéine EXTL3 dans le complexe TNFR1/TNF- α par contre, une augmentation de la dose

recombinante de Reg1B pour une concentration similaire de TNF- α , n'induit aucun effet supplémentaire (figure 14 B). Ceci suggère qu'une concentration de 10ng/mL de Reg1B est suffisante pour saturer le récepteur EXTL3. Il serait donc idéal de tester des doses inférieures de Reg1B, afin de déterminer celle qui est capable d'induire une répression complète d'EXTL3 dans le complexe TNFR1/ TNF- α , comme dans le cas des expériences de transfections transitoires avec un vecteur d'expression Reg1B. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que l'inhibition de l'activité NF- κ B par Reg1B serait directement liée à la capacité de Reg1B, de bloquer l'assemblage du complexe TNFR1-EXTL3 au niveau de la membrane. En effet, la liaison de Reg1B à EXTL3 empêcherait le recrutement de ce dernier au niveau du complexe TNFR1-TRAF2, résultant en une baisse de l'activité NF- κ B, puisqu'EXTL3 semble être un corécepteur essentiel à la signalisation du complexe TNF- α /TNFR1. Toutefois, les approches utilisées ne donnent aucune indication sur la façon dont Reg1B empêcherait l'interaction EXTL3-TNFR1. Il se pourrait bien que la liaison de Reg1B sur son récepteur entraîne, un changement conformationnel d'EXTL3 masquant ainsi son domaine de liaison à TRAF2 (figure 6). Il se pourrait aussi que la liaison de Reg1B séquestre EXTL3 le rendant ainsi indisponible, pour interagir avec le complexe TNF/TNFR1/TRAF2.

4.8. La glucosamine inhibe l'activation de NF- κ B par TNF α dans les cellules C28/I2 surexprimant EXTL3.

La glucosamine démontre des propriétés immunosuppressives *in vitro* et *in vivo* (Gouze, Bianchi et al. 2002; Ma, Rudert et al. 2002). Elle est couramment utilisée pour le soulagement des douleurs liées à l'inflammation chez les patients OA, bien que son mécanisme d'action ne soit pas encore caractérisé (Largo, Alvarez-Soria et al. 2003). Une caractéristique intéressante de la glucosamine demeure son utilisation comme substrat dans la synthèse des protéoglycans (Chard and Dieppe 2001). Le rôle de la glucosamine comme molécules anti-inflammatoire est encore de nos jours fort controversé, bien qu'il ait été mis en évidence par des études réalisées sur les chondrocytes articulaires de patients

arthrosiques (Largo, Alvarez-Soria et al. 2003). Dans ces chondrocytes, la glucosamine inhibait l'inflammation induite par l'IL- β par un mécanisme qui n'a pas été caractérisé. Comme nous avons préalablement démontré une similarité dans les mécanismes d'activation de la voie NF- κ B par les cytokines IL-1 β et TNF- α , nous avons donc examiné les effets de la glucosamine sur l'activité NF- κ B induite par TNF- α dans les C28/I2. De manière forte intéressante (figure 15A), la glucosamine était capable de réprimer l'activité NF- κ B jusqu'à son niveau basal, suggérant un rôle inhibiteur de la glucosamine dans l'activation de NF- κ B induite par TNF- α . Pour tenter d'élucider le mécanisme d'action de la glucosamine, nous avons procédé à une analyse par immunoprécipitation dirigée contre TNFR1 suivi d'un immunobuvardage contre EXTL3, sur des extraits de protéines membranaires de cellules C28/I2 traitées au TNF- α et à la glucosamine. En effet, le fait que la glucosamine soit utilisée comme substrat dans la synthèse des protéoglycans, un dérivé d'héparane sulfate (HS), et que le récepteur REG/EXTL3 soit aussi une glycosyltransférase impliquée dans la synthèse des HS; suggérerait une grande affinité entre ces deux molécules. Ainsi, leur liaison à l'instar du ligand Reg1B empêcherait la formation du complexe EXTL3-TRAF2-TNFR1. Par conséquent NF- κ B ne pourrait être activé car le signal du ligand TNF- α ne pourra plus être modulé. Nos résultats semblent confirmer cette idée (figure 15B), parce que la glucosamine inhibe presque entièrement la présence de la protéine EXTL3 dans le complexe TNFR1/TNF- α .

4.9. Effet de la glucosamine sur le niveau d'expression du gène EXTL3.

Pour clore cette étude nous avons examiné l'effet de la glucosamine sur le niveau d'expression du gène EXTL3. Nos résultats de RT-PCR (figure 16A) et de qPCR (figure 16C) montrent une augmentation de l'expression du gène EXTL3 qui est proportionnelle au temps de traitement à la glucosamine. De plus, une analyse par RT-PCR (figure 16B) avec l'ARN extrait de lignées non traitées, indique que l'augmentation du niveau d'expression d'EXTL3 est dépendant de la glucosamine. La grande affinité du récepteur

REG pour la glucosamine expliquerait cette augmentation. En effet, l'entrée ou l'injection de glucosamine extracellulaire fait en sorte que toutes les molécules de glucosamine libres sont tout de suite liées par les EXTL3 endogènes. Comme EXTL3 est exprimé de façon ubiquitaire, suggérant une analogie aux gènes d'entretien (Stickens, Brown et al. 2000), la cellule est alors amenée à synthétiser une plus grande quantité d'EXTL3 en réponse à la concentration accrue de glucosamine. Ce phénomène pourrait d'ailleurs expliquer une réponse inflammatoire intense chez les patients OA qui arrêtent subitement le traitement à la glucosamine (Sharma et Berenbaum, 2007). En effet, une fois le substrat épuisé, les EXTL3 se retrouvant en plus grande concentration au niveau de la membrane peuvent potentialiser les signaux inflammatoires, initiant ainsi un cercle vicieux. Ceci pourrait être à l'origine du rôle controversé de la glucosamine dans le traitement de l'OA.

CHAPITRE 5 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

5.1. Conclusion

La présente étude nous a permis de montrer par différentes approches expérimentales, que la protéine EXTL3 potentialisait l'activation de NF- κ B aussi bien par IL-1 β que par TNF- α . Toutefois, il serait intéressant de tester d'autres cytokines pro-inflammatoires afin de d'évaluer s'il s'agit d'un mécanisme général d'amplification des effets des cytokines pro-inflammatoires.

Nos expériences de co-immunoprécipitation (Co-IP) avec TNFR1 et TRAF2 ont révélé la présence d'EXTL3 dans le complexe TNF- α /TNFR1/TRAF2 formé au niveau de la membrane plasmique. L'assemblage de ce complexe serait TRAF2 dépendant, et constituerait une phase clé du mécanisme d'amplification de l'activation de la voie NF- κ B induite par la cytokine TNF- α . De même, la microscopie confocale nous a permis d'observer la formation du complexe TNFR1-TRAF2-EXTL3 dans la membrane nucléaire. Toutefois, un doute subsiste sur la nature de ce complexe nucléaire. Il y a des chances qu'il provienne de la translocation du complexe membranaire. Cependant, sa propre translocation dans le noyau tend à réfuter cette idée. Ceci suggère que le complexe récepteur TNFR1-TRAF2-EXTL3 de l'enveloppe nucléaire est formé indépendamment de celui de la membrane plasmique.

Nous avons aussi mis en évidence la capacité du ligand Reg1B à réprimer l'activité NF- κ B induite par la cytokine TNF- α dans les chondrocytes surexprimant le récepteur REG/EXTL3. Nous avons suggéré un mécanisme d'action du ligand Reg1B, qui repose sur l'inhibition de l'assemblage du complexe TNFR1-TRAF2-EXTL3 membranaire. Dans le même contexte, nous avons démontré que la glucosamine connue pour son rôle anti-inflammatoire, inhibait elle aussi la formation du complexe TNFR1-TRAF2-EXTL3, tout comme elle abolissait la potentialisation de l'activité NF- κ B par EXTL3 en réponse au TNF- α . Globalement, nos résultats suggèrent non seulement que le recrutement d'EXTL3 libre dans le complexe TNF/TNFR1 est requis pour amplifier l'activation de NF- κ B par TNF- α , mais aussi la capacité du ligand Reg1B et de la glucosamine à moduler cette activation via la baisse ou l'inhibition de l'interaction EXTL3-TNFR1.

5.2. Perspectives

Le présent projet constitue un progrès important dans la compréhension du processus inflammatoire. Il permet surtout de mettre en évidence le rôle essentiel de la protéine EXTL3 comme corécepteur dans la réponse inflammatoire induite par TNF- α et IL-1 β au niveau des lignées de chondrocytes articulaire humain (C28/I2). Toutefois pour prouver que cet effet est directement dépendant d'EXTL3, il serait nécessaire de répéter les expériences de transfections transitoires avec les lignées de chondrocytes C28/I2 dans lesquelles, le niveau endogène de la protéine EXTL3 aura été inhibée par l'utilisation d'ARNi et/ou shRNA. De même, comme EXTL3 est impliqué dans la synthèse des HSPGs, il serait intéressant de considérer la possibilité selon laquelle une surexpression d'EXTL3 puisse affecter la qualité et la quantité des glycosaminoglycans de la surface cellulaire, résultant ainsi à une modulation de la réponse cellulaire vis à vis de TNF- α . Par conséquent, des études approfondies sur EXTL3 permettraient d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour l'OA.

De plus, une caractérisation détaillée du domaine d'activité et du mécanisme d'action de Reg1B par des expériences de délétions ou mutations ponctuelles, ferait de ce dernier une cible thérapeutique pour le traitement de l'inflammation. Nous testerons aussi la capacité des autres membres de la famille Reg à interagir avec EXTL3, et à moduler l'activité NF- κ B en réponse au TNF- α ou à l'IL-1 β .

Finalement, l'application des essais présentés dans ce mémoire sur les chondrocytes articulaires de patients arthrosiques constituerait une étape de plus dans l'élucidation des mécanismes responsables de la pathogenèse de l'OA.

BIBLIOGRAPHIE

Aigner, T., K. Gluckert, et al. (1997). "Activation of fibrillar collagen synthesis and phenotypic modulation of chondrocytes in early human osteoarthritic cartilage lesions." Osteoarthritis Cartilage **5**(3): 183-189.

Aigner, T., J. Haag, et al. (2007). "Osteoarthritis: aging of matrix and cells--going for a remedy." Curr Drug Targets **8**(2): 325-331.

Akiyama, T., S. Takasawa, et al. (2001). "Activation of Reg gene, a gene for insulin-producing beta -cell regeneration: poly(ADP-ribose) polymerase binds Reg promoter and regulates the transcription by autopoly(ADP-ribosylation)." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 48-53.

Alaaeddine, N., J. A. DiBattista, et al. (1997). "Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha." J Rheumatol **24**(10): 1985-1994.

Arch, R. H., R. W. Gedrich, et al. (1998). "Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death." Genes Dev **12**(18): 2821-2830.

Attur, M. G., M. Dave, et al. (2002). "Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine." Osteoarthritis Cartilage **10**(1): 1-4.

Aupperle, K., B. Bennett, et al. (2001). "NF-kappa B regulation by I kappa B kinase-2 in rheumatoid arthritis synoviocytes." J Immunol **166**(4): 2705-2711.

Baldwin, A. S., Jr. (1996). "The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights." Annu Rev Immunol **14**: 649-683.

Bale, S. J., N. C. Dracopoli, et al. (1989). "Mapping the gene for hereditary cutaneous malignant melanoma-dysplastic nevus to chromosome 1p." N Engl J Med **320**(21): 1367-1372.

Ballinger, A. B. and C. Anggiansah (2007). "Colorectal cancer." BMJ **335**(7622): 715-718.

Barnes, P. J. and M. Karin (1997). "Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases." N Engl J Med **336**(15): 1066-1071.

Bartoli, C., N. Baeza, et al. (1998). "Expression of peptide-23/pancreatitis-associated protein and Reg genes in human pituitary and adenomas: comparison with other fetal and adult human tissues." J Clin Endocrinol Metab **83**(11): 4041-4046.

Bartoli, C., J. C. Dagorn, et al. (1995). "A limited genomic region contains the human REG and REG-related genes." Eur J Hum Genet **3**(6): 344-350.

- Benito, M. J., D. J. Veale, et al. (2005). "Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis." Ann Rheum Dis **64**(9): 1263-1267.
- Berenbaum, F. (2004). "Signaling transduction: target in osteoarthritis." Curr Opin Rheumatol **16**(5): 616-622.
- Bernard-Perrone, F. R., W. P. Renaud, et al. (1999). "Expression of REG protein during cell growth and differentiation of two human colon carcinoma cell lines." J Histochem Cytochem **47**(7): 863-870.
- Bernard, J. P., Z. Adrich, et al. (1992). "Inhibition of nucleation and crystal growth of
- Bird, H. A. (2003). "Controversies in the treatment of osteoarthritis." Clin Rheumatol **22**(3): 165-167.
- Bodmer, J. L., P. Schneider, et al. (2002). "The molecular architecture of the TNF superfamily." Trends Biochem Sci **27**(1): 19-26.
- Boileau, C., N. Amiable, et al. (2007). "Activation of proteinase-activated receptor 2 in human osteoarthritic cartilage upregulates catabolic and proinflammatory pathways capable of inducing cartilage degradation: a basic science study." Arthritis Res Ther **9**(6): R121.
- Boldin, M. P., T. M. Goncharov, et al. (1996). "Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death." Cell **85**(6): 803-815.
- Bondeson, J., S. D. Wainwright, et al. (2006). "The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis." Arthritis Res Ther **8**(6): R187.
- Bonizzi, G. and M. Karin (2004). "The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity." Trends Immunol **25**(6): 280-288.
- Bonnet, C. S. and D. A. Walsh (2005). "Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation." Rheumatology (Oxford) **44**(1): 7-16.
- Borzi, R. M., I. Mazzetti, et al. (2004). "Chemokines in cartilage degradation." Clin Orthop Relat Res(427 Suppl): S53-61.
- Boyle, P. and J. Ferlay (2005). "Cancer incidence and mortality in Europe, 2004." Ann Oncol **16**(3): 481-488.

- Bradley, J. R. and J. S. Pober (2001). "Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)." Oncogene **20**(44): 6482-6491.
- Brandt, K. D. (1994). "Insights into the natural history of osteoarthritis provided by the cruciate-deficient dog. An animal model of osteoarthritis." Ann N Y Acad Sci **732**: 199-205.
- Brandt, K. D., P. Dieppe, et al. (2009). "Etiopathogenesis of osteoarthritis." Med Clin North Am **93**(1): 1-24, xv.
- Broekaert, D., S. Eyckerman, et al. (2002). "Comparison of leptin- and interleukin-6-regulated expression of the rPAP gene family: evidence for differential co-regulatory signals." Eur Cytokine Netw **13**(1): 78-85.
- Buckland-Wright, C. (2004). "Subchondral bone changes in hand and knee osteoarthritis detected by radiography." Osteoarthritis Cartilage **12 Suppl A**: S10-19.
- Burmester, G. R., A. Dimitriu-Bona, et al. (1983). "Identification of three major synovial lining cell populations by monoclonal antibodies directed to Ia antigens and antigens associated with monocytes/macrophages and fibroblasts." Scand J Immunol **17**(1): 69-82.
- Burr, D. B. (2004). "The importance of subchondral bone in the progression of osteoarthritis." J Rheumatol Suppl **70**: 77-80.
- Busse, M., A. Feta, et al. (2007). "Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to heparan sulfate chain elongation." J Biol Chem **282**(45): 32802-32810.
- Busse, M. and M. Kusche-Gullberg (2003). "In vitro polymerization of heparan sulfate backbone by the EXT proteins." J Biol Chem **278**(42): 41333-41337.
- Butler, D. M., A. M. Malfait, et al. (1997). "DBA/1 mice expressing the human TNF-alpha transgene develop a severe, erosive arthritis: characterization of the cytokine cascade and cellular composition." J Immunol **159**(6): 2867-2876.
- Carlson, C. S., R. F. Loeser, et al. (1996). "Osteoarthritis in cynomolgus macaques. III: Effects of age, gender, and subchondral bone thickness on the severity of disease." J Bone Miner Res **11**(9): 1209-1217.
- Caron, H., M. Peter, et al. (1995). "Evidence for two tumour suppressor loci on chromosomal bands 1p35-36 involved in neuroblastoma: one probably imprinted, another associated with N-myc amplification." Hum Mol Genet **4**(4): 535-539.

- Caron, J. P., J. C. Fernandes, et al. (1996). "Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression." Arthritis Rheum **39**(9): 1535-1544.
- Carswell, E. A., L. J. Old, et al. (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(9): 3666-3670.
- Cavallini, G., P. Bovo, et al. (1998). "Lithostathine messenger RNA expression in different types of chronic pancreatitis." Mol Cell Biochem **185**(1-2): 147-152.
- Chan, F. K. and M. J. Lenardo (2000). "A crucial role for p80 TNF-R2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes." Eur J Immunol **30**(2): 652-660.
- Chard, J. and P. Dieppe (2001). "Glucosamine for osteoarthritis: magic, hype, or confusion? It's probably safe-but there's no good evidence that it works." BMJ **322**(7300): 1439-1440.
- Chevalier, X. (1998). "[Physiopathogenesis of arthrosis. Therapeutic perspectives]." Presse Med **27**(2): 88-92.
- Chiba, T. (1999). "Is reg gene mutation involved in the development of enterochromaffin-like cell carcinoid tumors?" Gastroenterology **116**(6): 1489-1491.
- Clem, R. J. (2001). "Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly." Cell Death Differ **8**(2): 137-143.
- Conrozier, T., C. Chappuis-Cellier, et al. (1998). "Increased serum C-reactive protein levels by immunonephelometry in patients with rapidly destructive hip osteoarthritis." Rev Rhum Engl Ed **65**(12): 759-765.
- Conrozier, T. and R. M. Flipo (2003). "[Current management of osteoarthritis. Part 1: pharmacological strategies]." Rev Med Interne **24**(3): 183-188.
- Crofford, L. J., H. Sano, et al. (1993). "Corticotropin-releasing hormone in synovial fluids and tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis." J Immunol **151**(3): 1587-1596.
- Darnay, B. G. and B. B. Aggarwal (1997). "Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations." J Leukoc Biol **61**(5): 559-566.
- De Reggi, M., C. Capon, et al. (1995). "The glycan moiety of human pancreatic lithostathine. Structure characterization and possible pathophysiological implications." Eur J Biochem **230**(2): 503-510.

De Reggi, M. and B. Gharib (2001). "Protein-X, Pancreatic Stone-, Pancreatic thread-, reg-protein, P19, lithostathine, and now what? Characterization, structural analysis and putative function(s) of the major non-enzymatic protein of pancreatic secretions." Curr Protein Pept Sci **2**(1): 19-42.

Delgado, M., D. Pozo, et al. (2004). "The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation." Pharmacol Rev **56**(2): 249-290.

Devin, A., A. Cook, et al. (2000). "The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation." Immunity **12**(4): 419-429.

Dieckgraefe, B. K., D. L. Crimmins, et al. (2002). "Expression of the regenerating gene family in inflammatory bowel disease mucosa: Reg Ialpha upregulation, processing, and antiapoptotic activity." J Investig Med **50**(6): 421-434.

Dieppe, P. and J. Kirwan (1994). "The localization of osteoarthritis." Br J Rheumatol **33**(3): 201-203.

Ding, C., F. Cicuttini, et al. (2005). "Association between age and knee structural change: a cross sectional MRI based study." Ann Rheum Dis **64**(4): 549-555.

Duncan, G., C. McCormick, et al. (2001). "The link between heparan sulfate and hereditary bone disease: finding a function for the EXT family of putative tumor suppressor proteins." J Clin Invest **108**(4): 511-516.

Dusetti, N. J., J. M. Frigerio, et al. (1994). "Molecular cloning, genomic organization, and chromosomal localization of the human pancreatitis-associated protein (PAP) gene." Genomics **19**(1): 108-114.

Esko, J. D. and S. B. Selleck (2002). "Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate." Annu Rev Biochem **71**: 435-471.

Felson, D. T., M. T. Hannan, et al. (1991). "Occupational physical demands, knee bending, and knee osteoarthritis: results from the Framingham Study." J Rheumatol **18**(10): 1587-1592.

Felson, D. T., R. C. Lawrence, et al. (2000). "Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors." Ann Intern Med **133**(8): 635-646.

Felson, D. T., Y. Zhang, et al. (1992). "Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study." Ann Intern Med **116**(7): 535-539.

- Francannet, C., A. Cohen-Tanugi, et al. (2001). "Genotype-phenotype correlation in hereditary multiple exostoses." J Med Genet **38**(7): 430-434.
- Garrington, T. P. and G. L. Johnson (1999). "Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways." Curr Opin Cell Biol **11**(2): 211-218.
- Goldring, M. B. (2006). "Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases." Best Pract Res Clin Rheumatol **20**(5): 1003-1025.
- Goldring, M. B. and F. Berenbaum (2004). "The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide." Clin Orthop Relat Res(427 Suppl): S37-46.
- Goldring, M. B. and S. R. Goldring (2007). "Osteoarthritis." J Cell Physiol **213**(3): 626-634.
- Goldring, S. R. and M. B. Goldring (2004). "The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis." Clin Orthop Relat Res(427 Suppl): S27-36.
- Gomez, P. F., M. H. Pillinger, et al. (2005). "Resolution of inflammation: prostaglandin E2 dissociates nuclear trafficking of individual NF-kappaB subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts." J Immunol **175**(10): 6924-6930.
- Gouze, J. N., A. Bianchi, et al. (2002). "Glucosamine modulates IL-1-induced activation of rat chondrocytes at a receptor level, and by inhibiting the NF-kappa B pathway." FEBS Lett **510**(3): 166-170.
- Graf, R., M. Schiesser, et al. (2002). "Coordinate regulation of secretory stress proteins (PSP/reg, PAP I, PAP II, and PAP III) in the rat exocrine pancreas during experimental acute pancreatitis." J Surg Res **105**(2): 136-144.
- Grell, M., E. Douni, et al. (1995). "The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor." Cell **83**(5): 793-802.
- Gu, Z., M. A. Rubin, et al. (2005). "Reg IV: a promising marker of hormone refractory metastatic prostate cancer." Clin Cancer Res **11**(6): 2237-2243.
- Gurr, W., R. Yavari, et al. (2002). "A Reg family protein is overexpressed in islets from a patient with new-onset type 1 diabetes and acts as T-cell autoantigen in NOD mice." Diabetes **51**(2): 339-346.

- Hacker, U., X. Lin, et al. (1997). "The *Drosophila* sugarless gene modulates Wingless signaling and encodes an enzyme involved in polysaccharide biosynthesis." Development **124**(18): 3565-3573.
- Hadler, N. M., D. B. Gillings, et al. (1978). "Hand structure and function in an industrial setting." Arthritis Rheum **21**(2): 210-220.
- Halliday, D. A., J. D. McNeil, et al. (1993). "A metabolite of substance P, SP7-11 is involved in the pathogenesis of inflammatory joint disease." Med Hypotheses **40**(4): 227-231.
- Handel, M. L., L. B. McMorrow, et al. (1995). "Nuclear factor-kappa B in rheumatoid synovium. Localization of p50 and p65." Arthritis Rheum **38**(12): 1762-1770.
- Hannan, M. T., D. T. Felson, et al. (1990). "Estrogen use and radiographic osteoarthritis of the knee in women. The Framingham Osteoarthritis Study." Arthritis Rheum **33**(4): 525-532.
- Hartupee, J. C., H. Zhang, et al. (2001). "Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel member of the human regenerating protein family: Reg IV." Biochim Biophys Acta **1518**(3): 287-293.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2004). "Signaling to NF-kappaB." Genes Dev **18**(18): 2195-2224.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." Cell **132**(3): 344-362.
- Hsu, H., H. B. Shu, et al. (1996). "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways." Cell **84**(2): 299-308.
- Hsu, H., J. Xiong, et al. (1995). "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation." Cell **81**(4): 495-504.
- Izumisawa, Y., M. Yamaguchi, et al. (1996). "Equine synovial villi: distinctive structural organization of vasculature and novel nerve endings." J Vet Med Sci **58**(12): 1193-1204.
- Johnson, G. L. and R. Lapadat (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." Science **298**(5600): 1911-1912.
- Joosten, L. A., M. M. Helsen, et al. (1996). "Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra." Arthritis Rheum **39**(5): 797-809.

- Kaidonis, X., W. C. Liaw, et al. (2010). "Gene silencing of EXTL2 and EXTL3 as a substrate deprivation therapy for heparan sulphate storing mucopolysaccharidoses." Eur J Hum Genet **18**(2): 194-199.
- Karibe, T., H. Fukui, et al. (2008). "EXTL3 promoter methylation down-regulates EXTL3 and heparan sulphate expression in mucinous colorectal cancers." J Pathol **216**(1): 32-42.
- Kawanami, C., H. Fukui, et al. (1997). "Regenerating gene expression in normal gastric mucosa and indomethacin-induced mucosal lesions of the rat." J Gastroenterol **32**(1): 12-18.
- Kiji, T., Y. Dohi, et al. (2005). "Activation of regenerating gene Reg in rat and human hearts in response to acute stress." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(1): H277-284.
- Kim, B. T., H. Kitagawa, et al. (2001). "Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode alpha 1,4- N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/ heparin biosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7176-7181.
- Kim, B. T., H. Kitagawa, et al. (2003). "In vitro heparan sulfate polymerization: crucial roles of core protein moieties of primer substrates in addition to the EXT1-EXT2 interaction." J Biol Chem **278**(43): 41618-41623.
- Kim, S. J. and J. S. Chun (2003). "Protein kinase C alpha and zeta regulate nitric oxide-induced NF-kappa B activation that mediates cyclooxygenase-2 expression and apoptosis but not dedifferentiation in articular chondrocytes." Biochem Biophys Res Commun **303**(1): 206-211.
- Kim, S. J., S. G. Hwang, et al. (2002). "p38 kinase regulates nitric oxide-induced apoptosis of articular chondrocytes by accumulating p53 via NFkappa B-dependent transcription and stabilization by serine 15 phosphorylation." J Biol Chem **277**(36): 33501-33508.
- Kinoshita, Y., S. Ishihara, et al. (2004). "Reg protein is a unique growth factor of gastric mucosal cells." J Gastroenterol **39**(6): 507-513.
- Kishore, U., P. Eggleton, et al. (1997). "Modular organization of carbohydrate recognition domains in animal lectins." Matrix Biol **15**(8-9): 583-592.
- Kitagawa, H., H. Shimakawa, et al. (1999). "The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an alpha1, 4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. The key enzyme for the chain initiation of heparan sulfate." J Biol Chem **274**(20): 13933-13937.

- Kobayashi, S., T. Akiyama, et al. (2000). "Identification of a receptor for reg (regenerating gene) protein, a pancreatic beta-cell regeneration factor." J Biol Chem **275**(15): 10723-10726.
- Krasnokutsky, S., J. Samuels, et al. (2007). "Osteoarthritis in 2007." Bull NYU Hosp Jt Dis **65**(3): 222-228.
- Kreuger, J., D. Spillmann, et al. (2006). "Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity." J Cell Biol **174**(3): 323-327.
- Kujala, U. M., J. Kettunen, et al. (1995). "Knee osteoarthritis in former runners, soccer players, weight lifters, and shooters." Arthritis Rheum **38**(4): 539-546.
- Landreville V (2005). Étude de la signalisation des facteurs de croissance de la famille REG: Implication dans les mécanismes inflammatoires et l'arthrose. FES, Udm.
- Lanske, B., A. C. Karaplis, et al. (1996). "PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth." Science **273**(5275): 663-666.
- Largo, R., M. A. Alvarez-Soria, et al. (2003). "Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes." Osteoarthritis Cartilage **11**(4): 290-298.
- Laurine, E., X. Manival, et al. (2005). "PAP IB, a new member of the Reg gene family: cloning, expression, structural properties, and evolution by gene duplication." Biochim Biophys Acta **1727**(3): 177-187.
- Lawrence, J. S. (1961). "Rheumatism in cotton operatives." Br J Ind Med **18**: 270-276.
- Le Merrer, M., L. Legeai-Mallet, et al. (1994). "A gene for hereditary multiple exostoses maps to chromosome 19p." Hum Mol Genet **3**(5): 717-722.
- Lee, T. H., J. Shank, et al. (2004). "The kinase activity of Rip1 is not required for tumor necrosis factor-alpha-induced IkappaB kinase or p38 MAP kinase activation or for the ubiquitination of Rip1 by Traf2." J Biol Chem **279**(32): 33185-33191.
- Levetan, C. S., L. V. Upham, et al. (2008). "Discovery of a human peptide sequence signaling islet neogenesis." Endocr Pract **14**(9): 1075-1083.
- Levine, J. L., K. J. Patel, et al. (2000). "A recombinant rat regenerating protein is mitogenic to pancreatic derived cells." J Surg Res **89**(1): 60-65.

- Lidholt, K. and U. Lindahl (1992). "Biosynthesis of heparin. The D-glucuronosyl- and N-acetyl-D-glucosaminyltransferase reactions and their relation to polymer modification." Biochem J **287** (Pt 1): 21-29.
- Lin, X. and N. Perrimon (2002). "Developmental roles of heparan sulfate proteoglycans in Drosophila." Glycoconj J **19**(4-5): 363-368.
- Lin, Y., A. Devin, et al. (1999). "Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis." Genes Dev **13**(19): 2514-2526.
- Lindahl, U., M. Kusche-Gullberg, et al. (1998). "Regulated diversity of heparan sulfate." J Biol Chem **273**(39): 24979-24982.
- Lingen, M. W. (2001). "Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing." Arch Pathol Lab Med **125**(1): 67-71.
- Locksley, R. M., N. Killeen, et al. (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." Cell **104**(4): 487-501.
- Ludecke, H. J., M. J. Wagner, et al. (1995). "Molecular dissection of a contiguous gene syndrome: localization of the genes involved in the Langer-Giedion syndrome." Hum Mol Genet **4**(1): 31-36.
- Ma, L., W. A. Rudert, et al. (2002). "Immunosuppressive effects of glucosamine." J Biol Chem **277**(42): 39343-39349.
- Makarov, S. S. (2001). "NF-kappa B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction." Arthritis Res **3**(4): 200-206.
- Maroudas, A., M. T. Bayliss, et al. (1998). "Aggrecan turnover in human articular cartilage: use of aspartic acid racemization as a marker of molecular age." Arch Biochem Biophys **350**(1): 61-71.
- Martel-Pelletier, J., N. Alaaeddine, et al. (1999). "Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis." Front Biosci **4**: D694-703.
- Martel-Pelletier, J., C. Boileau, et al. (2008). "Cartilage in normal and osteoarthritis conditions." Best Pract Res Clin Rheumatol **22**(2): 351-384.
- Martin, I., S. Miot, et al. (2007). "Osteochondral tissue engineering." J Biomech **40**(4): 750-765.

- Martinon, F., N. Holler, et al. (2000). "Activation of a pro-apoptotic amplification loop through inhibition of NF-kappaB-dependent survival signals by caspase-mediated inactivation of RIP." FEBS Lett **468**(2-3): 134-136.
- McCarthy, J. V., J. Ni, et al. (1998). "RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase." J Biol Chem **273**(27): 16968-16975.
- McCormick, C., G. Duncan, et al. (2000). "The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 668-673.
- Meili, S., R. Graf, et al. (2003). "Secretory apparatus assessed by analysis of pancreatic secretory stress protein expression in a rat model of chronic pancreatitis." Cell Tissue Res **312**(3): 291-299.
- Micheau, O. and J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." Cell **114**(2): 181-190.
- Miyashita, H., K. Nakagawara, et al. (1995). "Human REG family genes are tandemly ordered in a 95-kilobase region of chromosome 2p12." FEBS Lett **377**(3): 429-433.
- Mizuno, K., S. Irie, et al. (2001). "Overexpression of EXTL3/EXTR1 enhances NF-kappaB activity induced by TNF-alpha." Cell Signal **13**(2): 125-130.
- Murray, C. J. and A. D. Lopez (1997). "Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study." Lancet **349**(9064): 1498-1504.
- Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, et al. (1996). "FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex." Cell **85**(6): 817-827.
- Nevitt, M. C., S. R. Cummings, et al. (1996). "Association of estrogen replacement therapy with the risk of osteoarthritis of the hip in elderly white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group." Arch Intern Med **156**(18): 2073-2080.
- Nevitt, M. C., D. T. Felson, et al. (2001). "The effect of estrogen plus progestin on knee symptoms and related disability in postmenopausal women: The Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study, a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." Arthritis Rheum **44**(4): 811-818.
- O'Byrne, E. M., V. Blancuzzi, et al. (1990). "Elevated substance P and accelerated cartilage degradation in rabbit knees injected with interleukin-1 and tumor necrosis factor." Arthritis Rheum **33**(7): 1023-1028.

- Okamoto, H. (1999). "The Reg gene family and Reg proteins: with special attention to the regeneration of pancreatic beta-cells." J Hepatobiliary Pancreat Surg **6**(3): 254-262.
- Okamoto, H. and S. Takasawa (2002). "Recent advances in the Okamoto model: the CD38-cyclic ADP-ribose signal system and the regenerating gene protein (Reg)-Reg receptor system in beta-cells." Diabetes **51 Suppl 3**: S462-473.
- Ornitz, D. M. (2000). "FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development." Bioessays **22**(2): 108-112.
- Osman, N. M., Y. Kagohashi, et al. (2003). "Alpha1,4-N-acetylglucosaminyltransferase encoding gene EXTL3 expression pattern in mouse adult and developing tissues with special attention to the pancreas." Anat Embryol (Berl) **207**(4-5): 333-341.
- Otero, M. and M. B. Goldring (2007). "Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Chondrocytes." Arthritis Res Ther **9**(5): 220.
- Pastoureau, P. C., A. C. Chomel, et al. (1999). "Evidence of early subchondral bone changes in the meniscectomized guinea pig. A densitometric study using dual-energy X-ray absorptiometry subregional analysis." Osteoarthritis Cartilage **7**(5): 466-473.
- Patard, L., J. Y. Lallemand, et al. (2003). "An insight into the role of human pancreatic lithostathine." JOP **4**(2): 92-103.
- Pearse, B. M. and M. S. Robinson (1990). "Clathrin, adaptors, and sorting." Annu Rev Cell Biol **6**: 151-171.
- Pettipher, E. R., G. A. Higgs, et al. (1986). "Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(22): 8749-8753.
- Picard, C., Taheri M., Wang, D., Franco, A., Martel-Pelletier, J., Moldovan, F., Lavigne, P., Moreau, A. (2010). "Novel Biomarkers of Osteoarthritis Associated with Tissue Regeneration and Regulated by the Transcription Factor PITX1". Arthritis and Rheumatism Wiley Manuscrit- Draft.
- Pritzker, K. P., S. Gay, et al. (2006). "Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging." Osteoarthritis Cartilage **14**(1): 13-29.
- Radin, E. L. and R. M. Rose (1986). "Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage." Clin Orthop Relat Res(213): 34-40.

- Rauert, H., A. Wicovsky, et al. (2010). "Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2)." J Biol Chem **285**(10): 7394-7404.
- Rechreche, H., G. Montalto, et al. (1999). "pap, reg Ialpha and reg Ibeta mRNAs are concomitantly up-regulated during human colorectal carcinogenesis." Int J Cancer **81**(5): 688-694.
- Robbins, J. R., B. Thomas, et al. (2000). "Immortalized human adult articular chondrocytes maintain cartilage-specific phenotype and responses to interleukin-1beta." Arthritis Rheum **43**(10): 2189-2201.
- Rodén, L (1980). In the biochemistry of glycoproteins and proteoglycans, ed. Lennarz, W.J. (plenum, New York), pp. 267-371.
- Roman-Blas, J. A. and S. A. Jimenez (2006). "NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis." Osteoarthritis Cartilage **14**(9): 839-848.
- Roos, H., H. Lindberg, et al. (1994). "The prevalence of gonarthrosis and its relation to meniscectomy in former soccer players." Am J Sports Med **22**(2): 219-222.
- Rothe, M., V. Sarma, et al. (1995). "TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40." Science **269**(5229): 1424-1427.
- Rousseau, J. C. and P. D. Delmas (2007). "Biological markers in osteoarthritis." Nat Clin Pract Rheumatol **3**(6): 346-356.
- Roy, N., Q. L. Deveraux, et al. (1997). "The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases." EMBO J **16**(23): 6914-6925.
- Sadouk, M. B., J. P. Pelletier, et al. (1995). "Human synovial fibroblasts coexpress IL-1 receptor type I and type II mRNA. The increased level of the IL-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor." Lab Invest **73**(3): 347-355.
- Saklatvala, J. (1986). "Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage." Nature **322**(6079): 547-549.
- Sanchez, D., V. Gmyr, et al. (2004). "Implication of Reg I in human pancreatic duct-like cells in vivo in the pathological pancreas and in vitro during exocrine dedifferentiation." Pancreas **29**(1): 14-21.

- Sandell, L. J. and T. Aigner (2001). "Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis." Arthritis Res **3**(2): 107-113.
- Satomura, Y., N. Sawabu, et al. (1993). "The immunohistochemical evaluation of PSP/reg-protein in normal and diseased human pancreatic tissues." Int J Pancreatol **13**(1): 59-67.
- Schiesser, M., D. Bimmler, et al. (2001). "Conformational changes of pancreatitis-associated protein (PAP) activated by trypsin lead to insoluble protein aggregates." Pancreas **22**(2): 186-192.
- Schmale, G. A., E. U. Conrad, 3rd, et al. (1994). "The natural history of hereditary multiple exostoses." J Bone Joint Surg Am **76**(7): 986-992.
- Schneider-Brachert, W., V. Tchikov, et al. (2004). "Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles." Immunity **21**(3): 415-428.
- Segat, D., R. Comai, et al. (2002). "Integrins alpha(6A)beta 1 and alpha(6B)beta 1 promote different stages of chondrogenic cell differentiation." J Biol Chem **277**(35): 31612-31622.
- Seguin, C. A. and S. M. Bernier (2003). "TNFalpha suppresses link protein and type II collagen expression in chondrocytes: Role of MEK1/2 and NF-kappaB signaling pathways." J Cell Physiol **197**(3): 356-369.
- Seitz, S., K. Rohde, et al. (1997). "Strong indication for a breast cancer susceptibility gene on chromosome 8p12-p22: linkage analysis in German breast cancer families." Oncogene **14**(6): 741-743.
- Sekikawa, A., H. Fukui, et al. (2005). "REG Ialpha protein may function as a trophic and/or anti-apoptotic factor in the development of gastric cancer." Gastroenterology **128**(3): 642-653.
- Sharma L, Berenbaum F (2007). *Osteoarthritis: a companion to rheumatology*. Mosby, Inc., an affiliate of Elsevier Inc. 1st Ed.
- Shi, J., E. Schmitt-Talbot, et al. (2004). "The differential effects of IL-1 and TNF-alpha on proinflammatory cytokine and matrix metalloproteinase expression in human chondrosarcoma cells." Inflamm Res **53**(8): 377-389.
- Shikhman, A. R., D. C. Brinson, et al. (2009). "Differential metabolic effects of glucosamine and N-acetylglucosamine in human articular chondrocytes." Osteoarthritis Cartilage **17**(8): 1022-1028.

- Shu, H. B., M. Takeuchi, et al. (1996). "The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13973-13978.
- Simon, L. S., L. M. Grierson, et al. (2009). "Efficacy and safety of topical diclofenac containing dimethyl sulfoxide (DMSO) compared with those of topical placebo, DMSO vehicle and oral diclofenac for knee osteoarthritis." Pain **143**(3): 238-245.
- Solomon, L. (1964). "Hereditary Multiple Exostosis." Am J Hum Genet **16**: 351-363.
- Spector, T. D., F. Cicuttini, et al. (1996). "Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study." BMJ **312**(7036): 940-943.
- Spector, T. D., D. J. Hart, et al. (1997). "Low-level increases in serum C-reactive protein are present in early osteoarthritis of the knee and predict progressive disease." Arthritis Rheum **40**(4): 723-727.
- Srikanth, V. K., J. L. Fryer, et al. (2005). "A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis." Osteoarthritis Cartilage **13**(9): 769-781.
- Stanton, L. A., T. M. Underhill, et al. (2003). "MAP kinases in chondrocyte differentiation." Dev Biol **263**(2): 165-175.
- Stickens, D., D. Brown, et al. (2000). "EXT genes are differentially expressed in bone and cartilage during mouse embryogenesis." Dev Dyn **218**(3): 452-464.
- Stickens, D., G. Clines, et al. (1996). "The EXT2 multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes." Nat Genet **14**(1): 25-32.
- Sutton, S., A. Clutterbuck, et al. (2009). "The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis." Vet J **179**(1): 10-24.
- Takasawa, S. and H. Okamoto (2002). "Pancreatic beta-cell death, regeneration and insulin secretion: roles of poly(ADP-ribose) polymerase and cyclic ADP-ribose." Int J Exp Diabetes Res **3**(2): 79-96.
- Takeda, K., S. Akagi, et al. (2002). "Mitochondrial activity in response to serum starvation in bovine (*Bos taurus*) cell culture." Cloning Stem Cells **4**(3): 223-229.
- Takeuchi, M., M. Rothe, et al. (1996). "Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins." J Biol Chem **271**(33): 19935-19942.

- Tartaglia, L. A., T. M. Ayres, et al. (1993). "A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death." Cell **74**(5): 845-853.
- Terazono, K., H. Yamamoto, et al. (1988). "A novel gene activated in regenerating islets." J Biol Chem **263**(5): 2111-2114.
- Tetlow, L. C., D. J. Adlam, et al. (2001). "Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes." Arthritis Rheum **44**(3): 585-594.
- Trippel, S. B. (1995). "Growth factor actions on articular cartilage." J Rheumatol Suppl **43**: 129-132.
- Trowbridge, I. S., J. F. Collawn, et al. (1993). "Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway." Annu Rev Cell Biol **9**: 129-161.
- Ulrich-Vinther, M., M. D. Maloney, et al. (2003). "Articular cartilage biology." J Am Acad Orthop Surg **11**(6): 421-430.
- Unno, M., H. Yonekura, et al. (1993). "Structure, chromosomal localization, and expression of mouse reg genes, reg I and reg II. A novel type of reg gene, reg II, exists in the mouse genome." J Biol Chem **268**(21): 15974-15982.
- Valdes, A. M. and T. D. Spector (2009). "The contribution of genes to osteoarthritis." Med Clin North Am **93**(1): 45-66, x.
- van de Loo, F. A., L. A. Joosten, et al. (1995). "Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis." Arthritis Rheum **38**(2): 164-172.
- van den Berg, W. B. (2001). "Anti-cytokine therapy in chronic destructive arthritis." Arthritis Res **3**(1): 18-26.
- van der Kraan, P. M. and W. B. van den Berg (2007). "Osteophytes: relevance and biology." Osteoarthritis Cartilage **15**(3): 237-244.
- Van Hul, W., W. Wuyts, et al. (1998). "Identification of a third EXT-like gene (EXTL3) belonging to the EXT gene family." Genomics **47**(2): 230-237.
- Verzijl, N., J. DeGroot, et al. (2000). "Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products." J Biol Chem **275**(50): 39027-39031.

- Violette, S., E. Festor, et al. (2003). "Reg IV, a new member of the regenerating gene family, is overexpressed in colorectal carcinomas." Int J Cancer **103**(2): 185-193.
- Wajant, H., F. Henkler, et al. (2001). "The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators." Cell Signal **13**(6): 389-400.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier, et al. (2003). "Tumor necrosis factor signaling." Cell Death Differ **10**(1): 45-65.
- Watanabe, T., H. Yonekura, et al. (1990). "Complete nucleotide sequence of human reg gene and its expression in normal and tumoral tissues. The reg protein, pancreatic stone protein, and pancreatic thread protein are one and the same product of the gene." J Biol Chem **265**(13): 7432-7439.
- Weinstein, S. L. (1997). "Natural history and treatment outcomes of childhood hip disorders." Clin Orthop Relat Res(344): 227-242.
- Weis, W. I., R. Kahn, et al. (1991). "Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing." Science **254**(5038): 1608-1615.
- Wluka, A. E., F. M. Cicuttini, et al. (2000). "Menopause, oestrogens and arthritis." Maturitas **35**(3): 183-199.
- Wuyts, W., S. Ramlakhan, et al. (1995). "Refinement of the multiple exostoses locus (EXT2) to a 3-cM interval on chromosome 11." Am J Hum Genet **57**(2): 382-387.
- Yamamoto, Y. and R. B. Gaynor (2004). "IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway." Trends Biochem Sci **29**(2): 72-79.
- Yang, Q., Y. S. Kim, et al. (2006). "Tumour necrosis factor receptor 1 mediates endoplasmic reticulum stress-induced activation of the MAP kinase JNK." EMBO Rep **7**(6): 622-627.
- Ye, H., Y. C. Park, et al. (1999). "The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2." Mol Cell **4**(3): 321-330.
- Yeh, W. C., J. L. Pompa, et al. (1998). "FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis." Science **279**(5358): 1954-1958.
- Yonemura, Y., T. Takashima, et al. (1984). "Amelioration of diabetes mellitus in partially depancreatized rats by poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors. Evidence of islet B-cell regeneration." Diabetes **33**(4): 401-404.

Zak, B. M., B. E. Crawford, et al. (2002). "Hereditary multiple exostoses and heparan sulfate polymerization." Biochim Biophys Acta **1573**(3): 346-355.

Zenilman, M. E., J. Chen, et al. (1998). "Effect of reg protein on rat pancreatic ductal cells." Pancreas **17**(3): 256-261.

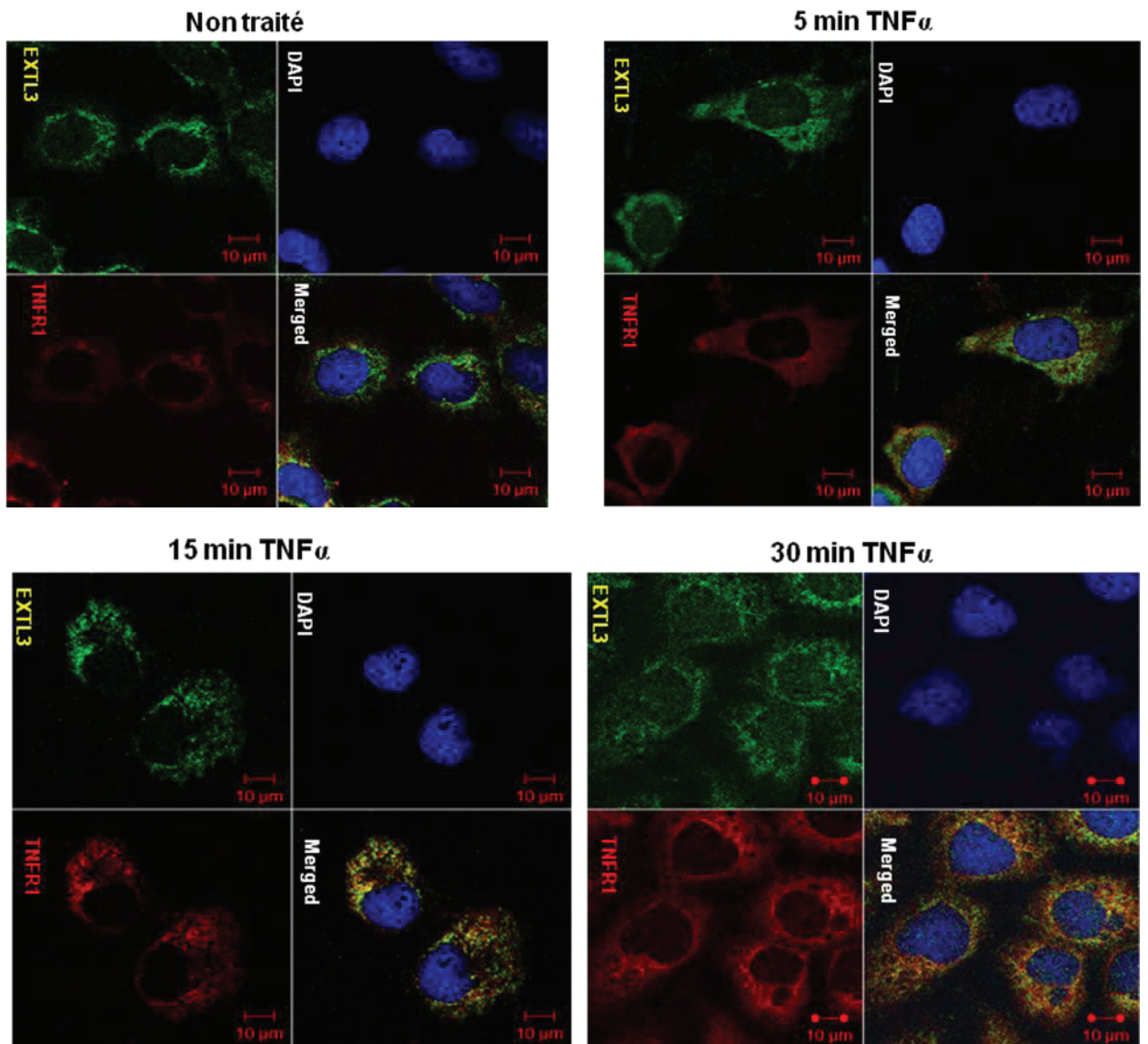
Zenilman, M. E., T. H. Magnuson, et al. (1996). "Pancreatic thread protein is mitogenic to pancreatic-derived cells in culture." Gastroenterology **110**(4): 1208-1214.

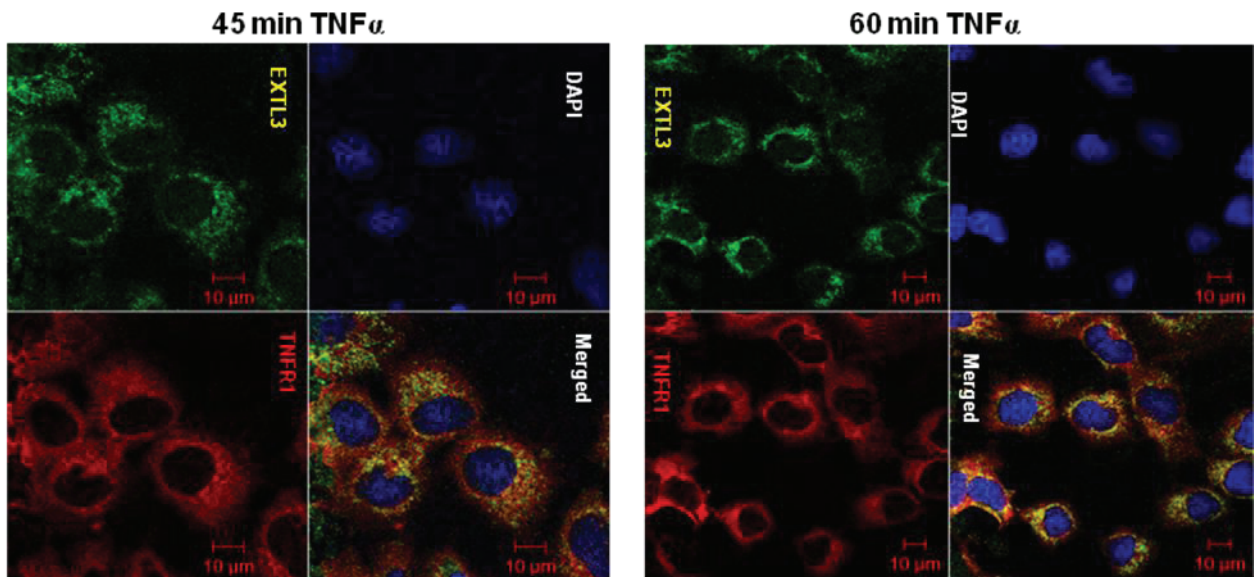
Zhang, J., D. Cado, et al. (1998). "Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1." Nature **392**(6673): 296-300.

Zhang, Y. and J. M. Jordan (2008). "Epidemiology of osteoarthritis." Rheum Dis Clin North Am **34**(3): 515-529.

Zhang, Y. W., L. S. Ding, et al. (2003). "Reg gene family and human diseases." World J Gastroenterol **9**(12): 2635-2641.

ANNEXE





Grossissement figure 13

Les lignées C28/I2 ont été mises en culture dans des « Labtek » pour 24h. Les cellules ont été incubées environ 2h dans du DMEM/F12 dépourvu de FBS, puis traitées ou non au TNF- α (10ng/mL) pour un intervalle de temps de 0 à 60 minutes (min). Elles ont été fixées dans 3.7% de PFA, perméabilisées avec 0.1% Triton-100X et colorées par double immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre EXTL3 (vert), TNFR1 (rouge) et TRAF2 (rouge). Les images fluorescentes ont été prises grâce au microscope Confocal Zeiss LSM 510 doté d'un objectif 63X/1.4 à huile. Le DAPI (bleu) a servi au marquage des noyaux. La superposition de des images (merged) confirme la co-localisation des protéines (coloration jaune).