

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

**Université de Montréal**

**Etude des isoformes PPAR- $\gamma$ 1 et PPAR- $\gamma$ 2 dans la régulation  
transcriptionnelle du gène *pitx1* : Implication dans l'étiopathogénèse  
de l'arthrose**

par

**Catherine Chassaing**

Laboratoire de Génétique Moléculaire de l'Os et des Malformations  
Musculo-Squelettiques  
Hôpital Sainte-Justine

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

Janvier 2005

© Catherine Chassaing, 2005



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
**Etude des isoformes PPAR- $\gamma$ 1 et - $\gamma$ 2 dans la régulation  
transcriptionnelle du gène *pitx1* : Implication dans l'étiopathogenèse  
de l'arthrose.**

présenté par  
**Catherine Chassaing**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Guy Boileau  
président-rapporteur

Dr Alain Moreau  
Directeur de recherche

Dr Johanne Martel-Pelletier  
Co-directrice

Dr Florina Moldovan  
membre du jury

## RESUME

L'arthrose est une maladie caractérisée par la destruction localisée du cartilage articulaire, la croissance anormale de l'os sous-chondral adjacent ainsi que de l'inflammation. Malgré l'existence de certains facteurs de prédisposition, l'étiopathogénèse de l'arthrose demeure inconnue. Récemment, l'inactivation du facteur de transcription *pitx1* chez la souris a permis de démontrer son importance dans le développement des os et du cartilage des membres inférieurs. Bien que les souris knock-out *pitx1*<sup>-/-</sup> ne soient pas viables, les souris hétérozygotes *pitx1*<sup>+/-</sup> présentent une dégénérescence progressive du cartilage ressemblant en plusieurs points à l'arthrose chez l'humain. Ceci nous a donc conduit à examiner les niveaux d'expression de ce facteur de transcription dans l'arthrose, et à mettre en évidence l'extinction de l'expression de ce gène au niveau des chondrocytes articulaires isolés de cartilage de patients atteints d'arthrose. Les travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire ont également permis de déterminer que le mécanisme responsable de cette faible expression, au cours de la vie adulte, pourrait impliquer un autre facteur de transcription,  $PPAR\gamma$ . En effet, la perte d'expression de *pitx1* observée chez les patients atteints d'arthrose pourrait être causée par des mutations, que nous avons identifiées dans deux éléments de réponse à  $PPAR\gamma$  (PPRE), situés dans les régions (-1349/-1324pb) et (-943/-918pb) en amont du gène *pitx1* humain. Une mutation chez tous les patients arthrosiques analysés a été mise en évidence dans le PPRE le plus proximal, affectant les deux demi-sites de l'élément de réponse. D'autre part, une mutation dans un second PPRE plus distal, n'affectant que le demi-site en 5', n'est retrouvée que chez les patients présentant une arthrose et une obésité précoce. De tels résultats pourraient expliquer le développement concomitant de l'arthrose et de l'obésité chez un grand nombre de patients arthrosiques.

Mots clés : arthrose, *pitx1*,  $PPAR\gamma$ , PPRE, obésité

## ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is characterized by the degeneration of articular cartilage, the abnormal growth of the subchondral bone and inflammation. Even though many predisposition factors may be involved, the aetiology of this disease remains unknown. The recent inactivation of the transcription factor *pitx1* in mice has demonstrated its involvement in the development of bones and cartilage in hindlimbs. Although knock-out mice *pitx1*<sup>-/-</sup> are not viable, heterozygous mice *pitx1*<sup>+/-</sup> exhibit a progressive degradation of their cartilage, similar to the one observed in human OA. This has led us to examine the level of *pitx1* expression in articular chondrocytes isolated from OA patients, and to show the lack of expression of this gene in articular chondrocytes isolated from OA patients. The works realized in this Master thesis have also allowed us to determine a molecular mechanism underlying the lack of expression of *pitx1* during adulthood, that could involve another transcription factor, PPAR $\gamma$ . Indeed, the loss-of-function of *pitx1* observed in OA patients could be the consequence of mutations identified in two PPAR $\gamma$  response elements (PPRE), located in the promoter region of *pitx1* at (-1349/1324bp) and (-943/-918bp). One mutation in every OA patients analyzed has been identified in the most proximal PPRE, affecting the two half sites of the response element. Moreover, one mutation in the distal PPRE, affecting only the half-site in 5' has been identified only in early OA and obese patients. Such results could explain the parallel development of osteoarthritis and obesity in most of OA patients.

Keywords: osteoarthritis, *pitx1*, PPAR $\gamma$ , PPRE, obesity

## Table des matières

Titre.....	ii
Identification du jury.....	iii
Résumé.....	iv
Abstract.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xii
Liste des sigles et abréviations.....	xiv
Dédicace.....	xv
Remerciements.....	xvi
<b>Chapitre 1 Revue de la littérature.....</b>	<b>1</b>
1.1 L'arthrose.....	1
1.1.1 Définition .....	1
1.1.2 L'arthrose, fardeau des années 2000.....	2
1.1.3 Répercussions socio-économiques de l'arthrose.....	2
1.1.4 Pathogenèse de l'arthrose.....	5
1.1.5 Le cartilage articulaire.....	6
1.1.5.1 La dégradation du cartilage articulaire.....	8
1.1.6 Rôle des cytokines pro-inflammatoires dans l'arthrose .....	8
1.1.7 Traits cliniques et pathologiques de l'arthrose .....	9
1.1.8 Types d'arthrose .....	10
1.1.8.1 Gonarthrose.....	10
1.1.8.2 Coxarthrose.....	11
1.1.8.3 La polyarthrose des doigts.....	11
1.1.9 Etiologie de l'arthrose.....	11
1.1.9.1 Facteurs de risque systémiques.....	13
1.1.9.1.1 Facteurs ethniques.....	13
1.1.9.1.2 Influence de la densité osseuse.....	13
1.1.9.1.3 Statut hormonal et développement de l'arthrose.....	14

1.1.9.1.4	Rôle de la nutrition dans le développement de de l'arthrose.....	14
1.1.9.1.5	Génétique et arthrose.....	15
1.1.9.1.6	Influence de l'âge dans le développement de l'arthrose.....	16
1.1.9.2	Facteurs de risque locaux.....	16
1.1.9.2.1	Environnement mécanique du joint.....	16
1.1.9.2.2	Obésité et arthrose.....	17
1.1.9.2.3	Impact du sport sur les traumatismes articulaires.....	18
1.1.9.2.4	Facteurs occupationnels.....	18
1.1.10	Traitements actuels.....	19
1.1.10.1	Traitements non pharmacologiques.....	19
1.1.10.1.1	Exercice.....	19
1.1.10.1.2	Support mécanique.....	19
1.1.10.2	Traitements pharmacologiques.....	20
1.1.10.2.1	Paracétamol.....	20
1.1.10.2.2	Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	20
1.1.10.2.3	Opioïdes analgésiques.....	21
1.1.10.2.4	Dérivés de l'acide hyaluroniques.....	22
1.1.10.2.5	Glucosamine et chondroïtine.....	22
1.1.10.3	Traitements à l'étude.....	23
1.2	Rôle de l'os dans l'arthrose.....	24
1.2.1	Développement des os.....	24
1.2.2	Ossification endochondrale.....	25
1.2.3	La famille des gènes Pitx.....	27
1.2.3.1	Pitx1.....	30
1.2.3.1.1	Généralités.....	30
1.2.3.1.2	Rôle de pitx1 dans le développement des membres inférieurs.....	30
1.2.3.1.3	Régulation transcriptionnelle de pitx1.....	31
1.3	Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR).....	32
1.3.1	PPAR, généralités.....	32
1.3.2	Structure générale de PPAR.....	33

1.3.3	Rôles physiologiques de PPAR $\gamma$ .....	36
1.3.3.1	PPAR $\gamma$ et la différenciation des cellules du mésenchyme.....	36
1.3.3.2	PPAR $\gamma$ et l'inflammation.....	37
1.3.3.3	PPAR $\gamma$ et le cartilage articulaire.....	38
1.3.3.4	PPAR $\gamma$ et l'os.....	39
1.3.3.5	PPAR $\gamma$ et l'obésité.....	40
1.3.4	Régulation de l'activité de PPAR $\gamma$ .....	41
1.3.4.1	Régulation transcriptionnelle.....	41
1.3.4.2	Modifications post-traductionnelles.....	43
1.3.4.3	Activation de la transcription par un élément de réponse spécifique à PPAR $\gamma$ (PPRE).....	44
1.4	Plan de l'étude.....	47
<b>Chapitre 2 Matériels et méthodes.....</b>		<b>48</b>
2.1	Matériels.....	48
2.1.1	Souris hétérozygotes pitx1+/-.....	48
2.1.2	Critères d'inclusion des patients arthrosiques et des patients sains.....	48
2.2	Méthodes.....	50
2.2.1	Culture cellulaire.....	50
2.2.1.1	Culture primaire de chondrocytes provenant de cartilage articulaire humain.....	50
2.2.1.2	Culture d'ostéoblastes.....	50
2.2.2	Immunohistochimie.....	51
2.2.3	Histologie.....	52
2.2.4	Extraction d'ARN.....	52
2.2.5	Analyse d'expression génique.....	53
2.2.6	Séquençage d'ADN génomique.....	53
2.2.7	Analyses statistiques.....	54
<b>Chapitre 3 Résultats.....</b>		<b>56</b>
3.1	Etude du rôle du facteur de transcription pitx1 dans l'arthrose.....	56
3.1.1	Analyse phénotypique des souris pitx1-/-.....	56
3.1.2	Les patients arthrosiques présentent-ils un défaut d'expression de pitx1 ?.....	61

3.2	Détermination de la régulation de <i>pitx1</i> .....	66
3.2.1	Evaluation de l'expression de PPAR $\gamma$ chez les souris <i>pitx1</i> <sup>+/-</sup> .....	70
3.2.2	Evaluation de l'expression de PPAR $\gamma$ chez les patients sains versus arthrosiques.....	70
3.2	Recherche d'un élément de réponse à PPAR $\gamma$ dans les régions promotrice et intronique de <i>pitx1</i> .....	73
<b>Chapitre 4 Discussion.....</b>		<b>81</b>
4.1	Aspect fondamental de l'arthrose.....	81
4.1.1	Base génétique de l'arthrose : une perte d'expression de <i>pitx1</i> .....	81
4.1.2	Mécanisme moléculaire de l'arthrose : un défaut dans la régulation de <i>pitx1</i> au cours de la vie adulte.....	84
4.1.3	Lien avec l'obésité.....	86
4.1.4	Caractérisation d'un élément de réponse à PPAR $\gamma$ par analyse du séquençage.....	87
4.1.5	Caractérisation d'une cascade moléculaire impliquée dans la pathologie de l'arthrose.....	89
4.2	Aspect clinique.....	91
4.2.1	PPAR $\gamma$ , une cible thérapeutique potentielle.....	91
4.3	Perspectives.....	92
4.3.1	Détermination de la fonctionnalité d'un PPRE.....	92
4.3.2	Une nouvelle cible de recherche et de traitement.....	92
<b>Bibliographie.....</b>		<b>94</b>

## Liste des tableaux

### Chapitre 1 Revue de la littérature

TABLEAU 1.1: TRAITEMENTS ACTUELS POUR UNE MEILLEURE GESTION DE L'ARTHROSE.....	21
TABLEAU 1.2. PATRON D'EXPRESSION DES ISOFORMES DE PPAR.....	33

### Chapitre 2 Matériels et méthodes

TABLEAU 2.1 : DONNEES CLINIQUES DES PATIENTS DONT L'ARN ISOLE DE CHONDROCYTES ARTICULAIRES A ETE UTILISE LORS DE L'ANALYSE D'EXPRESSION GENIQUE.....	49
TABLEAU 2.2 : DONNEES CLINIQUES DE PATIENTS DONT L'ADN GENOMIQUE A ETE UTILISE POUR L'ANALYSE PAR SEQUENÇAGE.....	49
TABLEAU 2.3 : AGONISTES ET ANTAGONISTES DE PPAR $\gamma$ .....	53
TABLEAU 2.4 : AMORCES UTILISEES POUR L'AMPLIFICATION DES GENES PITX1, PPAR $\gamma$ ET $\gamma$ 2, ET $\beta$ -ACTINE CHEZ LA SOURIS ET CHEZ L'HUMAIN.....	55
TABLEAU 2.5 : AMORCES UTILISEES POUR L'AMPLIFICATION DES DIFFERENTES REGIONS D'INTERET DU PROMOTEUR (P3 ET P4) ET DU SECOND INTRON (I4) DE PITX1 .....	55

### Chapitre 3 Résultats

TABLEAU 3.1 : ALIGNEMENT DES SÉQUENCES NUCLÉOTIDIQUES CORRESPONDANT AU SITE PPRE SITUÉ AU NIVEAU DE LA DEUXIÈME PARTIE DU PROMOTEUR (P2) ENTRE -1349 ET -1324 PB, PROVENANT D'UN PANEL DE 12 PATIENTS ARTHROSIQUES OBÈSES OU NON, AINSI QUE DE 8 SUJETS SAINS.....	76
TABLEAU 3.2 : ALIGNEMENT DES SÉQUENCES NUCLÉOTIDIQUES CORRESPONDANT AU SITE PPRE SITUÉ AU NIVEAU DE LA DEUXIEME PARTIE DU PROMOTEUR (P2) ENTRE -1268 ET -1243 PB, PROVENANT D'UN PANEL DE 12 PATIENTS ARTHROSIQUES OBÈSES OU NON, AINSI QUE DE 8 SUJETS SAINS.....	77

TABLEAU 3.3 : ALIGNEMENT DES SÉQUENCES NUCLÉOTIDIQUES CORRESPONDANT AU SITE PPRE SITUÉ AU NIVEAU DE LA DEUXIÈME PARTIE DU PROMOTEUR (P2) ENTRE -1220 ET -1195 PB, PROVENANT D'UN PANEL DE 12 PATIENTS ARTHROSIQUES OBESES OU NON, AINSI QUE DE 8 SUJETS SAINS.....	78
TABLEAU 3.4 : ALIGNEMENT DES SÉQUENCES NUCLÉOTIDIQUES CORRESPONDANT AU SITE PPRE SITUÉ AU NIVEAU DE LA TROISIEME PARTIE DU PROMOTEUR (P3) ENTRE -943 ET -918 PB, PROVENANT D'UN PANEL DE 12 PATIENTS ARTHROSIQUES OBÈSES OU NON, AINSI QUE DE 8 SUJETS SAINS.....	79
TABLEAU 3.5 : ALIGNEMENT DES SÉQUENCES NUCLÉOTIDIQUES CORRESPONDANT AU SITE PPRE SITUÉ AU NIVEAU DU SECOND INTRON (I4) ENTRE +1641 ET +1666 PB DU SECOND EXON, PROVENANT D'UN PANEL DE 12 PATIENTS ARTHROSIQUES OBÈSES OU NON, AINSI QUE DE 8 SUJETS SAINS.....	80

## Liste des figures

### Chapitre 1 Revue de la littérature

FIGURE 1.1 : PRÉVALENCE AUTODÉCLARÉE DE CERTAINS PROBLÈMES DE SANTÉ DE LONGUE DURÉE, SELON LE SEXE; POPULATION À DOMICILE DE PLUS DE 15 ANS, CANADA (2000).....	3
FIGURE 1.2 : FARDEAU ÉCONOMIQUE DE L'ARTHROSE PAR COMPOSANTE DE COÛT, CANADA (1998).....	4
FIGURE 1.3 : STRUCTURE DU CARTILAGE ARTICULAIRE.....	7
FIGURE 1.4 : PRÉVALENCE DE L'ARTHROSE DE LA HANCHE, PAR GROUPES D'ÂGE, DE SEXE ET DE RÉGION DE L'ANNÉE 2000.....	12
FIGURE 1.5 : PROCESSUS D'OSSIFICATION ENDOCHONDRALE.....	26
FIGURE 1.6 : PATRONS D'EXPRESSION DES MEMBRES DE LA FAMILLE PITX CHEZ LES VERTÉBRÉS.....	29
FIGURE 1.7 : REPRÉSENTATION SHÉMATIQUE DE LA STRUCTURE DES PPARS.....	35
FIGURE 1.8 : MÉCANISME D'ACTIVATION DE LA TRANSCRIPTION PAR LES PPARS ET LES RÉTINOÏDES.....	42
FIGURE 1.9 : PARAMÈTRES IMPORTANTS POUR LA DÉTERMINATION DE LA FONCTIONNALITÉ ET DE LA SPÉCIFICITÉ DES ÉLÉMENTS DE RÉPONSE À PPAR (PPRE).....	46

### Chapitre 3 Résultats

FIGURE 3.1 : LOCALISATION DES PROTÉINES PITX1 PAR IMMUNOHISTOCHIMIE SUR UNE COUPE DE FÉMUR DE SOURIS DE 13,5 JOURS EMBRYONNAIRES.....	57
FIGURE 3.2 : RADIOGRAPHIES DE SOURIS MÂLES ÂGÉES DE 7 MOIS DE TYPE SAUVAGE (PITX1+/+), ET DEUX TYPES HÉTÉROZYGOTES (PITX1+/-).....	59
FIGURE 3.3 : ANALYSE HISTOLOGIQUE COMPARATIVE DU CARTILAGE ARTICULAIRE DE TROIS SOURIS MÂLES ÂGÉES DE 7 MOIS.....	60
FIGURE 3.4 : IMMUNOLOCALISATION DE LA PROTÉINE PITX1 DANS LE CARTILAGE ARTICULAIRE D'UN SUJET SAIN (A) PAR RAPPORT A UN PATIENT ARTHROSIQUE (B) PAR IMMUNOHISTOCHIMIE.....	62
FIGURE 3.5 : ETUDE HISTOMORPHOMÉTRIQUE DU CARTILAGE HUMAIN, ANALYSÉ PAR IMMUNOHISTOCHIMIE, POUR LA PRÉSENCE DE LA PROTÉINE PITX1.....	63

FIGURE 3.6 : ANALYSE DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DE PITX1 DANS DES CHONDROCYTES ARTICULAIRES DE PATIENTS.....	65
FIGURE 3.7(A) : ANALYSE DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DE PITX1, DE PPAR $\gamma$ ET DE PARP-1 DANS DES OSTÉOBLASTES DE SOURIS, TRAITÉS PENDANT 24H AVEC UN AGONISTE PHARMACOLOGIQUE (CIGLITAZONE, 10MM) ET DES ANTAGONISTES PHARMACOLOGIQUE (BADGE, 10 MM) ET PHYSIOLOGIQUES (TNFA, 20NG\ML) DE PPAR $\gamma$ .....	68
FIGURE 3.7(B) : ANALYSE DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DE PARP-1 CHEZ LES SOURIS PITX1 DE TYPE SAUVAGE (PITX1 $^{+/+}$ ), HÉTÉROZYGOTE (PITX1 $^{+/-}$ ) ET KNOCK-OUT (PITX1 $^{-/-}$ ).....	69
FIGURE 3.8 : ANALYSE DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DES ISOFORMES PPAR $\gamma$ 1 ET $\gamma$ 2 CHEZ LES SOURIS PITX1 DE TYPE SAUVAGE (PITX1 $^{+/+}$ ), HÉTÉROZYGOTE (PITX1 $^{+/-}$ ) ET KNOCK-OUT (PITX1 $^{-/-}$ ).....	71
FIGURE 3.9 : ANALYSE DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DES ISOFORMES PPAR $\gamma$ 1 ET $\gamma$ 2 DANS LES CHONDROCYTES ARTICULAIRES DE PATIENTS SAINS (N1-N4) ET ARTHROSIQUES (OA1-OA7).....	72
FIGURE 3.10 : ALIGNEMENT DE SÉQUENCES CONSENSUS POTENTIELLES DE PPRE CONSERVÉES ENTRE L'HOMME ET LA SOURIS DANS LES REGIONS REGULATRICES DU GÈNE PITX1.....	75

## Chapitre 4 Discussion

FIGURE 4.1 : CASCADE MOLÉCULAIRE IMPLIQUÉE DANS LA PATHOGENÈSE ARTHROSIQUE.....	90
---	----

## Liste des sigles et abréviations

(par ordre alphabétique)

AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens

COX2 : cyclo-oxygénase 2

DBB : DNA binding domain

DR1 : Direct repeat 1

IL-1 $\beta$  : interleukine 1 bêta

IMC : indice de masse corporelle

LBD : ligand binding domain

MMP: matrix metalloproteinases (métalloprotéinases matricielles)

MSC : mesenchymal stem cells

OA: Osteoarthritis (Arthrose)

OMS: Organisation mondiale de la santé

Pitx1/ptx1 : pituitary homeobox factor-1

PPAR $\gamma$ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma

PPRE: peroxisome proliferator-activated receptor response element

RXR: Retinoïd X receptor

TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha

TZD: thiazolidinediones

*A la mémoire de ma Grand-Maman*

## Remerciements

A ma Maman, pour le respect, la persévérance, la gentillesse et l'espoir.

A mon Papa, pour ta grande confiance.

A mes deux frères

A Moumtaj.

A mon directeur de recherche, le Dr Alain Moreau, pour l'opportunité que tu m'as offerte.

A ma co-directrice, le Dre Johanne Martel-Pelletier

A toute l'équipe du laboratoire du Dr Moreau

Au Dre Florina Moldovan, et à l'équipe de son laboratoire

A Nathalie Jourdain

Au Programme MENTOR, aux IRSC.

A Bouziane, pour ton oreille, tes conseils, tes connaissances, ta spiritualité. Merci Bouziane !

A Anca pour ta fidèle amitié, malgré les distances

A Too-too, my smooth operator abroad

A Carole, pour les jeudis philosophiques de Montréal, et pour ton amitié.

## CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE

L'arthrose est une maladie caractérisée par une dégradation progressive du cartilage articulaire, ainsi que par des altérations au niveau osseux et musculaire, ce qui distingue ce type de dégénérescence articulaire des autres formes d'arthrite. La présente revue de littérature résume les caractéristiques du développement de la pathologie arthrosique, son étiologie ainsi que les traitements actuels. Par ailleurs, des études antérieures portant sur l'inactivation du facteur de transcription *pitx1* ont permis de mettre en évidence son rôle dans le développement des os et du cartilage des membres inférieurs. Le rôle joué par ce facteur de transcription sera présenté, compte tenu des altérations morphologiques du cartilage et du tissu osseux observées chez les souris hétérozygotes *pitx1+/-*. Ce phénotype, similaire à celui de l'arthrose chez les humains, pourrait impliquer un autre facteur,  $PPAR\gamma$ , facteur de transcription essentiel à la différenciation des adipocytes. Il est concevable que le lien entre l'arthrose et l'obésité puisse impliquer *pitx1* et  $PPAR\gamma$ , par un mécanisme que nous tenterons d'expliquer dans le cadre de ce mémoire.

### 1.1 L'arthrose

#### 1.1.1 Définition

L'arthrose est définie comme un groupe hétérogène de conditions qui mènent à des symptômes dans les joints des articulations, ainsi que des signes qui sont associés à une dégradation de l'intégrité du cartilage articulaire, en plus d'altérations dans l'os sous-jacent à la périphérie des joints (Altman et coll. 1986). Il s'agit d'une maladie chronique, dégénérative, qui affecte graduellement le cartilage articulaire, caractérisée par une dégradation mécanique et enzymatique de la matrice extracellulaire du cartilage provoquant ainsi l'exposition de l'os sous-chondral adjacent, de la douleur et des mouvements limités des joints articulaires (Silver et coll. 2001). L'arthrose est classée en deux groupes ; l'arthrose primaire, qui peut être localisée ou généralisée, le second cas étant plus particulier aux femmes ménopausées, et l'arthrose secondaire possédant

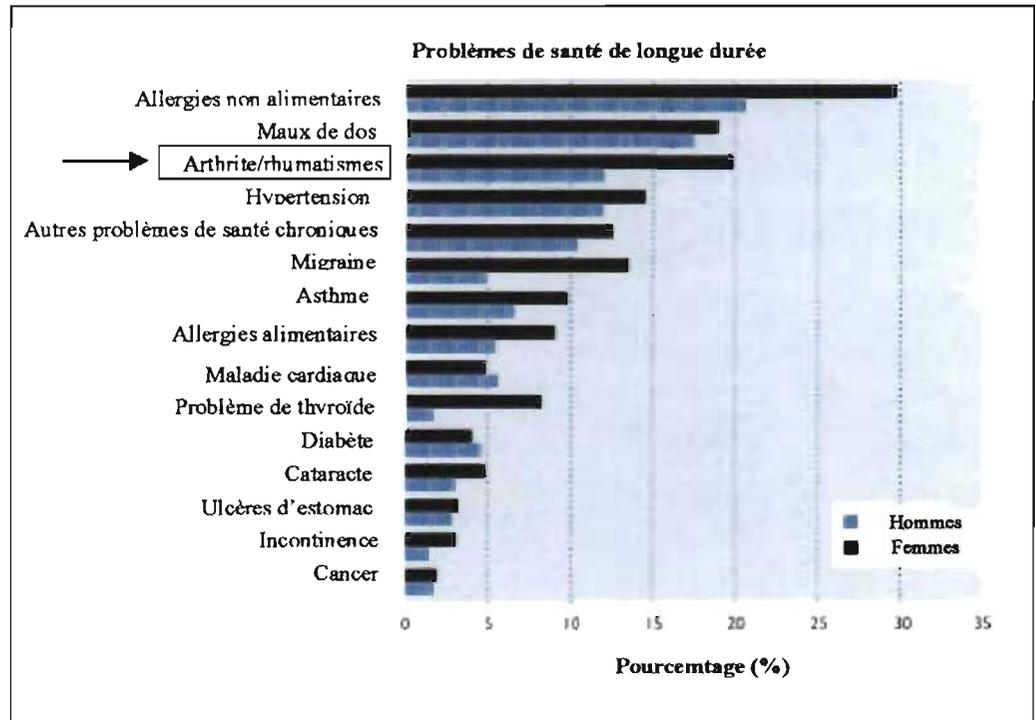
une cause sous-jacente, tel qu'un traumatisme, de l'obésité, la maladie de Paget ou encore une arthrite inflammatoire.

### **1.1.2 L'arthrose, fardeau des années 2000.**

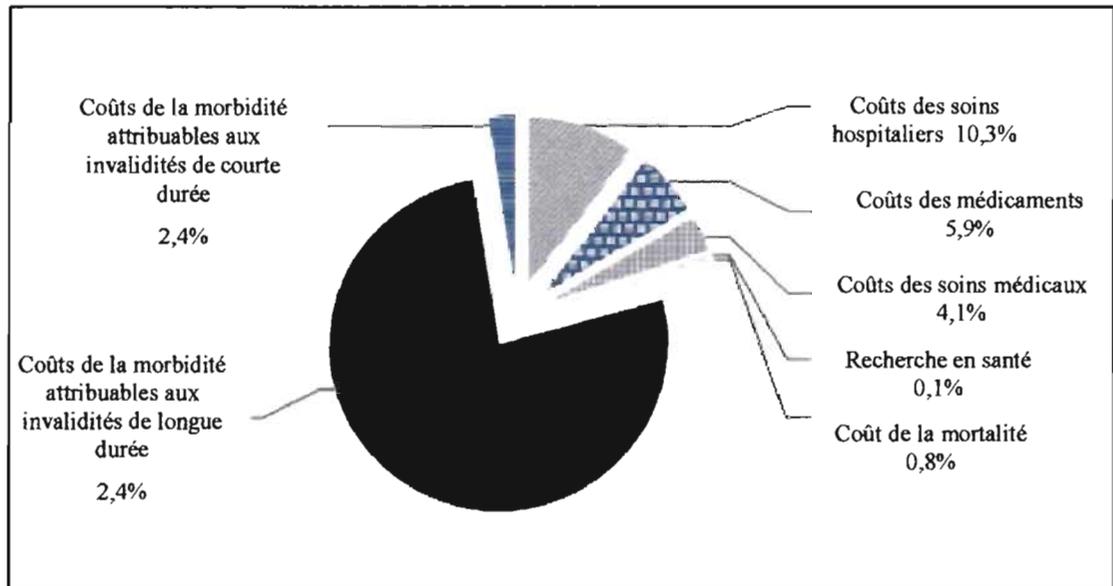
L'arthrose est la forme la plus commune de problèmes musculo-squelettiques à travers le monde. Reconnue par l'Organisation mondiale de la Santé comme le quatrième problème de santé chronique, responsable d'un accroissement du taux « d'années vécues avec la maladie » de 3%, l'arthrose est une cause majeure de la détérioration de la mobilité, particulièrement chez les femmes (Symmons et coll. WHO report, 2002). Cette maladie suit une évolution parallèle à l'augmentation de l'espérance de vie. La **figure 1.1** présente la prévalence autodéclarée de certains problèmes de santé de longue durée, selon le sexe au Canada, mettant en évidence l'importance de l'arthrose. En 2000, les maladies rhumatismales affligeaient près de 4 millions de Canadiens, dont 3 millions étaient atteints d'arthrose, soit 16% de la population.

### **1.1.3 Répercussions socio-économiques de l'arthrose**

L'invalidité physique provoquée par l'arthrose présente des répercussions sociales et économiques considérables. En effet, le risque d'infirmité (défini comme une aide lors de la marche ou de la montée de marches d'escalier) attribuable à l'arthrose du genou est aussi important que celui associé à des risques cardio-vasculaires, et plus important que la majorité des conditions médicales généralement observées chez les personnes âgées. Selon de récentes études, la détection d'une arthrose du genou par radiographie, même en l'absence de symptômes, augmente considérablement la dépendance d'une personne aux autres pour les activités quotidiennes. Les facteurs liés à une invalidité chez ces patients incluent outre la douleur, des facteurs psychosociaux tels que des symptômes dépressifs ainsi qu'une faiblesse musculaire (Felson et coll. 2000). De plus, le taux d'absentéisme au travail ainsi que le coût des traitements sont devenus des problèmes économiques non négligeables. La **figure 1.2** met en évidence les coûts engendrés par la gestion et les traitements de l'arthrose.



**Figure 1.1 : Prévalence autodéclarée de certains problèmes de santé de longue durée, selon le sexe, population à domicile de plus de 15 ans, Canada (2000).**



**Figure 1.2 : Fardeau économique de l'arthrose par composante de coût, Canada (1998).** Adapté de Santé Canada, 2004

#### 1.1.4 Pathogenèse de l'arthrose

Le processus arthrosique résulte d'une dégénération de l'os avoisinant le joint, avec une perte du cartilage et une formation irrégulière et anormale de l'os adjacent, ainsi qu'un amincissement de l'espace du joint. Il demeure controversé si l'arthrose est initiée dans le cartilage articulaire du joint synovial ou est une conséquence de l'affaiblissement de l'os sous-chondral par micro-fracture, des études expérimentales supportant ces deux possibilités (Radin et Rose, 1986; Mori et coll. 1993). Quelle que soit l'amorce initiale, le chemin commun final dans l'arthrose est la destruction du cartilage articulaire, le remodelage du joint ainsi qu'une sclérose de l'os sous-chondral.

D'un point de vue microscopique, on observe une érosion et une fibrillation de la surface du cartilage articulaire, ainsi qu'une destruction de sa microarchitecture. Des variations cellulaires et vasculaires de l'os sous-chondral conduisent à une sclérose ainsi qu'une formation calleuse et osseuse où la synovie est continue avec le périoste. Au niveau moléculaire, l'arthrose est caractérisée par un déséquilibre entre les voies cataboliques (i.e. la dégradation de la matrice extracellulaire) et anaboliques (i.e. la biosynthèse de la matrice extracellulaire) dans lesquelles le cartilage articulaire est le lieu principal de réponse aux problèmes tissulaires. (Ghosh et coll. 2002). Parallèlement, on observe une diminution de la concentration et de la viscosité du fluide synovial, ce qui diminue les propriétés lubrifiantes et amortissantes du joint.

Ce processus entier implique des interactions complexes de cellules et de médiateurs solubles tels que les cytokines, les facteurs de croissance, les médiateurs inflammatoires, les métalloprotéinases et les enzymes chondro-dégradantes.

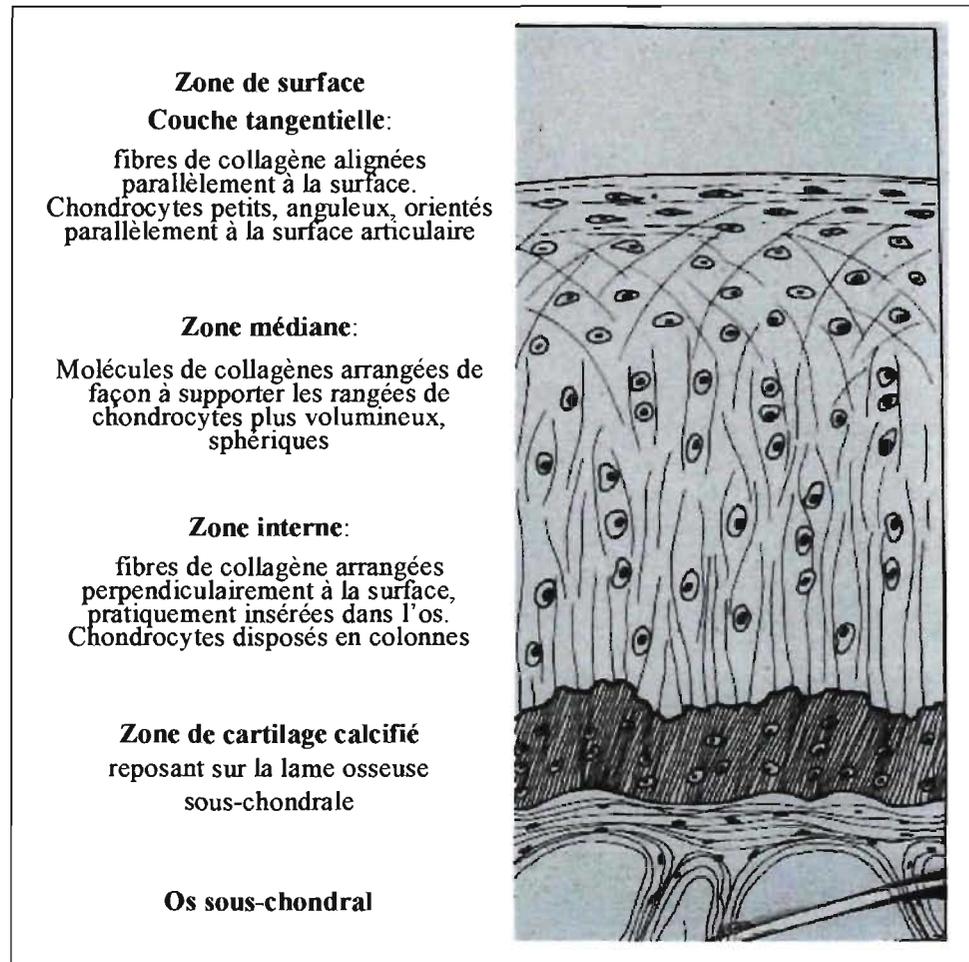
La progression de la maladie se fait en plusieurs stades, soit la dégradation protéolytique de la matrice cartilagineuse, suivie de la fibrillation et de l'érosion de la surface du cartilage, accompagnée par la libération de produits de dégradation dans le fluide synovial. Cela conduit à une inflammation synoviale et à la production de médiateurs solubles, de protéases et de cytokines pro-inflammatoires dans ce tissu. Ces derniers diffusent dans le liquide synovial puis dans le cartilage, dans lequel il y a augmentation du processus catabolique et enclenchement d'un cercle vicieux (Martel-Pelletier, 2003).

### 1.1.5 Le cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif spécialisé, qui recouvre la surface des os longs et des jonctions des articulations supportant une charge. Il s'agit d'un tissu multicouche (**figure 1.3**) dont le principal rôle est de diminuer les frictions dans les joints et d'absorber les chocs associés à la locomotion. La matrice extracellulaire est composée d'un réseau de macromolécules conférant des propriétés de rigidité, de capacité à amortir les chocs ainsi que de nutrition et de signalisation. Par ailleurs, le cartilage articulaire fournit un support structural pour l'embryon, sert de matrice pour l'ossification endochondrale et aide à la croissance post-natale du squelette (Shum et coll. 2002).

Le cartilage articulaire est baigné dans le fluide synovial, un lubrifiant qui sert à certains degrés de source nutritive pour les chondrocytes. La lubrification par le fluide synovial permet des mouvements sans friction des surfaces articulaires.

Les chondrocytes du cartilage adulte sont des cellules différenciées, dispersées dans la matrice cartilagineuse, responsables de la synthèse et du maintien des macromolécules spécialisées de cette matrice. De plus, les chondrocytes sont capables de répondre à des stimuli biochimiques, structurels et physiques, et de synthétiser différentes enzymes, facteurs de croissance, cytokines et des composants de la matrice extracellulaire. Bien que les chondrocytes soient biosynthétiquement actifs chez l'animal en croissance, leur capacité à remplacer le collagène est limitée dans le cartilage articulaire mature. Ils subissent également des changements métaboliques résultants de l'âge, de maladies ou de blessures. Ces changements sont capables d'entraver le maintien et la réparation du tissu, résultant en une perte accélérée de la surface articulaire. L'arthrose a lieu lorsque le cartilage commence à se fissurer et à se détruire. La perte du cartilage laisse les os frotter l'un contre l'autre, ce qui provoque une douleur des joints et une perte de la mobilité.



**Figure 1.3 : Structure du cartilage articulaire.** Adapté de Comparative morphology centre, University of Bristol

### **1.1.5.1 La dégradation du cartilage articulaire**

Les MMPs (métalloprotéinases matricielles) sont une famille d'enzymes qui dégradent les composants de la matrice extracellulaire. Elles sont synthétisées dans les tissus articulaires par les cellules synoviales et les chondrocytes. Bien qu'elles soient importantes pour le remodelage de ce tissu, une expression élevée de MMPs est associée à une dégradation du cartilage; les MMPs étant fortement impliquées dans le processus de dégradation de la matrice cartilagineuse arthrosique. La dégradation de cette matrice est due en partie aux collagénases MMP-1 et MMP-13 responsables de la dégradation du collagène de type II, collagène de structure majoritairement trouvé dans le cartilage articulaire des sujets sains, ainsi qu'à la stromélysine (MMP-3) et aux aggrecanases, responsables de la dégradation du protéoglycan (Neuhold et coll. 2001). Les métalloprotéinases peuvent être régulées par différents facteurs produits localement, comme les cytokines. Plusieurs études portent sur l'identification de cibles des collagénases, comme par exemple, les résultats de Neuhold et coll. (2001) chez la souris, et de Mitchell et coll. (1996) dans le cartilage humain, qui démontrent une activité excessive de MMP-13, la collagénase-3, lors de la dégradation du cartilage articulaire et la pathologie subséquente du joint.

Cependant, bien que l'altération enzymatique du cartilage articulaire puisse expliquer la dégradation exhaustive du tissu, elle ne fournit pas une explication suffisante pour la synthèse et l'expression accrue des MMPs dans les tissus articulaires (Martel-Pelletier, 2003).

### **1.1.6 Rôle des cytokines pro-inflammatoires dans l'arthrose**

Tel que mentionné précédemment, le processus inflammatoire est d'une importance considérable dans la progression des lésions cartilagineuses dans l'arthrose. De nombreuses études montrent que les cytokines pro-inflammatoires fournissent les signaux biomécaniques essentiels qui stimulent les chondrocytes à libérer des enzymes de dégradation du cartilage (Goldring 1999 ; Martel-Pelletier et coll. 1999 ; Goldring 2000). Ces cytokines, synthétisées par les chondrocytes, par les synoviocytes activés ou

par des cellules mononucléaires se lie à des récepteurs spécifiques sur les membranes cellulaires, et activent ainsi la transcription des gènes des métalloprotéinases (MMPs). Les cytokines pivots dans l'arthrose sont l'interleukine 1 bêta (IL-1 $\beta$ ) et le tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), qui sont capables d'augmenter la synthèse des enzymes responsables de la dégradation du cartilage articulaire (les MMPs), d'inhiber la synthèse de la plupart des inhibiteurs physiologiques de ces enzymes, ainsi que d'inhiber la synthèse des principaux constituants de la matrice, tels que le collagène et le protéoglycan. Par exemple, l'IL-1 $\beta$  est capable d'induire la dégradation du cartilage via la sur-expression des gènes codant pour plusieurs MMP, tel que décrit pour les MMP-1 par Fuchs et coll. (2004).

Bien que l'on retrouve très peu de TNF $\alpha$  dans le cartilage arthrosique, cette cytokine pro-inflammatoire joue un rôle important. En effet, les chondrocytes articulaires humains de cartilage arthrosique expriment un nombre élevé de récepteurs p55 TNF $\alpha$ , ce qui rend le cartilage arthrosique particulièrement susceptible au stimuli de dégradation exercé par TNF $\alpha$ . Ces cytokines sont également capables de bloquer les voies de synthèse de certains composants matriciels, voies requises afin de restaurer l'intégrité de la matrice extracellulaire dégradée.

Ainsi, l'action de ces cytokines sur le processus enzymatique, combinée avec la suppression de la synthèse de la matrice extracellulaire, provoquent une sévère dégradation du cartilage et l'apparition de conditions arthrosiques, ce qui fait de ces deux cytokines des cibles de choix pour d'éventuelles approches thérapeutiques.

### **1.1.7 Traits cliniques et pathologiques de l'arthrose**

L'homéostasie physiologique du cartilage articulaire est maintenue par les chondrocytes, qui synthétisent les collagènes, les protéoglycans et les protéinases. L'arthrose résulte d'un métabolisme anormal des chondrocytes, qui les rend incapables de synthétiser une matrice de bonne qualité, en terme de résistance et d'élasticité, et de maintenir la balance entre la dégradation et la synthèse de la matrice extracellulaire.

Les patients souffrant d'arthrose ont habituellement plus de 50 ans et se plaignent de douleurs et de rigidité du joint affecté, processus pouvant être exacerbé avec l'activité et

diminué au repos. La rigidité matinale, si elle a lieu, est de moins d'une demie heure. Une faiblesse et un craquement du joint au mouvement peuvent également se manifester. Un gonflement peut être dû à une déformation de l'os tel que la formation d'ostéophytes, ou dû à une effusion causée par une accumulation du liquide synovial. Les symptômes systémiques sont absents. La présence de fièvre, une perte de poids, de l'anorexie ou des tests sanguins anormaux doivent alerter le clinicien sur des processus pathologiques tels qu'une infection ou une tumeur. Plusieurs critères pour le diagnostic de l'arthrose ont été mis au point par l'American College of Rheumatology. Ils ont été développés à des fins épidémiologiques et ne peuvent être utilisés dans la pratique clinique quotidienne.

Traditionnellement, l'arthrose a été définie comme un processus pathologique dégénératif progressif inévitable. De récents travaux suggèrent qu'il s'agit plutôt d'un processus épisodique (Haq et coll. 2003), soit une réponse adaptative des joints à une variété de pressions environnementales, génétiques et biomécaniques.

### **1.1.8 Types d'arthroses**

Les causes et les manifestations de l'arthrose diffèrent en fonction du site anatomique des joints articulaires. Les trois types d'arthrose les plus courants sont l'arthrose du genou (gonarthrose), l'arthrose de la hanche (coxarthrose) ainsi que l'arthrose des doigts.

#### **1.1.8.1 Gonarthrose**

L'arthrose du genou est sûrement l'atteinte la plus grave de la maladie arthrosique, entraînant parfois une impotence fonctionnelle majeure. Son incidence est au moins deux fois plus fréquente que la coxarthrose. Cette pathologie est rarement primitive, fréquemment secondaire, particulièrement consécutive à des traumatismes, des troubles statiques axiaux et biomécaniques. Elle peut concerner les trois compartiments du genou, soit fémoraux-tibiaux internes et externes, et le compartiment fémoropatellaire (Jamard et coll. 2000).

### 1.1.8.2 Coxarthrose

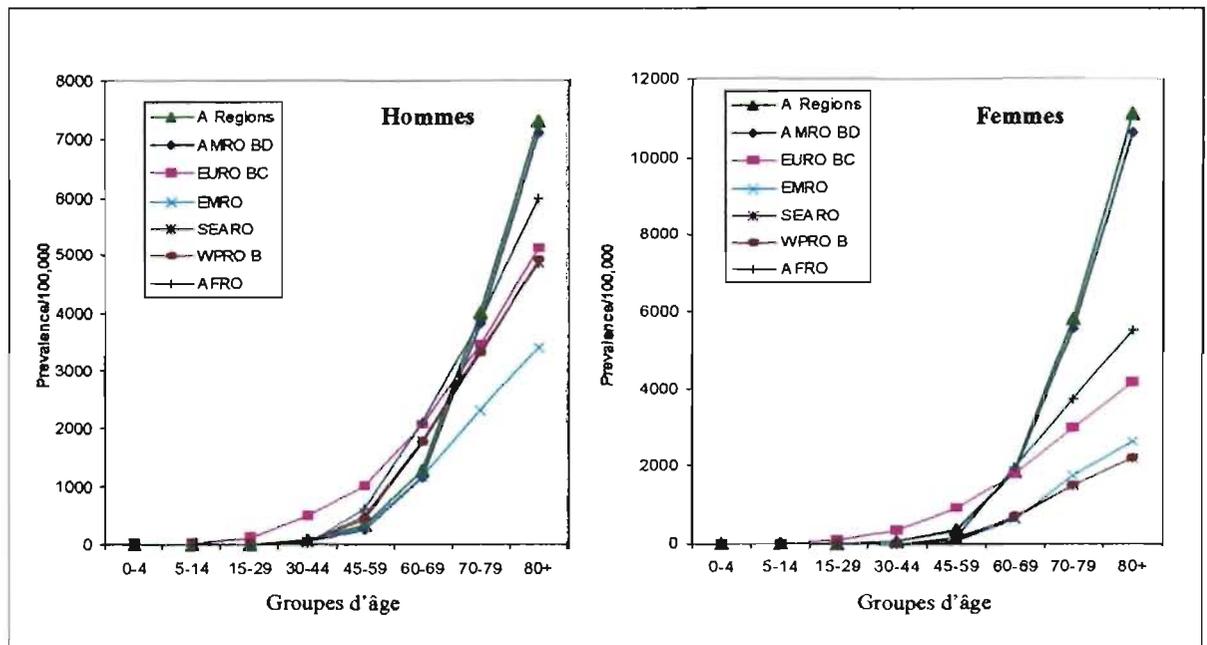
L'arthrose de la hanche affecte de 7 à 25% de la population de plus de 55 ans. La coxarthrose affecte la plupart du temps un seul joint et son étiologie est en général biomécanique. De nombreux critères ont été évalués afin de pouvoir classer et définir la coxarthrose (Reijman et coll. 2004). Les critères cliniques permettant de définir une arthrose de la hanche chez un patient sont, en plus de la douleur, une rotation interne de la hanche supérieure ou égale à 15 degrés, de la rigidité matinale jusqu'à 60 minutes et un âge supérieur à 50 ans (Altman et coll. 1991).

### 1.1.8.3 La polyarthrose des doigts

L'arthrose symptomatique de la main est un phénomène commun chez la population âgée caucasienne, particulièrement chez les femmes. Cependant, la prévalence de cette altération n'augmente pas avec l'âge. Les joints les plus fréquemment impliqués sont les joints distaux et proximaux interphalange, ainsi que les joints à la base du pouce. Cela diminue la force de préhension et contribue à limiter les activités quotidiennes. Actuellement, on estime qu'il y a plus de 13% des hommes et plus de 26% des femmes de plus de 70 ans souffrant de cette maladie (Zhang et coll. 2002).

## 1.1.9 Etiologie de l'arthrose

L'arthrose est une maladie multifactorielle. Bien que la cause exacte de son développement n'ait pas encore été déterminée, de nombreux facteurs de prédisposition sont à considérer. La **figure 1.4** présente la prévalence d'arthrose de la hanche en fonction de groupes d'âge, de sexe et de régions.



**Figure 1.4 : Prévalence de l'arthrose de la hanche, par groupes d'âge, de sexe et de région de l'année 2000.** Adapté de Symmons et coll, 2003. **A Regions** : pays développés en Amérique du nord, Europe de l'ouest, Japon, Australie et Nouvelle Zélande. **AFRO** : pays d'Afrique sub-saharienne. **AMRO BD** : pays en voie de développement d'Amérique. **EMRO** : pays de la méditerranée orientale et régions d'Afrique du nord. **EURO BC** : pays en voie de développement d'Europe. **SEARO** : pays du sud-est asiatique. **WPRO B** : pays de la région du Pacifique ouest. La forte prévalence d'arthrose est évidente dans les pays industrialisés, ainsi que dans les pays en voie de développement d'Amérique, par rapport au reste du monde. Notez l'incidence beaucoup plus forte de la maladie chez les femmes par rapport aux hommes, ainsi que le développement plus tardif de la maladie chez les femmes, soit dans le groupe d'âge 45-59 ans, par rapport aux hommes (30-44 ans).

### **1.1.9.1 Facteurs de risque systémiques**

#### **1.1.9.1.1 Facteurs ethniques**

Bien qu'ubiquitaire, l'arthrose est généralement plus commune chez les Européens que chez les Asiatiques. L'arthrose de la hanche est présente entre 7% et 25% chez les Européens, alors que le taux atteint difficilement les 4% chez les Chinois et les Africains. L'arthrose de la main est plus commune chez les femmes européennes que chez les femmes africaines et afro-caribéennes (Tepper et coll. 1993).

Les contributions relatives de facteurs biologiques, socio-économiques et ethniques tels que le mode de vie demeurent obscurs. Bien que des différences ethniques pour des facteurs tel que l'indice de masse corporelle peuvent partiellement expliquer ces variations, la différence ethnique des biomarqueurs de l'arthrose suggère que les facteurs génétiques et biologiques jouent également un rôle très important.

#### **1.1.9.1.2 Influence de la densité osseuse**

Il existe une corrélation entre la densité osseuse et l'arthrose. Une augmentation de la densité osseuse sous-chondrale peut conduire à une augmentation de la charge sur le cartilage articulaire participant ainsi au processus biomécanique postulé par Radin et coll. (1978). Toutefois, il demeure incertain si ces changements au niveau osseux précèdent ou accompagnent la dégénérescence articulaire de l'arthrose. De plus, Zhang et coll. (2000) suggèrent qu'une forte densité osseuse pourrait freiner la progression de la maladie.

Par ailleurs, il existe une relation inverse entre l'ostéoporose et l'arthrose. Une forte densité minérale osseuse est associée à une augmentation de la prévalence de l'arthrose de la hanche, de la main et du genou (Felson et coll. 2000).

### 1.1.9.1.3 Statut hormonal et développement de l'arthrose

Le vieillissement du cartilage peut contribuer au développement de l'arthrose. En effet, le cartilage articulaire est l'unique tissu dans lequel les cellules, les chondrocytes, et la majorité des protéines de la matrice extracellulaire sont sujets à peu de renouvellement, ce qui résulte en un tissu qui doit supporter des années d'utilisation et peut également accumuler des années de changements associés au vieillissement (Loeser, 2004).

En dessous de 50 ans, les hommes présentent une plus forte prévalence et incidence que les femmes pour la maladie. Cependant, après cet âge, la tendance s'inverse, puis s'atténue vers 80 ans. La forte incidence d'arthrose chez les femmes juste après la ménopause suggère qu'une diminution systémique du taux d'oestrogènes puisse jouer un rôle dans le développement de la maladie. L'identification des deux récepteurs aux oestrogènes ( $ER\alpha$  et  $ER\beta$ ) dans les chondrocytes souligne la sensibilité du cartilage à ces hormones (Richette et coll. 2003). Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* mettent en évidence les effets divergents des oestrogènes sur le cartilage, soit en fonction de la dose et de l'âge. Ces hormones sont capables de favoriser la synthèse de protéoglycans par les chondrocytes, de l'IGFBP-2 (insulin-like growth factor binding protein 2) (Richmond et coll. 2000), ainsi que d'interagir avec des molécules d'adhésion, des cytokines, et de restaurer la balance entre les MMPs et les TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinase) (Lee et coll. 2003). Ces expériences confirment que le cartilage répond aux oestrogènes, mais de façon dose-dépendante. En effet, des dosages physiologiques, tels que les thérapies de substitution hormonale, ont des effets protecteurs alors que des dosages plus concentrés présentent des effets délétères sur le cartilage (Gokhale et coll. 2004).

### 1.1.9.1.4 Rôle de la nutrition dans le développement de l'arthrose

L'apport alimentaire est bien connu pour jouer un rôle impératif dans les processus physiologiques et pathologiques. Une exposition continue aux oxydants contribue au développement de plusieurs maladies reliées à l'âge, incluant l'arthrose. De plus, les

chondrocytes sont une source importante de corps réactifs à l'oxygène, ce qui peut endommager le collagène du cartilage et le fluide synovial. Comme les micronutriments antioxydants fournissent une défense contre la dégradation de tissus, de forts apports de ces derniers pourraient avoir des effets protecteurs contre l'arthrose (Greenwald et Moy 1979). D'autre part, les personnes présentant de faibles taux sanguins de vitamine C et D présentent 3 fois plus de risque de développer une arthrose du genou que les autres. Les propriétés anti-oxydantes de la vitamine C seraient bénéfiques pour retarder la maladie, tel que démontré chez des modèles animaux. L'apport de vitamine D n'a pas d'effet sur le développement de l'arthrose en général, cependant de faibles apports et de faibles taux systémiques en vitamine D favorisent la progression de l'arthrose. La vitamine D possède également des effets directs dans les chondrocytes du cartilage articulaire, qui sont capables de redévelopper les récepteurs à la vitamine D. Dans l'état actuel des connaissances, la vitamine E ne présente pas de bénéfice particulier (Felson et coll. 2000).

#### **1.1.9.1.5 Génétique et arthrose**

L'arthrose sous toutes ses formes hétérogènes semble être fortement déterminée génétiquement. Les facteurs génétiques comptent pour au moins 50% des cas de l'arthrose de la main et de la hanche, et un plus faible pourcentage pour le genou. Les gènes candidats pour les formes communes de l'arthrose incluent le gène du récepteur pour la vitamine D, qui influence la densité osseuse et est situé à proximité du locus pour le collagène de type II, la forme prépondérante de collagène dans le cartilage articulaire hyalin, les gènes « insuline-like growth factor », les gènes pour les protéines oligomériques du cartilage ainsi que la région HLA. Il est fort probable que la plupart des gènes affectant l'arthrose soient capables d'affecter la pathologie dans de nombreuses jonctions articulaires, cependant le courant de pensée actuel suggère qu'il doit y avoir des gènes spécifiques pour des sites spécifiques, tel que la hanche (Felson et coll. 2000). De manière générale, les gènes défectueux codent la plupart du temps pour des protéines de structure de la matrice extracellulaire du joint et des protéines du collagène.

D'autre part, les enfants de parents développant une arthrose précoce présentent des risques plus élevés de développer la maladie par rapport à des familles ne présentant pas de tels cas (Haq et coll. 2003).

#### **1.1.9.1.6 Influence de l'âge sur l'arthrose**

La propension à développer de l'arthrose est favorisée par des processus physiologiques dûs au vieillissement, soit un relâchement élevé autour des joints articulaires, une calcification du cartilage ainsi qu'une altération de la fonction des chondrocytes. En effet, on observe de nombreuses altérations au niveau cellulaire associées à l'âge dans le cartilage articulaire et l'os, tels que des dommages oxydatifs, de l'apoptose, ainsi que des changements systémiques et locaux (Carrington, 2005). Par ailleurs, des études ont défini qu'environ 80% des personnes de plus de 65 ans présentent des évidences radiographiques d'arthrose, bien que la maladie puisse rester asymptomatique, mais l'incidence et la prévalence de l'arthrose symptomatique diminue chez les hommes et les femmes après 80 ans (Haq et coll. 2003).

#### **1.1.9.2 Facteurs de risque locaux**

Les facteurs de risque locaux pour l'arthrose sont biomécaniques. L'environnement mécanique du joint, la charge supportée par ce dernier, dans les cas d'obésité par exemple, le sport et l'occupation sont autant de paramètres qui contribuent au développement et à la progression de l'arthrose.

##### **1.1.9.2.1 Environnement mécanique du joint**

La laxité du genou est le déplacement ou la rotation du tibia en accord avec le fémur. La proprioception est la perception consciente ou non de la position et du mouvement du joint. Elle est critique pour le maintien de la stabilité du joint dans des conditions dynamiques. Enfin, l'alignement du genou est la position du genou par rapport à la

hanche et de la cheville. Un mauvais alignement prédit des retombées chirurgicales mauvaises. Ces altérations de l'environnement mécanique du joint sont capables d'affecter d'une façon néfaste la distribution de la charge.

#### **1.1.9.2.2 Obésité et arthrose**

L'excès pondéral représente un facteur de risque significatif de l'arthrose. Pendant plusieurs années, il n'était pas clair si présenter un excès de poids était une cause ou une conséquence du développement de l'arthrose, étant donné l'immobilité et l'invalidité que la maladie pouvait produire. Des études ont démontré qu'un excès de poids précède le développement de la maladie (Manninen et coll. 1996). De plus, ce risque est plus élevé chez la femme. Les personnes présentant un excès pondéral présentent une forte prévalence pour le développement d'une arthrose du genou. Le poids du corps est transposé de trois à six fois sur le joint de cette articulation durant la marche. Toute augmentation de poids devrait être multipliée par ce facteur afin d'estimer l'excès de force appliqué sur le genou chez les patients en surpoids. Etre en surpoids vers l'âge de 35 ans est un facteur de risque pour le développement d'une arthrose du genou vers les 70 ans. La relation entre l'augmentation de la masse corporelle avec l'arthrose de la hanche est moins évidente qu'avec l'arthrose du genou. Un excès pondéral sur les joints articulaires du genou et de la hanche peut provoquer une dégradation du cartilage et des fissures du ligament et d'autres supports structuraux. Le cartilage articulaire normal possède un mécanisme de support de charge unique, gouverné par un contenu élevé en eau ainsi que par une rigidité et une perméabilité de sa matrice collagène-protéoglycan. La pression sur le fluide interstitiel durant la charge contribue à plus de 90% au support de charge, protégeant ainsi la matrice collagène-protéoglycan de tensions excessives et réduisant la friction à la surface articulaire. Des changements pathologiques dans la composition du cartilage et l'organisation moléculaire ainsi qu'un contenu élevé en eau altèrent la balance des propriétés biomécaniques et de charges sur les joints, provoquant la déformation excessive du cartilage.

Enfin, un amalgame entre l'obésité et l'arthrose de la main a été mis en évidence, suggérant ainsi qu'un intermédiaire métabolique ou des anomalies lipidiques, puisse

jouer un rôle dans cette relation (Carman et coll. 1994). Le rapport entre l'obésité et l'arthrose est un problème d'autant plus sérieux lorsque l'on considère l'obésité comme le problème de santé publique numéro un en Amérique du Nord.

### **1.1.9.2.3 Impact du sport sur les traumatismes articulaires**

Des études épidémiologiques ont démontré que la pratique de certains sports de compétition augmentait le risque de développer de l'arthrose (Buckwalter et Lane, 1997). De la course modérée régulière présente de très faibles risques, voir inexistant. Les activités sportives qui semblent augmenter le risque d'arthrose sont celles qui demandent un impact sur les joints de forte intensité, aiguë, et directe comme un contact entre des participants, des surfaces de jeu ou de l'équipement. Cela est courant dans le football, le hockey etc. Les efforts pour réduire le risque chez ces sportifs incluent une évaluation de préparticipation des facteurs de risques individuels et des conseils basés sur ces évaluations, une modification éventuelle des règles afin de réduire le contact direct entre les joueurs, la torsion des joints de haute densité et la charge d'impact, l'utilisation d'un équipement adéquat tel que rembourrages et chaussures adéquates, ainsi qu' un entraînement régulier afin de d'augmenter la stabilité dynamique des joints (Felson et coll. 2000).

### **1.1.9.2.4 Facteurs occupationnels**

Les professions et activités dans lesquelles les travailleurs exercent des tâches répétitives provoquent une sur-utilisation des joints, et une fatigue des muscles qui les protègent, ce qui augmente le risque d'arthrose dans ces jonctions articulaires. Des études portant sur des travaux physiques répétitifs comme dans des ateliers ou dans des fermes montrent clairement une augmentation du taux d'arthrose des doigts, des hanches ou encore des genoux, selon le travail effectué (Felson et coll. 1991).

### **1.1.10 Traitements actuels**

Les traitements proposés pour enrayer la progression arthrosique sont d'ordre physique, soit de l'exercice et des supports mécaniques, et d'ordre pharmacologique. Le **tableau 1.1** résume différentes approches actuellement utilisées afin de mieux gérer la progression des symptômes et la douleur subséquente. L'arthrose est une maladie progressive à traiter au cas par cas.

#### **1.1.10.1 Traitements non pharmacologiques**

##### **1.1.10.1.1 Exercice**

Le rôle bénéfique de l'exercice physique sur la maladie est universellement accepté, et semble être l'intervention la plus importante. En effet, l'inactivité due à la douleur arthrosique provoque une réduction de la masse musculaire entourant le joint, ce qui le déstabilise. La capacité aérobie est également réduite, ce qui augmente le risque d'obésité. L'exercice est nécessaire afin de favoriser la force et l'endurance de la masse musculaire, d'améliorer la flexibilité ainsi que le mouvement du joint, et de favoriser l'activité aérobie. Des recommandations officielles de l'OMS ainsi que de Santé Canada préconisent l'activité physique pour les patients arthrosiques.

##### **1.1.10.1.2 Support mécanique**

Pour l'arthrose du genou, des chaussures amortissant les chocs peuvent réduire l'impact de la charge exercée sur l'articulation. Des chaussures orthopédiques, munies de prothèses peuvent améliorer la proprioception ainsi que réduire la douleur, alors que des chaussures rembourrées sont fortement recommandées lors de la pratique d'exercices physiques. L'utilisation d'aides pour la marche comme une canne par exemple, ainsi qu'un environnement fonctionnel sûr et adapté à la maison comme au travail contribuent à une meilleure gestion de la maladie.

### **1.1.10.2 Traitements pharmacologiques**

La gestion conventionnelle de l'arthrose se concentre principalement sur le soulagement de la douleur et des symptômes, par l'administration d'agents analgésiques et anti-inflammatoires. Ces molécules sont cependant associées à des effets secondaires significatifs, et sont incapables de freiner la progression de l'arthrose. Les différentes classes d'agents pharmacologiques sont décrites dans les lignes qui suivent.

#### **1.1.10.2.1 Paracétamol**

Pour de nombreux patients, le soulagement de l'arthrose faible à modérée par l'acétaminophène (paracétamol) présente une efficacité comparable à celle des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Bien que l'amenuisement de la douleur ne soit pas exceptionnel, les bénéfices dûs au coût, à l'efficacité et au profil de toxicité font du paracétamol un médicament de choix. La thérapie initiale recommandée par l'American College of Rheumatology est d'une dose de 1g de paracétamol quatre fois par jour. Ce composé est sûr et bien toléré, surtout chez les personnes âgées. Son unique contre-indication concerne les alcooliques chroniques ou les patients présentant des problèmes hépatiques, ainsi qu'une administration de warfarine (anti-coagulant), dont la demi-vie se trouve prolongée en cas d'utilisation d'acétaminophène. L'ajout d'opiacées, tels que la codéine, en association permet d'obtenir de meilleurs effets antalgiques.

#### **1.1.10.2.2 Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)**

L'utilisation d'AINS est très fréquente. En effet, leur efficacité équivaut celle du paracétamol, avec de plus larges effets anti-inflammatoires. Une anamnèse du patient est cependant nécessaire afin d'établir un schéma de posologie adapté tant au niveau des effets indésirables (prescription d'anti-acides ou de misoprostol) qu'au niveau des coûts (les coxibes étant nettement plus chers que les AINS non sélectifs). Les coxibes sont des antagonistes sélectifs de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2), ce qui minimise principalement les effets secondaires sur l'estomac. Cependant, ces composés sont actuellement sujets à de nombreuses controverses. Le risque élevé de crises cardiaques après administration

prolongée de rofecoxib (commercialisé sous le nom Vioxx® par Merck) a porté atteinte à la popularité de ces molécules, et de nombreuses études visent à déterminer l'inocuité de son homologue, le celecoxib (Celebrex® de Pfizer).

**Tableau 1.1 : Traitements actuels pour une meilleure gestion de l'arthrose.** Adapté de Haq et coll. (2002)

<b>Education du patient</b>	Conseils, exercices, perte de poids (si approprié), aide à la marche
<b>Planning individuel</b>	Accord entre le patient, le médecin et d'autres thérapeutes
<b>Paracétamol</b>	De premier choix, rares effets indésirables
<b>AINS</b>	Avec précaution en raison des nombreux effets secondaires
<b>COX-2 sélectifs</b>	Efficacité égale aux AINS, mais moins d'effets secondaires (nombreuses controverses) Retrait du marché de Vioxx® (2004)
<b>Injections intra-articulaires</b>	Meilleure efficacité en cas d'effusion du joint articulaire
<b>Sulfate de glucosamine</b>	Pas d'effets secondaires, utilisation en cas d'arthrose faible à modérée
<b>Acide hyaluronique</b>	Réservé en cas d'arthrose sévère, lorsqu'une intervention chirurgicale n'est pas possible

#### 1.1.10.2.3 Opiïdes analgésiques

Ce traitement est réservé aux patients ne répondant pas ou ne tolérant pas les AINS et le paracétamol, et qui continuent à avoir de fortes douleurs. La tolérance, la dépendance et les effets secondaires, tels que la dépression respiratoire et la constipation, sont relatifs à une administration d'opioïdes analgésiques.

#### **1.1.10.2.4 Dérivés de l'acide hyaluronique**

L'acide hyaluronique, composant majeur du fluide synovial et du cartilage, est un polysaccharide dont le poids moléculaire et la concentration diminuent fortement en cas d'arthrose. Un supplément d'acide hyaluronique par injection intra-articulaire pourrait aider à favoriser la viscoélasticité du fluide synovial. Des études montrent que des injections hebdomadaires favorisent une diminution de la douleur ainsi qu'une réduction d'injections intra articulaires de corticoïdes sur 12 mois, données nettement supérieures par rapport au placebo (Ayril, 2001). Les effets symptomatiques démarrent après 3 à 5 semaines, et peuvent persister jusqu'à 12 mois. Lorsque comparé à un stéroïde intra-articulaire, une étude en double aveugle a révélé que les injections d'acide hyaluronique et de corticoïdes intra-articulaires présentent la même efficacité pendant 5 semaines, puis on remarque une efficacité supérieure de l'acide hyaluronique. D'autres évidences démontrent que les injections d'acide hyaluronique auraient une efficacité similaire à celle des AINS entre 3-6 mois après injection. De futures études détermineront l'effet d'injections répétées, le rapport coût-bénéfice ainsi que de possibles interactions avec d'autres maladies (Ayril, 2001).

#### **1.1.10.2.5 Glucosamine et chondroïtine**

L'administration de sulfate de glucosamine et de chondroïtine, des dérivés des glycosaminoglycans, présenterait des effets thérapeutiques dans le traitement de l'arthrose en fournissant des substrats pour le processus de réparation du cartilage. Ces composés se trouvent naturellement dans le corps et pourraient être impliqués dans la réparation et le maintien du cartilage articulaire. Ces dernières années, de nombreuses revues de nutrition et de bien-être, ainsi que de nombreux débats ont popularisé l'administration du sulfate de glucosamine dans le traitement de l'arthrose. Cependant, ce composés fait l'objet de nombreuses controverses quant à son mode d'action, qui demeure non expliqué ainsi qu'à son efficacité. L'équipe de Reginster et coll. (2001) rapporte une amélioration des symptômes de 20 à 25% chez des patients atteints

d'arthrose du genou, ainsi qu'une réduction des altérations du compartiment médian du genou sur une période de trois ans, chez les patients prenant de la glucosamine. D'autres études rapportent son efficacité comme analgésique (McAlindon et coll. 2000). Cependant, les études de Hughes et Carr (2002) démontrent une absence d'effet analgésique cliniquement et statistiquement, ainsi qu'une réponse augmentée avec un placebo chez des patients avec une arthrose sévères et de fortes douleurs. Le sulfate de glucosamine présenterait des propriétés analgésiques dans les cas d'arthrose du genou faibles à modérées, mais son efficacité dans d'autres types d'arthrose n'est pas prouvée.

### **1.1.10.3 Traitements à l'étude**

Les affections rhumatismales inflammatoires sont souvent traitées au moyen d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Mais leurs effets secondaires sont nombreux, et la recherche s'attelle à trouver de nouvelles substances, mieux supportées. En Allemagne, huit produits à base d'enzymes ont été enregistrés pour un traitement à visée anti-inflammatoire (Heyll et coll. 2003). La preuve de l'efficacité de ces produits à base d'enzymes en cas d'affections rhumatismales inflammatoires manque encore. Leur mécanisme d'action et la pharmacocinétique des enzymes sont aussi sujets à controverse. Seules des traces d'enzymes sous forme inchangée parviennent dans la circulation sanguine lors d'une administration per os. Actuellement, il n'existe aucun résultat convaincant permettant de prouver l'efficacité antiphlogistique de la thérapie à base d'enzymes en cas de maladies rhumatismales.

D'autre part, des études actuelles portant sur la libération locale de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-6, ou encore l'induction d'un gène en utilisant des méthodes de transfert pourraient fournir une nouvelle classe de traitements (Trippel et coll. 2004). La recherche demeure très active dans ce domaine.

## **1.2 Rôle de l'os dans l'arthrose**

L'arthrose est caractérisée par une dégradation du cartilage, une inflammation de la synoviale ainsi qu'un métabolisme anormal de l'os sous-chondral adjacent, ce qui le rend sclérotique et sous-minéralisé. Il est possible qu'une augmentation du remodelage osseux puisse précéder et déclencher la dégradation du cartilage. En effet, des changements dans l'os sous-chondral tel que rigidité et sclérose pourraient être des éléments initiateurs de la pathologie, étant donné que l'intégrité du cartilage adjacent à l'os est fortement influencée par les propriétés mécaniques de ce dernier. De ce fait, les facteurs impliqués dans le développement des os pourraient jouer un rôle dans l'initiation du processus arthrosique. Les études d'inactivation réalisées sur le facteur de transcription à homéodomaine *pitx1* démontrent son importance dans le développement des os des membres inférieurs et dans la chondrogenèse des régions péri-articulaires (Lanctôt et coll. 1999; Szeto et coll. 1999).

### **1.2.1 Développement des os**

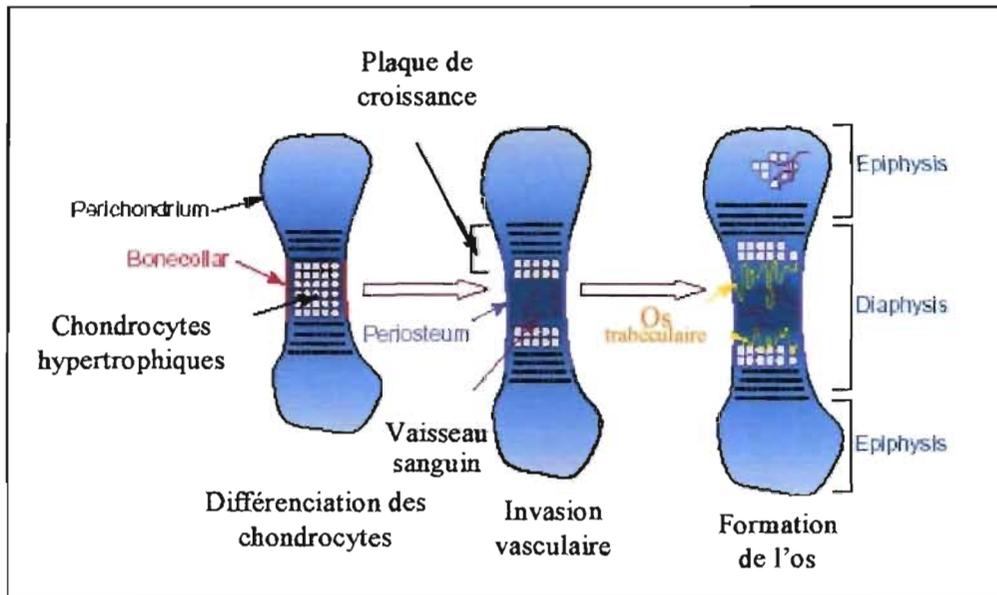
Afin d'atteindre la longueur et les proportions adultes des os des membres, la croissance longitudinale du squelette doit être finement régulée. Cette régulation, qui a lieu au niveau de la plaque de croissance, est la conséquence d'une interaction intime entre des hormones systémiques circulantes, et des facteurs de croissance produits localement. Le résultat est une favorisation des changements de l'expression des gènes par les chondrocytes de la plaque de croissance (Ballock et O'Keefe, 2003). Ces événements moléculaires mènent à une altération précisément orchestrée de la taille des chondrocytes, des composants de la matrice extracellulaire, des enzymes, des facteurs de croissance sécrétés ainsi que de l'expression de certains récepteurs. La culmination de ces événements est la calcification de la matrice, l'apoptose des chondrocytes, et l'achèvement de la formation osseuse endochondrale.

### 1.2.2 Ossification endochondrale

Le cartilage embryonnaire peut être destiné à plusieurs voies. En effet, il peut rester un cartilage permanent, tel que sur la surface articulaire des os longs et des joints articulaires, mais il peut également fournir une matrice pour la formation osseuse, par le procédé d'ossification endochondrale (**figure 1.5**) qui forme les os longs, soit le remplacement d'un modèle cartilagineux par l'os (Shum et Nuckolls, 2002), contrairement à l'ossification intra-membranaire, dans laquelle l'os se forme directement, pour les os du crâne par exemple (Klippel et coll. 2001).

L'ossification endochondrale commence lorsque les cellules du mésenchyme se différencient en chondrocytes. Ces chondrocytes vont subir plusieurs phases de prolifération rapide, puis vont s'arrêter dans leur cycle cellulaire. Ces cellules post-mitotiques vont changer leur morphologie, altérer l'expression de leurs gènes et remodeler leur matrice extra-cellulaire afin de devenir des chondrocytes hypertrophiques. Ces derniers vont engendrer la synthèse du collagène de type X au détriment du collagène de type II. La matrice cartilagineuse devient minéralisée, et les chondrocytes hypertrophiés rentrent en apoptose. Juste avant la mort cellulaire, ils déposent le facteur angiogénique, le VEGF (vascular endothelial growth factor) dans leur matrice extracellulaire, ce qui favorise l'angiogenèse dans le tissu cartilagineux. Ces vaisseaux apportent les chondroclastes, les ostéoblastes et les ostéoclastes dans le nouveau centre d'ossification, qui commence à se débarrasser de la matrice de cartilage minéralisé et à former le tissu osseux.

Lors du développement, ces structures de cartilage sont appelées plaques de croissance, et sont situées entre l'épiphyse et la métaphyse, servant d'usines pour la production rapide d'os (Shum et Nuckoll, 2002). La plaque de croissance peut être divisée en une série de zones anatomiques qui distinguent des stades morphologiques et biochimiques uniques durant le processus de différenciation des chondrocytes (Ballock et O'Keefe, 2003).



**Figure 1.5 : Processus d'ossification endochondrale.** Adapté de Ortega et coll. (2004).

### 1.2.3 La famille des gènes Pitx

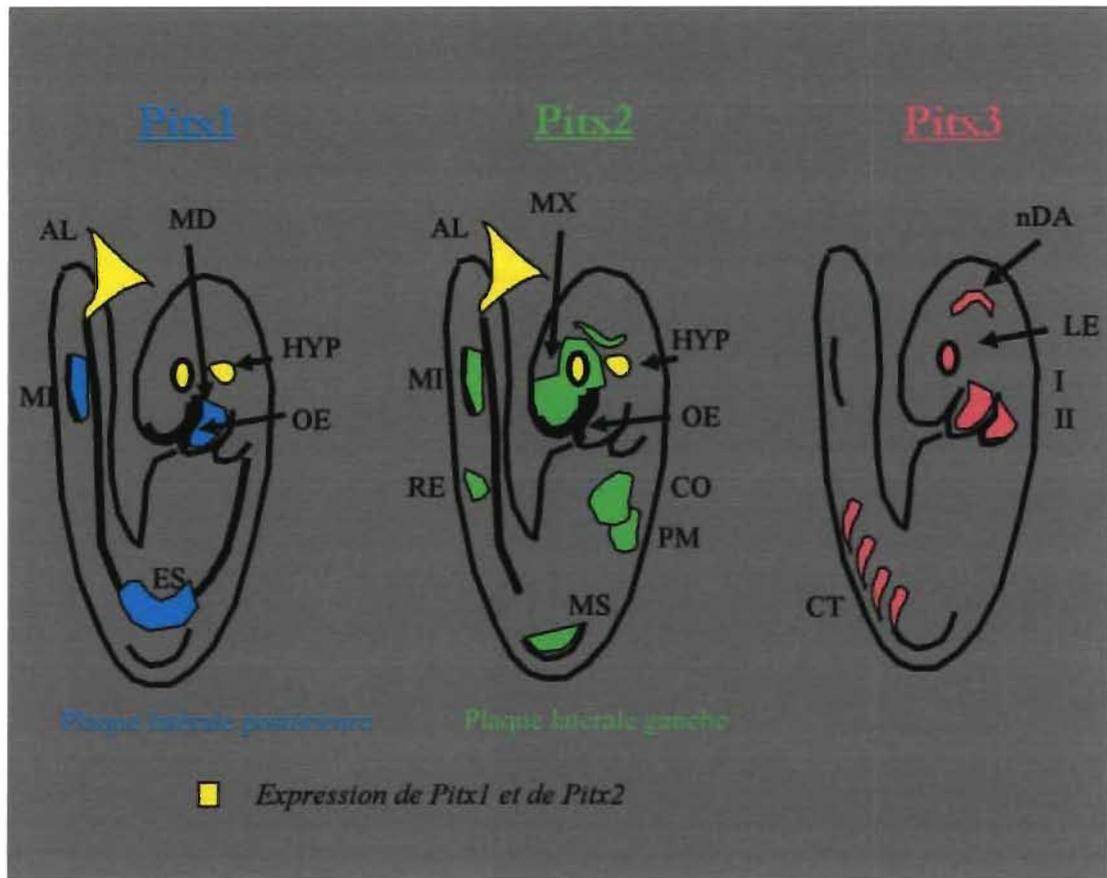
La famille des gènes à homéodomaine Pitx (pituitary homeobox) est une famille de facteurs de transcription à homéodomaine de la famille *paired*, dont les propriétés transcriptionnelles ont été définies pour un certain nombre de gènes cibles dans la glande pituitaire, mais également pour des patrons d'expression indispensables dans le développement. L'homéodomaine est un motif hélice-boucle-hélice de 60 acides aminés qui agit comme domaine de liaison à l'ADN (Gehring et coll. 1994). Les gènes contenant cet homéodomaine sont généralement impliqués dans les processus de développement tels que la définition d'un patron embryogénique, l'organogenèse et/ou la différenciation cellulaire.

Les trois gènes paralogues Pitx1, Pitx2 et Pitx3 des vertébrés, présentent des patrons d'expression de développement uniques et tissu-spécifiques, bien que certains chevauchements significatifs existent, tel que présenté sur la **figure 1.6**. Chacun de ces gènes est impliqué dans des désordres humains distincts, et la nature des tissus et des fonctions affectés dans chaque cas est consistante avec le patron d'expression des gènes respectifs durant le développement. De plus, Pitx1 et Pitx2 sont les marqueurs génétiques les plus précocement connus pour la poche de Rathke initiale, le précurseur des lobes antérieurs et intermédiaires de l'hypophyse.

Pitx2 est bien connu pour son rôle dans l'asymétrie gauche-droite des organes internes lors du développement (Boorman et Shimeld 2002 ; Gage et coll. 1997), en plus de son rôle essentiel dans la formation du patron et de l'axe. Pitx2 est exprimé à la fois dans la glande pituitaire en développement et adulte, dans les tissus des yeux et du cerveau, suggérant un rôle important dans le développement et le maintien des structures antérieures. Par ailleurs, il a été démontré que Pitx2/Rieger est le gène causant le syndrome de Rieger, une maladie autosomique dominante avec des anomalies crânio-faciales et oculaires ainsi qu'une hypoplasie dentaire, occasionnellement associée à des défaillances de certaines fonctions pituitaires (Semina et al. 1996).

Pitx3 est spécifiquement exprimé dans les neurones dopaminergiques du cerveau médian des vertébrés. De récentes études mettent en évidence son rôle essentiel dans la survie des neurones dopaminergiques localisés dans la substance noire compacte durant le développement (Lebel et coll. 2001, Smidt MP et coll. 2004). Pitx3 n'est cependant pas exprimé dans les membres en développement (Marcil et coll. 2003). Enfin, des mutations de Pitx3 sont rapportées chez les patients présentant des malformations congénitales de la lentille (Semina et coll. 1998).

Ces données soulignent l'importance des membres de la famille Pitx dans de multiples tissus durant le développement, et plus spécifiquement dans l'élaboration de certaines structures du squelette.



**Figure 1.6 : patrons d'expression des membres de la famille pitx chez les vertébrés.**

I : 1<sup>ère</sup> arche branchiale; II : 2<sup>ème</sup> arche branchiale; AL : allantoïde; CO : cœur; CT : côtes; ES : estomac; HYP : hypophyse; LE : lentille; MD : mandibule; MI : membres inférieurs; MS : Membres supérieurs; MX : maxillaire; nDA : neurones dopaminergiques; OE : œsophage; PM: poumon; RE : rein.

### **1.2.3.1 Pitx1**

#### **1.2.3.1.1 Généralités**

Pitx1 est un facteur de transcription contenant un homéodomaine analogue à celui trouvé dans les gènes antérieurs spécifiques bicoïd et orthodenticle chez la Drosophile, et Otx-1 et Otx-2 chez les mammifères (Szeto et coll. 1999). Pitx1 est le prototype de la famille Pitx. Ce facteur active la transcription en se liant à une séquence en relation avec les sites cibles de bicoïde de la drosophile. Les protéines Pitx1 appartiennent toutes à la sous-classe des protéines à homéodomaine reliées à bicoïde, car elles codent pour une lysine définie au résidu 50 dans l'homéodomaine. Ce résidu, correspondant au neuvième résidu dans l'hélice de reconnaissance de l'homéodomaine, est le déterminant majeur de la spécificité de la liaison de l'ADN (Gehring et coll. 1994). Au niveau génomique, le gène Pitx1 se trouve proche du locus pour le syndrome de Treacher Collins Franceschetti, caractérisé par des malformations crânio-faciales (Crawford et al. 1997). Lors du développement, son patron d'expression se situe au niveau de l'hypophyse, de l'épithélium maxillaire ainsi que dans le mésenchyme des membres inférieurs. Son rôle dans la formation des membres inférieurs, dans la fermeture du palais et le développement mandibulaire a été démontré. Le rôle de Pitx1 dans la spécification de l'identité des membres inférieurs est supporté à la fois par des expériences d'inactivation génique (Lanctôt et coll. 1999 ; Szeto et coll. 1999), ainsi que par une analyse de l'expression ectopique du gène (Logan et Tabin, 1999).

#### **1.2.3.1.2 Rôle de pitx1 dans le développement des membres inférieurs**

L'inactivation génique du facteur pitx1 chez la souris conduit à de sérieuses anomalies crânio-faciales, notamment au niveau de la mandibule, ainsi qu'au niveau des pattes arrières. Les souris hétérozygotes pour la mutation sont phénotypiquement normales et fertiles à la naissance, alors que les souris homozygotes pitx1<sup>-/-</sup> ne sont pas viables.

D'après les études réalisées par Lanctôt et coll. (1999), l'inactivation de ce gène chez la souris provoque une réduction de la taille des os des membres inférieurs, notamment le fémur et le tibia, alors que les membres supérieurs demeurent intacts. Il ne s'agit pas uniquement d'une réduction de la taille de ces membres par une altération de structure, mais plutôt d'une délétion de ces structures morphologiques. En effet, lors d'une délétion de *pitx1* chez la souris (Lanctôt et coll. 1999; Szeto et coll. 1999), des altérations significatives de structures squelettiques spécifiques sont remarquées dans une région des membres inférieurs. Ces changements anatomiques correspondent aux traits morphologiques et de croissance des os des membres supérieurs, suggérant qu'ils sont dépendants de l'expression de *Pitx1* dans les populations mésenchymales des membres inférieurs. Par exemple, les diamètres du tibia et du péronée des souris *pitx1* mutantes sont similaires à ceux correspondants dans les membres supérieurs, soit le radius et le cubitus respectivement (Lanctôt et coll. 1999). De plus, le cartilage secondaire des joints du genou, comprenant la rotule et le fabella, ne se forme pas, ce qui résulte en une articulation qui ressemble plus à la jonction du coude. Toutefois, malgré les similarités de structure au niveau moléculaire, les membres inférieurs des souris *pitx1*<sup>-/-</sup> n'expriment pas *Tbx5*, un marqueur spécifique des membres antérieurs. De plus, lors de l'inactivation de *pitx1*, une calcification inhabituelle de la tête du tibia est observée et pourrait être due à une différenciation accélérée de la plaque de croissance. L'absence de cartilage articulaire dans les membres inférieurs de ces souris, ainsi que la chondrogenèse anormale observée, suggèrent un rôle pour *pitx1* dans la prolifération, la différenciation et/ou la signalisation dans le mésenchyme des bourgeons des membres inférieurs dorsaux.

#### **1.2.3.1.3 Régulation transcriptionnelle de *pitx1***

Actif pendant et après le développement de la glande pituitaire, *Pitx1* agit comme un activateur de la transcription pan-pituitaire et active la transcription de la plupart des hormones de l'hypophyse comme la  $LH\beta$ , la  $FSH\beta$ , la  $TSH\beta$  et la GH (Day et coll. 1990; Sarapura et coll. 1998). *Pitx1* peut coopérer synergiquement et moduler l'activité transcriptionnelle de facteurs tels que Pit-1, Neuro-D1/PanI et SF-1. Par ailleurs, *pitx1*

est capable d'augmenter synergiquement l'activité transcriptionnelle du gène  $LH\beta$  avec SF-1 par des interactions protéine-protéine, indépendamment de sa séquence consensus (Tremblay et coll. 1999). La récente littérature portant sur son rôle et sa régulation transcriptionnelle dans l'os et le cartilage demeure encore inconnu à ce jour.

### 1.3 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)

#### 1.3.1 PPAR, généralités

PPAR, « peroxisome proliferator-activated receptor », est un membre de la super-famille des récepteurs nucléaires. Il s'agit d'un facteur de transcription activé par la liaison de ligands, qui régulent divers événements biologiques, de la différenciation et du développement cellulaire, du métabolisme lipidique et de l'homéostasie énergétique. Ce récepteur est activé par une variété de composés comprenant les fibrates, les membres de la famille des thiazolidinediones, les prostaglandines ainsi que les acides gras. La sous-famille de PPAR inclu des gènes distincts qui codent pour trois différents isoformes, soit alpha, delta/bêta et gamma. La forme gamma contient trois promoteurs qui donnent trois isoformes d'ARN, soit par usage alternatif de promoteur, soit par épissage. Gamma 1 et 3 se traduisent en une même protéine, gamma 1, qui ne diffère de gamma 2 que par 30 acides aminés additionnels à l'extrémité N-terminale. L'expression des trois isoformes de PPAR est tissu-dépendante, tel que résumé dans le **tableau 1.2**.

**Tableau 1.2. Patron d'expression des isoformes de PPAR.**

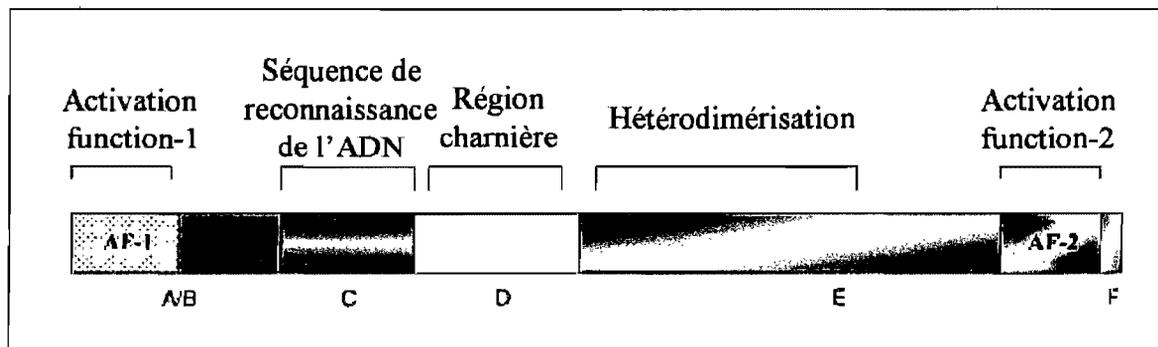
PPAR	$\alpha$	$\beta/\delta$	$\gamma$
<b>Patron d'expression</b>	Entérocytes Hépatocytes Cardiomyocytes Tubule proximal des reins	Ubiquitaire Placenta Gros intestin	Tissu adipeux brun et blanc ( $\gamma 2$ surtout) Colon Système immunitaire Cellules stromales de la moelle osseuse Cartilage articulaire Os
<b>Références</b>	Mukherjee et coll. 1997; Auboeuf et coll. 1997; Vidal-Puig et coll. 1997; Bordji et coll. 2000; Johnson et coll. 1999		

### 1.3.2 Structure générale de PPAR

Chaque sous-type de PPAR possède un fort degré de conservation de séquence à travers les diverses espèces. Dans une espèce donnée, les domaines de liaison de l'ADN des trois sous-types sont à 80% identiques, alors que les domaines de liaison au ligand présentent un faible degré d'identité, soit environ 65% (Desvergnès et Wahli 1999).

Les protéines PPAR sont toutes composées de cinq différents domaines (cf **figure 1.7**). Le domaine NH<sub>2</sub>-terminal, qui contient le domaine AF-1 (activation fonction 1) est capable d'opérer en l'absence de ligand, et est le site pour la régulation fonctionnelle par phosphorylation (Blanquart et coll. 2003). Le domaine C ou DBD (DNA binding domain), le domaine de liaison à l'ADN, est dépendant de la liaison au ligand pour opérer. Il est composé de deux doigts de zinc et contient 9 cystéines conservées tout au long de la super-famille des récepteurs nucléaires. Ce domaine confère la spécificité de liaison à l'ADN aux PPARs. Ces récepteurs nucléaires contrôlent l'expression des gènes

par la liaison à des séquences d'ADN, les éléments de réponse à PPAR, PPRE (cf 1.3.4.3). Entre une région charnière, le domaine D, et la région terminale F, le domaine E procure la liaison au ligand, LBD (ligand binding domain). Ce domaine (LBD) est le plus grand et permet une modulation des activités du récepteur en déterminant la reconnaissance du ligand. Il est formé de 12 régions hélicoïdales  $\alpha$  PPAR active la transcription sous forme d'un hétérodimère avec RXR. La région d'interaction entre PPAR et RXR est localisée dans ce domaine, dont la structure est organisée en sandwich hélicoïdal anti-parallèle, formant une cavité hydrophobe appelée poche de liaison au ligand. La taille de cette poche est grande et permet ainsi la liaison de ligands de différentes tailles.



**Figure 1.7 : Représentation schématique de la structure des PPARs.** Adapté de Blanquart et coll. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85 (2003), 267-273.

### **1.3.3 Rôles physiologiques de PPAR $\gamma$**

Les PPARs jouent un rôle dans la transcription de plusieurs gènes impliqués dans divers procédés physiologiques et pathophysiologiques. Ce large spectre d'activités est surtout dû à la spécificité cellulaire des fonctions de PPAR ainsi qu'à la nature du ligand (Lecka-Czernick et coll. 2002). En effet, le domaine de liaison au ligand présente une forte promiscuité et est capable d'interagir avec une grande variété de substances. Dans le cadre de ce mémoire, j'ai orienté cette revue sur le rôle de PPAR $\gamma$  dans la différenciation du mésenchyme, et plus spécifiquement dans le cartilage et l'os.

#### **1.3.3.1 PPAR $\gamma$ et la différenciation des cellules du mésenchyme**

Les cellules souches du mésenchyme se trouvent dans la moelle osseuse tout au long de la vie d'un adulte normal et possèdent la capacité de se différencier en différentes lignées de tissus conjonctifs, tels que l'os, le cartilage et le tissu adipeux selon la nature et la concentration du ligand stimulant (Nuttall et Gimble, 2004). Durant le développement, ces cellules pluripotentes deviennent de plus en plus restreintes à des voies de différenciation spécifiques. Les adipocytes médullaires partagent donc une cellule souche du mésenchyme commune (MSC) avec les ostéoblastes formant l'os. Cela montre la grande plasticité de ces cellules, soit le phénomène de transdifférenciation. L'adipogenèse est le procédé de différenciation des cellules précurseurs de pré-adipocytes en adipocytes. Il s'agit d'un phénomène qui a lieu avant et après la naissance en réponse au turnover cellulaire normal, pour supporter les réserves d'excès d'énergie. La différenciation des adipocytes résulte de changements coordonnés dans l'expression de plusieurs protéines impliquées dans la conservation et le métabolisme lipidique. Ces changements dans l'expression de ces protéines spécialisées sont principalement le résultat d'altérations dans le taux de transcription de différents gènes. PPAR $\gamma$  est un des facteurs de transcription responsable de l'orchestration du processus de différenciation des adipocytes et des ostéoblastes (Fajas et coll. 1997). En effet, il a été montré que différents agents qui favorisent la différenciation de lignées de fibroblastes en adipocytes se trouvent être des agonistes de

PPAR $\gamma$ , soit la 15-deoxy-delta-prostaglandin J2, les thiazolidinediones ainsi qu'une variété d'AINS. L'expression de PPAR $\gamma$  est un évènement précoce et charnière dans la différenciation des adipocytes (Jiang et coll. 1998). De manière générale, les thiazolidinediones, agonistes de PPAR $\gamma$ , activent ce récepteur, ce qui favorise la voie de différenciation des adipocytes, et inhibe l'expression et l'action de la protéine régulant la transcription des ostéoblastes, Runx2/Cbfa-1 (Lecka-Czernick et coll. 1999).

La capacité de PPAR $\gamma$ 2, l'isoforme majoritairement exprimé dans les tissus adipeux, de stimuler la différenciation des adipocytes est en relation avec le métabolisme du squelette, étant donné que l'augmentation en tissus gras chez l'animal et l'humain est concomitante à une réduction de la production des ostéoblastes. En effet, l'activation de PPAR $\gamma$ 2 par la rosiglitazone (Rzonca et coll. 2004) dans des cellules du mésenchyme dérivées de la moelle osseuse chez la souris stimule leur différenciation en adipocytes et bloque leur capacité à se différencier en ostéoblastes. Les agonistes de PPAR $\gamma$ 2 seraient donc de puissants répresseurs du phénotype ostéoblaste et seraient impliqués d'une manière critique dans la différenciation des progéniteurs mésenchymateux de la moelle osseuse envers les adipocytes (Lecka-Czernik et coll. 2002).

Il est par ailleurs intéressant de signaler que le maintien de l'homéostasie des tissus comme l'os et le cartilage, cibles caractéristiques de l'arthrose, peut être influencé par des changements dans le profil de différenciation des cellules progénitrices médullaires (Murphy et coll. 2002).

### 1.3.3.2 PPAR $\gamma$ et l'inflammation

Une littérature abondante relate l'implication de PPAR $\gamma$  dans la régulation de multiples procédés inflammatoires, en démontrant les propriétés anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo* du récepteur activé par ses agonistes (Youssef et Badr, 2004). Les cytokines pro-inflammatoires, notamment IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ , jouent un rôle clé dans le processus catabolique de l'arthrose (Goldring 2000), puisque l'inflammation de la membrane synoviale est d'une importance considérable dans la progression des lésions cartilagineuses. PPAR $\gamma$  est exprimé dans de nombreux tissus qui produisent de grandes quantités d'acide arachidonique. Cet acide gras est un puissant activateur des PPARs, et,

par l'intermédiaire de ses métabolites (prostaglandines, leucotriènes et thromboxane) joue d'importants rôles dans les voies de signalisation de plusieurs cellules (Braissant et coll. 1996). Les PPARs sont exprimés dans le système immunitaire et leur expression est induite durant la différenciation des monocytes en macrophage, ils ont pour effet d'accélérer cette conversion (Debril et coll. 2001). De plus, le traitement de monocytes avec de hautes doses de ligands naturels comme la 15-PGJ2 inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires telles que  $TNF\alpha$  et  $IL-1\beta$  (Jiang et coll. 1998). En plus de cytokines pro-inflammatoires, les monocytes/macrophages produisent de nombreux médiateurs tels que les métalloprotéinases, des radicaux libres d'oxygène et de l'acide arachidonique, tous présentant des effets délétères sur les joints articulaires (Burmester et coll. 1997). Les agonistes de  $PPAR\gamma$  sont capables d'inhiber la production et les effets des cytokines pro-inflammatoires (Boyault et coll. 2001, Jiang et coll. 1998, Ricote et coll. 1998) par les monocytes en empêchant la production de ces cytokines par l'inhibition de AP-1 (activator protein) et de NF- $\kappa$ B, facteur de transcription clé dans la médiation des réponses inflammatoires. Comme ce dernier active la transcription des cytokines,  $PPAR\gamma$  possède alors une action inhibitrice sur ces médiateurs de l'inflammation par l'intermédiaire de NF- $\kappa$ B. (Ji et coll. 2001).

### 1.3.3.3 $PPAR\gamma$ et le cartilage articulaire

Les cytokines pro-inflammatoires exercent des effets délétères sur le cartilage articulaire et jouent un rôle central dans la dégradation du cartilage dans l'arthrite rhumatoïde et l'arthrose. Par exemple, l'interleukine- $1\beta$  ( $IL-1\beta$ ) provoque une dégradation des cellules du cartilage, par la surexpression de plusieurs gènes, dont les métalloprotéinases. Cette cytokine peut également favoriser une réduction de la synthèse du protéoglycan ainsi que la production d'acide nitrique.

Bordji et coll. (2000) ont mis en évidence la présence d'ARNm et de protéines de  $PPAR\gamma$  dans le cartilage de rat; Fahmi et coll (2001) l'ont mis en évidence chez l'humain. De plus, les résultats montrent que les agonistes du récepteur sont capables d'améliorer la réduction de la synthèse de protéoglycan et la production d'oxyde nitrique induits par l' $IL-1\beta$ . Cela suggère que les agonistes de  $PPAR\gamma$  pourraient avoir

des effets chondroprotecteurs chez les patients souffrant d'arthrite rhumatoïde et d'arthrose. Autrement dit, ces composés sont capables de moduler les effets délétères de l'IL-1 $\beta$  sur le cartilage. De plus, des injections (François et coll. 2004) intra-articulaires de 15d-PGJ2 chez l'animal et dans des chondrocytes humains traités à l'IL-1 $\beta$  contrent les effets de la dégradation du protéoglycan générés par cette cytokine (Boyault et coll., 2001 ; Fahmi et coll., 2001 ; Sabatini et coll., 2002). D'autres études mettent en évidence l'effet chondroprotecteur d'injections d'antagonistes du récepteur interleukine-1 qui supprime, entre autres, l'expression de la collagénase -1 (Caron et coll. 1996). Fahmi et coll. (2001) démontrent que les agonistes de PPARgamma inhibent l'induction de NO et des MMP-13, via l'IL-1 $\beta$ , dans les chondrocytes articulaires humains. Par ailleurs, les ligands naturels des PPARs présentent des propriétés de protection anti-cytokines dans ces cellules (François et al. 2004). Ces études ont mis en évidence un PPAR $\gamma$  fonctionnel dans des chondrocytes *in vitro*. Ces résultats supportent l'intérêt porté sur les agonistes de PPARgamma comme candidats potentiels pour l'inhibition de la dégradation pathologique du cartilage articulaire.

#### 1.3.3.4 PPAR $\gamma$ et l'os

Les PPARs sont fortement impliqués dans le métabolisme osseux, d'une part par leur action dans le processus de différenciation des cellules souches du mésenchyme, d'autre part par la régulation de l'ossification endochondrale opérée via différents facteurs.

Les ostéoblastes dérivent d'un pool de cellules souches dans la moelle osseuse qui, selon le stimulus, peut se différencier en une variété de lignées cellulaires dont les ostéoblastes, les chondrocytes et les adipocytes, tel que mentionné précédemment. Les ligands pharmacologiques de PPAR $\gamma$  tels que la ciglitazone ou la 15d-PGJ2 sont capables de favoriser la conversion d'une lignée de cellules pré-ostéoblastes en des cellules adipeuses (Khan et Abu-Amer, 2003). Les agonistes de PPAR $\gamma$  possèdent donc des propriétés d'inhibition de l'ostéoblastogenèse au profit de la différenciation des adipocytes (Johnson et coll. 1999). Il faut cependant souligner quelques différences entre les membres de la famille des thiazolidinediones. En effet, la rosiglitazone est capable de favoriser l'adipogenèse et de diminuer parallèlement l'ostéoblastogenèse,

alors que la troglitazone favorise la voie des adipocytes mais ne semble pas influencer l'ostéoblastogenèse (Lecka-Czernik et coll. 2002). Ceci indique que les effets pro-adipogéniques et anti-ostéoblastogéniques de PPAR $\gamma$ 2 sont médiés par deux chemins de régulation distincts, qui peuvent être modulés différemment en fonction de la nature du ligand. De plus, il est intéressant de signaler que les effets de la 15d-PGJ2 sur les chondrocytes peuvent être exercés également par une voie indépendante de PPAR $\gamma$  (Boyault et coll. 2001).

Par ailleurs, il a été démontré qu'une inhibition de PPAR $\gamma$  est capable de favoriser l'ostéogénèse par une formation accrue des ostéoblastes. Une concentration physiologique d'agonistes de PPAR $\gamma$  favorise la maturation des préostéoblastes en augmentant l'activité de la phosphatase alcaline, l'expression des gènes de la différenciation des ostéoblastes ainsi que la calcification de la matrice. Cependant, à une concentration plus élevée de ces ligands, soit à des doses pharmacologiques (10 $\mu$ M pour la ciglitazone), la maturation est inhibée (Jackson et Demer, 2000).

#### 1.3.3.5 PPAR $\gamma$ et l'obésité.

L'obésité se caractérise par un excès de tissu adipeux blanc. Ce tissu est composé d'adipocytes qui jouent un rôle central dans l'homéostasie lipidique ainsi que dans le maintien de la balance énergétique chez les vertébrés (Fajas et coll. 1997). Ces cellules conservent de l'énergie sous la forme de triglycérides durant les périodes d'affluence nutritionnelle et la libèrent sous la forme d'acides gras libres lors de périodes de restriction alimentaire. Un excès de tissu adipeux blanc conduit à l'obésité. Contrairement au développement du tissu adipeux brun qui a lieu avant la naissance, le développement du tissu adipeux blanc est le résultat d'un processus de différenciation continue tout au long de la vie.

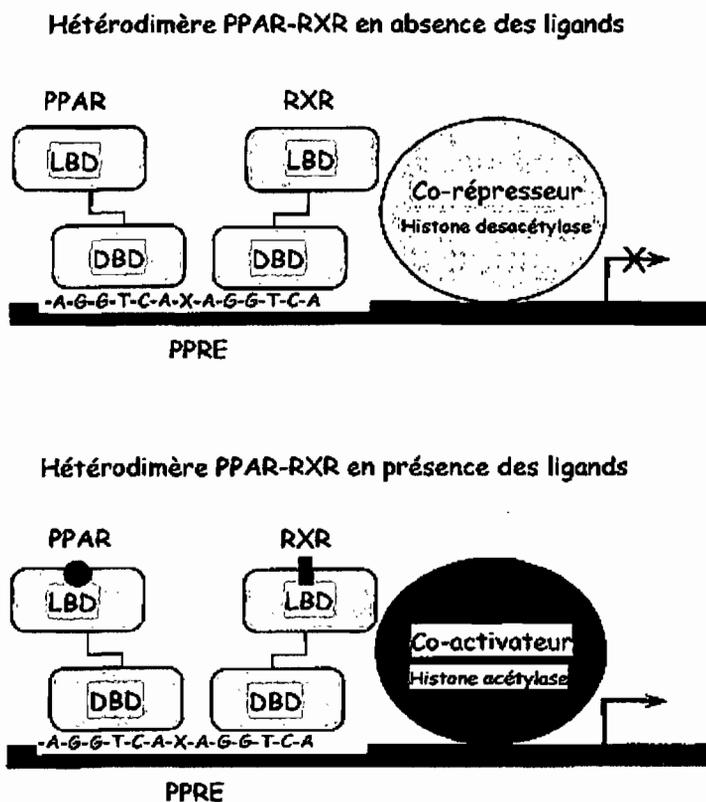
PPAR $\gamma$  est relié structurellement aux récepteurs nucléaires pour les hormones et d'autres petits ligands lipophiles. Les ligands initiaux sont ceux issus du métabolisme des acides gras, soit une corrélation directe avec le métabolisme lipidique, via l'apport alimentaire de lipides. L'isoforme PPAR $\gamma$ 2 est spécifique au tissu adipeux blanc, et il a été récemment démontré que PPAR $\gamma$ 2 régule le gène aP2, qui code pour une

protéine liant les acides gras spécifiques aux adipocytes (Braissant et coll. 1996). De plus, les travaux de Xing et coll. (1997), ainsi que de Kudo et coll. (2004) rapportent que TNF $\alpha$  agit comme antagoniste de PPAR $\gamma$ , notamment dans les cellules adipocytaires. PPAR $\gamma$  est un régulateur dominant de l'adipogenèse et est requis pour l'expression de nombreux gènes adipocytaires, incluant la protéine de liaison des acides gras adipocyte-spécifique, la carboxykinase phosphoenolpyruvate et la lipoprotéine lipase (Pei et Tontonoz, 2004). Par ailleurs, les résultats de Akune et coll. (2004) montrent que les souris PPAR $\gamma$ <sup>-/-</sup> ne possèdent pas de tissu adipeux.

### 1.3.4 Régulation de l'activité de PPAR $\gamma$

#### 1.3.4.1 Régulation transcriptionnelle

La régulation de PPAR peut se produire au niveau de l'expression du gène et de l'accessibilité du ligand. La liaison du ligand de PPAR au récepteur nucléaire va provoquer un changement de conformation menant au repositionnement de l'hélice H12, qui contient le noyau de l'AF-2, le maintenant éloigné des autres hélices H3 et H4 afin de créer une surface interagissant avec des co-activateurs. Parallèlement, les co-répresseurs sont capables de tourner la structure hélicoïdale en un motif ne permettant pas le repositionnement de l'hélice AF-2 dans sa conformation active. Gampe et al. (2000) rapportent que l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  est asymétrique, avec des domaines de liaison au ligand (LBDs) déviés approximativement de 10 degrés de la symétrie C2, permettant à l'hélice AF-2 de PPAR $\gamma$  d'interagir avec 7 à 10 hélices de RXR $\alpha$ . L'interface de l'hétérodimère est composée de motifs conservés de PPAR $\gamma$  et RXR $\alpha$ , qui forment une bobine enroulée autour de l'hélice 10 avec des interactions de charge additionnelles des hélices 7 et 9. Ces structures fournissent une compréhension moléculaire de la capacité de RXR à hétérodimériser avec la plupart des récepteurs nucléaires, et de l'activation permissive de l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR $\beta$  par le 9cRA (9-cis rétinoinc acid), tel que représenté sur la **figure 1.8**. Par ailleurs, l'activation de la transcription peut également être induite par la liaison de ligands de RXR (Desvergne et Wahli, 1999).



**Figure 1.8 : Mécanisme d'activation de la transcription par les PPARs et les Rétinoïdes. Adapté de Girard (2001).**

### 1.3.4.2 Modifications post-traductionnelles

L'activité transcriptionnelle des PPARs peut être régulée par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et l'ubiquitination. Les PPARs sont régulés par des kinases activées par de nombreux signaux extracellulaires. Ainsi, l'activité de PPAR est sujette à des modifications par une grande variété de changements physiologiques. PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  sont des phosphoprotéines. Elles peuvent être phosphorylées par la voie des MAPK. Une phosphorylation de PPAR $\gamma$  chez la souris par des activateurs des MAPK induit une inhibition de son activité transcriptionnelle. Différentes études montrent l'importance de la phosphorylation de certains résidus sérine pour l'activation et la répression de l'activité transcriptionnelle. Il est d'ailleurs intéressant de noter qu'une phosphorylation par la voie des MAPK influence différemment l'activité de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$ ; en effet la phosphorylation par la voie des MAPK active PPAR $\alpha$  alors qu'elle inhibe PPAR $\gamma$  (Blanquart et coll. 2003). D'autre part, l'ubiquitination est un système de dégradation qui affecte l'activité d'une quantité de protéines impliquées dans les fonctions cellulaires essentielles. Il s'agit d'un processus en trois temps, soit l'activation de l'ubiquitine par une enzyme (E1), le transfert de l'ubiquitine activée à une protéine de transport (E2), suivi par la liaison covalente de l'ubiquitine à la protéine cible, réaction catalysée par une ligase (E3). L'ubiquitine va alors modifier les résidus lysine de la protéine, soit PPAR $\gamma$ , qui sera finalement dégradée par le protéasome 26S. Diverses études ont porté sur l'influence de cette voie sur les PPARs (Blanquart et coll. 2003). Le repositionnement de l'hélice AF-2 de PPAR $\gamma$  semble être essentiel pour son ubiquitination, et donc pour sa dégradation. Fait intéressant, l'interaction avec des protéines co-répresseurs protège PPAR $\gamma$  de la dégradation, alors que l'interaction avec des co-activateurs provoque une augmentation de sa dégradation. Pour conclure, la dégradation de PPAR par la voie ubiquitine-protéasome semble être un important mécanisme dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de PPAR en contrôlant les niveaux de protéines PPAR cellulaires.

### 1.3.4.3 Activation de la transcription par un élément de réponse spécifique à PPAR $\gamma$ (PPRE)

Les récepteurs nucléaires régulent la transcription en se liant à des séquences d'ADN spécifiques dans les gènes cibles, séquences appelées éléments de réponse hormono-dépendants (HRE). Ces éléments sont localisés dans des séquences régulatrices normalement présentes dans la région 5' du gène cible. Bien que ces éléments de réponse se trouvent souvent proches du promoteur, ils peuvent être présents dans certains cas dans des régions enhancers en amont de plusieurs kilobases du site d'initiation de la transcription (Aranda et Pascual, 2001). Originellement, les premiers éléments de réponse à PPAR (PPAR response element, PPRE) étaient définis comme une répétition directe de deux motifs de reconnaissance AGGTCA, considéré comme le demi site de liaison parfait des hormones nucléaires. Ces deux motifs sont généralement séparés par un nucléotide, ainsi sont ils appelés DR1, ou par deux nucléotides, soit IR2. Le premier PPRE naturel trouvé dans le promoteur du gène de l'acyl-CoA oxidase (Varanasi et coll. 1996.) et d'autres PPRE naturels identifiés répondent à ces critères, ce qui permet de les discriminer d'autres éléments de réponse à répétition comme DR2 et DR3 par exemple (Zhang et coll. 1992, Juge-Aubry et coll. 1997, Woodyatt et coll. 1999, Gosh et Natarajan, 2001, Galetto et coll. 2001, Hansmannel et coll. 2003). Cependant, l'analyse détaillée des PPREs de certains gènes comme celui du cytochrome CYP4A6 et de l'enzyme malique (enzyme qui catalyse la décarboxylation oxydative du malate en pyruvate, dont le résultat est la production de NADPH pour la synthèse des acides gras) a permis la détermination de critères additionnels pour catégoriser les PPREs (Ijpenberg et coll. 1997). Ces résultats ajoutent trois propriétés importantes à la définition initiale de DR1, soit un demi site en 5' étendu, un noyau DR1 imparfait ainsi qu'une adénine en tant que nucléotide d'espacement entre les deux hexamères. Cette structure de PPRE reflète la polarité avec laquelle l'hétérodimère PPAR/RXR se lie à l'élément : PPAR reconnaît le demi site étendu en 5' et RXR le demi site en 3'. En effet, un élément parfait DR1 présente une forte promiscuité puisqu'il permet la liaison d'homodimères RXR, et d'hétérodimères PPAR/RXR, ainsi que des récepteurs orphelins de la super-famille. Cela montre que l'espacement n'est pas suffisant pour

conférer une spécificité totale à un élément de répétition directe. Ce paramètre discriminant contribue à la sélectivité de la liaison de PPAR/RXR par rapport aux homo- et hétérodimères d'autres membres de la superfamille. De plus, l'équipe de Juge-Aubry (1997) souligne l'importance de la région en amont de PPRE de 7 nucléotides. En effet, Palmer et coll. (1995) ont démontré que les séquences en amont de DR1, avec le consensus C(A/G)(A/G)A(A/T)CT proposé, séquence riche en A/T, peuvent contribuer à une liaison sélective de PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  sur la liaison d'autres complexes tels que RXR/RXR ou l'apolipoprotéine régulatrice protéine-1. L'analyse mutationnelle démontre que la délétion de séquences immédiatement en amont du motif abolit cette réponse. Enfin, l'équipe de Temple et coll. (2004) a récemment mis en évidence le rôle de variations de séquences sur RXR. Cette étude démontre l'importance de la conservation de la séquence consensus en 3' qui permet la liaison de RXR, alors que des mutations dans la séquence en 5' correspondant au site de liaison de PPAR $\gamma$  affectent peu l'activation de la transcription par l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR *in vitro*. La **figure 1.9** présente quelques exemples tirés de la littérature qui démontrent la grande hétérogénéité des éléments de réponse PPRE et les paramètres permettant de les caractériser.

<p><b><u>Localisation:</u></b></p> <p><b>En amont du site d'initiation de la transcription:</b>          Varie entre -5320 pour ARE6, et -108 pour HMG</p> <p><b>Dans un intron:</b> ACBP, intron 1 (Helledie et coll. 2002)          rTB, intron 3 (Hansmannel et coll. 2003)</p>	
<p><b><u>Importance de la région 5' en amont de PPRE</u></b></p> <p>PPAR<math>\gamma</math> interagit avec séquence A/T riche du 1er motif          RXR<math>\alpha</math> interagit avec le 2ème motif, plus conservé          (Ijpenberg et coll. 1997)</p> <p>Spécificité de la liaison du sous-type de PPAR par région en amont          consensus: AACT (Juge-Aubry et coll. 1997)</p>	
<p align="center"><b><u>Séquence consensus:</u></b></p> <p align="center"><b>(AACT) AGGNCA A AGGTCA</b></p>	
<p><b><u>Motif de répétition inversé:</u></b></p> <p>ACOX: AGGNCA (Varanasi et coll. 1996)          HGF: RGGTCA (Jiang et coll. 2001)</p>	<p><b><u>Sites spécifiques pour la liaison de l'hétérodimère PPAR<math>\gamma</math>/RXR<math>\alpha</math></u></b></p> <p>ACBP: 1er motif: TGACCT liaison de PPAR<math>\gamma</math>          2ème motif: CAGCAC liaison de RXR<math>\alpha</math>          (Helledie et coll. 2002)</p>
<p><b><u>Nombre de nucléotides entre deux séquences:</u></b></p> <p><b>DR1:</b> LPL GGGGGA-N-AGGGCA (Schoonjans et coll. 1996)  <b>IR2:</b> HGF GGGCCA-NN-TGACCT (Jiang et coll. 2001)</p>	
<p><b><u>Fonctionnalité:</u></b> ACO selon patients</p> <p>AGGTCA C TGGTCA <i>ACTIF</i> (Varanasi et coll. 1996)          AGGTCA <u>G</u> CTGTCA <i>INACTIF</i> (Woodyatt et coll. 1999)</p>	

**Figure 1.9 : Paramètres importants pour la détermination de la fonctionnalité et de la spécificité des éléments de réponse à PPAR (PPRE).**

#### 1.4 Plan de l'étude

Le facteur de transcription *pitx1* est important pour le développement des os longs des membres inférieurs. Bien que les souris knock-out *pitx1*<sup>-/-</sup> ne soient pas viables, les souris hétérozygotes *pitx1*<sup>+/-</sup> présentent un phénotype ressemblant à l'arthrose chez les humains. Les problèmes de marche précoces qu'elles développent nous ont amenés à analyser, dans un premier temps, les effets de l'inactivation partielle d'un allèle de *pitx1* sur leurs membres inférieurs par des analyses radiographiques et histologiques. Nous avons par la suite mis en évidence, par une analyse histologique, une forte augmentation de la calcification et de l'érosion du cartilage articulaire chez ces souris, traits histomorphologiques caractéristiques de l'arthrose. Conséquemment, nous avons voulu déterminer, au niveau des profils d'expression moléculaire, si une perte d'expression de *pitx1* se retrouvait également chez les patients malades, par des analyses d'expression génique de chondrocytes articulaires dérivés de cartilage de patients arthrosiques obtenus au moment de chirurgies correctives visant l'implantation d'une prothèse. Les résultats obtenus montrent un défaut de l'expression de *pitx1* chez les humains atteints d'arthrose. Étant donné le lien existant entre l'arthrose et l'obésité, nous avons orienté notre recherche sur le facteur PPAR $\gamma$ , afin de déterminer si ce facteur de transcription pouvait réguler directement le niveau d'expression de *pitx1*, ce à l'aide d'extraction d'ARN de cartilage articulaire de souris *pitx1* saines et hétérozygotes, ainsi que de chondrocytes articulaires humains obèses et/ou arthrosiques. En effet, nous supposons qu'un défaut de la régulation de *pitx1* par PPAR $\gamma$  pourrait être à l'origine du développement concomitant de ces deux maladies. Par des analyses de bio-informatique et de séquençage sur de l'ADN génomique provenant de patients arthrosiques obèses et non obèses, nous avons pu caractériser cinq éléments de réponse potentiels pour PPAR $\gamma$  au niveau du promoteur et du second intron de *pitx1*, et démontré l'existence de mutations dans deux éléments de réponse uniquement chez les patients arthrosiques et obèses.

## CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 2.1 Matériels

#### 2.1.1 Souris hétérozygotes *pitx1*<sup>+/-</sup>

Les souris hétérozygotes *pitx1*<sup>+/-</sup> ont été obtenues grâce à la méthode décrite par Lanctôt et coll. (1999). Brièvement, le gène murin *pitx1* a été cloné à partir d'une librairie génomique Sv129, puis inséré dans un vecteur cible. La recombinaison homologue entre le gène *pitx1* et le vecteur induit la délétion de l'exon 2, codant pour le domaine de liaison à l'ADN, qui est remplacé par une cassette PGKneo (gène de sélection). Les souris ainsi obtenues ont été génotypées par Southern Blott.

#### 2.1.2 Critères d'inclusion des patients arthrosiques et des sujets sains

Les tissus humains dans lesquels l'expression des différents gènes a été évaluée proviennent de sujets sains (N) après autopsie post-mortem (maximum 24h après le décès) ainsi que de patients arthrosiques (OA) selon des critères médicaux, lors de chirurgies de remplacement du genou. Les chondrocytes extraits de cartilages articulaires ont été obtenus à partir d'un panel d'échantillons de patients tels que résumé dans le **tableau 2.1**. Un morceau de chaque tissu est inclus en paraffine puis coupé et coloré avec le Safranine O et le fast green, puis évalués en utilisant l'échelle de Mankin (Mankin et coll. 1971). Le **tableau 2.2** présente les caractéristiques cliniques des patients arthrosiques dont l'ADN génomique a été analysé lors de la recherche de l'élément de réponse PPRE, échantillons gracieusement obtenus par le Dr J. Martel-Pelletier. L'ADN génomique des sujets sains (n=8) vient de prises de sang de personnes âgées qui n'ont jamais développé d'arthrose. Les évaluations cliniques ont été réalisées par les chirurgiens orthopédiques attachés au département de recherche en arthrose du CHUM Notre-Dame Montréal, sous la supervision du Dr Pelletier. Les variables cliniques ont été obtenues au moment de la chirurgie. Le protocole de recherche et l'utilisation de tissus pour la recherche ont été approuvés par le comité d'éthique en recherche de l'hôpital Notre-Dame à Montréal et celui de l'hôpital Sainte-Justine.

**Tableau 2.1. Données cliniques des patients dont l'ARN isolé de chondrocytes articulaires a été utilisé lors de l'analyse d'expression génique. M : homme ; F : femme. OA : arthrosique. IMC : indice de masse corporelle.**

Analyse	Type	#	Sexe	IMC
Expression génique	Sain	N1	F	-
	Sain	N2	M	-
	Sain	N3	M	-
	Sain	N4	M	-
	OA	OA1	F	-
	OA	OA2	F	Obèse
	OA	OA3	M	Obèse
	OA	OA4	F	-
	OA	OA5	F	-
	OA	OA6	F	-
	OA	OA7	F	Obèse

**Tableau 2.2 : Données cliniques de patients dont l'ADN génomique a été utilisé pour l'analyse du séquençage. M : homme. F : femme. IMC : indice de masse corporelle. OA : arthrose.**

Type	#	Sexe	Age au prélèvement	IMC	Date début obésité
OA	1	F	66	Obèse	1995
OA	2	M	65	Obèse	?
OA	3	M	61	Obèse	?
OA	4	M	66	Non obèse	-
OA	5	F	60	Obèse	-
OA	6	F	61	Obèse	1964
OA	7	M	63	Obèse	-
OA	8	M	65	Obèse	1996
OA	9	M	89	Obèse	-
OA	10	M	46	Obèse	1988
OA	11	F	62	Obèse	-
OA	12	F	65	Non obèse	-

## 2.2 Méthodes

### 2.2.1 Culture cellulaire

#### 2.2.1.1 Culture primaire de chondrocytes provenant de cartilage articulaire humain

Les échantillons de cartilage articulaire ont été obtenus lors de chirurgie de remplacement du genou effectuées sur des patients arthrosique, ou lors d'autopsie chez des patients non-arthrosiques post-mortem (après 24h maximum). Le cartilage a été digéré dans la pronase 1mg/ml (Sigma-Aldrich) pendant 1 heure, dans du milieu de culture Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM ; Invitrogen Burlington, ON, Canada), et en présence d'un mélange de pénicilline 100U/ml et de streptomycine 100ug/ml (PEN/STREP 1% ; Invitrogen, Canada). Le tissu a ensuite été digéré pendant six heures dans une solution de collagénase à 2mg/ml (type IA ; Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) à 37°C et les cellules ont été récupérées par filtration et centrifugation. Par la suite, les cellules ont étéensemencées à haute densité ( $2 \times 10^6$  cellules /  $25\text{cm}^2$ ) et cultivées jusqu'à confluence dans du milieu de culture DMEM supplémenté de sérum bovin foetal (FBS 10%) et du mélange PEN/STREP 1% à 37°C sous atmosphère humide, avec 5% de  $\text{CO}_2$ .

#### 2.2.1.2 Culture d'ostéoblastes

Pour cette étude, nous avons également utilisé des ostéoblastes provenant de la lignée cellulaire d'ostéosarcome humain (MG63, passages 10 à 20) (ATCC : American Type Culture Collection), ainsi que des ostéoblastes de souris (lignée MC3T3-E1). Les cellules ont été cultivées jusqu'à confluence dans le milieu Minimum essential medium (MEM) pour les ostéoblastes MG63, et dans le milieu Minimum essential medium alpha medium ( $\alpha$ MEM) pour les ostéoblastes MC3T3-E1 (MEM;  $\alpha$ MEM : GIBCO, Invitrogen Burlington, ON, Canada), supplémenté de 10% de sérum foetal bovin (Invitrogen Burlington, ON, Canada), sous atmosphère humide à 37°C, à 5% de  $\text{CO}_2$ .

### 2.2.2 Immunohistochimie

Par immunohistochimie, nous avons analysé deux types de tissus, soit du cartilage humain, provenant de sujets sains et de patients arthrosiques d'âge et de sexe appariés, ainsi que le fémur d'une souris, prélevé à 13,5 jours embryonnaires. Les échantillons ont été préalablement décalcifiés. Des coupes de  $5\mu$  ont été réalisées à partir de tissu inclus en paraffine, puis directement traitées pour l'immunohistochimie tel que décrit par Lanctôt et coll. 1999. Ces sections ont alors été déparaffinées, réhydratées et soumises à des traitements successifs : trois traitements de 5 minutes au micro-onde dans du citrate de sodium 0,1M de pH6,0 à 240 watts, suivi par 20 minutes à température pièce, et un traitement final au micro-onde de 5 minutes dans le même tampon à 240 watts. Les coupes ont alors été traitées avec de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  à 3%, et les amines réactives ont été inhibées par une incubation dans la glycine à 300mM. Toute la réaction d'immunohistochimie a été réalisée dans du PBS 0,1% Tween-20 (PBT). Le bruit de fond non spécifique a été bloqué par du sérum normal de chèvre dans du PBT pendant 1 heure à température ambiante. Les coupes ont été rincées dans du PBT, et incubées avec un anticorps polyclonal mPitx1 (Lanctôt et coll. 1999), reconnaissant les acides aminés 24 à 56 de la protéine Pitx1, à une concentration de  $20\mu\text{g/ml}$  pendant 16 heures à 4 degrés.

Les complexes immuns ont été révélés avec un anticorps secondaire anti-lapin ( $1\mu\text{g/ml}$ ) lié à la biotine pendant 45 minutes à température ambiante, puis avec le substrat avidin-biotin complexe (Vectastain ABC kit) pendant 45 minutes. La couleur est développée avec le substrat DAB (3,3'-diaminobenzidine ; DAKO ; Mississauga, Ontario, Canada) contenant du peroxyde d'hydrogène, puis les lames sont montées au Permount (Fischer Scientific, New Jersey, USA). Le contrôle négatif a été effectué en substituant l'anticorps primaire par des IgG de lapin à  $20\mu\text{g/ml}$  (Nordic Immunology, Tilburg, The Netherland), suivi de la même procédure de détection.

### 2.2.3 Histologie

Les coupes de fémur non-décalcifiées d'embryons de souris normales et hétérozygotes *pitx1*<sup>+/-</sup> à sept mois ont été fixées pendant 24 heures dans du paraformaldéhyde frais (4%) immédiatement après leur extraction dans un tampon phosphaté, et déshydratées progressivement dans de l'éthanol. Les tissus ont été traités au MMA (Méthylmétacrylate), coupés au microtome (Leica SM2500) et inclus en coupes épaisses de 5  $\mu$ . Ces sections ont été colorées avec la méthode de Goldner selon la méthode standard.

### 2.2.4 Extraction d'ARN

Les chondrocytes articulaires et les ostéoblastes MC3T3-E1 ont été cultivés jusqu'à confluence dans le milieu Dubelcco's Modified Eagle Medium pour les chondrocytes articulaires et le milieu Minimum essential medium alpha medium pour les ostéoblastes (DMEM ;  $\alpha$ MEM ; GIBCO, Invitrogen Burlington, Ontario, Canada), supplémenté de 10% de sérum foetal bovin (Invitrogen Burlington, ON, Canada) dans une atmosphère humide à 37°C, à 5% de CO<sub>2</sub>. Certaines cellules ont été traitées avec l'agoniste et les antagonistes de PPAR $\gamma$  (**tableau 2.3**), ajoutés au milieu correspondant, contenant 1% de sérum pendant 24 heures. L'agoniste spécifique de PPAR $\gamma$  que nous avons utilisé est la ciglitazone (10 $\mu$ M), de la famille des thiazolidinediones, déjà utilisé comme agent anti-arthritique grâce à ses propriétés anti-inflammatoires. Les antagonistes que nous avons choisis sont BADGE (10  $\mu$ M), un antagoniste pharmacologique de PPARgamma, ainsi que la cytokine pro-inflammatoire TNF $\alpha$  (20ng/ml) comme antagoniste physiologique. L'ARN total a été extrait des cellules préalablement traitées par la méthode au GTC, guanidium thiocyanate-phénol-chloroforme en utilisant les réactifs Trizol (Invitrogen). L'ARN est alors précipité dans de l'isopropanol toute la nuit à -20 degrés, lavé avec de l'éthanol à 70%, séché à l'air et récupéré dans de l'eau DEPC. La transcription inverse est réalisée sur 4 $\mu$ g d'ARN (cf. 2.3.5).

**Tableau 2.3 : Agonistes et antagonistes de PPAR $\gamma$** 

Composé	Action	Concentration effective	Fournisseurs	Références
Ciglitazone	Agoniste pharmacologique de PPAR $\gamma$	10 $\mu$ M	Tocris Cookson Inc, MO, USA	Missbach et coll. 1996 ; Sabatini et coll. 2002
BADGE	Antagoniste pharmacologique de PPAR $\gamma$	10 $\mu$ M	Tocris Cookson Inc, MO, USA	Wright et coll. 2000
TNF $\alpha$	Antagoniste physiologique de PPAR $\gamma$	20 ng/ml	Sigma-Aldrich, Oakville, ON	Centrella et coll. 1988 ; Kudo et coll. 2004

### 2.2.5 Analyse d'expression génique

Pour la RT-PCR semi-quantitative, l'ARN total a été extrait du cartilage par la méthode au Trizol énoncée précédemment. Après précipitation dans l'éthanol 70%, les échantillons d'ARN ont été transcrits en ADN complémentaire, soit 4 $\mu$ g d'ARN ont été utilisés pour chaque réaction, en utilisant des amorces oligo(dT) à 100 pmoles et le thermoscript RT à 15U/ul (kit Thermoscript TM RT-PCR ; Invitrogen). L'ADN complémentaire est amplifié avec des amorces spécifiques (**tableau 2.4**) à 35 cycles, non saturé, et la taille des fragments obtenus est évaluée après migration sur gel d'agarose et visualisé par coloration au bromure d'éthidium.

### 2.2.6 Séquençage d'ADN génomique

L'ADN génomique de sujets sains et de patients arthrosiques a été obtenu après des prises de sang réalisées au CHUM, hôpital Notre-Dame, par la méthode standard en utilisant le kit QIAamp DNA blood (Qiagen, ON). Les échantillons ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques, correspondant aux régions d'intérêt (**tableau 2.5**). Ces séquences consensus PPRE potentielles ont été déterminées par analyse bio-

informatique, par la banque de données génomiques PubMed (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>). Les critères de sélection de ces séquences sont décrits dans la section résultat. L'alignement de séquence entre l'homme (numéro d'accèsion : Gi 37550270) et la souris (numéro d'accèsion : Gi 51767737) a été réalisé par le programme Blast 2 sequence (Tatusova et Madden, 1999).

Les produits PCR ont été identifiés après migration sur gel d'agarose, et révélés grâce au bromure d'éthidium. Afin d'optimiser les conditions de séquençage, ces produits ont été purifiés avec le kit d'extraction de gel QIAquick® (Qiagen, MD, USA). L'analyse de séquences a été réalisée dans le laboratoire d'innovation génomique de l'hôpital Sainte-Justine avec l'appareil CEQ 2000XL (Beckman Coulter), ainsi qu'au centre d'innovation de Génome Québec de l'Université McGill. Le système d'analyse utilisé est le 3730XL d'ABI.

### **2.2.7 Analyses statistiques**

Les résultats pour l'immunohistochimie sont donnés en % de cellules marquées  $\pm$  écart-type. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le test non paramétrique de Mann-Whitney U, la valeur de P étant significative si  $p < 0,05$ .

**Tableau 2.4 : Amorces utilisées pour l'amplification des gènes *pitx1*, *PPAR $\gamma$ 1* et  $\gamma$ 2, et  $\beta$ -Actine chez la souris et chez l'humain.**

Séquence	Espèce	Sense	Anti-sense	Taille (pb)
<i><math>\beta</math>-actin</i>	Souris	5'-GGAAATCGTGCGTGACAT-3'	5'-TCATGATGGAATTGAATGTAGTT-3'	233
<i><math>\beta</math>-actin</i>	Humain	5'-GGAAATCGTGCGTGACAT-3'	5'-TCATGATGGAGTTGAAGGTAGTT-3'	233
<i>Pitx1</i>	Souris	5'-CCCACCTCCATGGACGCCTT-3'	5'-GTCAGCTGTTGTACTGGCAAGCGT-3'	960
<i>Pitx1</i>	humain	5'-CCCACCTCCATGGACGCCTT-3'	5'-GTCAGCTGTTGTACTGGCACGC-3'	960
<i>PPAR<math>\gamma</math>1</i>	Souris	5'-ACGTTCTGACAGGACTGTGTGA-3'	5'-ATAAGGTGGAGATGCAGGTTC-3'	354
<i>PPAR<math>\gamma</math>1</i>	humain	5'-GTTGGTCTTGTCGGCAGG-3'	5'-ATAAGGTGGAGATGCAGGTTC-3'	407
<i>PPAR<math>\gamma</math>2</i>	Souris	5'-GCTGTTATGGGTGAAACTCTG-3'	5'-ATAAGGTGGAGATGCAGGTTC-3'	350
<i>PPAR<math>\gamma</math>2</i>	humain	5'-GCTGTTATGGGTGAAACTCTG-3'	5'-ATAAGGTGGAGATGCAGGTTC-3'	350

**Tableau 2.5 : Amorces utilisées pour l'amplification des différentes régions d'intérêt du promoteur (P2 et P3) et du second intron de *pitx1* (I4).** Le segment P2 a permis l'amplification de trois sites PPRE potentiels situés entre (-1349/-1324), (-1268/-1243) et (-1220/-1195) paires de bases du promoteur. Le segment P3 a permis l'amplification d'un site PPRE potentiel situé entre (-943/-918) paires de bases du promoteur. Le segment I4 a permis l'amplification d'un site PPRE potentiel situé entre (+1641/+1666) paires de bases du second exon.

Séquence	Sense	Anti-sense	Taille (pb)
P2	5'-TCAAAGGCAGAACCTGCAGA-3'	5'-TCCAGCTTCTCTCCCACACA-3'	460
P3	5'-AAGCTGGAAGACTGAGGGCTT-3'	5'-TTCTCCAGCCTCTTCTCCC-3'	499
I4	5'-TGAGCGATGAAATAGATCGAA-3'	5'-AGGGGACGGGAGAAGGGT-3'	435

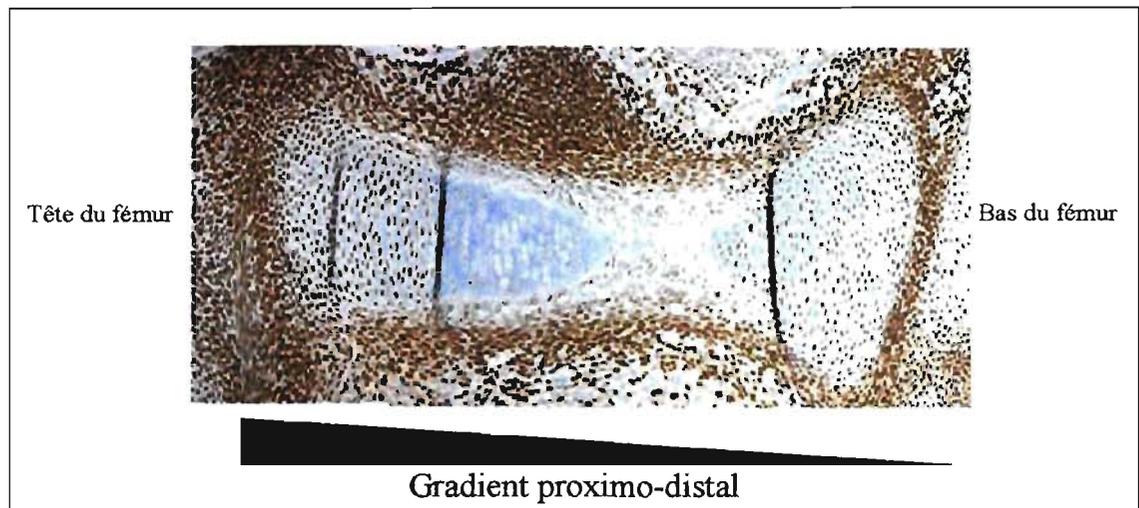
## CHAPITRE 3      RESULTATS

### 3.1      Etude du rôle du facteur de transcription *pitx1* dans l'arthrose

#### 3.1.1      Analyse phénotypique des souris *pitx1*<sup>+/-</sup>

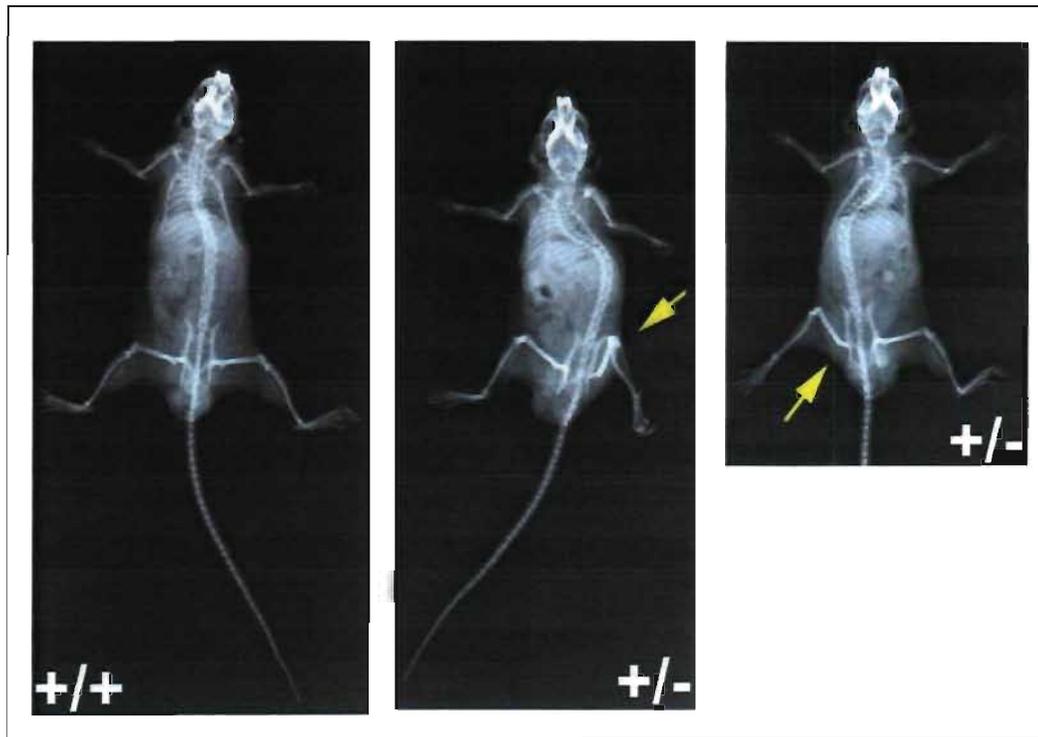
L'inactivation complète du gène *pitx1* chez la souris provoque des malformations lors du développement crânio-facial et des membres inférieurs. Outre ces importantes anomalies, qui ont lieu durant l'embryogenèse, les souris *pitx1*<sup>-/-</sup> meurent à la naissance. Cependant, les souris hétérozygotes *pitx1*<sup>+/-</sup> sont viables à la naissance mais présentent, en vieillissant, des problèmes de marche causés par des raideurs articulaires aux membres inférieurs cinq mois déjà après la naissance, ce qui n'est pas un phénotype normal chez des souris. Ce phénomène précoce, unilatéral, est retrouvé aussi bien chez les mâles que chez les femelles et s'accroît pendant la vie de l'animal, phénotype spécifique ressemblant fortement à l'arthrose chez les humains, que nous avons voulu caractériser.

La **figure 3.1** met en évidence les protéines de ce facteur de transcription par immunohistochimie. Cette coupe représente un fémur de souris normale en développement à 13,5 jours embryonnaires, dans lequel on peut observer une forte concentration des protéines *pitx1* notamment au niveau des jonctions articulaires, ainsi que tout le long du périoste, la membrane fibreuse entourant l'os. La distribution des protéines *Pitx1* décroît selon un gradient proximo-distal, soit une accumulation plus importante à la hanche qui diminue à l'articulation du genou, pour ne retrouver presque aucune protéine au niveau des chevilles.

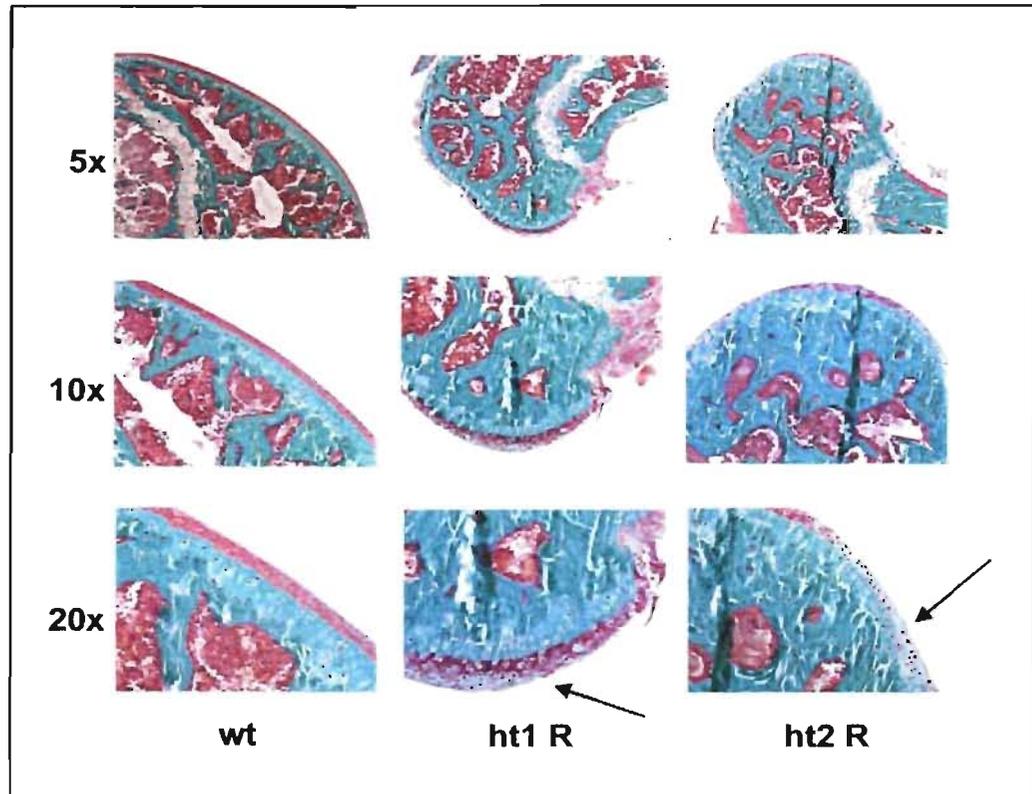


**Figure 3.1 : Localisation des protéines Pitx1 par immunohistochimie sur une coupe de fémur de souris normale à 13,5 jours embryonnaires.** La forte densité de ces protéines se concentre au niveau de la région péri-articulaire qui va donner lieu au cartilage articulaire de la tête fémorale, et tout au long du périchondre, suivant un gradient proximo-distal. Notez la forte décroissance du marquage de ces protéines dans le bas du fémur, au niveau de l'articulation du genou.

La caractérisation morphologique de l'inactivation partielle d'un allèle de *pitx1* chez la souris a été analysée par radiographie ainsi que par histologie. Pour ce faire, nous avons comparé trois souris mâles âgées de sept mois, soit une de type sauvage (wt), et deux de type hétérozygote pour la mutation *pitx1*<sup>+/-</sup> (*ht1 R* et *ht2 R*). L'analyse radiographique de ces trois souris (**figure 3.2**) permet de mettre en évidence des taches blanches correspondant à une augmentation de la calcification au niveau des articulations des membres inférieurs chez les souris où le facteur *pitx1* a été partiellement inactivé. On observe également une flexion anormale unilatérale du bassin, générant ainsi une scoliose secondaire. Cette augmentation de la densité minérale osseuse est confirmée par l'analyse histologique des têtes fémorales chez ces souris. Une forte calcification et minéralisation du cartilage articulaire sont observées chez les souris hétérozygotes par rapport au type sauvage, grâce à la coloration de Goldner (**figure 3.3**). La coloration au trichrome de Goldner permet la quantification du tissu ostéoïde et minéralisé. Ainsi, l'os non minéralisé, le cartilage et les cellules sanguines sont colorés en rouge, alors que l'os minéralisé et tout autre tissu calcifié se colore en vert. De plus, il est intéressant de constater sur ces coupes, au plus gros grossissement (20X), un début d'érosion du cartilage lorsque comparé au type sauvage (flèches noires). Ce phénotype caractérisé par une augmentation de la minéralisation des os, ainsi que par une forte érosion de la surface du cartilage articulaire est caractéristique de la pathologie arthrosique.



**Figure 3.2 : Radiographies de souris mâles âgées de 7 mois de type sauvage ( $pitx1^{+/+}$ ), et deux types hétérozygotes ( $pitx1^{+/-}$ ). Ces radiographies présentent une forte calcification du fémur chez les souris hétérozygotes ( $pitx1^{+/-}$ ) par rapport au type sauvage (flèches jaunes). On observe également une scoliose qui semble être secondaire à un déséquilibre asymétrique au niveau du bassin chez ces souris  $pitx1^{+/-}$ . Notez la calcification importante au niveau du fémur de la première souris hétérozygote (au centre).**



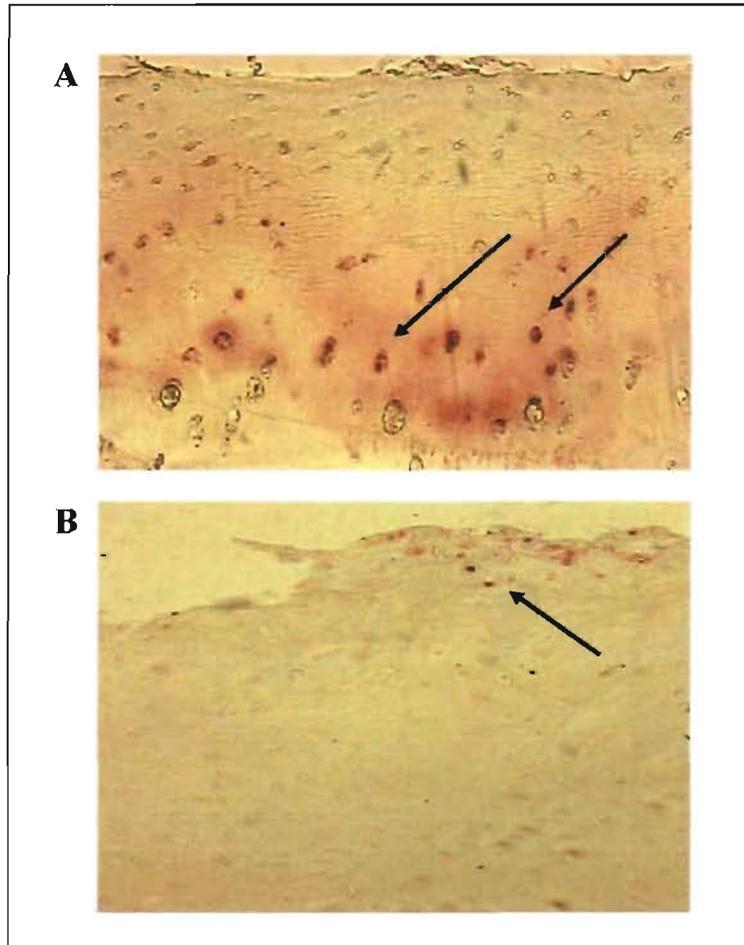
**Figure 3.3 : Analyse histologique comparative du cartilage articulaire de trois souris mâles âgées de 7 mois.** Mise en évidence, par coupe histologique, de cartilage articulaire de la tête fémorale de souris mâles âgées de 7 mois, soit une souris *pitx1* de type sauvage (*wt*) dans la première colonne, et deux souris hétérozygotes *pitx1*<sup>+/-</sup> dans la deuxième et la troisième colonne (*ht1 R* et *ht2 R*). La coloration de Goldner permet de dissocier les tissus calcifiés (en vert) des autres tissus et cellules, notamment le cartilage articulaire (en rouge). Cette minéralisation est fortement prononcée dans le cartilage des souris hétérozygotes par rapport aux souris de type sauvage. Par ailleurs, il est possible d'observer un début d'érosion de ce cartilage au plus fort grossissement (20x) chez les souris hétérozygotes uniquement, mis en évidence par les flèches noires.

### 3.1.2 Les patients arthrosiques présentent-ils un défaut d'expression de *pitx1* ?

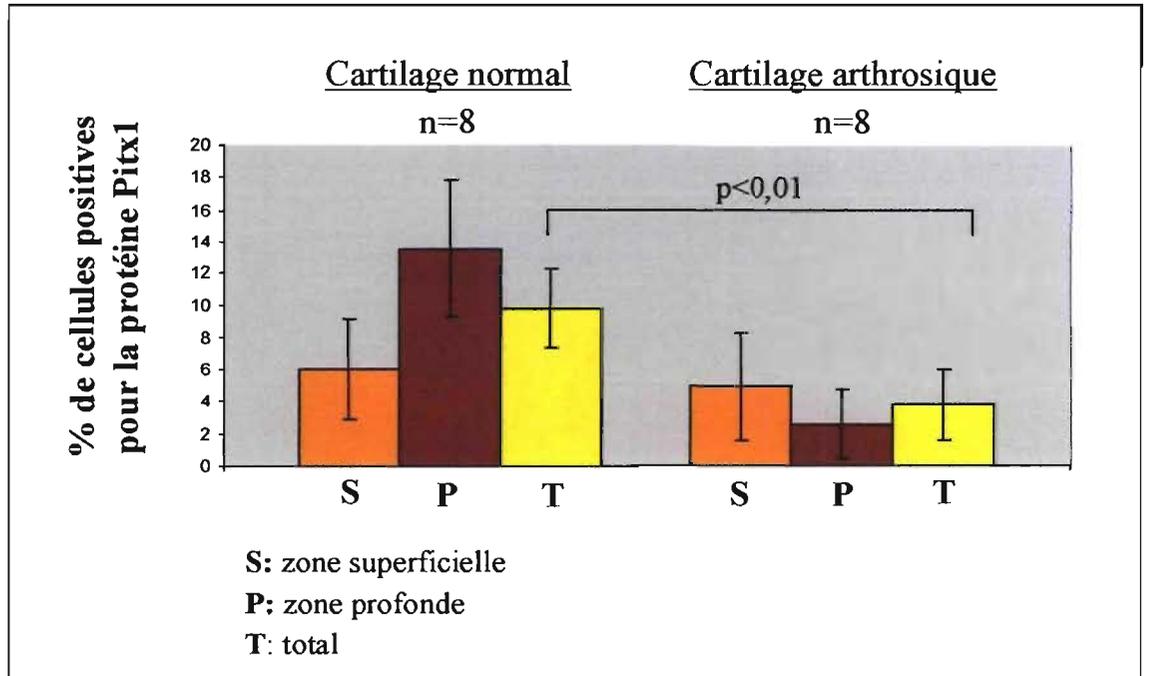
Les résultats précédents suggèrent qu'une inactivation partielle du gène *pitx1* chez la souris est capable de générer un phénotype ressemblant fortement à celui de l'arthrose chez les humains. Conséquemment, ces résultats nous ont conduit à examiner si le gène *pitx1* était exprimé chez les patients arthrosiques par rapport à des sujets sains appariés.

Nous avons d'abord mis en évidence, par immunohistochimie, la localisation des protéines Pitx1 dans le cartilage articulaire de sujets sains et de patients arthrosiques d'âge, de sexe et de poids apparié. Un immunomarquage représentatif est présenté à la **figure 3.4**. On observe une diminution de l'intensité du marquage, ainsi que du nombre de cellules positives détectées dans le cartilage du patient arthrosique (panneau B) par rapport au sujet sain (panneau A). L'immunohistochimie a été suivie d'une analyse qui nous a permis de déterminer le nombre de cellules positives pour la protéine Pitx1 dans le cartilage articulaire, selon chacune des zones histologiques (superficielle et profonde). Huit sujets sains et huit patients arthrosiques ont été analysés (**figure 3.5**). On remarque une différence significative dans le nombre de cellules marquées positives pour la protéine Pitx1 dans le cartilage de sujets sains par rapport au cartilage de patients arthrosiques ( $p < 0,01$ ). De plus, il est intéressant de noter que dans certains cartilages normaux, il y a moins de cellules positives ( $x=6$ ) dans la zone superficielle que dans la zone profonde ( $x=13,5$ ), tandis que la tendance s'inverse dans le cartilage arthrosique ( $x=4,85$  pour la zone superficielle;  $x=2,5$  pour la zone profonde). La signification de ces observations reste à déterminer.

Ces résultats montrent d'une part la présence de *pitx1* dans le cartilage articulaire de sujets sains, d'autre part une forte diminution de ces protéines dans le cartilage articulaire de patients arthrosiques de manière significative ( $p < 0,05$ ).

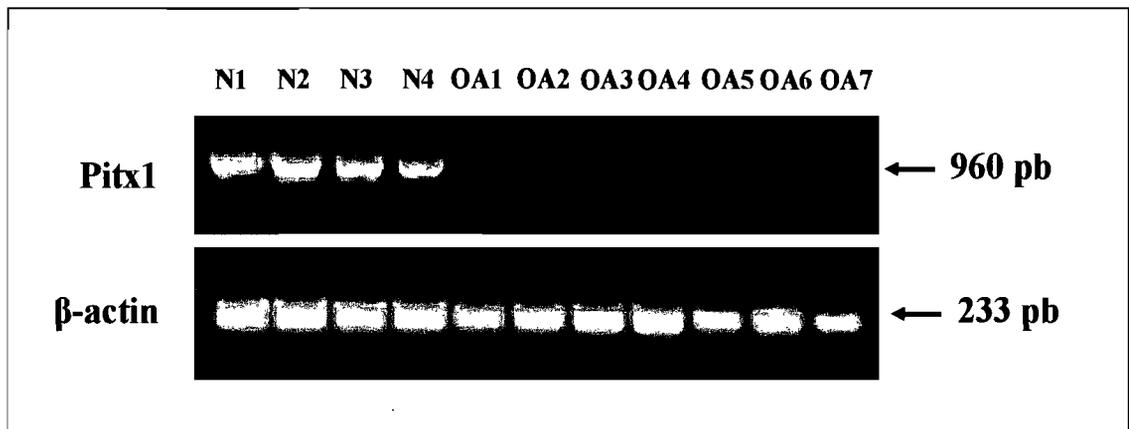


**Figure 3.4 : Immunolocalisation de la protéine pitx1 dans le cartilage articulaire d'un sujet sain (A) par rapport à un patient arthrosique (B) par immunohistochimie. Notez la nette diminution d'intensité de marquage et du nombre de cellules détectées dans le cartilage articulaire du patient arthrosique (B) par rapport au cartilage du sujet sain (A).**



**Figure 3.5 :** Etude histomorphométrique du cartilage humain, analysé par immunohistochimie, pour la présence de la protéine Pitx1. Le pourcentage de cellules positive est significativement plus élevé dans le cartilage normal (n=8) lorsque comparé au cartilage arthrosique (n=8),  $p < 0,01$ .

L'analyse de l'expression de *pitx1* a été déterminée après extraction d'ARN d'un panel de chondrocytes articulaires de sujets sains (n=4) et de patients arthrosiques (n=7), obtenus après chirurgie (tableau 2.1), par la technique de RT-PCR. La **figure 3.6** présente les résultats obtenus, soit une expression normale de *pitx1* chez les sujets sains, alors que l'on observe une absence d'expression de ce gène chez tous les patients arthrosiques analysés. Ces patients présentent une arthrose primaire, et possèdent, pour la majorité, un indice de masse corporel supérieur à la moyenne ( $IMC \geq 28$ ), soit un excès pondéral. Ces résultats sont intéressants car ils mettent en évidence pour la première fois un défaut d'expression de *pitx1* chez les patients atteints d'arthrose, et ils permettent également de valider la souris *pitx1*<sup>+/-</sup> comme modèle animal pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de l'arthrose.



**Figure 3.6 : Analyse de l'expression génique de pitx1 dans des chondrocytes articulaires de patients.** L'expression de pitx1 chez les sujets sains (N1-N4) est normale, alors que l'on observe une absence d'expression de pitx1 chez les patients arthrosiques analysés (OA1-OA7). L'expression de la  $\beta$ -actine sert d'étalon interne pour normaliser les résultats obtenus.

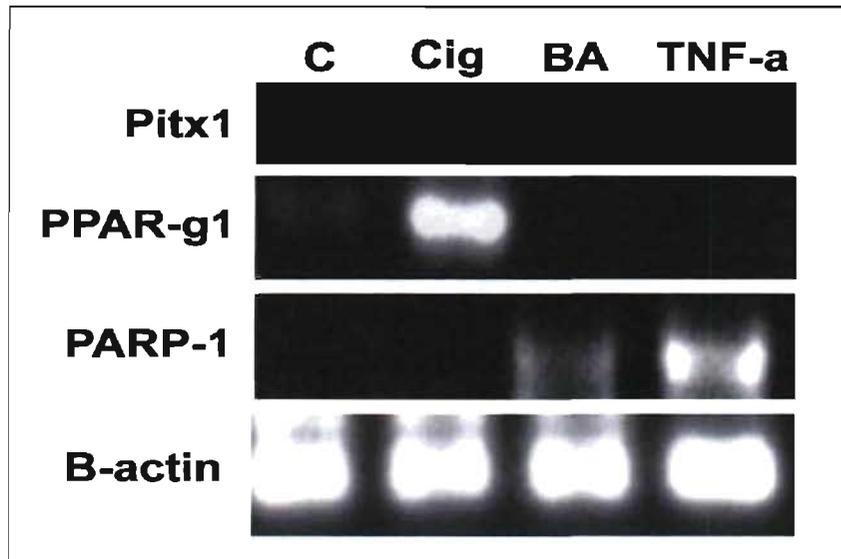
### 3.2 Détermination de la régulation de pitx1

La perte d'expression de pitx1 chez les patients arthrosiques ne peut résulter d'une simple inactivation du gène, étant donné les nombreuses malformations conséquentes lors du développement. Il a d'ailleurs été montré que les souris knock-out pitx1<sup>-/-</sup> ne sont pas viables. Les patients arthrosiques ne présentant pas de malformations importantes, nous avons plutôt postulé qu'il puisse s'agir d'un défaut au niveau de la régulation de l'expression du gène pitx1 au cours de la vie adulte. Compte tenu du lien existant entre l'arthrose et l'obésité, ainsi que du rôle joué par le facteur PPAR $\gamma$  dans le mécanisme de différenciation des adipocytes, nous avons émis l'hypothèse que ce facteur pourrait jouer le rôle d'activateur transcriptionnel de pitx1. En effet, tel que mentionné dans la revue de la littérature, PPAR $\gamma$  joue un rôle clé dans le processus de dégradation du cartilage, dans la différenciation des ostéoblastes et dans l'inflammation subséquente. De plus, la présence de ce facteur dans le cartilage articulaire a récemment été mise en évidence (Bordji et coll. 2000 ; Fahmi et coll. 2001), et l'utilisation de ses agonistes, les thiazolidinediones, présente des effets protecteurs sur le cartilage.

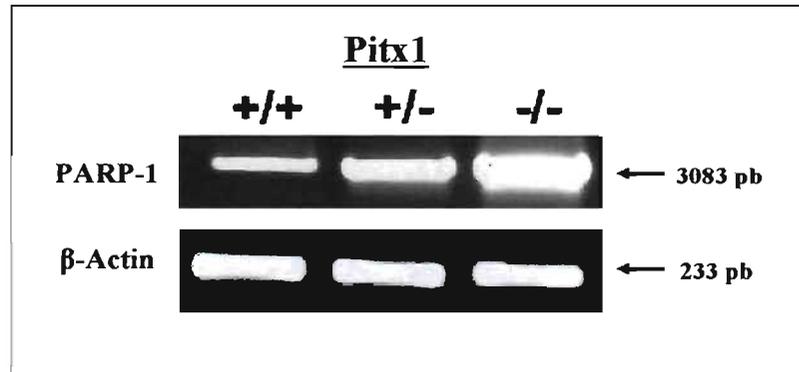
A partir de cellules ostéoblastes MC3T3-E1 de souris, nous avons voulu déterminer si l'expression de pitx1 était influencée par les agonistes et antagonistes spécifiques de PPAR $\gamma$  (**tableau 2.3**). Nous avons choisi des ostéoblastes car l'expression basale de pitx1 est faible mais détectable chez les souris saines, mais également parce que les chondrocytes articulaires sont plus difficiles à manipuler. Les ostéoblastes mis en culture ont été traités 24h avec ces composés (**tableau 2.3**) afin de mettre en évidence une éventuelle activation et inhibition de pitx1 par ces derniers, réalisée par la technique de RT-PCR. La **figure 3.7 (a)** présente ces résultats. On observe une nette augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$  et de pitx1 après stimulation des ostéoblastes avec l'agoniste de PPAR $\gamma$ , la ciglitazone (10 $\mu$ M). Par contre, la stimulation de ces cellules par les antagonistes pharmacologiques (BADGE, 10 $\mu$ M) et physiologiques (TNF $\alpha$ , 20ng/ml) inhibe l'expression de ces deux facteurs.

Afin de s'assurer que les antagonistes utilisés exercent un effet inhibiteur sur pitx1, nous avons également analysé l'expression du gène PARP-1, codant pour le Poly(ADP-ribose) polymérase 1. En effet, ce facteur est un régulateur transcriptionnel connu des

gènes Reg, qui augmentent l'expression de NF- $\kappa$ B, et est également impliqué dans des processus tels que le cancer et l'instabilité génomique (Nguewa et coll. 2005). Nos résultats montrent que pitx1 est capable de réprimer l'expression de PARP-1, tel qu'illustré à la **figure 3.7(b)**. De plus, l'expression de PARP-1 est inversement proportionnelle au nombre de copies du gène pitx1 tel qu'observé chez les souris normales, pitx1<sup>+/-</sup> et pitx1<sup>-/-</sup>. Donc, l'expérience présentée à la **figure 3.7(a)** montrant une augmentation de l'expression de PARP-1 lorsque les ostéoblastes sont traités avec les antagonistes de PPAR $\gamma$ , indique indirectement que ces molécules exercent bien un effet antagoniste sur pitx1, confirmant ainsi que l'activation de pitx1 est influencée par l'activation et l'expression du facteur PPAR $\gamma$ .



**Figure 3.7 (a) : Analyse de l'expression génique de Pitx1, de PPAR $\gamma$ 1 et de PARP-1 dans des ostéoblastes de souris, traités pendant 24h avec un agoniste pharmacologique (ciglitazone, 10 $\mu$ M) et des antagonistes pharmacologique (BADGE, 10 $\mu$ M) et physiologique (TNF $\alpha$ , 20ng/ml) de PPAR $\gamma$ . L'activation de l'expression de PPAR $\gamma$  par la ciglitazone augmente parallèlement celle de pitx1, qui réprime conséquemment l'expression de PARP-1. Inversement, les antagonistes de PPAR $\gamma$  inhibent l'expression de pitx1, ce qui augmente l'expression de PARP-1.**

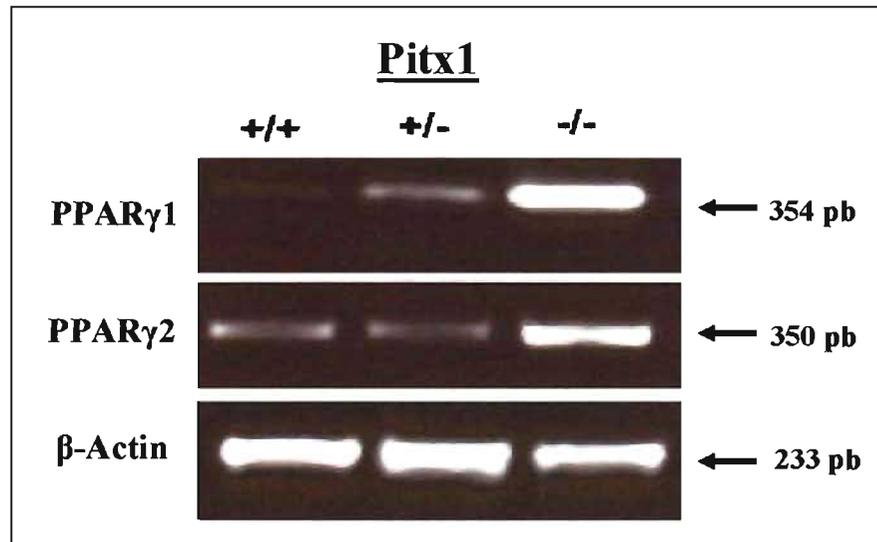


**Figure 3.7 (b) : Analyse de l'expression génique de PARP-1 chez les souris *pitx1* de type sauvage (*pitx1*<sup>+/+</sup>), hétérozygote (*pitx1*<sup>+/-</sup>) et knock-out (*pitx1*<sup>-/-</sup>). L'expression de PARP-1 est réprimée par *pitx1*. Son expression augmente en fonction de l'inactivation d'un (*pitx1*<sup>+/-</sup>) et de deux allèles de *pitx1* (*pitx1*<sup>-/-</sup>). L'expression de la  $\beta$ -actine sert d'étalon interne afin de normaliser les résultats obtenus.**

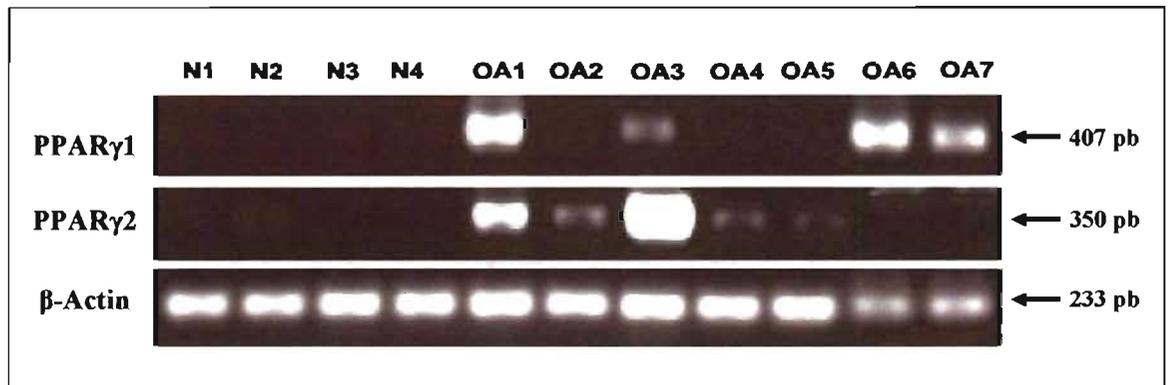
Après avoir montré que l'expression de *pitx1* était influencée par PPAR $\gamma$ , nous avons voulu analyser l'expression de PPAR $\gamma$  dans des souris normales par rapport aux souris hétérozygotes (*pitx1*<sup>+/-</sup>) et homozygotes (*pitx1*<sup>-/-</sup>). Pour ce faire, nous avons extrait l'ARN de cinq souris normales, cinq souris hétérozygotes et cinq souris homozygotes, toutes sacrifiées à la naissance. La **figure 3.8** présente ces résultats très significatifs. En effet, l'expression de PPAR $\gamma$  chez la souris de type sauvage est très faible, contrairement à la souris hétérozygote *pitx1*<sup>+/-</sup> chez qui l'expression des isoformes de PPAR $\gamma$  est augmentée. L'expression de PPAR $\gamma$  augmente en fonction du degré d'inactivation génique de *pitx1*. Ainsi, la souris knock-out pour *pitx1* présente les taux d'expression les plus élevés pour les deux isoformes de PPAR $\gamma$ . Ces résultats sont d'autant plus importants qu'ils présentent pour la première fois une relation entre l'inactivation de *pitx1* et l'augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$ .

### 3.2.2 Evaluation de l'expression de PPAR $\gamma$ chez les sujets sains versus arthrosiques

Après avoir vérifié la relation entre une perte d'expression de *pitx1* et une augmentation parallèle de PPAR $\gamma$  chez la souris, nous avons entrepris l'analyse de l'expression des isoformes de PPAR $\gamma$  dans des chondrocytes issus de cartilage articulaire de sujets sains versus arthrosiques. Les sujets analysés sont issus du panel présenté dans le **tableau 2.1**, soit des patients arthrosiques chez lesquels l'expression de *pitx1* a été précédemment analysée, ainsi que chez quatre sujets sains. La **figure 3.9** présente ces résultats et montre une absence d'expression de PPAR $\gamma$  chez les sujets sains, contrairement aux patients arthrosiques qui expriment d'une façon plus ou moins forte l'un des deux isoformes de PPAR $\gamma$ , soit  $\gamma$ 1 et  $\gamma$ 2. En fonction de la région du cartilage prélevée, les chondrocytes articulaires peuvent présenter une grande variabilité contribuant ainsi à l'hétérogénéité observée dans les niveaux d'expression, en plus d'être liée à la variabilité des conditions pathologiques de chaque individu testé.



**Figure 3.8 : Analyse de l'expression génique des isoformes PPARγ1 et γ2 chez les souris pitx1 de type sauvage (pitx1+/+), hétérozygote (pitx1+/-) et knock-out (pitx1-/-).** L'expression des isoformes de PPAR augmente en fonction de l'inactivation des allèles de pitx1. La souris de type sauvage ne présente pratiquement pas d'expression de PPARγ par rapport à la souris hétérozygote pitx1+/- . La souris homozygote pitx1-/- présente l'expression la plus élevée des isoformes de PPARγ se retrouve chez la souris homozygote pitx1-/- . L'expression de la β-actine sert d'étalon interne afin de normaliser les résultats obtenus.



**Figure 3.9 : Analyse de l'expression génique des isoformes PPAR $\gamma$ 1 et  $\gamma$ 2 dans les chondrocytes articulaires de sujets sains (N1-N4) et arthrosiques (OA1-OA7). L'absence d'expression des isoformes de PPAR $\gamma$  chez les sujets sains contraste avec la forte expression du gène observée chez les patients arthrosiques. L'expression de la  $\beta$ -actine sert d'étalon interne afin de normaliser les résultats obtenus.**

Nous avons émis l'hypothèse que PPAR $\gamma$  était capable d'activer directement la transcription de *pitx1*, par l'intermédiaire d'un élément de réponse à PPAR $\gamma$ , PPRE. Malgré le fait que nous ayons privilégié cette hypothèse, on ne peut exclure la possibilité que ce mécanisme soit indirect et implique d'autres facteurs et/ou co-activateurs. Nous avons entrepris la recherche de séquences répondant aux critères de définition des PPREs, par analyse bio-informatique à l'aide du programme GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Genome>) dans les régions promotrices et introniques de *pitx1*. Afin d'affiner notre recherche, nous avons procédé à un alignement de séquences entre l'homme et la souris, pour nous concentrer sur les éléments de réponse les plus conservés entre ces deux espèces. Les séquences consensus potentielles ainsi déterminées sont deux hexamères séparés par un nucléotide (DR1), possédant toutes une séquence **NGG(T/A)(C/G)A** ou son complément, soit **T(C/G)(T/A)CCN** dans l'hexamère en 3', important pour la liaison de RXR. Les séquences retenues répondant à la définition de PPRE potentiels les plus conservées entre l'homme et la souris sont présentées dans la **figure 3.10**.

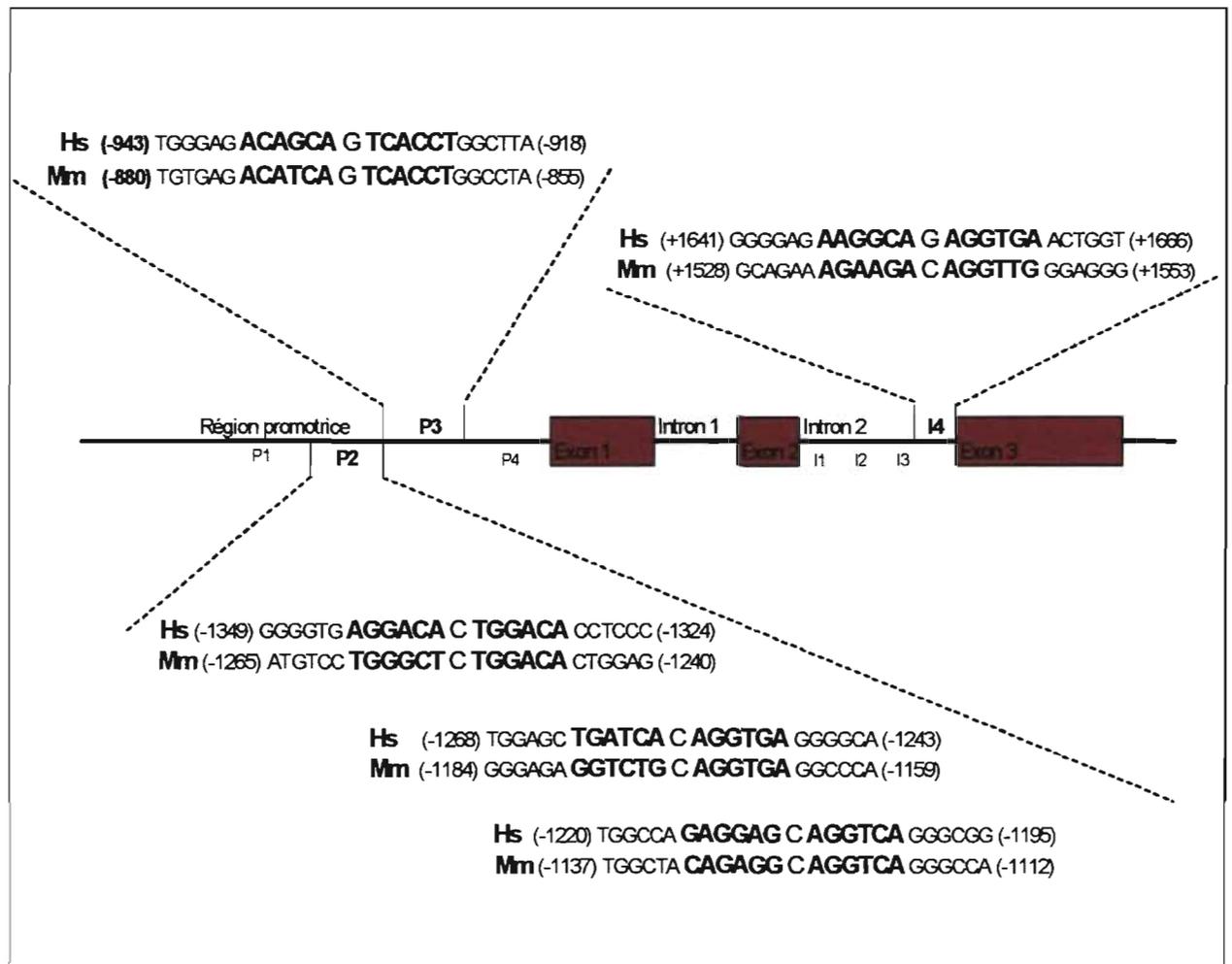
Parallèlement, nous avons conçu des amorces afin de pouvoir amplifier les fragments d'intérêt de 500 paires de base chacun dans deux régions du promoteur, soit entre -500 et -1500 pb en amont du site d'initiation de la transcription (régions P2 et P3), ainsi que dans une région intéressante du deuxième intron (I4), soit entre +1500 et +2000 pb à partir de l'extrémité 3' du second exon (**tableau 2.5**), soit trois fragments afin de procéder à une analyse systématique de ces cinq régions d'intérêt dans le gène humain de *pitx1*.

Le séquençage de ces régions a été réalisé sur de l'ADN génomique de patients arthrosiques obèses, de patients arthrosiques non obèses ainsi que de sujets sains, à partir de prises de sang. Les critères de sélection des patients analysés ont été réalisés en fonction du site anatomique où se situe l'arthrose, ainsi que de l'indice de masse corporel. Selon notre hypothèse, le mécanisme que nous proposons est un développement concomitant de l'arthrose et de l'obésité suite à un défaut dans la régulation de *pitx1*, dû à un problème lors de la transcription de ce dernier par PPAR $\gamma$ , soit une mutation au niveau de l'élément de réponse PPRE sur *pitx1*. Les patients

régulation de *pitx1*, dû à un problème lors de la transcription de ce dernier par PPAR $\gamma$ , soit une mutation au niveau de l'élément de réponse PPRE sur *pitx1*. Les patients présentant à la fois une arthrose sur une articulation sensible à une surcharge pondérale comme le genou, et présentant un excès de poids seraient plus susceptibles, selon notre hypothèse, de présenter une mutation dans cette séquence PPRE du gène *Pitx1*.

Cette analyse nous a permis de mettre en évidence une mutation au niveau du site PPRE potentiel situé dans la deuxième (P2) partie du promoteur de *pitx1* (**tableau 3.1**). En effet, seulement ce PPRE putatif présente une altération intéressante dans sa séquence, soit la séquence P2, située dans la région -1349 à -1324 pb. Les deux autres séquences consensus potentielles en P2 (-1268/-1243) et (-1220/-1195) (**tableau 3.2 et 3.3**), la séquence en P3 (-943/-918) (**tableau 3.4**), ainsi que celle se situant dans la quatrième partie du second intron (I4 ; +1641/+1666) (**tableau 3.5**) ne présentent aucune altération dans leur séquence par rapport à la séquence wild-type.

Les résultats obtenus en P2 (-1349/-1324) présentent un polymorphisme chez les patients arthrosiques et obèses analysés (4 sur 10), mais également chez les sujets sains (2 sur 8). Il semblerait que ce polymorphisme soit présent chez les patients malades et chez les sujets sains. On ne peut alors conclure que ce site PPRE soit responsable du défaut d'activation de *pitx1*. Toutefois, nous ne savons pas si cette mutation existe sous forme hétérozygote ou homozygote, des analyses de dHPLC nous permettront de le déterminer.



**Figure 3.10 : Alignement de séquences consensus potentielles de PPRE conservées entre l'homme et la souris dans les régions régulatrices du gène *pitx1*.** L'homme (Homo sapiens, **Hs**) et la souris (Mus musculus, **Mm**) possèdent cinq séquences conservées répondant aux critères de définition des sites consensus PPRE. Nous trouvons trois séquences dans la deuxième partie du promoteur (**P2**, entre -1000 et -1500 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription), une séquence dans la troisième partie du promoteur (**P3**, entre -1000 et -500 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription), ainsi qu'un site putatif dans la quatrième partie de l'intron 2 (**I4**, entre +1500 et +2000 paires de bases du deuxième intron). Les deux hexamères sont montrés en gras et les six paires de bases adjacentes aux sites sont également mises en évidence.

**Tableau 3.1 : Alignement des séquences nucléotidiques correspondant au site PPRE situé au niveau de la deuxième partie du promoteur (P2) entre -1349 et -1324 pb, provenant d'un panel de 12 patients arthrosiques obèses ou non, ainsi que de 8 sujets sains. Les données cliniques de ces patients sont regroupées dans le tableau 2.2. Les séquences conservées sont indiquées en bleu, alors que les bases qui changent sont indiquées en rouge.**

<b><u>P2 Homo Sapiens</u></b> (-1349/-1324)					
	GGGGTG	<b>AGGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC
<b><u>Patients arthrosiques et obèses :</u></b>					
1	GGGGTG	<b>AGGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC
2	GGGGTG	<b>AGGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC
3	GGGGTG	<b>AGGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC
8	GGGGTG	<b>AGGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC
9	GGGGTG	<b>AGGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC
11	GGGGTG	<b>AGGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC
5	GGGGTG	<b>ATGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC
6	GGGGTG	<b>ATGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC
7	GGCGTG	<b>ATGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	GCCTCC
10	GGGGTG	<b>ATGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC
<b><u>Patients arthrosiques non-obèses</u></b>					
4	GGGGTG	<b>AGGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC
12	GGGGTG	<b>AGGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC
<b><u>Sujets sains</u></b>					
N1	GGGGTG	<b>AGGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC
N2	GGGGTG	<b>AGGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC
N3	GGGGTG	<b>ATGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC
N4	GGGGTG	<b>AGGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC
N5	GGGGTG	<b>AGGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC
N6	GGGGTG	<b>AGGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC
N7	GGGGTG	<b>ATGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC
N8	GGGGTG	<b>AGGACA</b>	C	<b>TGGACA</b>	CCTCCC

**Tableau 3.2 : Alignement des séquences nucléotidiques correspondant au site PPRE situé au niveau de la deuxième partie du promoteur (P2) entre -1268 et -1243 pb, provenant d'un panel de 12 patients arthrosiques obèses ou non, ainsi que de 8 sujets sains. Les données cliniques de ces patients sont regroupées dans le tableau 2.2. Les séquences conservées sont indiquées en bleu.**

<b><u>P2 Homo Sapiens</u></b>		<b>(-1268/-1243)</b>	
	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
<b><u>Patients arthrosiques et obèses</u></b>			
1	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
2	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
3	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
8	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
9	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
11	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
5	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
6	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
7	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
10	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
<b><u>Patients arthrosiques non-obèses</u></b>			
4	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
12	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
<b><u>Sujets sains</u></b>			
N1	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
N2	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
N3	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
N4	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
N5	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
N6	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
N7	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA
N8	TGGAGC	<b>TGATCA</b>	<b>C AGGTGA</b> GGGGCA

**Tableau 3.3 : Alignement des séquences nucléotidiques correspondant au site PPRE situé au niveau de la deuxième partie du promoteur (P2) entre -1220 et -1195 pb, provenant d'un panel de 12 patients arthrosiques obèses ou non, ainsi que de 8 sujets sains. Les données cliniques de ces patients sont regroupées dans le tableau 2.2. Les séquences conservées sont indiquées en bleu.**

<b><u>P2 Homo Sapiens</u></b> (-1220/-1195)	
	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
<b><u>Patients arthrosiques et obèses</u></b>	
1	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
2	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
3	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
8	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
9	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
11	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
5	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
6	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
7	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
10	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
<b><u>Patients arthrosiques non-obèses</u></b>	
4	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
12	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
<b><u>Sujets sains</u></b>	
N1	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
N2	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
N3	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
N4	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
N5	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
N6	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
N7	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG
N8	TGGCCA <b>GAGGAG</b> C <b>AGGTCA</b> GGGCGG

**Tableau 3.4 : Alignement des séquences nucléotidiques correspondant au site PPRE situé au niveau de la troisième partie du promoteur (P3) entre -943 et -918 pb, provenant d'un panel de 12 patients arthrosiques obèses ou non, ainsi que de 8 sujets sains.** Les données cliniques de ces patients sont regroupées dans le tableau 2.2. Les séquences conservées sont indiquées en bleu, alors que les bases qui changent sont indiquées en rouge.

<b><u>P3 Homo Sapiens</u></b> (-943/-918)	
	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
<b><u>Patients arthrosiques et obèses</u></b>	
1	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
2	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
3	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
8	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
9	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
11	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
5	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
6	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
7	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
10	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
<b><u>Patients arthrosiques non-obèses</u></b>	
4	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
12	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
<b><u>Sujets sains</u></b>	
N1	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
N2	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
N3	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
N4	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
N5	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
N6	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
N7	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA
N8	TGGGAG <b>ACAGCA</b> <b>G</b> <b>TCACCT</b> GGCTTA

**Tableau 3.5 : Alignement des séquences nucléotidiques correspondant au site PPRE situé au niveau du second intron (I4) entre +1641 et +1666 pb du second exon, provenant d'un panel de 12 patients arthrosiques obèses ou non, ainsi que de 8 sujets sains. Les données cliniques de ces patients sont regroupées dans le tableau 2.2. Les séquences conservées sont indiquées en bleu.**

<b><u>I4 Homo Sapiens</u></b> (+1641/+1666)	
	GGGGAG <b>AAGGCA</b> <b>G</b> <b>AGGTGA</b> ACTGGT
<b><u>Patients arthrosiques et obèses</u></b>	
1	GGGGAG <b>AAGGCA</b> <b>G</b> <b>AGGTGA</b> ACTGGT
2	GGGGAG <b>AAGGCA</b> <b>G</b> <b>AGGTGA</b> CCTGGT
3	GGGGAG <b>AAGGCA</b> <b>G</b> <b>AGGTGA</b> ACTGGT
8	GGGGAG <b>AAGGCA</b> <b>G</b> <b>AGGTGA</b> ACTGGT
9	GGGGAG <b>AAGGCA</b> <b>G</b> <b>AGGTGA</b> ACTGGT
11	GGGGAG <b>AAGGCA</b> <b>G</b> <b>AGGTGA</b> CCTGGT
5	GGGGAG <b>AAGGCA</b> <b>G</b> <b>AGGTGA</b> ACTGGT
6	GGGGAG <b>AAGGCA</b> <b>G</b> <b>AGGTGA</b> ATTGGT
<b><u>Patients arthrosiques non-obèses</u></b>	
4	GGGGAG <b>AAGGCA</b> <b>G</b> <b>AGGTGA</b> CCTGGT
12	GGGGAG <b>AAGGCA</b> <b>G</b> <b>AGGTGA</b> CCTGGT
<b><u>Sujets sains</u></b>	
N1	GGGGAG <b>AAGGCA</b> <b>G</b> <b>AGGTGA</b> CCTGGT
N2	GGGGAG <b>AAGGCA</b> <b>G</b> <b>AGGTGA</b> CCTGGT
N3	GGGGAG <b>AAGGCA</b> <b>G</b> <b>AGGTGA</b> CCTGGT
N4	GGGGAG <b>AAGGCA</b> <b>G</b> <b>AGGTGA</b> CCTGGT
N5	GGGGAG <b>AAGGCA</b> <b>G</b> <b>AGGTGA</b> CCTGGT
N6	GGGGAG <b>AAGGCA</b> <b>G</b> <b>AGGTGA</b> CCTGGT
N7	GGGGAG <b>AAGGCA</b> <b>G</b> <b>AGGTGA</b> CCTGGT
N8	GGGGAG <b>AAGGCA</b> <b>G</b> <b>AGGTGA</b> CCTGGT

## CHAPITRE 4 DISCUSSION

Les résultats présentés dans le cadre de ce mémoire mettent en évidence une perte d'expression du gène *pitx1* comme base génétique impliquée dans l'étiopathogenèse de l'arthrose. L'aspect fondamental de cette étude vise à déterminer les causes et les mécanismes sous-jacents à l'absence d'expression de *pitx1*, notamment la régulation transcriptionnelle exercée par le facteur de transcription PPAR $\gamma$ . Par ailleurs, les travaux réalisés dans le cadre de ce projet de maîtrise pourraient avoir un impact clinique intéressant et seront discutés plus particulièrement au niveau des mécanismes et des traitements potentiels en vue d'un rétablissement de l'expression de *pitx1*, notamment par le développement de molécules plus spécifiques permettant d'activer ou de maintenir l'expression endogène de ce facteur.

### 4.1 Aspect fondamental de l'arthrose

#### 4.1.1 Base génétique de l'arthrose : une perte d'expression de *pitx1*

Le développement et la progression de la maladie arthrosique dans le cartilage péri-articulaire et l'os sous-chondral sont difficiles à étudier génétiquement chez l'humain car ce sont des manifestations tardives, qui évoluent progressivement dans le temps. Pour cette raison, le développement d'un modèle animal peut faciliter la compréhension des mécanismes moléculaires générant cette maladie. Outre le fait que le facteur de transcription *Pitx1* soit essentiel pour le développement des membres inférieurs, la diminution de son expression au cours de la vie adulte semble être la source du mécanisme pathogénique causant l'arthrose.

En effet, les études portant sur l'inactivation du facteur de transcription *pitx1* démontrent clairement son implication dans le développement des membres inférieurs, notamment dans les régions péri-articulaires du genou et de la hanche. Ce facteur joue un rôle important durant les stades précoces de l'embryogenèse, et les souris dont les deux copies du gène ont été inactivées (*pitx1*<sup>-/-</sup>) présentent de sévères anomalies squelettiques au niveau crânio-facial et des membres inférieurs, et ne sont pas viables à la naissance (Lanctôt et coll. 1999). Les études réalisées chez ces souris knock-out

mettent en évidence une chondrogenèse inhabituelle, caractérisée par une forte calcification de la tête du tibia et du fémur en réponse à une différenciation et une prolifération anormale des chondrocytes des régions péri-articulaires de ces os. Cependant, l'inactivation d'un des deux allèles chez la souris hétérozygote *pitx1*<sup>+/-</sup> conduit au développement normal de souris qui, toutefois, présentent en vieillissant un phénotype arthrosique que nous avons voulu caractériser au cours de cette étude. En effet, les souris hétérozygotes *pitx1*<sup>+/-</sup> présentent des problèmes de marche précoces, dus à des raideurs dans les articulations de leurs membres inférieurs environ cinq mois après la naissance, phénomène inhabituel chez les souris saines. Ces problèmes s'accroissent tout au long de la vie de l'animal. Les analyses radiographiques et histologiques de ces souris à sept mois présentent (**figure 3.2 et 3.3**) des traits morphologiques typiques de l'arthrose, soit une forte augmentation de la minéralisation des membres inférieurs des souris hétérozygotes par rapport au type sauvage, une fibrillation et une calcification du cartilage, ainsi que des irrégularités de la surface du cartilage dues à l'érosion de ce dernier. La forte minéralisation observée chez ces souris *pitx1*<sup>+/-</sup> résulte d'un défaut lors de la différenciation des chondrocytes articulaires, trait morphologique caractéristique mis en évidence chez les souris *pitx1* knock-out. Cependant, contrairement à ces souris *pitx1*<sup>-/-</sup>, les souris hétérozygotes ne présentent pas de réduction de la taille de leur membres inférieurs, ni de malformations à la naissance.

L'atteinte des membres est habituellement asymétrique tel qu'observé par radiographie chez les souris *pitx1*<sup>+/-</sup>, et est un phénomène courant dans l'arthrose. En effet, tel que souligné par l'équipe de Neame et coll. (2004), l'arthrose peut être unilatérale, plus fréquemment observée du côté droit. Cela met en évidence l'importance de facteurs locaux dans le développement de la pathologie par rapport aux facteurs systémiques. Par ailleurs, la redondance entre les gènes *pitx1* et *pitx2* pourrait expliquer cette asymétrie. Il est intéressant de souligner que nous avons réalisé une analyse de l'expression de *pitx2* dans des ostéoblastes traités avec les différents agonistes et antagonistes de PPAR $\gamma$  tel que nous l'avons fait pour *pitx1* (**figure 3.7(a)**). Nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de *pitx2* par l'agoniste de PPAR $\gamma$  (la ciglitazone), ainsi qu'une inhibition de son expression par les antagonistes de PPAR $\gamma$ , résultats similaires à ceux observés pour *pitx1* (résultats non présentés). Cela suggère que la discordance de symétrie observée chez les souris *pitx1*<sup>+/-</sup> peut être due à une

compensation partielle de la déficience en *pitx1* par la présence de *pitx2*, préférentiellement exprimé du côté gauche de la plaque du mésoderme lors du développement (Logan et coll. 1999).

Conséquemment, nous avons évalué le niveau d'expression du gène *pitx1* chez les patients arthrosiques par rapport à des sujets normaux. L'absence d'expression de ce gène, observée chez les patients malades par rapport aux sujets sains (**figure 3.6**), ainsi que le phénotype caractéristique observé chez les souris hétérozygotes *pitx1 +/-* démontrent pour la première fois une relation entre le défaut d'expression du facteur *pitx1* et le développement caractéristique de l'arthrose.

De nombreux gènes ont été mis en évidence dans le développement et le maintien des structures osseuses et cartilagineuses. Cependant, les études portant sur l'implication de ces gènes dans la pathologie arthrosique ne démontrent aucune concordance entre un défaut d'activation et le développement de la maladie. L'analyse d'un défaut de l'expression de gènes potentiels chez les humains atteints d'arthrose ne permet pas de définir ces facteurs comme seuls responsables du développement et de la progression de la maladie. Compte tenu du caractère multi-génétique de la maladie, certains polymorphismes ont été rapportés (Valdes et coll. 2004), en fonction du site anatomique de développement de la maladie, ainsi que d'autres paramètres tels que le sexe, une maladie métabolique ou un excès pondéral mais les études réalisées sur ces facteurs ne présentent pas un phénotype typiquement arthrosique. Les facteurs incriminés comme la COX2 et CD36 sont régulés par le facteur PPAR $\gamma$  dans des processus inflammatoires, mais aucune étude ne met en évidence le lien de ces facteurs agissant sur le développement des structures osseuses et cartilagineuses.

Dernièrement, l'équipe de Rountree et coll. (2004) a démontré qu'une variation génétique dans la signalisation d'un des récepteurs de BMP (BMP1a) pourrait être à l'origine d'un risque plus élevé de développer de l'arthrose. Il s'agit de la première étude mettant en évidence le rôle d'un facteur impliqué dans le développement des os dans la pathologie de l'arthrose. Malgré l'importance des symptômes qui se développent suite à un défaut dans la signalisation de ce facteur, les souris hétérozygotes pour le récepteur de BMP (*Bmp1a+/-*) présentent peu de signes caractéristiques de l'arthrose, même avec l'âge. De plus, les individus présentant cette mutation n'ont pas développé jusqu'à maintenant les signes cliniques de la maladie.

Les résultats présentés au cours de ce mémoire démontrent, pour la première fois, que le facteur de transcription *pitx1*, indispensable pour le développement de l'os et du cartilage durant l'embryogenèse, pourrait jouer un rôle dans le développement de la maladie arthrosique. Il s'agit de la première étude mettant en évidence l'initiation du processus pathologique par un défaut dans la chondrogenèse suite à l'inactivation partielle du facteur *pitx1*.

#### **4.1.2 Mécanisme moléculaire de l'arthrose : un défaut dans la régulation de *pitx1* au cours de la vie adulte ?**

Le défaut d'expression de *pitx1* au niveau des chondrocytes articulaires observée chez les patients arthrosiques ne peut résulter d'une simple inactivation de ce facteur. En effet, les patients présenteraient de sévères malformations à la naissance dans les cas homozygotes pour la mutation. De plus, comme la majorité des pathologies et des syndromes osseux existent sous la forme hétérozygote chez l'humain, tel que pour la maladie de Gaucher, et la dysplasie cleidocrâniale, il est probable que les patients arthrosiques soient hétérozygotes pour le gène *pitx1*. C'est pourquoi, nous avons plutôt préféré postuler l'hypothèse que cette perte d'expression devait survenir au cours de la vie adulte et impliquerait au moins un facteur de transcription non essentiel au rôle de *pitx1* dans l'embryogenèse.

Bien que *pitx1* soit un facteur indispensable durant l'embryogenèse, les résultats que nous présentons suggèrent un rôle pour ce facteur également durant la vie adulte pour le maintien des structures telles que l'os et le cartilage. Nous supposons que le facteur de transcription  $PPAR\gamma$  permet de maintenir l'expression du facteur de transcription *pitx1* pendant la vie adulte et qu'une perte d'expression de *pitx1* puisse affecter les chondrocytes articulaires et les ostéoblastes, et conduire à l'arthrose. Cette perte d'expression serait favorisée par une mutation dans les éléments de réponse à  $PPAR\gamma$  sur *pitx1*. Nous avons obtenu, chez les modèles de souris STR/Ort, des résultats qui montrent que les jeunes souris (8 semaines) expriment *pitx1*, alors que les souris plus âgées (37 semaines) présentent une diminution de l'expression de *pitx1* (résultats non présentés). Les souris STR/ort sont un modèle reconnu pour l'étude de l'arthrose car

elles développent spontanément de l'arthrose (Mason et coll. 2001 ; Flannelly et coll. 2002 ; Chambers et coll. 2002).

Parmi les facteurs de transcription susceptibles de réguler l'expression de *pitx1*, nous avons concentré notre attention principalement sur PPAR $\gamma$  compte tenu de son rôle dans la différenciation cellulaire des adipocytes et du lien existant entre l'arthrose et l'obésité. Ce choix s'est avéré intéressant car ce facteur est également présent dans l'os et le cartilage, et les thiazolidinediones, agonistes de PPAR $\gamma$ , présentent des propriétés de diminution de l'inflammation et de la dégradation du joint, tel que les résultats obtenus chez les rats avec arthrite rhumatoïde (Missbach et coll. 1996 ; Kawahito et coll. 2000). Nous avons d'ailleurs démontré, chez les cellules osseuses MC3T3-E1 traitées à la ciglitazone, une augmentation de l'expression endogène de PPAR $\gamma$ l. La formation de l'os et du cartilage durant l'embryogenèse, ainsi que la réparation et le turnover de ces cellules durant la vie adulte sont directement dépendants de ces voies de différenciation des cellules du mésenchyme. Des facteurs extrinsèques locaux et intrinsèques génétiques interagissent avec les lignées cellulaires, à différents stades de différenciation pour garantir le développement et le maintien du phénotype du tissu émergent. De plus, le lien évident existant entre l'arthrose et l'obésité pourrait favoriser l'implication du facteur PPAR $\gamma$  comme médiateur essentiel pour le développement parallèle de ces deux maladies dans une catégorie de patients développant les deux pathologies. Bien qu'une littérature abondante existe sur PPAR $\gamma$ , son implication dans le processus arthrosique demeure un axe de recherche actuel.

Le rôle de PPAR $\gamma$  comme activateur transcriptionnel de *pitx1* est d'ailleurs supporté expérimentalement à la **figure 3.7(a)**, qui présente l'activation de *pitx1* par l'agoniste spécifique de PPAR $\gamma$ , ainsi qu'une inhibition de l'expression de *pitx1* par des agonistes pharmacologique et physiologiques de ce facteur. De plus, les résultats de l'analyse de l'expression génique des isoformes de PPAR $\gamma$  chez les souris knock-out, *pitx1*<sup>+/-</sup> et de type sauvage (**figures 3.8**) ainsi que l'analyse de l'expression génique des isoformes de PPAR $\gamma$  dans des chondrocytes articulaires de sujets sains et de patients arthrosiques (**figure 3.9**) montrent respectivement une augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$  chez les souris hétérozygotes *pitx1*<sup>+/-</sup> en comparaison avec les souris de type sauvage, ainsi qu'une sur-expression de ce facteur dans le cartilage articulaire des patients arthrosiques par rapport aux sujets sains. Par ailleurs, il est important de souligner qu'il

est peu probable que ce mécanisme s'applique aux patients présentant une arthrose secondaire, soit aux athlètes, ou les patients ayant développé de l'arthrose suite à un traumatisme ou une maladie métabolique impliquant des facteurs inflammatoires qui favorise le développement de la maladie.

#### 4.1.3 Lien avec l'obésité

L'obésité est définie comme un excès pondéral important, soit un indice de masse corporel (IMC) supérieur à  $30\text{kg/m}^2$ , selon les normes fixées par l'OMS (World Health Organization, 1997) et l'International Obesity Task Force (1998). Il s'agit d'un vrai problème de santé publique, qui ne cesse de prendre de l'ampleur particulièrement dans les pays industrialisés. Les maladies qui se développent conséquemment à l'obésité, notamment l'arthrose, font de cette pathologie un vrai fardeau.

Le développement de l'arthrose est directement lié à une surcharge pondérale, d'une part par un excès de charge biomécanique sur les joints articulaires supportant cette charge comme les hanches et les genoux, mais également par la relation existant entre une augmentation de la différenciation des cellules adipocytaires conséquente à des taux anormaux d'hormones, de facteurs de croissance et de cytokines pro-inflammatoires sécrétés, et le développement de l'arthrose. Le rôle possible joué par PPAR $\gamma$  dans l'arthrose est appuyé par la relation existant entre l'augmentation de l'indice de masse corporel (IMC) et le risque accru d'arthrose conséquent (Marks et coll. 2002), ainsi que par la favorisation de la différenciation des adipocytes. D'après les résultats que nous avons obtenus, (**figure 3.9**), les patients arthrosiques présentent un taux élevé de PPAR $\gamma$  lorsque comparé aux sujets sains. Tous les patients analysés n'étant pas obèses, la forte expression de ce facteur ne peut résulter d'une masse adipocytaire élevée. De plus, l'expérience mettant en évidence une augmentation de l'expression des isoformes de PPAR $\gamma$ , observée parallèlement à l'inactivation d'un et de deux allèles de *pitx1* chez la souris, présente une relation évidente entre ces deux facteurs (**figure 3.8**).

Les analyses d'expression géniques illustrées à la **figure 3.7(a)** laissent donc supposer que PPAR $\gamma$  est essentiel pour le maintien de l'expression de *pitx1* dans le cartilage articulaire des os des membres inférieurs, soit le fémur et le tibia, durant la vie adulte. Il

est concevable que la sur-expression de PPAR $\gamma$  chez les patients arthrosiques soit le résultat d'une tentative de compenser l'absence de pitx1, au niveau cellulaire et tissulaire, probablement causée par une mutation dans l'élément de réponse à PPAR $\gamma$  dans la région promotrice de pitx1. Dans ce contexte, le phénotype observé sera un développement concomitant de l'arthrose et de l'obésité chez certains patients arthrosiques. Pour cette raison évidente, nous avons choisi pour nos analyses des patients arthrosiques obèse et non obèses, afin de caractériser ce mécanisme qui sous-tend le développement concomitant de ces deux pathologies.

D'après les résultats obtenus, il ne semble pas y avoir de différence significative dans l'expression des isoformes PPAR $\gamma$ 1 et PPAR $\gamma$ 2 chez les patients arthrosiques analysés (figure 3.9). Cependant, il est possible que le mécanisme de rétro-contrôle qui opère entre pitx1 et PPAR $\gamma$  ne concerne que l'isoforme PPAR $\gamma$ 2. En effet, l'isoforme PPAR $\gamma$ 2 contient 28 acides aminés supplémentaires à son extrémité NH<sub>2</sub>-terminal, ce qui lui confère une plus grande efficacité pour son domaine d'activation indépendant du ligand. De plus, nous avons identifié la présence d'un site de liaison de Pitx1 (TAATCC) dans la région régulatrice en amont du gène PPAR $\gamma$ 2, que l'on ne retrouve pas dans l'isoforme PPAR $\gamma$ 1.

Par ailleurs, PPAR $\gamma$ 2 est l'isoforme prépondérante exprimée chez les patients obèses. Compte tenu de l'échantillonnage de patients analysés, dont la majorité est arthrosiques et obèse, il est possible que le mécanisme que nous proposons implique principalement l'isoforme PPAR $\gamma$ 2. D'ailleurs, l'analyse de l'expression de ces isoformes chez les souris nouveaux-nés pitx1<sup>+/-</sup> et pitx1<sup>-/-</sup> montre une augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$ 2 en fonction du nombre de copie du gène Pitx1, alors que l'isoforme PPAR $\gamma$ 1 n'est augmentée que chez les souris KO

#### 4.1.4 Caractérisation d'un élément de réponse à PPAR $\gamma$ par analyse du séquençage

Comme la majorité des récepteurs nucléaires, PPAR $\gamma$  active la transcription en se liant à une séquence consensus dans la région promotrice ou intronique du gène cible. Cet élément de réponse à PPAR $\gamma$ , PPRE, est présent dans les régions régulatrices situées en amont du gène pitx1. Par analyse bio-informatique, plusieurs sites PPREs potentiels

selon les critères de définition généraux, ont été identifiés, et en vérifiant la conservation de ces sites entre l'homme et la souris, nous avons pu sélectionner les séquences les plus conservées (**figure 3.10**). Nous avons donc mis en évidence cinq séquences PPRE consensus, quatre au niveau du promoteur, et une au niveau du second intron, que nous avons amplifiées et séquencées avec de l'ADN génomique issu d'un panel de patients arthrosiques obèses ou non. Le **tableau 3.1**. présente les altérations observées dans la séquence du PPRE situé en P2 (entre -1349 et -1324 pb). Les deux autres séquences PPRE potentielles situées en P2 (entre -1268 et -1243 ainsi que -1220 et -1195 pb), la séquence en P3, ainsi que la séquence au niveau du second intron (I4) ne présentent pas de modification chez les patients arthrosiques obèses ou pas lorsque comparé à la séquence normale et aux sujets sains (**tableau 3.2, 3.3, 3.4, 3.5**).

Le polymorphisme observé en P2 (AGGACA → ATGACA) est présent chez 4/10 patients arthrosiques et obèses analysés ainsi que chez 2/8 sujets sains analysés. On remarque également une mutation dans le nucléotide d'espacement pour le patient #7, soit la séquence DR1 avec un C qui devient un IR2 avec CT.

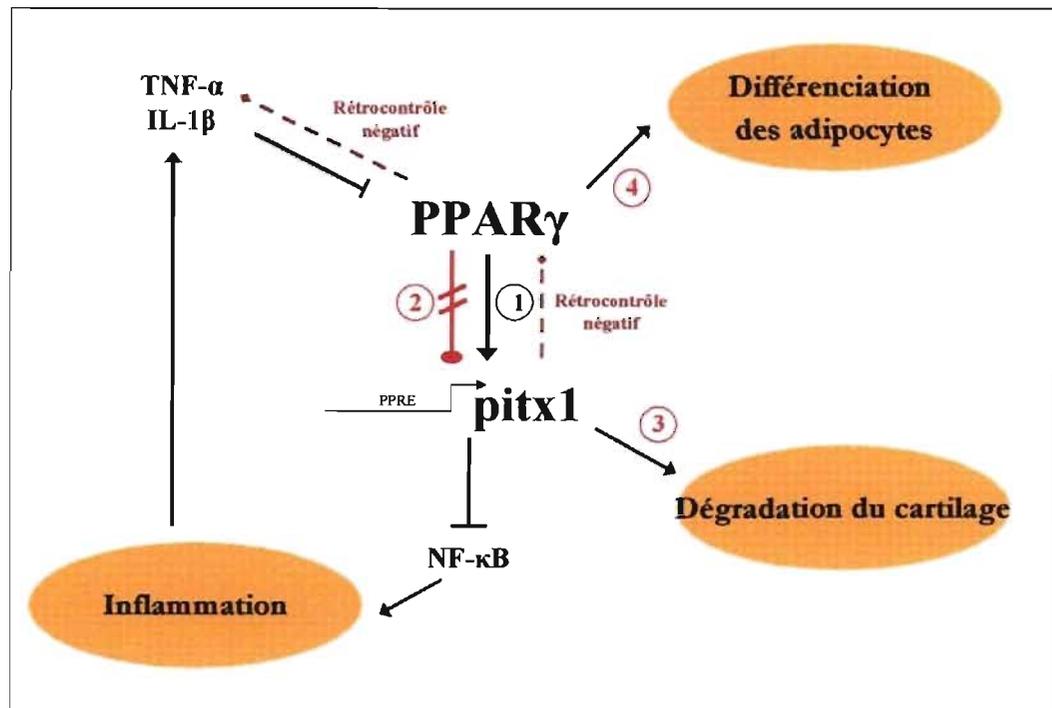
Lorsque l'on se penche sur la date de début d'obésité des patients arthrosiques et obèses présentant la mutation, on observe que ces derniers ont présenté un excès pondéral très tôt, vers 25 ans, contrairement aux patients ayant une séquence non altérée, qui sont devenus obèses vers 55-60 ans. Cela pourrait signifier que les patients présentant une altération dans leur séquence présenteraient une expression élevée précoce de PPAR $\gamma$ . La conséquence de cette mutation sur ce site de pitx1 expliquerait le développement précoce d'arthrose et d'obésité chez ces patients. On suppose par ailleurs que les patients ne présentant pas la mutation dans ce PPRE ont pu maintenir un certain niveau d'expression de pitx1 qui a diminué avec le temps, ce qui a altéré le taux de PPAR $\gamma$  plus tardivement, soit un développement plus tardif de l'obésité. Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'on observe aucune différence significative en fonction du sexe.

Cependant, il semble prématuré d'associer ce polymorphisme au développement conséquent de l'arthrose, et on ne peut conclure que ce site PPRE est responsable du défaut d'activation de pitx1. D'autre part, il serait intéressant de déterminer si cette mutation existe sous la forme hétérozygote ou homozygote.

#### 4.1.5 Caractérisation d'une cascade moléculaire impliquée dans la pathogenèse de l'arthrose

Les résultats présentés au cours de ce mémoire ont permis de mettre en évidence pour la première fois une perte d'expression de *pitx1* chez les patients arthrosiques ainsi qu'une augmentation concomitante de l'expression de PPAR $\gamma$ . Nous avons postulé que PPAR $\gamma$  est essentiel au maintien de l'expression de *pitx1* dans la vie adulte, et que la surexpression des isoformes  $\gamma 1$  et/ou  $\gamma 2$  pourrait être causée par une mutation dans un élément de réponse à PPAR $\gamma$  (PPRE), se trouvant dans la région promotrice ou intronique du gène *pitx1*. Si PPAR $\gamma$  est le régulateur transcriptionnel de *pitx1*, comment expliquer sa faible expression parallèle à la forte expression de *pitx1* ? Nous supposons qu'il existe un mécanisme impliquant une boucle de rétrocontrôle entre ces facteurs, tel que schématisé à la **figure 4.1**.

Chez les sujets sains, PPAR $\gamma$  est capable d'activer la transcription, en se liant à un élément de réponse PPRE sur *pitx1*. On observe alors une expression élevée de *pitx1* qui favorise le phénotype normal de l'os et de la chondrogenèse, ainsi qu'une absence d'inflammation, via l'inhibition du facteur NF- $\kappa$ B. Nous supposons que chez les sujets sains, *pitx1* est capable d'exercer une boucle de rétrocontrôle négative sur PPAR $\gamma$ , ce qui maintient une expression élevée de *pitx1*, ainsi qu'une faible expression de PPAR $\gamma$ . Chez les patients arthrosiques, PPAR $\gamma$  n'est plus capable d'activer l'expression de *pitx1*, à cause d'une mutation dans un PPRE présent dans la région promotrice du gène *pitx1*. L'absence d'expression de *pitx1* empêche le rétrocontrôle sur PPAR $\gamma$ , ce qui résulte en une augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$ . La perte d'expression de *pitx1* ne permet plus un maintien adéquat des structures osseuses et cartilagineuses, d'où le probable développement de l'arthrose. Ce mécanisme est dû au défaut d'activation de transcription de *pitx1*, qui se développe progressivement pendant la vie adulte, ce qui explique pourquoi les patients arthrosiques n'ont pas de malformations telles que celles observées chez les souris *pitx1* knock-out. Chez les sujets sains, le rétrocontrôle exercé entre *pitx1* et PPAR $\gamma$  permet d'éviter la sur-expression de PPAR $\gamma$ , alors que chez les patients arthrosiques, PPAR $\gamma$  est fortement exprimé, ce qui entraîne le développement concomitant de l'obésité puisque PPAR $\gamma$  stimule la voie de différenciation des adipocytes. De plus, le défaut d'expression de *pitx1* ne permet plus d'inhiber le facteur NF- $\kappa$ B, ce qui va se traduire par de l'inflammation, tel que retrouvé dans les cas d'arthrose.



**Figure 4.1 : Cascade moléculaire impliquée dans la pathogenèse arthrosique.** Chez les sujets sains, PPAR $\gamma$  est capable d'activer la transcription de pitx1 (1), ce dernier peut alors exercer un rétrocontrôle négatif sur PPAR $\gamma$ . Chez les patients arthrosiques, PPAR $\gamma$  est incapable d'activer la transcription de pitx1 (2), suite à une mutation dans l'élément de réponse PPRE situé dans la région promotrice de pitx1. La perte d'expression de pitx1 favorise la dégradation du cartilage articulaire, possiblement via la modulation anormale de plusieurs gènes situés en aval de ce facteur de transcription (3). De plus, le mécanisme de rétrocontrôle sur PPAR $\gamma$  ne peut avoir lieu, ce qui augmente fortement l'expression de ce dernier, et favorise ainsi la voie de différenciation des adipocytes (4).

## 4.2. Aspect clinique

### 4.2.2 PPAR $\gamma$ , une cible thérapeutique potentielle

Les thiazolidinediones sont une classe de composés possédant des propriétés chondroprotectrices, tel que mentionné dans les cas d'arthrite rhumatoïde chez les rats (Missbach et coll. 1996 ; Kawahito et coll. 2000). La majorité des molécules dérivées de cette famille sont actuellement utilisées comme agents anti-diabétiques, contre le diabète de type 2 non-insulino dépendant. Ces médicaments, approuvés par la FDA (Actos®, Avandia®), mentionnent clairement dans leurs effets secondaires une prise pondérale plus ou moins importante. Il est d'ailleurs connu que les personnes utilisant cette sorte de composé ont tendance à grossir. Cela n'est pas étonnant compte tenu du fait que ces molécules sont des agonistes de PPAR $\gamma$ , d'où leur propriété de favoriser la voie de différenciation des cellules du mésenchyme préférentiellement en adipocytes. La recherche s'attelle à développer des molécules plus spécifiques, afin de dissocier l'action anti-diabétique de ces composés des effets indésirables tels qu'une surcharge pondérale.

Tel que souligné par l'équipe de Lecka-Czernick et coll. (2002), les effets pro-adipogéniques et anti-ostéoblastogéniques de PPAR $\gamma$ 2 sont médiés par deux voies distinctes de stimulation des cellules du mésenchyme. Ces observations confirment la nécessité de développer de molécules plus spécifiques, favorisant l'une ou l'autre voie de différenciation. De plus, tel que suggéré par Murphy et coll. (2002), l'augmentation de la densité osseuse et la perte de cartilage caractéristiques de l'arthrose pourraient être la conséquence de changements dans le profil de différenciation des cellules progénitrices qui contribuent au maintien de l'homéostasie de ces tissus. Toutes ces données suggèrent que l'administration d'agonistes de PPAR $\gamma$  pour le rétablissement de la balance ostéoblaste/adipocyte peut présenter de nombreux effets indésirables.

Il est concevable que l'administration de composés tels que les dérivés des thiazolidinediones (TZD) dans le but de protéger les cartilages via l'activation de pitx1, ne devrait pas être appliquée aux patients présentant des mutations dans un PPRE activant l'expression de pitx1, compte tenu de l'incapacité de PPAR $\gamma$  de se lier aux PPRE présents dans le promoteur de pitx1, à cause de la mutation présumée sur

l'élément de réponse à PPAR $\gamma$ . Ces composés, agonistes de PPAR $\gamma$ , ne devraient que contribuer à développer d'avantage l'obésité de ces patients. Cependant, dans les cas d'arthrose secondaire causés par une sur-utilisation de la jonction articulaire pour les athlètes, ou chez les obèses métaboliques, on encore en cas de blessure, les TZDs pourraient être bénéfiques parce qu'ils vont réactiver et/ou maintenir un niveau adéquat de pitx1, puisque chez ces patients, les PPREs identifiés devraient toujours être fonctionnels. Malheureusement, étant donné la lente progression de la maladie, les répercussions cliniques de l'utilisation des thiazolidinediones sur les os ne sont pas encore connues.

#### **4.3. Perspectives**

##### **4.3.1 Détermination de la fonctionnalité d'un PPRE :**

Afin de déterminer si les sites PPREs analysés sont fonctionnels ou non, il sera nécessaire d'avoir recours à une étude de fonctionnalité pour chacun de ces éléments de réponse. Pour ce faire, nous proposons de compléter ces études par des méthodes de retard sur gel (EMSA) et de transfections transitoires, à l'aide de constructions contenant le PPRE muté cloné en amont d'un gène rapporteur luciférase. De plus, des analyses par dHPLC devront être réalisées afin de déterminer si le polymorphisme observé en P2 existe sous forme hétérozygote ou homozygote.

##### **4.3.2 Une nouvelle cible de recherche et de traitement**

Cette étude contribue à illustrer la complexité des mécanismes à l'origine du développement et de la progression de l'arthrose. Cette maladie, d'origine multifactorielle, ne peut être traitée qu'en tenant compte de l'environnement génétique et pathologique favorisant son développement tel que souligné pour l'obésité dans cette étude, d'où la nécessité de prendre en compte ces problèmes associés lors de l'administration de médicaments. Nous avons démontré, pour la première fois, le rôle clé joué par le facteur de transcription pitx1 et sa relation avec PPAR $\gamma$  dans cette maladie, ce qui pourrait expliquer le développement concomitant de l'arthrose et de

l'obésité. Cela pourrait favoriser le développement de techniques de diagnostic génétique pour prédire une susceptibilité et une progression de la maladie basée sur l'identification de ces mutations.

D'autre part, une meilleure connaissance de la fréquence du polymorphisme identifié sur le PPRE en P2 serait importante afin de déterminer s'il existe sous forme hétérozygote ou homozygote.

De plus, une étude plus approfondie d'autres éléments de réponse putatifs sur le pitx1 pourrait servir à des tests génétiques pour identifier les individus présentant un risque de développer précocement de l'arthrose et une obésité associée. Ce test permettrait de mieux sélectionner les patients pour qui l'administration de TZD serait bénéfique. Par ailleurs, il serait intéressant de savoir s'il est possible de réactiver l'expression de pitx1 chez des individus arthrosiques en utilisant des facteurs de transcription qui normalement n'opèrent qu'au cours de l'embryogenèse et qui seraient réactivés par des drogues n'ayant pas d'effet sur PPAR $\gamma$ .

**BIBLIOGRAPHIE**

Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung UI, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, Kadowaki T et Kawaguchi H. PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest.* 113 (2004), 846-55

Altman R, Alarcon G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, Brown C, Cooke TD, Daniel W, Feldman D et coll. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum.* 34 (1991), 505-14

Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, et coll. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum.* 29 (1986), 1039-49

Aranda A et Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* 81 (2001), 1269-12304

Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M et Vidal H. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor- $\alpha$  in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes*, 48 (1997), 1319-1327

Ayral X. Injections in the treatment of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 15 (2001), 609-26

Ballock RT et O'Keefe RJ. The biology of the growth plate. *J Bone Joint Surg Am.* 85 (2003), 715-724

Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B et Glineur C. Peroxisome proliferator-activated receptors : regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 85 (2003), 267-273

Boorman CJ et Shimeld SM. The evolution of left-right asymmetry in chordates. *Bioessays*, 24 (2002), 1004-11

Bordji K, Grillasca JP, Gouze JN, Magdalou J, Schohn H, Keller JM, Bianchi A, Dauca M, Netter P et Terlain B. Evidence of the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  and  $\gamma$  and retinoid Z receptor in cartilage. *JBC*, 275 (2000), 12243-50

Boyault S, Simonin MA, Bianchi A, Compe E, Liagre B, Mainard D, Becuwe P, Dauca M, Netter P, Terlain B et Bordji K. 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2, but not troglitazone, modulates IL-1beta effects in human chondrocytes by inhibitiong NF-kappaB and AP-1 activation pathways. *FEBS Lett.* 501 (2001), 24-30

Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauça M et Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPARs) : tissue distribution of PPAR- $\alpha$ , - $\beta$  and - $\gamma$  in the adult rat. *Endocrinology*, 137 (1996), 354-366

Buckwalter JA et Lane LE. Athletics and osteoarthritis. *Am J Sports Med.* 25 (1997), 873-81

Burmester GR, Stuhlmuller B, Keyszer G et Kinne RW. Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum.* 40 (1997); 5-18.

Carman WJ, Sowers MF, Hawthorne WM et Weissfeld LA. Obesity as a risk factor for osteoarthritis of the hand and wrist: a prospective study. *Am J Epidemiol.* 139 (1994), 119-29

Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Tardif G, Mineau F, Geng C et Pelletier JP. Chondroprotective effect of intra-articular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum.* 39 (1996), 1535-44

Carrington JL. Aging bone and cartilage: cross-cutting issues. *Biochem Biophys Res Commun.* 18 (2005), 700-8

Centrella M, McCarthy TL et Canalis E. Tumor necrosis factor-alpha inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity independently of its effect on deoxyribonucleic acid synthesis in osteoblast-enriched bone cell cultures. *Endocrinology.* 123 (1988), 1442-1448

Chambers MG, Kuffner T, Cowan SK, Cheah KSE et Mason RM. Expression of collagen and aggrecan genes in normal and osteoarthritic murine knee joints. *Osteoarthritis Cartilage* 10 (2002), 51-61

Crawford MJ, Lanctôt C, Tremblay JJ, Jenkins N, Gilbert D, Copeland N, Beatty B et Drouin J. Human and murine PTX1/Ptx1 gene maps to the region for Treacher Collins syndrome. *Mamm Genome*, 8 (1997), 841-845.

Day RN, Koike S, Sakai M, Muramatsu M et Maurer RA. Both Pit-1 and the estrogen receptor are required for estrogen responsiveness of the rat prolactin gene. *Mol Endocrinol.* 4 (1990), 1964-1971

Debril MB, Renaud JP, Fajas L et Auwerx J. The pleiotropic functions of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *J Mol Med.* 47 (2001), 30-47

Desvergne B et Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors : nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 20 (1999), 649-688

Fahmi H, Di Battista JA, Pelletier JP, Mineau F, Ranger P et Martel-Pelletier J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 44 (2001), 595-607

Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H et Auwerx J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem.* 272 (1997), 18779-89

Felson DT, Hannan MT, Naimark A, Berkeley J, Gordon G, Wilson PW et coll. Occupational physical demands, knee bending, and knee osteoarthritis: results from the Framingham Study. *J Rheumatol.* 18 (1991), 1587-92

Felson, McAlindon, Lawrence, Dieppe, Hirsch, Helmick, Jordan, Kington, Lane, Nevitt, Zhang, Sowers, Spector, Poole, Yanovski, Ateshian, Sharma, Buckwalter, Brandt et Fries. Osteoarthritis: new insights. Part 1: The disease and its risk factors. *Ann Intern Med.* 133 (2000), 635-646

Felson, McAlindon, Lawrence, Hochberg, Dieppe, Minor, Blair, Berman, Fries, Weinberger, Lorig, Jacobs et Goldberg. Osteoarthritis: New insights. Part 2: Treatment approaches. *Ann Intern. Med.* 133 (2000), 726-737

Flannelly J, Chambers MG, Dudhia J, Hembry RM, Murphy G, Mason RM et Bayliss MT. Metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in the murine STR/ort model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 10 (2002), 722-733

François M, Richette P, Tsagris L, Raymondjean M, Fulchignoni-Lataud MC, Forest C, Savouret JF et Corvol MT. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  down-regulates

chondrocyte matrix metalloproteinase-1 via a novel composite element. *J Biol Chem.* 279 (2004), 28411-28418

Fuchs S, Skwara A, Bloch M et Dankbar B. Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage*, 12 (2004), 409-18

Gage PJ et Camper SA. Pituitary homeobox 2, a novel member of the bicoid-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. *Hum. Mol. Genet.* 6 (1997), 457-464

Galetto R, Albajar M, Polanco JI, Zakin MM et Rodriguez-Rey JC. Identification of a peroxisome-proliferator-activated-receptor response element in the apolipoprotein E gene control region. *Biochem J.* 357 (2001), 521-7.

Gampe RT Jr, Montana VG, Lambert MH, Miller AB, Bledsoe RK, Milburn MV, Kliewer SA, Willson TM et Xu HE. Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of the heterodimerization among nuclear receptors. *Mol Cell.*, 5 (2000), 545-555

Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, Affolter M, Otting G et Wuthrich K. Homeodomain-DNA recognition. *Cell*, 78 (1994), 211-23

Ghosh P, Smith M. Osteoarthritis, genetic and molecular mechanisms. *Biogerontology*, 3 (2002), 85-8

Ghosh S et Natarajan R. Cloning of the human cholesteryl ester hydrolase promoter : identification of functional peroxisomal proliferator-activated receptor responsive elements. *Biochem Biophys Res Commun.* 284 (2001), 1065-1070

Girard J. Mechanisms of action of thiazolidinediones. *Diabetes Metab.* 27 (2001), 271-8

Gokhale JA, Frenkel SR et Dicesare PE. Estrogen and osteoarthritis. *Am J Orthop.* 33 (2004), 71-80

Goldring MB. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep.* 2 (2000), 459-65

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

Greenwald RA et Moy WW. Inhibition of collagen gelation by action of the superoxide radical. *Arthritis Rheum.* 22 (1979), 251-9

Hansmannel F, Clémencet MC, Le Jossic-Corcoc C, Osumi T, Latruffe N et Nicolas-Francés V. Functional characterization of a peroxisome proliferator response-element located in the intron 3 of rat peroxisomal thiolase B gene. *Biochem Biophys Res Comm.* 311 (2003), 149-155

Haq I, Murphy E et Dacre J. Osteoarthritis. *Postgrad Med J.* 79 (2003), 377-383

Helledie T, Gróntved L, Jensen SS, Kiilerich P, Rietveld L, Albrektsen T, Boysen MS, Nóhr J, Larsen LK, Fleckner J, Stunnenberg HG, Kristiansen K et Mandrup S. The gene encoding the Acyl-CoA-binding protein is activated by peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  through an intronic response element functionally conserved between humans and rodents. *J Biol Chem.* 277 (2002), 26821-26830

Heyll U, Munnich U et Senger V. Proteolytic enzymes as an alternative in comparison with nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) in the treatment of degenerative and inflammatory rheumatic disease: systemic review. *Med. Klin. (Munich)*, 98 (2003), 609-15

Hill M, Young M, McCurdy C et Gimble J. Decreased expression of murine PPAR $\gamma$  in adipose tissue during endotoxemia. *Endocrinology*. 138 (1997), 3073–3076

Hughes R et Carr A. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of glucosamine sulphate as an analgesic in osteoarthritis of the knee. *Rheumatology (Oxford)* 41 (2002), 279–84.

Ijpenberg A, Jeannin E, Wahli W et Desvergne B. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem*. 272 (1997), 20108-20117

Jackson SM et Demer L. Peroxisome proliferator-activated receptor activators modulate the osteoblastic maturation of MC3T3-E1 preosteoblasts. *FEBS Letters* 471 (2000), 119-124

Jamard B, Verrouil E et Mazières B. Formes cliniques dela gonarthrose. *Rev. Rhum.* 67, suppl. 3 (2000), 149-53

Ji JD, Cheon H, Jun JB, Choi SJ, Kim YR, Lee YH, Kim TH, Chae IJ, Song GG, Yoo DH, Kim SY et Sohn J. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) on the expression of inflammatory cytokines and apoptosis induction in rheumatoid synovial fibroblasts and monocytes. *J Autoimmun.* 17(2001), 215-21

Jiang C, Ting AT et Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 391 (1998), 82-86

Jiang JG, Johnson C et Zarnegar R. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  mediated transcriptional up-regulation of the hepatocyte growth factor gene promoter via a novel composite *cis*-acting element. *J Biol Chem*. 276 (2001), 25049-25056

Johnson TE, Vogel R, Rutledge SJ, Rodan G et Schmidt A. Thiazolidinedione effects on glucocorticoid receptor-mediated gene transcription and differentiation in osteoblastic cells. *Endocrinology*, 140 (1999), 3245-54

Juge-Aubry C, Pernin A, Favez T, Burger AG, Wahli W, Meier CA et Desvergne B. DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem*. 272 (1997), 25252-25259

Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Bishop-Bailey D, Inoue K, Kohno M, Yamada R, Hla T et Sano H. 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest*. 106 (2000), 189-97

Khan E et Abu-Amer Y. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  inhibits differentiation of preosteoblasts. *J. Lab Clin Med*. 142 (2003), 29-34

Klippel JH, Crofford L, Stone J et Weyand C. Primer on the rheumatic diseases, Edition 12. Published by Arthritis foundation (2001).

Kudo M, Sugawara A, Uruno A, Takeuchi K et Ito S. Transcription suppression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 gene expression by tumor necrosis factor alpha via an inhibition of CCAAT/ enhancer-binding protein delta during the early stage of adipocyte differentiation. *Endocrinology*, 145 (2004), 4948-56

Lanctôt C, Gauthier Y et Drouin J. Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. *Endocrinology*, 140 (1999), 1416-1422

Lanctôt C, Moreau A, Chamberland M, Tremblay ML et Drouin J. Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development*, 126 (1999) 1805-1810

Lebel M, Gauthier Y, Moreau A et Drouin J. Pitx3 activates mouse tyrosine hydroxylase promoter via a high-affinity binding site. *J Neurochem.* 77 (2001), 558-67

Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman EJ, Kajkenova O, Lipschitz DA, Manolagas SC et Jilka RL. Inhibition of Osf2/Cbfa1 expression and terminal osteoblast differentiation by PPARgamma2. *J Cell Biochem.* 74 (1999), 357-71

Lecka-Czernik B, Moerman EJ, Grant DF, Lehman JM, Manolagas SC et Jilka RL. Divergent effects of selective peroxisome proliferators-activated receptor- $\gamma$ 2 ligands on adipocytes versus osteoblast differentiation. *Endocrinology*, 143 (2002), 2376-2384

Lee YJ, Lee EB, Kwon YE, Lee JJ, Cho WS, Kim HA et Song YW. Effect of estrogen on the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3, and MMP-13 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in osteoarthritis chondrocytes. *Rheumatol Int.* 23 (2003), 282-8.

Loeser RF Jr. Aging cartilage and osteoarthritis. – What's the link? *Sci. Aging Knowledge Environ.* 29 (2004), PE31

Logan M et Tabin C. Role of Pitx1 upstream of TBx4 in specification of hindlimb identity. *Science*, 283 (1999), 1736-1739

Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L et Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am.* 53 (1971), 523-37

Manninen P, Riihimaki H, Hellovaara M et Makela P. Overweight, gender and knee osteoarthritis. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 20 (1996), 595-7

Marcil A, Dumontier E, Chamberland M, Camper SA et Drouin J. Pitx1 and Pitx2 are required for development of hindlimb buds. *Development*, 130 (2003), 45-55

Marks R et Allegrante JP. Body mass indices in patients with disabling hip osteoarthritis. *Arthritis Res.* 4 (2002), 112-6

Martel-Pelletier J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 12 (2004), 31-3

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

Mason RM, Chambers MG, Flannelly J, Gaffen JD, Dudhia J et Bayliss MT. The STR/ort mouse and its use as a model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 9 (2001), 85-91

McAlindon TE, LaValley MP, Gulin JP, et coll. Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assessment and meta-analysis. *JAMA*, 283 (2000) 1469–75

Missbach M, Jagher B, Sigg I, Nayeri S, Carlberg C et Wiesenberg I. Thiazolidine diones, specific ligands of the nuclear receptor retinoid Z receptor/retinoid acid receptor-related orphan receptor  $\alpha$  with potent antiarthritic activity. *J Biol Chem.* 271 (1996), 13515-22

Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, Geoghegan KF et Hambor JE. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest.* 97 (1996), 761-768

Mori S, Haruff R et Burr DB. Microcracks in articular calcified cartilage of human femoral heads. *Arch Pathol lab Med.* 117 (1993), 196-8

Mukherjee R, Jow I, Croston GE et Paterniti Jr JR. Identification, characterization and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPAR $\gamma$ 2 versus PPAR $\gamma$ 1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem.* 272 (1997), 8071-8076

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

Neame R, Zhang W, Deighton C, Doherty M, Doherty S, Lanyon P et Wright G. Distribution of radiographic osteoarthritis between the right and left hands, hips, and knees. *Arthritis Rheum.* 50 (2004), 1487-1494

Neuhold LA, Killar L, Zhao W, Sung MLA, Warner L, Kulik J, Turner J, Wu W, Billingham C, Meijers T, Poole AR, Babij P et DeGennaro LJ. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest.* 107 (2001), 35-44

Nguewa PA, Fuertes MA, Valladares B, Alonso C et Perez JM. Poly(ADP-ribose) polymerases: homology, structural domains and functions. Novel therapeutical applications. *Prog Biophys Mol Biol.* 88 (2005), 143-72

Nuttall ME et Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol.* 4 (2004), 290-294

Ortega N, Behonick DJ et Werb Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol.* 14 (2004), 86-93

Palmer CN, Hsu MH, Griffin HJ et Johnson EF. Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling. *J Biol Chem.* 270 (1995), 16114-21

Pei L et Tontonoz P. Fat's loss is bone's gain. *J Clin Invest.* 113 (2004), 805-806

Radin EL, Abernethy PJ, Townsend PM et Rose RM. The role of bone changes in the degeneration of articular cartilage in osteoarthritis. *Acta Orthop Belg.* 44 (1978), 55-63

Radin EL et Rose RM. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop Relat Res.* 213 (1986), 34-40

Reginster JY, Deroisy R, Rovati LC, et coll. Long term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression. A randomised, placebo controlled trial. *Lancet*, 357 (2001), 251-6

Reijman M, Hazes JMW, Koes BW, Verhagen AP et Bierma-Zeinstra SMA. Validity, reliability, and applicability of seven definitions of hip osteoarthritis used in epidemiological studies: a systematic appraisal. *Ann Rheum Dis.* 63 (2004), 226-232

Richette P, Corvol M et Bardin T. Estrogens, cartilage and osteoarthritis. *Joint Bone Spine.* 70 (2003), 257-62

Richmond RS, Carlson CS, Register TC, Shanker G et Loeser RF. Functional estrogen receptors in adult articular cartilage: estrogen replacement therapy increases chondrocyte synthesis of proteoglycans and insulin-like growth factor binding protein 2. *Arthritis Rheum.* 43 (2000), 2081-90

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ et Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, 391 (1998), 79-82

Rountree RB, Schoor M, Chen H, Marks ME, Harley V, Mishina Y et Kingsley DM. BMP receptor signaling is required for postnatal maintenance of articular cartilage. *PLoS Biol.* 2 (2004), 1815-1827

Rzonca SO, Suva LJ, Gaddy D, Montague DC et Lecka-Czernik B. Bone is a target for the antidiabetic compound rosiglitazone. *Endocrinology*, 145 (2004), 401-6

Sabatini M, Bardirot A, Lesur C, Moulharat N, Thomas M, Richars I et Fradin A. Effects of agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on proteoglycan degradation and matrix metalloproteinase production in rat cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*, 10 (2002), 673-679

Sarapura VD, Strouth HL, Wood WM, Gordon DF et Ridgway EC. Activation of the glycoprotein hormone  $\alpha$ -subunit gene promoter in thyrotropes. *Mol Cell Endocrinol*. 146 (1998), 77-86

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res*. 37 (1996), 907-25

Semina EV, Ferrell RE, Mintz-Hitter HA, Bitoun P, Alward WL, Reiter RS, Funkhauser C, Daack-Hirsch S et Murray JC. A novel homeobox gene PITX3 is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD. *Nat Genet*. 19 (1998), 167-70.

Semina EV, Reiter R, Leysens NJ, Alward WL, Small KW, Datson NA, Siegel-Bartelt J, Bierke-Nelson D, Bitoun P, Zabel BU, Carey JC et Murray JC. Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat Genet*. 14 (1996), 392-9

Shum L et Nuckolls G. The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton. *Arthritis Res*. 4 (2002), 94-106

Silver FH, Bradica G et Tria A. Relationship among biomechanical, biochemical, and cellular changes associated with osteoarthritis. *Crit Rev Biomed Eng*. 29 (2001), 373-91

Smidt MP, Smits SM et Burbach JP. Homeobox gene Pitx3 and its role in the development of dopamine neurons of the substantia nigra. *Cell Tissue Res.* 318 (2004) 35-43

Symmons D, Mathers C et Pflieger B. Global burden of osteoarthritis in the year 2000. World Health Organization report, Geneva (2002)

Szeto DP, Rodriguez-Esteban C, Ryan AK, O'Connell SM, Liu F, Kioussi C, Gleiberman AS, Izpisua-Belmonte JC et Rosenfeld MG. Role of the bicoid-related homeodomain factor Ptx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev.* 13 (1999), 484-494

Tatusova TA et Madden TL. "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", *FEMS Microbiol Lett.* 174 (1999), 247-250

Temple KA, Cohen RN, Wondisford SR, Yu C, Deplewski D et Wondisford FE. An intact DNA-binding domain is not required for PPAR $\gamma$  binding and activation on some PPAR response elements. *J Biol Chem.* 280 (2005), 3529-40

Tepper S et Hochberg MC. Factors associated with hip osteoarthritis: data from the first National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES-1). *Am J Epidemiol.* 137 (1993) 1081-8

Tremblay JJ, Marcil A, Gauthier Y et Drouin J. Ptx1 regulates SF-1 activity by an interaction that mimics the role of the ligand-binding domain. *EMBO J.* 18 (1999), 3431-3441

Trippel SB, Ghivizzani SC et Nixon AJ. Gene-based approaches for the repair of articular cartilage. *Gene Ther.* 11 (2004), 351-359

Valdes AM, Hart DJ, Jones KA, Surdulescu G, Swarbrick P, Doyle DV, Schafer AJ et Spector TD. Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 50 (2004), 2497-2507

Varanasi U, Chu R, Huang Q, Castellon R, Yeldandi AV et Reddy JK. Identification of a peroxisome proliferators-responsive element upstream of the human peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase gene. *J Biol Chem.* 271 (1996), 2147-2155

Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF et Flier JS. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest.* 99 (1997), 2416-2422

Woodyatt NJ, Lambe KG, Myers KA, Tugwood JD et Roberts RA. The peroxisome proliferator (PP) response element upstream of the human acyl CoA oxidase gene is inactive among a sample human population: significance for species differences in response to PPs. *Carcinogenesis*, 20 (1999), 369-372

World Health Organization, 1997. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva, June 3-5

Wright HM, Clish CB, Mikami T, Hauser S, Yanagi K, Hiramatsu R, Serhan CN et Spiegelman BM. A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 275 (2000), 1873-1877

Xing H, Northrop JP, Grove JR, Kilpatrick KE, Su JL et Ringold GM. TNF $\alpha$ -mediated inhibition and reversal of adipocyte differentiation is accompanied by suppressed expression of PPAR $\gamma$  without effects on Pref-1 expression. *Endocrinol.* 138 (1997), 2776-2783

Youssef J et Badr M. Role of peroxisome proliferators-activated receptors in inflammation control. *J Biomed Biotechnol.* 3 (2004), 156-166

Zhang B, Marcus SL, Sajjadi FG, Alvares K, Reddy JK, Subramani S, Rachubinski R et Capone JP. Identification of a peroxisome proliferators-responsive element upstream of the gene encoding rat peroxisomal enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *PNAS*, 89 (1992), 7541-7545

Zhang W et Dziak R. Tumor necrosis factor alpha stimulates arachidonic acid metabolism in human osteoblastic osteosarcomal cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 54 (1996), 427-31

Zhang Y, Hannan MT, Chaisson CE, Mc Alidon TE, Evans SR, Aliabadi P et coll. Bone mineral density and risk of incident and progressive radiographic knee osteoarthritis in women : the Framingham Study. *J. Rheumatol*. 27 (2000), 1032-7

Zhang Y, Niu J, Kelly-Hayes M, Chaisson CE, Aliabadi P et Felson DT. Prevalence of symptomatic hand osteoarthritis and its impact on functional status among the elderly: The Framingham Study. *Am J Epidemiol*. 156 (2002), 1021-7