

Université de Montréal

Étude de la régulation transcriptionnelle du gène Indian Hedgehog
et de son rôle dans l'ostéoarthrose

par

Lauriane BERNARD

Département de Biochimie

Faculté de Médecine, Université de Montréal

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Science
en Biochimie

Février, 2011

© Lauriane Bernard, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Étude de la régulation transcriptionnelle du gène Indian Hedgehog
et de son rôle dans l'ostéoarthrose

Présenté par :
Lauriane BERNARD

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Guy BOILEAU, président-rapporteur
Dr Alain MOREAU, directeur de recherche
Dr Stéphane ROY, membre du jury

Résumé

Introduction : L'Ostéoarthrose (OA) est une maladie articulaire entraînant une dégénérescence du cartilage et une ossification de l'os sous-chondral. Elle touche un Canadien sur 10 et pourtant l'origine de cette pathologie est encore inconnue. Dans le cadre de ce projet, la contribution de deux facteurs de transcription, NFAT1 et PITX1, dans la régulation transcriptionnelle du promoteur d'*IHH* a été examinée compte tenu de l'implication potentielle de la voie hedgehog (Hh) et de ces facteurs dans la pathogenèse de l'OA. La voie de signalisation Hh régule la croissance et la différenciation des chondrocytes. Indian hedgehog (IHH), l'un des trois membres de la famille Hh, contrôle leur prolifération et leur différenciation.

Méthode et Résultats : Un fragment de 5 kpb du promoteur murin d'*Ihh* a été cloné en amont du gène rapporteur luciférase dans le vecteur pGL3. Des analyses *in silico* ont permis l'identification de sites de liaisons conservés pour NFAT1 et PITX1 sur la séquence promotrice d'*Ihh*. Des co-transfections avec NFAT1, un répresseur de la croissance et de la différenciation cellulaire dans le cartilage, ont conduit à une inhibition de l'activité du promoteur d'*Ihh* dans les ostéoblastes et à une activation dans les chondrocytes articulaires. Les mêmes expériences avec PITX1, un facteur de transcription impliqué dans le développement des membres inférieurs et dans le maintien de la fonction cartilagineuse, montrent une activation significative de l'activité du promoteur d'*Ihh* dans les chondrocytes. L'atténuation de l'expression de NFAT1 par une approche de RNAi concorde avec une surexpression d'*Ihh* dans les ostéoblastes et une diminution de son expression dans les chondrocytes. La fonctionnalité d'un des sites consensus NFAT1 au promoteur d'*IHH* a été validée par un essai d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Le cartilage articulaire arthrosique présente un haut niveau de chondrocytes pré-hypertrophiques. L'approche par RT-qPCR a révélé une répression de la voie Hh ainsi qu'une inhibition de l'expression de NFAT1 et de PITX1 chez les patients OA comparativement aux témoins non OA.

Conclusion : Ces travaux ont permis de mettre en évidence deux nouveaux régulateurs transcriptionnelle du gène *IHH*, NFAT1 et PITX1. Ces deux derniers activent *IHH* dans les chondrocytes et NFAT1 inhibe son expression dans les ostéoblastes. De plus, une déficience de ces deux gènes chez les patients OA coïncide avec une diminution de l'expression des gènes de la voie Hedgehog.

Mots-clés : Régulation génique, Indian Hedgehog, NFAT1, PITX1, ostéoarthrose.

Abstract

Introduction: Osteoarthritis (OA) is the most common joint disorder and is characterized by cartilage degradation and endochondral ossification. One in every ten Canadians is affected, yet its aetiopathogenesis remains unknown. In this present study, two new regulators of the *IHH* promoter, NFAT1 and PITX1, were studied. The down-regulation of *IHH* expression by these factors could contribute to the OA pathogenesis. The Hedgehog (Hh) signaling pathway regulates chondrocyte growth and differentiation in the growth plate. Indian hedgehog (IHH), one of its members, stimulates chondrocyte proliferation and osteoblast differentiation. IHH is essential in skeletogenesis, osteoblastogenesis and cartilage growth.

Method and Results: A 5 kbp fragment of the *Ihh* murin promoter was cloned upstream to the luciferase reporter gene in the pGL3 vector. By in silico analysis, several consensus conserved sites of NFAT1 and PITX1 were identified on the *Ihh* promoter. Co-transfections with NFAT1, a growth and differentiation cellular repressor in cartilage, show an inhibition of the *Ihh* promoter activity in osteoblasts and an activation in chondrocytes. The same experiments with PITX1, a transcriptional factor involved in the development of limb limbs and the maintenance of the cartilaginous function, show a significant activation of the *IHH* promoter activity in chondrocytes. Using an RNAi approach against these factors led to results that are consistent with the over-expression assays. Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) was performed to confirm the presence of NFAT1 in the *IHH* promoter. The OA articular cartilage shows high levels of prehypertrophic chondrocytes. RT-qPCR reveals a repression of the Hh pathway as well as an inhibition of the expression of *NFAT1* and *PITX1* in OA patients, when compared to non-affected controls.

Conclusion: This project allowed to shed light on two new transcriptional regulators of the *IHH* gene activity promoter, NFAT1 and PITX1. These two regulators activate *IHH* in chondrocytes and NFAT1 also inhibits its expression in osteoblasts. Furthermore, a deficiency of these two genes in OA patients coincide with a decrease of the expression of genes implicated in the Hedgehog signaling pathway.

Keywords: Gene regulation, Indian Hedgehog, NFAT1, PITX1, osteoarthritis.

Liste des abréviations

ADNc	: Acide désoxyribonucléique complémentaire
AP1	: <i>Activator Protein 1</i>
AP2α	: <i>Activating enhancer-binding Protein 2 alpha</i>
APS	: PerSulfate d'Ammonium
AR	: Arthrite Rhumatoïde
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
ATF4	: <i>Activating Transcription Factor 4</i>
BMP	: <i>Bone Morphogenic Proteins</i>
Ca²⁺	: Calcium
CaM	: Calmoduline
CaN	: Calcineurine Phosphatase
CBP	: <i>CREB-Binding Protein</i>
c/EBP	: <i>CCAAT/Enhancer-Binding Proteins</i>
CK1	: <i>Casein Kinase 1</i>
c-Myb	: <i>v-Myb myeloblastosis viral oncogene homolog</i>
CP2	: <i>CP2/LSF/LBP1 transcription factor</i>
CREB	: <i>Cyclic AMP Response Element Binding</i>
CsA	: Cyclosporine A
CSM	: (<i>Mesenchymal stem cells</i>) Cellules Souches Mésenchymateuses
DHH	: Desert Hedgehog
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	: DiMéthylSulfOxyde
DTT	: DiThioThréitol
DYRK1/2	: <i>Dual-specificity tyrosine-phosphorylation Regulated Kinase 1/2</i>
E2F1	: Facteur de transcription E2F-1 ou <i>Retinoblastoma-associated protein 1</i>
EDTA	: (<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>) Acide tétra-acétique d'éthylène-diamine
EGF	: (<i>Epidermal Growth Factor</i>) Facteur de croissance épidermique
EGTA	: (<i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i>) Acide tétra-acétique d'éthylène-glycol
ETS1/2	: <i>v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1/2 (avian)</i>
FBS	: (<i>Fetal Bovine Serum</i>) Sérum foetal bovin
FK506	: Tacrolimus ou Fujimycine
g ; rpm	: Unité d'accélération gravitationnelle (m/s ²) ; nombre de rotation par minute
GABPα	: <i>GA Binding Protein alpha</i>

GAG	: GlycosAminoGlycanes
GATA3	: <i>GATA-binding protein 3</i>
GRα	: (<i>Glucocorticoid Receptor alpha</i>) Récepteurs des glucocorticoïdes alpha
GSK3	: <i>Glycogen Synthase Kinase 3</i>
HEPES	: Acide 4-(2-HydroxyÉthyl)-1-Pipérazine Éthane Sulfonique
HES1	: <i>Hairy and Enhancer of Split homolog 1</i>
Hh	: Hedgehog
IGF1	: (<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>) Facteurs de croissance analogue à l'insuline 1
IHH	: Indian Hedgehog
IL1/2/4/13	: Interleukine 1/2/4/13
IL12Rβ2	: Récepteur beta-2 de l'interleukine 12
JNK1	: <i>cJun N-terminal Kinase 1</i>
kDa	: kilo Dalton
kpb	: kilo paire de bases
LYS	: Lysine
M	: Molaire (mol/L)
MAZ	: <i>Myc-Associated Zinc finger protein</i>
MMP	: (<i>Matrix MetalloProteinases</i>) Métalloprotéinases de la matrice extracellulaire
MSX2	: <i>Msh homeobox 2</i>
NaDOC	: Sodium DéOxyCholate
NFAT	: (<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>) Facteur nucléaire des lymphocytes T activés
NFκB	: (<i>Nuclear Factor kappa B</i>) Facteur nucléaire kappa B
NLS	: (<i>Nuclear Localisation Signal</i>) Signal de localisation nucléaire
nm	: nanomètre
NRF2	: <i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
OA	: OstéoArthrose
ONPG	: 2-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside
OREBP	: <i>Osmotic Response Element-Binding Protein</i>
p53	: Protéine 53
PAX5	: <i>Paired box protein Pax 5</i>
PBS	: (<i>Phosphate Buffered Saline</i>) Solution saline tamponnée par le phosphate
PFA	: ParaFormAldehyde
PITX1	: (<i>Pituitary Homeobox 1</i>) Facteur de transcription à homéodomaine 1
PLCγ	: PhosphoLipase C gamma

PTHrP	: (<i>ParaThyroid Hormone-related Peptide</i>) Protéine analogue de l'hormone parathyroïdienne
PVDF	: (<i>PolyVinylidene Fluoride</i>) Polyfluorure de vinylidène
RE	: Réticulum Endoplasmique
RIPA	: (<i>RadioImmunoPrecipitation Assay</i>) Tampon de radioimmunoprécipitation
RNAi	: (<i>RNA interference</i>) ARN interférent
RORα	: <i>Retinoic acid-related Orphan Receptor alpha</i>
RTK	: (<i>Receptor Tyrosine Kinases</i>) Récepteurs à activité Tyrosine Kinase
RT-qPCR	: (<i>Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>) PCR quantitative en temps réel
SDS-PAGE	: (<i>Sodium DodecylSulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>) Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
SHH	: Sonic Hedgehog
siRNA	: (<i>Small interfering RNA</i>) Petit ARN interférent
SMAD	: Protéines associées aux récepteurs des protéines BMP ou TGF- β
SNC	: Système Nerveux Central
SOX	: <i>Sry-related HMG box, SRY (sex determining region Y)-box</i>
SP	: Répétition du motif Sérine-Proline
SREBP1	: <i>Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1</i>
SRR1	: (<i>Serine-Rich Region 1</i>) Région riche en sérine 1
STAT1	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i>
SUMO-1	: (<i>Small Ubiquitin-like MOdifier 1</i>) Protéine SUMO-1
TCF3/E47	: <i>TCF3 transcription factor 3, E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47</i>
TCR	: (<i>T Cell Receptor</i>) Récepteur des cellules T
TE	: Tris-HCl/EDTA
TEMED	: N,N,N',N'-TétraMéthylÉthylèneDiAmine (ou TMEDA)
TGF-β	: (<i>Transforming Growth Factor-beta</i>) Facteur de croissance transformant bêta
TNF	: (<i>Tumor Necrosis Factor</i>) Facteur de nécrose tumorale
TonEBP	: <i>Tonicity-responsive Enhancer-Binding Protein</i>
TRIS	: Trishydroxyméthylaminométhane ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
USF1/2	: <i>UpStream transcription Factor 1/2</i>
WB	: (<i>Western Blot</i>) Immunotransfert de protéines
YY1	: <i>Yin Yang 1</i>
ZIC1/2/3	: (<i>Zinc finger protein</i>) Protéines à doigt de zinc 1/2/3

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Liste des abréviations	iii
Table des matières	vi
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Dédicace	xii
Remerciements	xiii
Partie I : Introduction	1
Partie II : Revue de la littérature.....	6
1. Le cartilage	7
1.1. Les différentes zones du cartilage	7
1.2. Les différents types de cartilage	8
1.3. Ontogenèse et croissance du cartilage	9
2. Les principaux composants de l'articulation	10
2.1. Le cartilage articulaire	10
2.2. La membrane et le liquide synoviale	14
2.3. L'os sous-chondral	15
3. Une pathologie dégénérative du cartilage : l'ostéoarthrose.....	16
4. Les voies de signalisation dans le cartilage articulaire.....	19
4.1. La voie des BMP.....	19
4.2. Le facteur SOX9.....	20
4.3. La voie Wnt/béta-caténine.....	21
4.4. La voie Hedgehog.....	22
5. Deux facteurs d'intérêt potentiel dans le cartilage articulaire	27
5.1. La famille NFAT.....	28
5.2. La famille PITX.....	37

Partie III : Matériel et méthodes	39
6. Culture cellulaire.....	40
7. Isolation de chondrocytes primaires.....	40
8. Collection d'échantillons d'articulation de genoux de souris STR/ort et C57BL/6	43
9. Constructions de vecteurs plasmidiques.....	43
10. Transfections transitoires avec gène rapporteur luciférase.....	44
11. Expériences de co-immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)	45
12. Atténuation de l'expression d'un gène par un siRNA.....	47
13. Réactifs et anticorps	47
14. Analyse par western blot.....	48
15. Préparation d'ARN et synthèse d'ADNc.....	48
16. Analyses par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)	49
17. Analyse Statistique	49
Partie IV : Résultats	51
18. Le promoteur du gène <i>IHH</i> contient des régions régulatrices conservées contrôlant sa transcription.....	52
19. NFAT1 régule l'expression d' <i>IHH</i> en se liant directement à son promoteur	56
19.1. <i>NFAT1</i> contribue à l'inhibition du gène <i>Ihh</i> dans les ostéoblastes de rat... 56	
19.2. <i>L'inhibition in vitro de NFAT1 est suffisante pour activer le gène Ihh dans les ostéoblastes de rat</i>	58
19.3. <i>NFAT1</i> contribue à l'activation du gène <i>IHH</i> dans les chondrocytes articulaires humains	65
20. Corrélations entre la perte d'expression de <i>NFAT1</i> et celle de la voie Hedgehog chez les patients ostéoarthrosiques.....	71
21. Corrélations entre les données cliniques et démographiques des patients OA et l'expression des gènes <i>PITX1</i> , <i>IHH</i> et <i>DHH</i>	73
21.1. <i>L'inactivation de PITX1 chez les patients OA pourrait contribuer à la perte d'expression de la voie Hedgehog</i>	73
22. <i>PITX1</i> régule indirectement l'expression d' <i>IHH</i>	76
22.1. <i>PITX1</i> contribue à l'activation d' <i>IHH</i> dans les chondrocytes	76

23. Perte d'expression de <i>Nfat1</i> , <i>Pitx1</i> et de la voie Hedgehog au cours du temps chez des souris arthrosiques STR/ort	78
Partie V : Discussion.....	81
24. Plusieurs régulateurs transcriptionnels du gène <i>Ihh</i> sont présents sur le premier kpb de la région promotrice en amont de l'ATG	82
25. L'activité transcriptionnelle du gène <i>IHH</i> est régulée directement par le facteur de transcription NFAT1 de façon tissu-spécifique	83
25.1. <i>NFAT1</i> contribue à l'inhibition du gène <i>IHH</i> dans les ostéoblastes et à l'activation du gène <i>IHH</i> dans les chondrocytes articulaires.....	83
25.2. <i>NFAT1</i> est détecté directement <i>in vivo</i> sur la chromatine <i>IHH</i>	84
25.3. Les interactions potentielles entre <i>NFAT1</i> et d'autres cofacteurs pourraient contribuer à la régulation du gène <i>IHH</i>	84
26. L'activité transcriptionnelle du gène <i>IHH</i> est régulée indirectement par le facteur de transcription PITX1	85
26.1. <i>PITX1</i> agirait en amont de <i>p53</i> pour réguler <i>IHH</i>	86
27. D'autres facteurs pourraient potentiellement influencer l'expression transcriptionnelle du gène <i>IHH</i>	88
28. La voie hedgehog est dérégulée dans les chondrocytes articulaires de patients OA et dans les genoux de souris STR/ort	90
28.1. Une dérégulation de la voie Hedgehog à travers la voie <i>NFAT</i> pourrait contribuer à la pathologie de l'OA.....	90
28.2. Une dérégulation de la voie Hedgehog à travers la voie <i>PITX1</i> pourrait contribuer à la pathologie de l'OA.....	91
Partie VI : Conclusion	94
Partie VII : Bibliographie	97
Partie VIII : Annexes.....	i
29. L'inhibition de <i>PITX1</i> inhibe l'activité du gène <i>IHH</i> dans des chondrocytes humains.....	ii
30. <i>HES1</i> contribue à la régulation d' <i>Ihh</i> dans les ostéoblastes	iii

Liste des tableaux

Tableau I. Les différents types de cartilage.....	9
Tableau II. Relations structure-fonction et interdépendance des composants de l'articulation	14
Tableau III. Liste des protéines de la famille NFAT incluant leurs noms alternatifs et le principal mécanisme de régulation qui caractérise chaque protéine	29
Tableau IV. Liste des différentes lignées cellulaires et de leurs origines	40
Tableau V. Données cliniques et démographiques des patients OA et sujets témoins utilisés dans le cadre de cette étude	42
Tableau VI. Liste des amorces utilisées pour les différentes expériences <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	50
Tableau VII. Listes non exhaustives de régulateurs potentiels de l'activité promotrice du gène <i>Ihh</i>	61

Liste des figures

Figure 1. Dessin schématique représentant l'organisation d'un cartilage articulaire	8
Figure 2. Composition cellulaire du cartilage hyalin provenant d'une trachée.....	10
Figure 3. Représentation schématique de la matrice extracellulaire cartilagineuse	12
Figure 4. Les différentes composantes de l'articulation	15
Figure 5. La progression de l'OA d'une articulation saine à très endommagée	17
Figure 6. La voie de signalisation des BMP à travers les protéines SMAD	20
Figure 7. Les étapes d'intervention du facteur SOX9 dans le développement des chondrocytes.....	21
Figure 8. La voie de signalisation Hedgehog	23
Figure 9. L'axe Indian hedgehog-PTHrP	25
Figure 10. Homologie de séquences entre les membres NFAT	29
Figure 11. Schéma de la structure primaire de la protéine NFAT	31
Figure 12. La voie de signalisation du calcium et l'activation de NFAT	33
Figure 13. Destruction du cartilage articulaire et présence de nombreuses masses ossifiées au niveau des articulations d'une souris femelle <i>Nfat1</i> ^{-/-} comparativement à une souris femelle <i>Nfat1</i> ^{+/+}	35
Figure 14. Diagramme représentatif des mécanismes liés à une déficience en NFAT1	37
Figure 15. Étude transcriptionnelle d'un fragment du promoteur murin du gène Indian Hedgehog	54
Figure 16. Alignement des séquences promotrices du gène <i>Ihh</i> chez l'humain, la souris et le rat	55
Figure 17. Transfections transitoires dans des ostéoblastes de rat des cinq principales constructions du promoteur d' <i>Ihh</i> en présence ou en absence de NFAT1.....	60
Figure 18. La mutation M2 du site putatif STAT1/NFAT1 abolit l'effet répressif de NFAT1 au promoteur d' <i>Ihh</i>	62
Figure 19. Clonage par la technique à l'exonucléase III de quatre nouvelles constructions de tailles comprises entre la construction -1331/+119 et -315/+119	63
Figure 20. La perte de NFAT1 par RNAi active l'expression du gène <i>Ihh</i> au niveau transcriptionnel et au niveau protéique dans les ostéoblastes	64

Figure 21. Co-transfections transitoires dans des chondrocytes articulaires humains du promoteur d' <i>IHH</i> et des deux constructions mutantes en présence ou en absence de NFAT1	67
Figure 22. La perte d'expression de <i>NFAT1</i> par RNAi dans des chondrocytes articulaires humains contribue à la répression de l'expression du gène <i>IHH</i>	68
Figure 23. Transfections transitoires dans des ostéoblastes humains de trois constructions promotrices d' <i>IHH</i> et des deux mutants en présence ou en absence de NFAT1	69
Figure 24. Analyses par RT-qPCR de la région promotrice du gène <i>IHH</i> et <i>IL12Rβ2</i> après immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) contre le facteur NFAT1 dans des ostéoblastes et des chondrocytes humains	70
Figure 25. L'expression du gène <i>NFAT1</i> et de la voie Hh est inhibée dans des cellules chondrocytaires de patients OA <i>versus</i> de patients témoins	72
Figure 26. L'expression des gènes <i>PITX1</i> , <i>IHH</i> et <i>DHH</i> chez les patients diminue avec une augmentation du score K/L ou une augmentation de l'âge	75
Figure 27. Transfections transitoires dans des chondrocytes humains des cinq principales constructions du promoteur <i>IHH</i> en présence ou en absence de PITX1	77
Figure 28. Perte d'expression de la voie Hh dans des genoux de souris STR/ort au cours du vieillissement	80

Dédicace

*À mon grand-père,
Cet autodidacte passionné par la science
Et d'une grande sagesse*

Celui qui aime à apprendre est bien près du savoir.

[Confucius]

Remerciements

Ce mémoire de fin d'études a été rédigé pour l'obtention du grade de maître ès sciences du département de biochimie à l'Université de Montréal (années universitaires 2008/2011). Le projet de recherche a été effectué au sein du laboratoire Viscogliosi en génétique moléculaire des maladies musculo-squelettiques, à l'hôpital Sainte-Justine, sous la direction du Docteur Alain Moreau.

Je souhaite remercier très chaleureusement le Docteur Alain Moreau qui m'a donné la chance de découvrir et de participer concrètement à la recherche scientifique. Il m'a permis de développer un nouveau projet dans des conditions de travail exemplaires et a mis à ma disposition les ressources nécessaires à la réalisation de ce mémoire.

Je remercie les autres membres du jury, le Professeur Guy Boileau et le Professeur Stéphane Roy, d'avoir cordialement accepté d'examiner et de corriger ce mémoire. Je tiens à exprimer ma gratitude envers le Professeur Guy Boileau qui m'a suivie en tant que parrain tout au long de ma maîtrise et qui a accepté d'être le président rapporteur de mon jury.

Mes remerciements s'adressent également au Docteur Benoit Saint-Jacques qui a été plus qu'un mentor tout au long de ma maîtrise. Il m'a apporté toute l'attention et la connaissance scientifique nécessaire au bon déroulement de mon projet de recherche. Je lui dois un grand merci pour son encadrement, sa disponibilité, ses recommandations et nos longues discussions qui m'ont permis de développer mon autonomie et mon esprit critique.

Je tiens à remercier aussi la famille Viscogliosi pour leur soutien financier et les patients pour leur contribution physique et morale. Merci à vous qui permettez ainsi de faire avancée la recherche.

Je remercie ensuite le chirurgien orthopédique Patrick Lavigne et son équipe de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont pour leur collaboration et le suivi des prélèvements et des données cliniques et démographiques qu'ils nous ont fournis.

Ensuite, j'aimerais remercier en particuliers trois collègues qui sont l'avenir de la recherche, les futurs docteurs Cynthia Picard et Martin Pellicelli ainsi que Jean-François Lavoie, post-doctorant, pour leur aide inconditionnelle, leur expertise et leur savoir faire irréprochable. Merci à vous trois.

Après quoi, je souhaite exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude à Anita Franco, assistante de recherche, Nancy Karam, doctorante, et Qing Yuan, étudiante à la maîtrise. Plus que des collègues, ce sont des amies sincères sans qui ces deux dernières années n'auraient pas été pareils. Un grand merci pour leurs soutiens, leurs présences et surtout pour l'ambiance conviviale qu'il y a eu au laboratoire.

Je souhaite aussi remercier Isabelle Turgeon et Saadallah Bouhanik, tous deux assistants de recherche, pour leur chaleureuse compagnie, leur aide inestimable et leur professionnalisme.

Pour tous les autres membres du laboratoire et les stagiaires qu'ils soient en scoliose ou en arthrose, qu'ils soient passés ou présents, merci pour tous les très bons moments passés ensembles.

D'autre part, je ne remercierai jamais assez mes parents, pour leur amour et leur soutien immuable. Vous m'avez donné les moyens et la force de commencer cette nouvelle vie au Canada. Je suis peut-être loin de vous physiquement mais vous êtes toujours plus proche à mes yeux et dans mon cœur.

Mes derniers remerciements mais pas des moindres seront pour M. Jean-Richard Bullet qui a su être à mes côtés et me comprendre. Nos destins se sont croisés, nos cœurs se sont destinés et grâce à toi je me surpasse chaque jour.

Merci à tous d'avoir été là...

Partie I : **I**ntroduction

Le cartilage est une unité fonctionnelle qui fait partie d'un système musculo-squelettique complexe. C'est un sous-ensemble qui avec la synovie et l'os sous-chondral forme les articulations indispensables à l'équilibre et aux déplacements du corps humain. Ce tissu avasculaire, non innervé et formé d'un seul type de cellules, les chondrocytes, est composé d'un grand nombre de molécules dont les caractéristiques physico-chimiques et l'organisation constitutionnelle assurent les propriétés fonctionnelles du cartilage.^{80, 135}

Les constituants majoritaires sont les différents collagènes, dont le maillage fibreux fournit résistance et souplesse au tissu, et les agrécanes, des molécules de taille élevée, chargées négativement et gorgées d'eau, ce qui confère à l'ensemble de la structure une grande visco-élasticité.¹¹⁶ Cet échafaudage est soutenu par le chondrocyte, capable de synthétiser et de dégrader toutes les molécules environnantes. Les cellules mésenchymateuses sont la source progénitrice des chondrocytes ainsi que de tous les autres types cellulaires présents dans les tissus musculo-squelettiques. Dans ce mémoire, seule la différenciation chondrocytaire sera décrite.

Par ailleurs, il n'y a pas que le cartilage qui participe au bon fonctionnement de l'articulation. La contribution de la synovie et de l'os sous-chondral est très importante au niveau mécanique mais également d'un point de vue biochimique. Ils viseraient à permettre une communication entre l'os et le cartilage.⁷⁶ Pour se faire, il existe des voies de signalisation qui régule cette communication intra-articulaire.

L'une des plus importantes voies de régulation de l'os et de l'articulation est la voie Hedgehog (Hh). L'un des membres de cette famille, Indian Hedgehog (IHH), régule entre autres l'ossification endochondrale, la maturation des ostéoblastes, la prolifération et la différenciation des chondrocytes hypertrophiés. IHH est un élément clé du développement et du maintien du cartilage articulaire.¹⁷

Lorsque l'articulation n'est plus en moyen de réparer les lésions qu'elle subit, il y a alors un déséquilibre de son équilibre biochimique entre les procédés de synthèse et de dégradation. C'est ce qui se passe dans la pathologie de l'ostéoarthrose (OA). Les messagers qui passent par les voies de signalisation et qui communiquent l'information aux trois composants essentiels de l'articulation soit le cartilage, la synovie et l'os sous-chondral ne sont plus conformes au bon fonctionnement de l'articulation.⁷⁶

Ce projet propose donc d'étudier les mécanismes de régulation transcriptionnelle du gène *IHH* notamment par des analyses *in vitro* et *in vivo* de son promoteur et de mettre en évidence un lien avec l'OA. L'hypothèse suggérée est qu'un dysfonctionnement de la voie Hh par l'intermédiaire de la protéine IHH serait en partie à l'origine de la pathologie de l'OA. Une déficience dans l'expression de facteurs transcriptionnels régulant finement l'expression d'*IHH* pourrait être à l'origine de sa dérégulation dans le cartilage OA.

Peu d'informations existent sur les facteurs qui régulent l'expression du gène *Ihh*. À ce jour, seulement trois types de facteurs de transcription ont été identifiés comme agissant directement sur le promoteur d'*IHH* : les protéines SMAD (voie de signalisation des BMP), TCF/LEF1 (voie de signalisation des Wnt/ β -caténine) et les facteurs de transcriptions RUNX2/3.^{128, 136, 169} Pourtant, plusieurs études ont démontré le rôle fonctionnel de la protéine IHH dans le développement cellulaire de l'os sous-chondral et du cartilage articulaire sans pour autant mettre en évidence les mécanismes impliqués dans sa régulation spatio-temporelle.^{72, 81} Ce projet a donc pour but d'explorer l'implication de deux facteurs d'intérêt potentiel, NFAT1 et PITX1, dans la régulation d'*IHH*. D'un premier abord, rien dans la littérature ne relie directement ces facteurs à la voie Hh mais certains travaux sur leurs rôles dans le cartilage articulaire et l'OA retiennent l'attention. Par ailleurs, NFAT1 et PITX1 ont été étudiés indépendamment l'un de l'autre car aucun lien apparent n'existe pour le moment entre ces deux facteurs. D'après la littérature, NFAT1 maintiendrait le phénotype différencié des chondrocytes articulaires adultes ainsi que l'intégrité de la structure os/cartilage de l'articulation. Sa déficience à l'âge adulte pourrait être une cause de l'apparition de l'OA.¹²⁷ D'un autre côté, le facteur PITX1 est retrouvé lors du développement des membres inférieurs dans la région embryonique à l'origine entre autre du cartilage articulaire. D'après le travail réalisé dans le laboratoire du Docteur Moreau, le facteur PITX1 jouerait un rôle important dans la pathologie de l'OA suite à sa perte d'expression chez les patients OA.¹¹⁴ Les résultats présentés dans le cadre de ce mémoire feront donc état du mécanisme de régulation de l'expression du gène *IHH* par liaison directe ou indirecte à son promoteur des facteurs d'intérêt potentiel que sont NFAT1 et PITX1 en utilisant des lignées cellulaires ostéoblastiques et chondrocytaires.

La régulation au promoteur d'*IHH* a été étudiée par des techniques biochimiques et de biologie moléculaire telles que des transfections transitoires, des expériences d'atténuation d'expression (*knock-down*) par RNAi et de co-immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).

Comme le cartilage articulaire arthrosique présente un haut niveau de chondrocytes hypertrophiques, il a donc été envisagé de comparer les niveaux d'expression d'*IHH* et de cibles de la voie Hh par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) mesurés dans les chondrocytes de patients OA *versus* ceux de sujets témoins afin d'évaluer une éventuelle contribution de la voie de signalisation Hh dans la pathologie de l'arthrose. En utilisant la même technique, l'expression des facteurs NFAT1 et PITX1 a été quantifiée pour valider notre hypothèse de départ. De la même manière, des études quantitatives ont été réalisées chez une lignée de souris arthrosiques, les souris STR/ort, *versus* des souris non OA, des souris de la lignée C57BL/6.^{85, 149}

Avant d'entrer dans le vif du sujet, les caractéristiques et les composants essentiels au cartilage sain seront détaillés dans la revue de littérature de ce mémoire, avec un intérêt tout particulier pour le cartilage articulaire. Par la suite, les principales voies de signalisation retrouvées dans le cartilage et l'os sous-chondral seront décrites et un lien sera fait avec la pathologie de l'ostéoarthrose. Après une brève description des techniques et des protocoles utilisés dans ce mémoire, les résultats ont été organisés en deux sous-parties : la première concernant la régulation transcriptionnelle basale du promoteur du gène *IHH* et la deuxième portant sur le rôle du gène *IHH* dans la pathologie de l'OA basée sur des études quantitatives d'expression génique.

Les voies de signalisation possèdent des mécanismes de régulation et d'intercommunication très complexes. Malgré cela, elles représentent des cibles thérapeutiques d'intérêt pour diverses maladies et pourraient apporter des solutions potentielles au traitement de l'arthrose.^{67, 127}

Pour le moment, les traitements médicaux de l'arthrose sont purement symptomatiques et visent seulement à prévenir ou à atténuer les douleurs du patient. Il n'existe pas de tests permettant le diagnostic précoce de cette pathologie.

En l'absence de traitements efficaces pour guérir cette maladie, d'autres facteurs s'ajoutent aux douleurs physiques telles que l'isolement du malade et la difficulté à exécuter par soi-même les gestes quotidiens. Le coût des maladies musculo-squelettiques est estimé à 22,3 milliards de dollars et l'arthrite, est au deuxième rang (6,4 milliards de dollars) des maladies les plus coûteuses au Canada (Statistique Canada, 2009).⁷ Les dépenses sont deux fois plus importants pour les personnes arthrosiques qui sont toujours actives (35 à 64 ans) comparativement aux aînés (65 ans et plus). Ces statistiques montrent que les coûts engendrés par les maladies arthritiques sont un fardeau considérable pour les sociétés industrialisées et il est estimé que le nombre de personnes atteintes devrait doubler au cours des quinze prochaines années.

L'idée de ce projet est donc d'apporter une contribution dans l'avancée des connaissances sur les mécanismes de régulation génique dans le cartilage OA pour permettre un jour la mise au point d'un test de dépistage précoce de la maladie.

Partie II : Revue de la littérature

1. Le cartilage

Le cartilage est un tissu conjonctif spécialisé très complexe. De nombreuses parties du corps comprennent du tissu cartilagineux comme la surface articulaire de l'os, les disques intervertébraux, l'oreille, le nez, la cage thoracique et même les bronches. Ce tissu protecteur dense et lisse possède des propriétés d'élasticité et de robustesse nécessaires à l'amortissement et à la réduction des forces de tension, de cisaillement et de pression. Le cartilage est le seul tissu conjonctif à ne pas contenir de vaisseaux sanguins et il ne contient pas de nerfs non plus.⁸⁰ Il est normalement renouvelé grâce au maintien d'un certain équilibre entre les procédés de dégradations (cataboliques) et ceux de synthèses (anaboliques).

1.1. *Les différentes zones du cartilage*

Le cartilage s'organise morphologiquement en quatre grandes zones identifiables microscopiquement d'après le modèle de Benninghoff.^{8, 20, 162} On retrouve à la surface la couche superficielle (ou tangentielle) : elle représente environ 10 à 20 % de l'épaisseur totale du cartilage.¹³⁵ Elle contient des fibres de collagène orientées parallèlement à la surface et de façon à suivre le sens des mouvements articulaires ainsi que des chondrocytes de forme aplatis (figure 1). La couche suivante est appelée couche moyenne (ou transitionnelle). Elle représente environ 40 à 60 % de l'épaisseur totale du cartilage. Les fibres de collagène y sont dirigées obliquement et sont enchevêtrées dans tous les sens. Puis, vient ensuite la couche profonde (ou radiée) qui représente environ 30 % du volume cartilagineux : ses fibres de collagène et ses chondrocytes sont disposés en colonnes agencés perpendiculairement à la surface articulaire. La couche profonde est séparée de la couche calcifiée par une ligne irrégulière de calcification nommée "*tidemark*" ou front d'ossification. Enfin la dernière, la couche calcifiée (environ 3 % de l'épaisseur totale du cartilage) est la couche de transition et de jonction du cartilage à l'os sous-chondral. Elle est très riche en protéoglycanes.¹³⁵ C'est l'organisation des différents réseaux de fibres de collagène qui garantit au tissu cartilagineux sa solidité et sa flexibilité pour renforcer son ossature.

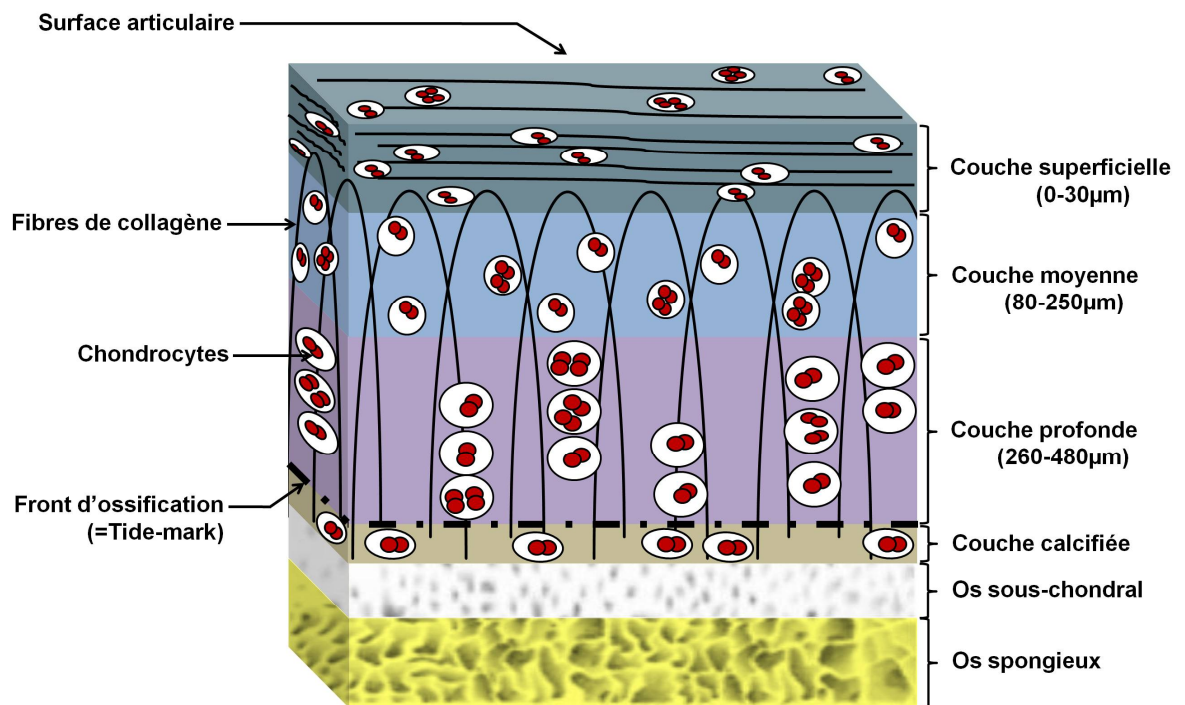
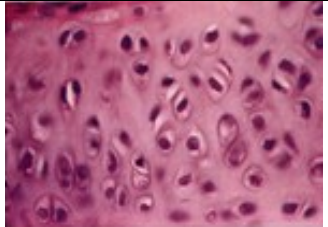
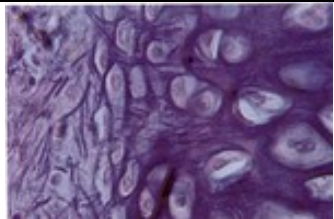



Figure 1. Dessin schématique représentant l'organisation d'un cartilage articulaire de la couche superficielle à l'os sous-chondral (L. Bernard, 2010)

1.2. Les différents types de cartilage

Il existe trois catégories de cartilage : le cartilage hyalin, le fibrocartilage et le cartilage élastique.⁸⁰ Chacun d'eux possède des caractéristiques propres. Le cartilage hyalin est le type de cartilage le plus représenté dans le corps humain. Il est aussi impliqué dans la majorité des lésions arthrosiques car comparativement à d'autres tissus conjonctifs, il se développe et se répare plus lentement et lorsqu'il n'est plus capable de se régénérer, toute anomalie du cartilage sera automatiquement irréversible.⁸⁰

Tableau I. Les différents types de cartilage

Composition	Propriétés	Localisation	Image
<i>Le cartilage hyalin</i>			
<ul style="list-style-type: none"> - Contient de nombreuses fibres de collagène de type II - Aspect blanc tirant sur le bleu semblable à du verre 	<ul style="list-style-type: none"> - Soutenir fermement les os - Maintenir une certaine flexibilité - Absorber les forces de compressions 	<ul style="list-style-type: none"> - Le nez - Les côtes - Les bronches - Le larynx - La trachée - Les articulations - Le squelette embryonique 	 <p>(D'après www.mreroh.com)</p>
<i>Le cartilage élastique</i>			
<ul style="list-style-type: none"> - Riche en fibres élastiques (coloration jaunâtre) et fibre de collagène de type II 	<ul style="list-style-type: none"> - Grande résistance aux flexions répétées - Maintien la forme structurale 	<ul style="list-style-type: none"> - L'oreille externe - L'épiglotte 	 <p>(D'après www.mreroh.com)</p>
<i>Le cartilage fibreux (fibrocartilage)</i>			
<ul style="list-style-type: none"> - Tissu intermédiaire entre le cartilage hyalin et le tissu conjonctif - Riche en fibres de collagène très denses de type I 	<ul style="list-style-type: none"> - Capacités de compression - Très résistant aux tractions 	<ul style="list-style-type: none"> - Les disques intervertébraux - Le ménisque - Les sites d'insertions des ligaments, des tendons et des capsules articulaires 	 <p>(D'après www.mreroh.com)</p>

1.3. *Ontogenèse et croissance du cartilage*

Tous les tissus cartilagineux se développent initialement à partir de cellules mésenchymateuses. Ces dernières se différencient en chondroblastes qui se divisent et secrètent la matrice extracellulaire (croissance appositionnelle) pour former un espace appelé lacune.⁴³ Certains chondroblastes maintiennent leur activité catabolique (croissance interstitielle) et se divise pour former un groupe de cellules nommé groupe isogénique de cellules cartilagineuses. Chaque groupe isogénique est entouré d'une "substance territoriale" et l'ensemble est appelé chondrone. Lorsque chaque chondroblaste ou chaque groupe isogénique se retrouve seul dans la lacune et enclavé par la matrice extracellulaire, ils deviennent alors des chondrocytes inclus dans des logettes nommées chondroplastes (figure 2).

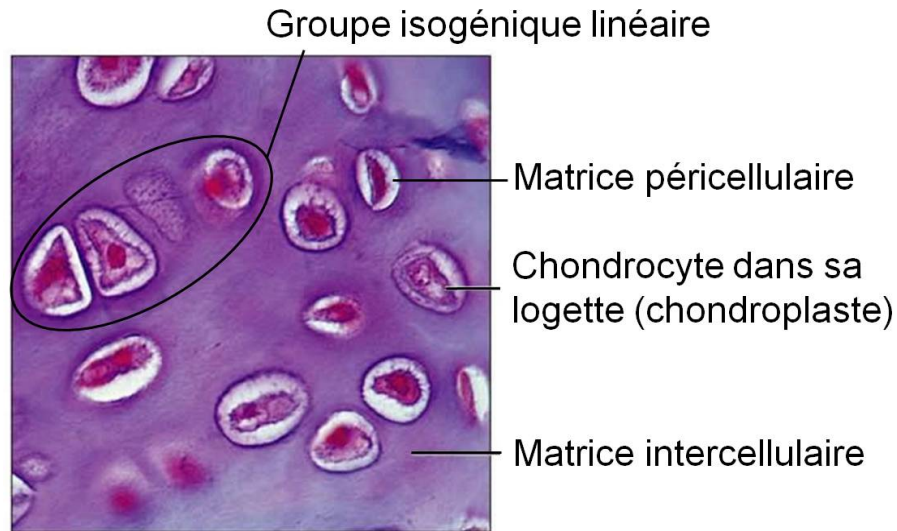


Figure 2. Composition cellulaire du cartilage hyalin provenant d'une trachée
(Adapté du site internet classes.midlandstech.edu)

2. Les principaux composants de l'articulation

2.1. *Le cartilage articulaire*

Le cartilage articulaire hyalin a comme principale fonction de protéger l'articulation et l'os sous-chondral. Sa composition peut se résumer en trois éléments essentiels : un réseau complexe de fibres de collagène, un gel de mucopolysaccharides et de glycoprotéines hydrophiles et un unique type cellulaire, les chondrocytes.¹¹⁶ Ce sont ses constituants qui lui donnent des propriétés de fermeté, de compression, et d'élasticité.

2.1.1. Composition biochimique du cartilage articulaire

2.1.1.1. *Les fibres de collagène*

Environ 20 types de collagène se distinguent, classés en deux catégories : les collagènes fibrillaires et non fibrillaires, dont huit sont présents au niveau du cartilage en proportions très variables.² Le collagène donne au cartilage sa forme et sa flexibilité. Il existe trois types de collagène spécifique au cartilage articulaire : le type II, IX et XI.^{23, 29} La matrice extracellulaire du cartilage articulaire est principalement constituée de fibres de collagène de type II qui forment une trame dense et résistante aux fortes tensions.

Ce collagène s'organise différemment selon sa localisation dans les chondrocytes ou au niveau de la matrice interterritoriale. Les fibres de collagène de type IX s'associent à la surface des fibres de collagène de type II et assurent la liaison entre les fibrilles elle-même et leurs interactions avec les protéoglycanes. Les fibres du type XI se retrouvent au centre des fibrilles de type II et régulent le diamètre et l'arrangement tridimensionnelle de la structure collagénique.¹¹³ Certaines fibres de collagène de type X vont traverser la zone calcifiée pour s'insérer dans l'os sous-chondral et ainsi augmenter l'adhérence du cartilage à l'os sous-chondral.

2.1.1.2. *Les protéoglycanes*

Ces molécules, appelées aussi mucopolysaccharides, contrôlent la déformation du cartilage soumis à des pressions. Elles sont constituées de protéines et de sucres. Plusieurs chaînes covalentes de glycosaminoglycanes (GAG) vont se fixer sur une protéine s'organisant ainsi en colonnes. Le cartilage contient trois sortes de protéoglycanes : le sulfate de kératane, le sulfate de chondroïtine, et l'acide hyaluronique.⁸³

Des chaînes de sulfate de chondroïtine et de sulfate de kératane vont se lier covalamment à une protéine de base pour former un monomère d'agrécane. Ce dernier va interagir avec l'acide hyaluronique (ratio 100:1) pour ériger de gigantesques agrégats hydratés. L'acide hyaluronique est constitué par la répétition d'un motif de deux sucres : l'acide glucuronique et la N-acétyl-glucosamine. La structure en forme de peignes des chaînes GAG permet de piéger de grandes quantités d'eau et de réguler la pression osmotique. Leur conformation facilite aussi la diffusion des solutés à travers le milieu.⁹⁴ C'est ce qui contribue à l'état spongieux du cartilage articulaire.

Ainsi, lorsque le corps est assis ou couché, la pression osmotique engendrée par le gonflement des agrégats de protéoglycanes et maintenue par le maillage de collagène élastique, sature le tissu en eau. En revanche, la position debout favorise la compression du cartilage et libère les molécules d'eau.^{24, 51, 75, 104} La matrice extracellulaire est composée principalement de grands agrégats de protéoglycanes hydratés piégés dans une matrice de fibres de collagène (figure 3).

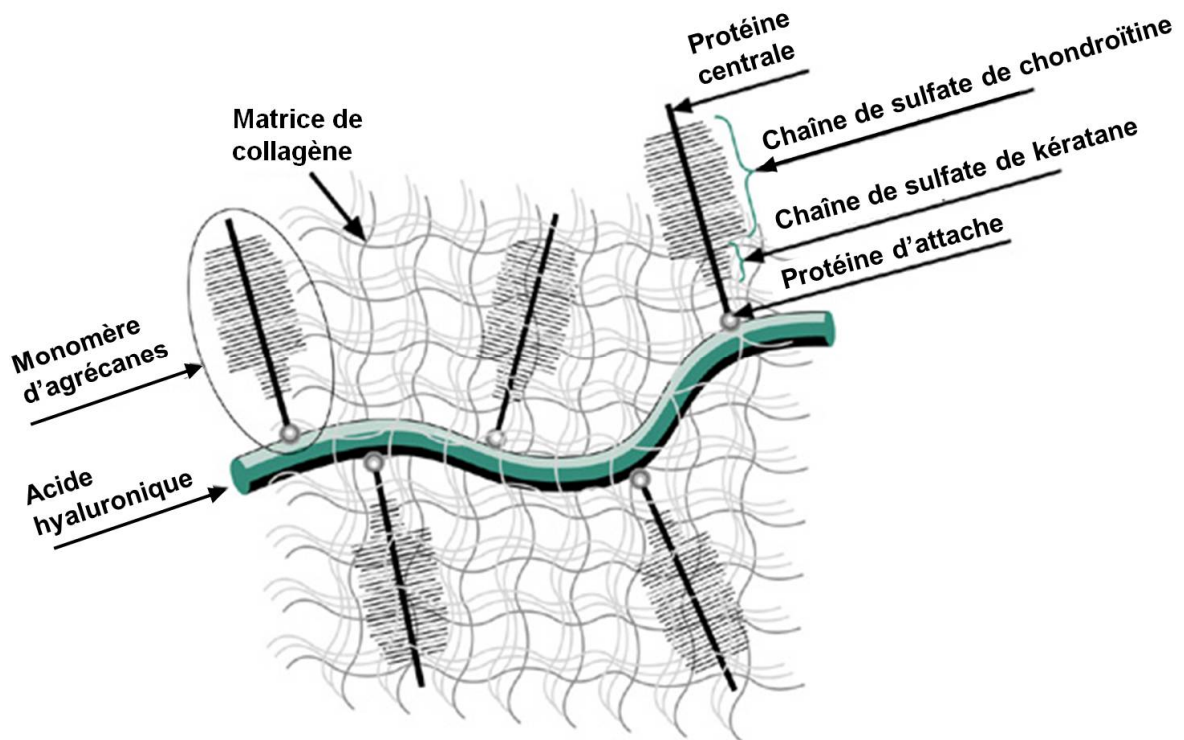


Figure 3. Représentation schématique de la matrice extracellulaire cartilagineuse
(Adapté du site internet de PeproTech, Inc.)

2.1.1.3. Les chondrocytes

Le chondrocyte (du grec *chondros*=cartilage et *kytos*=cellule) est l'unique vrai type cellulaire présent dans le cartilage. Ce sont des cellules arrondies et plutôt volumineuses dont le diamètre est compris entre 20 et 40 μm . Le chondrocyte se nourrit par diffusion à partir de l'os sous-chondral, aidé par les mouvements osmotiques engendrés par la compression ou la détente du cartilage articulaire.⁹⁴ Ce phénomène d'imbibition permet aussi le transport des éléments du métabolisme cellulaire depuis et vers le liquide synovial.

L'organisation des chondrocytes diffère du type de cartilage et du tissu auquel il a été assigné. Le chondrocyte secrète des molécules de la matrice telles que des cytokines et des enzymes capables de dégrader les fibres de collagène de type II, IX et XI et les chaînes de glycosaminoglycanes. Il assure ainsi la synthèse et le maintien de la matrice extracellulaire ainsi que le renouvellement du cartilage.¹³⁵

Dans un cartilage sain, le métabolisme chondrocytaire est régulé par un ensemble de cytokines et de facteurs de croissance. Les facteurs de croissance impliqués dans le catabolisme tels que l'IGF1 et TGF- β contrebalancent l'effet anabolique des interleukines telles que l'IL1 secrétée par les synoviocytes et les chondrocytes.¹⁶⁰ Dans des conditions pathologiques, ce métabolisme et celui de la matrice extracellulaire sont perturbés. Une suractivité catabolique va entraîner la production de signaux inhabituels et une altération phénotypique qui va dépasser l'hyperanabolisme.¹³⁴

2.1.1.4. *Les autres composants*

2.1.1.4.1. L'eau

L'eau représente 70 à 80 % du volume tissulaire cartilagineux. Son déplacement des mucopolysaccharides vers d'autres milieux intra-articulaires contribue à la protection de l'articulation.¹³⁵

2.1.1.4.2. Les protéines non collagéniques

Les protéines non collagéniques, dans une moindre mesure, font aussi partie de la composante cartilagineuse. Des glycoprotéines effectuent différentes connexions entre les chaînes de protéoglycanes, l'acide hyaluronique et les fibres de collagène¹³⁵

Il existe peu d'informations sur les protéines non collagéniques du cartilage comparativement aux collagènes. Certaines protéines comme l'annexine V ou l'anchorine CII sont présentes à la surface des chondrocytes.⁹⁵ Les protéines telles que la COMP (Cartilage Oligo Matrix Protein), la trombospondine, la tétranectine ou encore la ténascine jouent un rôle important dans les phénomènes d'adhésion et de migration des chondrocytes. Les intégrines sont des protéines transmembranaires qui permettent la liaison des chondrocytes au cytosquelette et qui induisent la transduction du signal nécessaire à l'activation de gènes cibles.⁹³

Le cartilage n'est pas le seul composant de l'articulation. D'autres composants sont essentiels pour le maintien et le bon fonctionnement articulaire. Les trois principaux sont le cartilage articulaire, la synovie et l'os sous-chondral. Leurs fonctions sont interdépendantes et c'est leur relation étroite qui permet de maintenir un équilibre biochimique (tableau II). Les deux prochaines sections vont préciser leur rôle respectif.

Tableau II. Relations structure-fonction et interdépendance des composants de l'articulation

Eléments distinctifs	Structure	Fonctions
Ligaments et tendons	Tissus conjonctifs denses et fibreux	- Prévient l'extension extrême des articulations, - Assure stabilité et force
Membrane synoviale	Tissu conjonctif aréolaire élastique, très vascularisé et composé de synoviocytes	- Sécrète le liquide synovial et sert de barrière hémossynoviale - Phagocyte les cristaux phlogogènes présents dans le liquide synovial
Liquide synovial	Tissu conjonctif liquide, visqueux et élastique	- Fournit les éléments nutritifs au cartilage de l'articulation - Lubrifie le cartilage pendant le mouvement articulaire
Cartilage	Cartilage hyalin ferme constituant la surface articulaire	- Supporte le poids - Répond de façon élastique à la compression
Cartilage basal	Cartilage calcifié, vascularisé	- Sépare le cartilage articulaire de l'os sous-chondral
Os sous-chondral	Os dur avec espaces médullaires	- Assure un appui à la surface articulaire - La cavité médullaire fournit des éléments nutritifs à la partie basale du cartilage et assure la production de cellules nécessaire à la formation d'un nouvel os

(Adapté de Hamerman et Taylor, 1993)

2.2. *La membrane et le liquide synoviale*

L'interaction entre la couche superficielle du cartilage articulaire et le liquide synovial crée une pellicule protectrice qui évite l'érosion du cartilage (figure 4). Le liquide synovial diminue les forces de frottements en lubrifiant les surfaces articulaires. Il facilite les mouvements de l'articulation et participe à la répartition des charges. Ce lubrifiant articulaire, tapissant la face interne de la cavité articulaire, est également un liquide nourricier pour le cartilage. Il se compose essentiellement d'acide hyaluronique ce qui lui donne des propriétés de viscosité et d'élasticité.³¹ Il est sécrété par la membrane synoviale qui régule les échanges entre le liquide synovial et le sang. C'est en partie l'innervation importante de la membrane synoviale qui contribue à la présence d'inflammations chez certains patients atteints par la pathologie de l'arthrose.¹³⁴

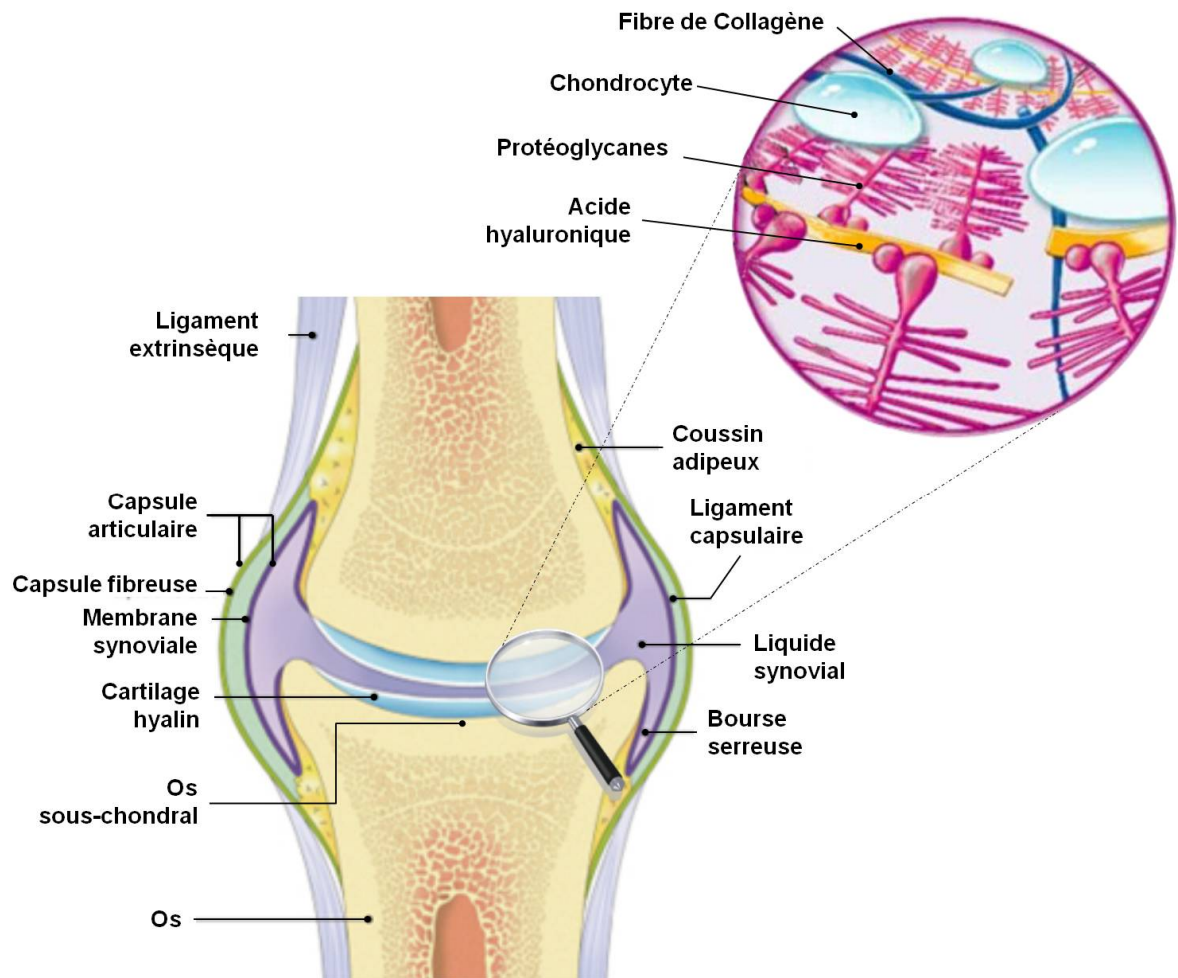


Figure 4. Les différentes composantes de l'articulation
(Adapté du site le corps humain des éditions Atlas et du site de Vitalbio)

2.3. *L'os sous-chondral*

Le troisième composant est l'os sous-chondral, c'est la partie osseuse sous-jacente au cartilage articulaire. Il existe maintenant plusieurs évidences qui indiquent que le cartilage articulaire et la région sous-chondrale forment une unité fonctionnelle nécessaire à une bonne communication intra-articulaire.⁷⁶ L'os sous-chondral joue un rôle prépondérant dans les modifications du cartilage articulaire engendrant des lésions cartilagineuses. L'os est non seulement un amortisseur important mais participe aussi au métabolisme du cartilage. La région sous-chondrale est richement vascularisée et ses vaisseaux terminaux ont un contact direct avec la couche profonde du cartilage pour permettre au flux nutritif d'aller jusqu'au cartilage.

Récemment, il a été confirmé que les interactions structurelles et fonctionnelles entre le cartilage articulaire et l'os sous-chondral étaient d'intérêt substantiel dans le développement de pathologies dégénératives telles que l'OA.^{14, 37, 38, 118}

3. Une pathologie dégénérative du cartilage : l'ostéoarthrose

La forme la plus connue des maladies articulaires est sans aucun doute l'arthrose ou ostéoarthrose (OA, aussi connue sous le nom d'arthrite dégénérative ou maladie dégénérative des articulations). L'OA est une maladie invalidante qui affecte un canadien sur dix (trois millions de Canadiens et 700 000 Québécois). On retrouve plus d'hommes atteints avant l'âge de 45 ans et au-delà de cet âge au contraire on retrouve plus de femmes. Il a été estimé qu'après 70 ans, 85 % des canadiens pourraient être affectés par l'OA résultant en un large fardeau pour la société canadienne entière. Les parties du corps les plus souvent atteintes sont les mains et les articulations ayant à supporter plus de poids, tels que les genoux, les hanches et la colonne vertébrale (*Arthritis Society, 2005*).

En théorie, l'arthrose s'accompagne d'un faible niveau d'inflammation et pourtant elle provoque chez certains patients de fortes douleurs dans l'articulation. L'inflammation est ce qui différencie l'arthrose (OA) de l'arthrite rhumatoïde (AR). L'arthrite rhumatoïde est une maladie des articulations qui s'accompagne d'inflammation. Quant à l'arthrose, c'est une maladie chronique des articulations caractérisée par une dégradation du cartilage articulaire et une ossification endochondrale ainsi que par la formation dans certains cas d'ostéophytes (excroissances osseuses au niveau des extrémités des os longs adjacentes à l'articulation). Dans ce mémoire, il ne sera question que de l'OA.

L'OA entraîne une perte de la mobilité sous l'effet cumulatif de pressions et de mobilisations des articulations au cours du temps. Elle entraîne des changements biochimiques et biomécaniques qui vont agir sur le cartilage articulaire et conduire lentement à un processus dégénératif de la matrice de collagène du cartilage qui perd sa capacité à se renouveler sous l'action d'enzymes et de cytokines qui détruisent les composants du cartilage.

L'arthrose n'affecte pas seulement le cartilage mais aussi d'autres structures articulaires comme l'os sous-chondral et la synovie en affectant la composition du liquide synovial qui assure la lubrification de l'articulation (figure 5). Les débris cartilagineux qui se détachent de l'os passent dans le liquide synovial, qui va réagir par une inflammation. L'arthrose n'est pas le résultat d'un vieillissement ordinaire mais résulte d'une exagération et d'une accélération des processus de réparation de l'articulation. Cette dégénérescence peut être provoquée par des lésions articulaires ou par des microtraumatismes répétés.

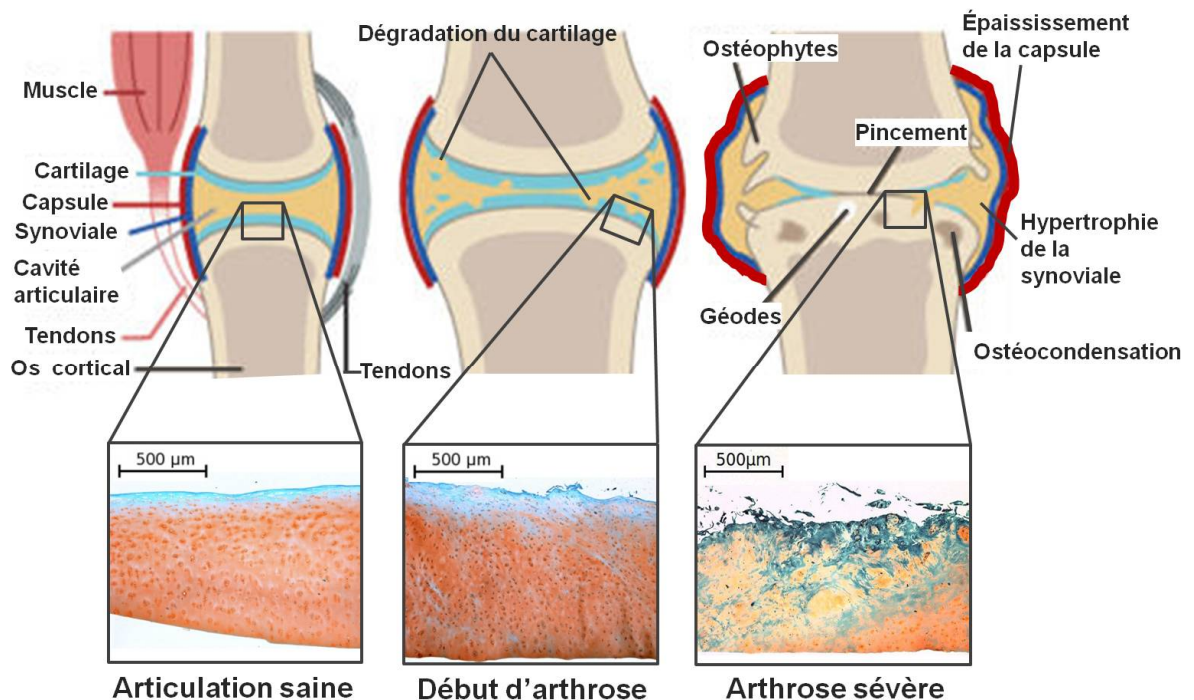


Figure 5. La progression de l'OA d'une articulation saine à très endommagée

Les coupes histologiques de cartilage humain ont été colorées à la Safranine-O et proviennent du laboratoire du Docteur Moreau (Adapté du site internet de Valorimer, 2009)

Malgré que bons nombres d'études soulignent le fait que les dommages sont réversibles et que le cartilage atteint peut être régénéré, il n'existe pas de stratégie de prévention, ni de traitements précoces de cette maladie chronique. De plus, les médicaments tels que les antidouleurs, les anti-inflammatoires et les injections de corticoïdes ne soignent que les symptômes. Ils favorisent la détérioration du cartilage et empêchent sa reconstruction.^{12, 13}

Certains médicaments ou traitements, dérivés de substances naturelles retrouvés dans le corps humain comme le sulfate de glucosamine et de chondroïtine ou d'algues comme le lithothamne, sont sensés stimuler les mécanismes de réparation tissulaire mais leurs effets controversés ne sont pas reconnus par l'ensemble du corps scientifique.^{112, 146, 158}

La cause et les facteurs à risques de l'OA sont encore mal connus. Il est clair qu'elle est aggravée par le surpoids, le manque d'activité physique, la fatigue, la tension musculaire, les microtraumatismes et les agressions externes (le froid et l'humidité). Des facteurs héréditaires pourraient aussi jouer un rôle dans cette pathologie.²²

La chirurgie est l'option ultime pour les personnes qui souffrent toujours ou qui ne peuvent plus réaliser les gestes de la vie quotidienne. En particulier, l'arthroplastie, ou remplacement de l'articulation, est une modalité thérapeutique importante et efficace en cas d'arthrose de la hanche ou du genou. La gonarthrose (arthrose du genou) est la plus répandue. Son incidence est plus de deux fois supérieure à celle de la coxarthrose (arthrose de la hanche). Cette incidence augmente avec l'âge. Elle peut toucher l'articulation fémoro-tibiale (entre le fémur et le tibia), l'articulation fémoro-rotulienne (entre le fémur et la rotule) ou les deux à la fois.

Bien que l'arthrose soit associée au vieillissement, plus de 1,9 millions de personnes dans la force de l'âge ont été diagnostiqués comme étant atteints d'arthrite. Les coûts médicaux et sociaux engendrés pourraient être atténués en développant des tests de dépistage précoce de la maladie avant que les lésions tissulaires ne soient irréversibles. Dans cette optique là, l'étude des voies de signalisation intracellulaire régulant l'homéostasie du cartilage représentent des cibles potentielles prometteuses et font l'objet de nombreuses recherches.

Ces voies font intervenir une cascade de molécules telles que des gènes cibles, des récepteurs membranaires ou des facteurs de transcription dont la structure et la fonction sont mal ou peu connues.

4. Les voies de signalisation dans le cartilage articulaire

Les chondrocytes sont des cellules ayant de grandes ressources métaboliques. Malheureusement, les voies et les mécanismes qui régulent l'homéostasie de ces cellules sont encore mal connus. L'investigation de certaines voies de signalisation a montré qu'elles affectaient le développement du cartilage. La caractérisation des phénotypes engendrés par des mutations génétiques a contribué à mieux comprendre les mécanismes régulant la structure du squelette, la chondrogenèse, l'ossification endochondrale et la formation des articulations. Ces voies signalétiques comprennent les facteurs de différenciation et de croissance extracellulaire incluant les protéines BMP (*Bone Morphogenic Proteins*), les facteurs de croissance FGF (*Fibroblast Growth Factors*), le facteur PTHrP (*Parathyroid Hormone (PTH)-related Peptide*), les composants de la matrice extracellulaire et les membres des familles Hedgehog (Hh) et Wnt. Elles transmettent d'importants signaux nécessaires à la régulation de mécanismes vitaux pour la cellule tels que la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire. La transduction de ces signaux dans les cellules mésenchymateuses et les chondrocytes articulaires provoque de nombreuses modifications dans l'expression génique. La régulation de ces gènes est médiée par des facteurs de transcriptions tels que les protéines SMAD, le facteur SOX9 et le facteur RUNX2/CBFA1 (*Runt-related transcription factor 2/Core-Binding Factor Alpha 1*).¹³³ Les principales voies de signalisation et principaux facteurs de transcription régulant l'homéostasie articulaire sont détaillées ci-dessous.

4.1. La voie des BMP

Les protéines BMP sont un groupe de facteurs de croissance et de cytokines connus pour leur capacité à induire la formation des os et du cartilage. Des données expérimentales suggèrent que la voie des BMP serait nécessaire pour le maintien du cartilage articulaire sain chez le nouveau-né et que la modulation de cette voie de signalisation jouerait un rôle important dans les maladies articulaires.¹²⁴ Les récepteurs aux BMP permettent la transduction de signaux par le biais des protéines SMAD1, 5 ou 8 (R-SMAD) et SMAD 4 (Co-SMAD) pour aller cibler la transcription de gènes cibles.¹³² Ce sont les principaux facteurs anaboliques du cartilage articulaire (figure 6).

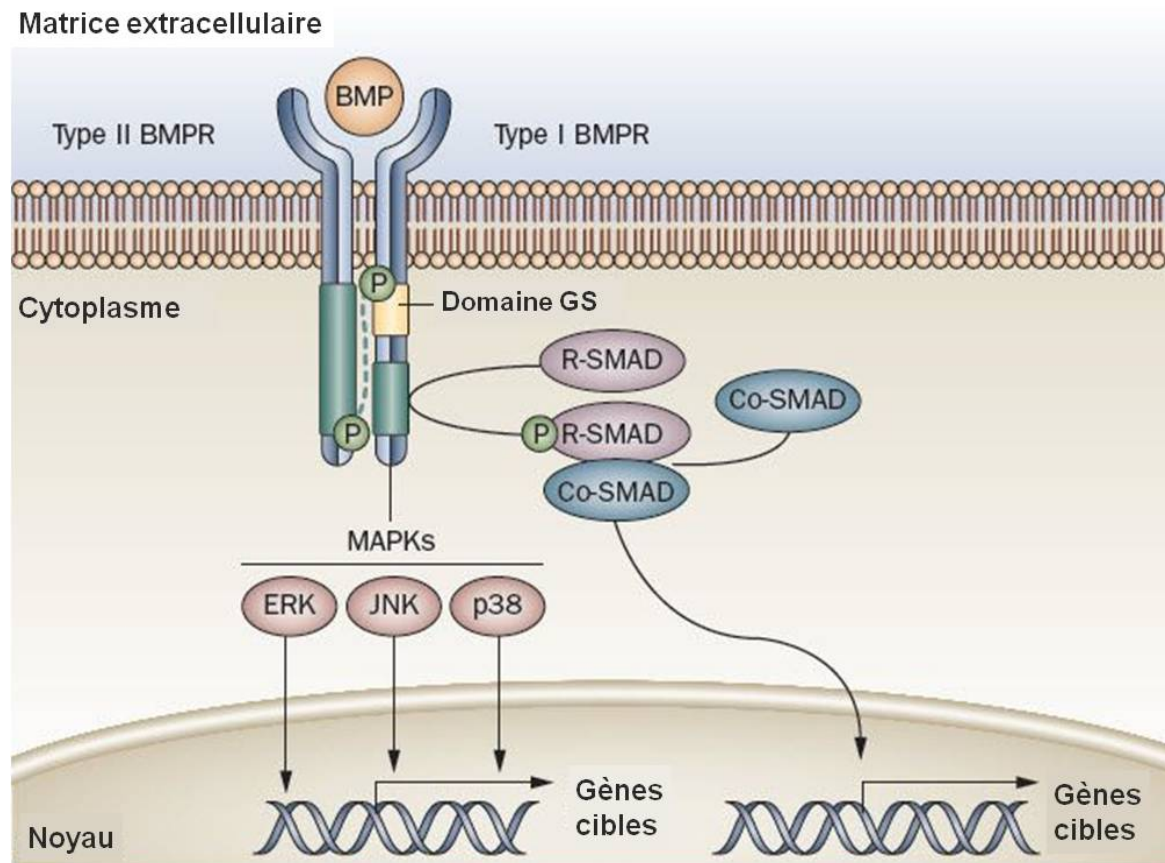


Figure 6. La voie de signalisation des BMP à travers les protéines SMAD
(Adapté de Shore *et al.*, 2010)

4.2. Le facteur *SOX9*

SOX9 est un facteur de transcription essentiel pour la formation de la matrice extracellulaire du cartilage. Dans les chondrocytes, l'expression de *SOX9* est régulée par la pression osmotique articulaire.¹¹⁰ De plus, des chercheurs ont identifié *SOX9* comme un important facteur pour la différenciation chondrocytaire et la formation du cartilage.

L'expression de *SOX9* dans des chondrocytes articulaires de souris sauvages est élevée au cours du développement embryonnaire et diminue chez l'adulte.⁹

L'expression de *SOX9* est en partie contrôlée par la voie Wnt et *SOX9* régule à son tour, dans une boucle de rétroaction négative, l'activité du complexe Wnt/ β -caténine/TCF dans le but de contrôler la chondrogenèse.¹⁴⁵ La figure 7 représente les différentes étapes de la différenciation chondrocytaire où intervient *SOX9*.³

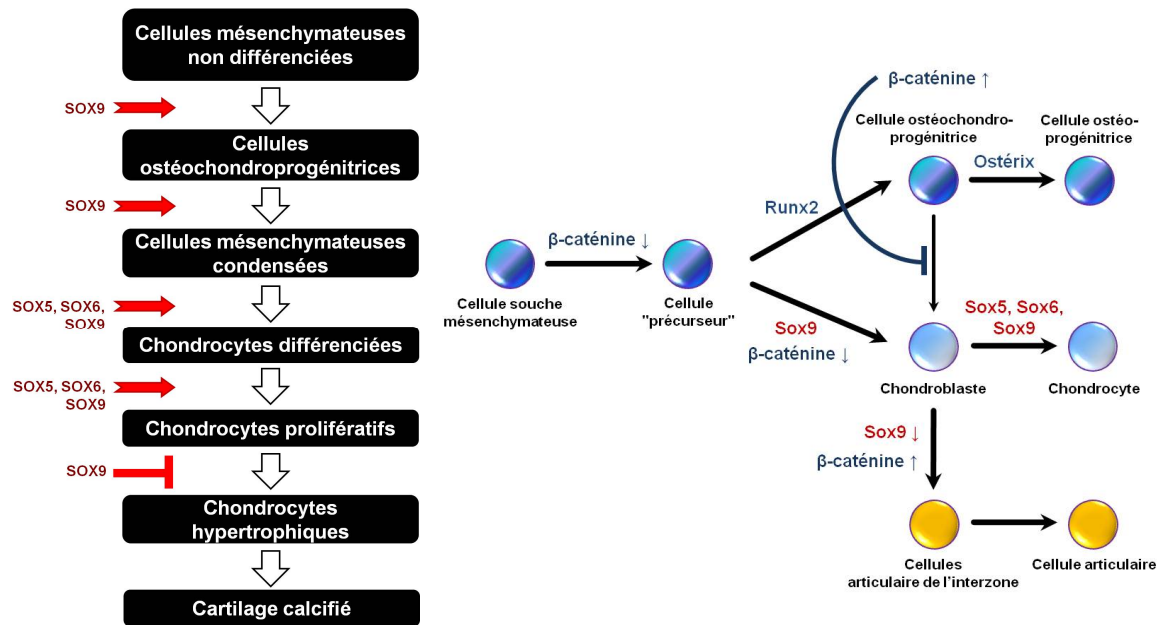


Figure 7. Les étapes d'intervention du facteur SOX9 dans le développement des chondrocytes
 (Adapté de Akiyama *et al.*, 2002 et du site internet de l'IMP
 (Research Institute of Molecular Pathology) de Vienne)

4.3. La voie Wnt/béta-caténine

La voie Wnt/ β -caténine est impliquée dans la formation et le développement de l'articulation lors de la squelettogenèse.¹⁹ Il semblerait que la voie Wnt soit une voie charnière dans la réparation du cartilage, dans le catabolisme de la matrice extracellulaire, dans la dédifférenciation des chondrocytes articulaires et dans le contrôle négatif de l'apoptose chondrocytaire.

Une étude menée par Velasco *et al.* chez des patients souffrant d'arthrose de la hanche ou du genou montre une activation de la voie de signalisation Wnt suggérant son implication dans la déformation du cartilage articulaire et dans les modifications subies par l'os sous-chondral.¹⁵²

Enfin, il a été démontré que la voie Wnt/ β -caténine stimulerait l'hypertrophie des chondrocytes en partie à travers l'activation du facteur RUNX2 qui en retour induirait l'expression de *COL10a1*, un marqueur important de l'arthrose.²⁷

4.4. *La voie Hedgehog*

Enfin, l'une des voies incontournables de la régulation os/cartilage est la voie Hedgehog. Le gène hedgehog (Hh) a été identifié en 1978 par Eric Wieschaus et Christiane Nusslein-Volhard suite à leur travaux sur le développement embryonnaire de la Drosophile, appelée aussi mouche à fruit.

Le nom Hedgehog (hérisson en français) fait référence au phénotype d'un mutant drosophilien présentant des protubérances comparable à des épines. Chez les mammifères, la famille des facteurs Hedgehog (Hh) est composée de trois membres appelés également des morphogènes :

- Desert (DHH) est impliqué dans le développement du système nerveux (cellules gliales) et dans la spermatogenèse.^{10, 107}

- Sonic (SHH) est impliqué dans l'asymétrie latérale, l'axe dorso-ventral et antéropostérieur, l'organogenèse des vertébrés et dans le développement du système nerveux central (SNC).^{47, 155}

- Indian (IHH) est impliqué dans les premières étapes du développement embryonnaire, l'ossification endochondrale, la maturation des chondrocytes et des ostéoblastes.^{21, 56, 87}

4.4.1. Le mécanisme de la voie Hedgehog

Les facteurs Hh sont des molécules sécrétées et agissent soit par voie paracrine, soit par voie autocrine en fonction du contexte cellulaire. Les trois facteurs Hh reconnaissent le même récepteur membranaire *Patched* (PTCH).

En absence de ligands Hh, un antagoniste intracellulaire va être clivé et va réprimer les gènes cibles de la voie Hh tels que *GLI*, *PTCH* et *HHIP* par l'intermédiaire de l'inhibition de la protéine membranaire *Smoothed* (SMO) par PTCH.⁷⁰

À l'inverse, lorsque les facteurs Hh sont disponibles, ils se lient au récepteur PTCH et lèvent l'inhibition de SMO pour permettre l'activation des facteurs de transcription GLI1, 2 et 3 (figure 8).

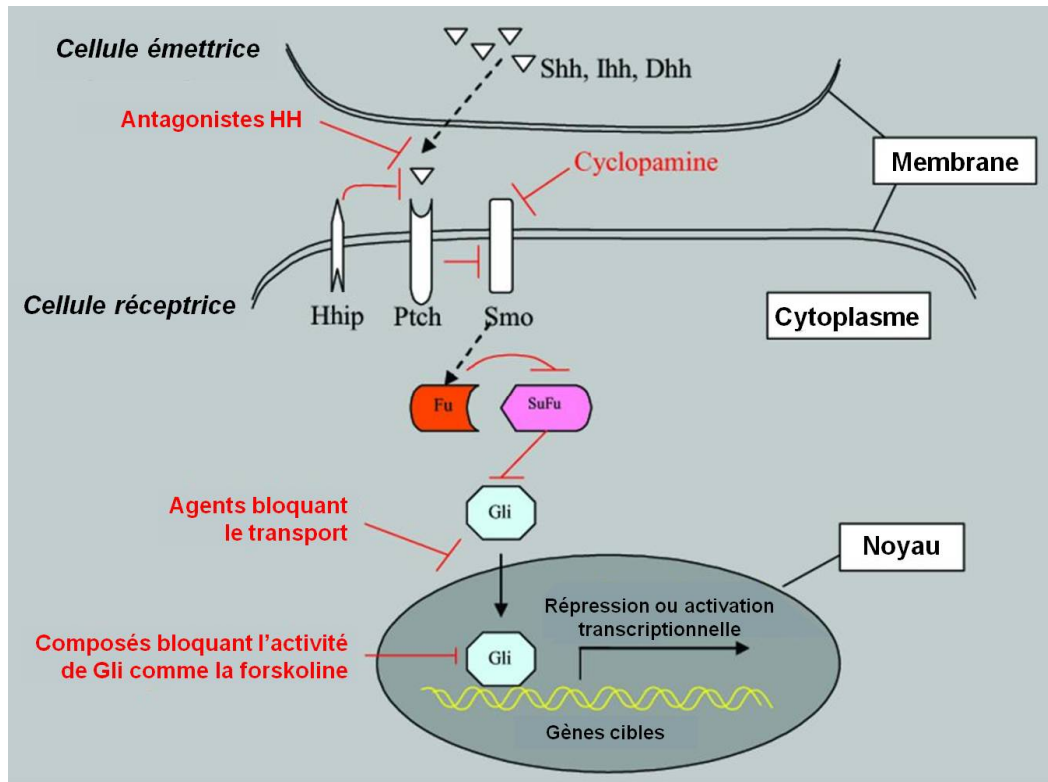


Figure 8. La voie de signalisation Hedgehog
(Adapté de Liu *et al.*, 2005)

Au départ, le récepteur des protéines Hh, PTCH, a été identifié chez la Drosophile. C'est une protéine d'environ 145 kDa qui comprend douze domaines transmembranaires.⁵² *Smoothened* (SMO) est une protéine à sept sections transmembranaires qui appartient à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR).⁴ La protéine SMO ne lie pas directement les facteurs Hh, mais participe à la transmission du signal Hh à l'intérieur de la cellule réceptrice.

La protéine HHIP (*Hedgehog Interacting Protein*) a été caractérisée chez la souris comme une glycoprotéine membranaire de type I, comprenant en C-terminal une longue partie extracytoplasmique et deux domaines de type EGF (*Epidermal Growth Factor*). HHIP est un antagoniste de la voie Hh en bloquant la transmission du signal à l'intérieur de la cellule cible. Il empêche les protéines Hh d'interagir avec PTCH en se liant avec elles.¹⁸

Les trois membres Hh subissent les mêmes modifications post-traductionnelles : soit tout d'abord le clivage de la partie C-terminale puis l'ajout d'un groupement cholestérol permettant l'ancrage et la sécrétion de la protéine à travers la membrane et enfin l'ajout d'un groupement palmityl nécessaire à l'optimisation de leur activité.¹²¹

Leur spécificité d'action est régulée par une expression spatio-temporelle variable pour chaque membre : *Shh* à l'affinité la plus forte puis vient *Ihh* et enfin *Dhh*.

4.4.2. Le facteur Indian Hedgehog (IHH)

Au départ, la protéine Indian Hedgehog (IHH) est un polypeptide de 449 acides aminés dont la masse est d'environ 49 kDa. Après clivage du peptide signal, la protéine mature IHH est composée de 384 acides aminés et sa masse est d'environ 42 kDa. Cette protéine subira par la suite un autoclivage générant deux peptides : un amino-peptide d'environ 19 kDa qui permettra la signalisation et un carboxyl-peptide d'environ 23 kDa. IHH est synthétisé par les chondrocytes hypertrophiques ou pré-hypertrophiques. Dans les os de souris en croissance, le gène *IHH* est exprimé par les chondrocytes préhypertrophiques de la plaque de croissance où il régule négativement la différenciation des chondrocytes et où il est nécessaire pour la prolifération des chondrocytes sains.

Néanmoins, les mécanismes impliqués dans la régulation transcriptionnelle du gène *IHH* aussi bien que les facteurs de transcription qui lient sa séquence promotrice sont peu connus. Deux groupes ont identifié des sites fonctionnels SMAD et RUNX2/3 au niveau du promoteur d'*IHH* par des essais d'activation transcriptionnelle. Une autre équipe a quant à elle suggéré que la voie Wnt/ β -caténine régulerait directement l'expression d'*Ihh* dans les chondrocytes préhypertrophiques par l'intermédiaire du complexe TCF/LEF1.^{128, 136, 169}

Une étude de Wang *et al.* en 2009, a permis d'identifier ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*) comme un nouvel activateur transcriptionnel d'*Ihh* dans les chondrocytes. ATF4 est une protéine de type glissière à leucine de la famille des protéines CREB (*cAMP Response Element-Binding*). L'inactivation génique d'*Atf4* (*Atf4*^{-/-}) chez la souris mène à de sévères anomalies du squelette. ATF4 est exprimé dans les chondrocytes prolifératifs et pré-hypertrophiques de la plaque de croissance, et joue un rôle dans l'ossification endochondrale. Ils ont pu observer aussi chez ces souris, une importante diminution de l'expression d'*Ihh*. À l'inverse, la surexpression d'ATF4 dans les chondrocytes induit l'expression endogène d'*Ihh*. ATF4 régulerait donc la prolifération et la différenciation des chondrocytes durant l'ossification endochondrale en se liant directement au promoteur d'*Ihh* et en activant sa transcription.¹⁶¹

Des travaux ont aussi montré un rôle de régulateur transcriptionnel d'*Ihh* pour le facteur à homéodomaine MSX2 impliqué dans le contrôle de l'ossification enchondral. MSX2 stimulerait la maturation des chondrocytes pré-hypertrophiques en activant indirectement l'expression d'*Ihh* via les protéines SMAD et BMP2.⁵

IHH est exprimé de façon prédominante dans les cellules préhypertrophiques et stimule l'expression du facteur PTHrP (*Parathyroid Hormone-related Peptide*) qui à son tour régule négativement la fin de la différenciation des chondrocytes par l'intermédiaire de son récepteur PTH/PTHrP de type I. Ce récepteur est exprimé à un faible niveau dans les chondrocytes en prolifération mais le niveau augmente dès que la prolifération cesse. L'hormone PTHrP maintient les chondrocytes en prolifération et empêche leur maturation (figure 9). De nombreuses données suggèrent aussi qu'*IHH* contrôle positivement la différenciation des chondrocytes péri-articulaires et la morphogénèse du squelette d'une manière PTHrP dépendante et indépendante.^{65, 79, 137, 154} La différenciation des chondrocytes est ainsi contrôlée à de multiples étapes par cette boucle de rétroaction de PTHrP et d'*IHH* entraînant l'augmentation du nombre de chondrocytes ayant un haut taux de prolifération.^{59,}

81

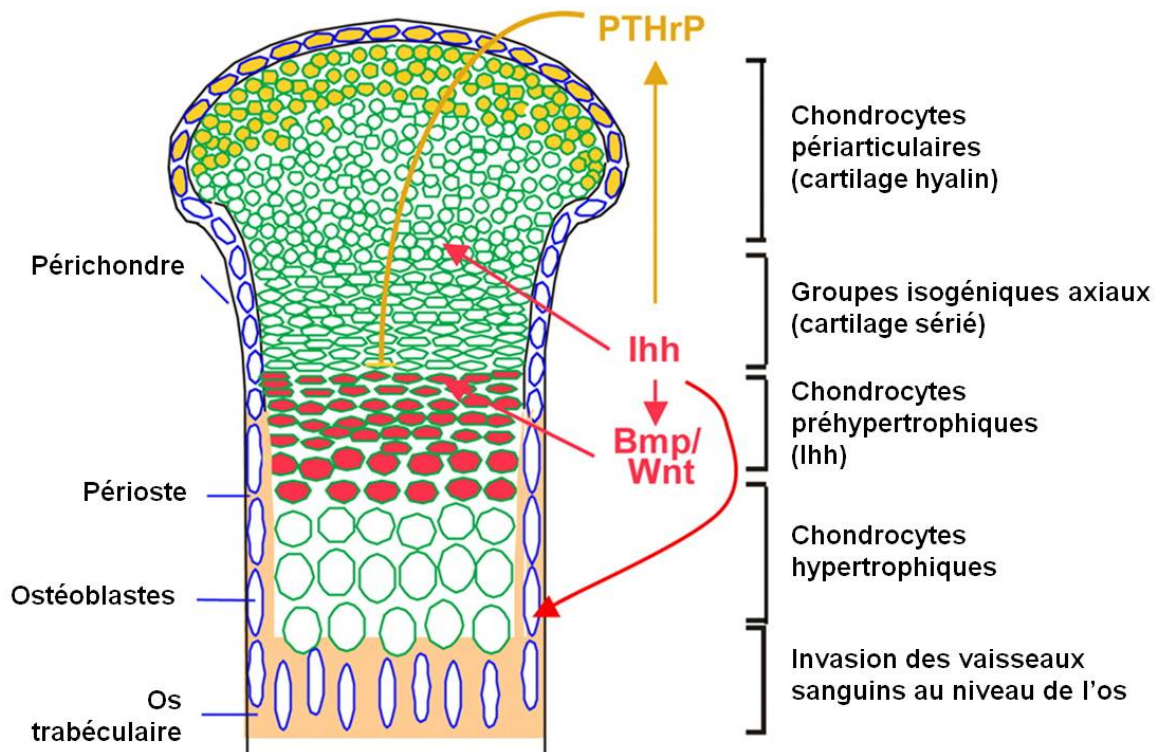


Figure 9. L'axe Indian hedgehog-PTHrP

(D'après K.K.Mak *et al.*, 2008)

Dans le cartilage en croissance et durant la phase endochondrale de l'ostéogenèse, le facteur de transcription IHH agit au niveau de trois phases : la prolifération des chondrocytes, leur différenciation en chondrocytes hypertrophiés et la maturation des ostéoblastes. IHH induit alors la production des protéines BMP2/4 et favorise la prolifération et la différenciation des chondrocytes permettant ainsi une croissance harmonieuses de l'os. IHH est connu pour son rôle primaire durant le développement et la formation des os long notamment dans le processus d'ossification endochondral. Une étude démontre que la voie IHH est directement requise au niveau des ostéoblastes pour le développement des os longs et qu'IHH fonctionne conjointement avec d'autres facteurs comme les BMP pour induire la différenciation des ostéoblastes. Il a été suggéré qu'IHH pourrait agir *in vivo* sur des cellules progénitrices pour promouvoir la différenciation des ostéoblastes et pour prévenir celle des chondrocytes.⁷²

En accord avec ces données, il a été suggéré par Shimoyama *et al.* qu'IHH régulerait la différenciation ostéoblastique des cellules mésenchymateuses à travers l'activation transcriptionnelle de RUNX2 par GLI2. Ce même groupe a laissé entendre qu'IHH stimulerait l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) au niveau de la zone de cartilage calcifié et l'expression de l'ostéocalcine dans les chondrocytes calcifiés.¹³¹

Les chondrocytes et les ostéoblastes sont originaires des mêmes cellules progénitrices mésenchymateuses et pourtant les deux sont caractérisés par des profils distincts d'expression génique une fois différenciés. Des recherches ont montré que la voie de signalisation p38 régulerait la communication cellulaire entre les chondrocytes et les cellules péri-chondrales durant le développement squelettique, partiellement à travers l'augmentation de la voie IHH.¹³⁹

D'autre part, de plus en plus de travaux suggèrent qu'IHH agit comme un médiateur des mécanismes de mécano-transduction qui convertissent des signaux mécaniques en stimuli biochimiques médiant ainsi la prolifération cellulaire dans le cartilage condyalaire.¹⁴² Par conséquent, ces données soutiennent l'idée que la voie Hh et peut-être même le facteur IHH régulerait la communication intercellulaire entre l'os et le cartilage.

4.4.3. La voie Hedgehog et l'OA

Le rôle d'IHH dans le cartilage n'est plus à prouver. Pourtant, aucun lien entre certaines pathologies articulaires et cette voie n'avait été démontré jusqu'à récemment. Ainsi, deux équipes de recherche ont proposés un rôle pour le facteur IHH dans le développement de l'OA.

D'un côté, l'équipe du Dr Chen a travaillé sur le rôle de l'axe IHH-PTHrP dans la maintenance du cartilage articulaire. Leurs travaux les ont amenés à penser que la dérégulation de ce système pourrait contribuer à la pathogénèse de l'OA.¹⁷

De leur côté, des chercheurs canadiens ont étudié l'expression de gènes cibles de la voie Hh par RT-qPCR dans des chondrocytes de cartilage articulaire de patients OA et de souris arthrosiques dont la pathologie a été chirurgicalement induite. Ils ont observé une activation de la voie Hh dans les échantillons très atteints par l'OA en opposition avec ceux moins atteints. Des analyses histologiques montrent une aggravation du phénotype OA lorsque les niveaux protéiques Hh sont plus élevés. Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de la voie Hh renverse le processus arthrosique.⁶⁷

5. Deux facteurs d'intérêt potentiel dans le cartilage articulaire

Ce projet s'inscrit dans la suite logique de ces récents travaux et a cherché à mettre en évidence des nouvelles voies de régulation du gène *IHH* dans le cadre de son rôle potentiel dans la pathologie de l'OA. Depuis quelques temps, la recherche se consacre au développement d'inhibiteurs de facteurs de transcription clés dans la régulation de voies de signalisation permettant ainsi de développer des thérapies ciblées ayant le moins d'effets secondaires non souhaités.

Pour cela, une meilleure connaissance des mécanismes d'activation et d'action de ces facteurs de transcription est nécessaire. La suite de cette revue sera consacrée à deux d'entre eux, NFAT1 et PITX1, qui pourraient jouer un rôle prépondérant dans la régulation du gène *IHH*.

5.1. *La famille NFAT*

La voie de signalisation NFAT aurait un rôle majeur dans l'origine des vertébrés.¹⁶³ Initialement décrit par le Docteur Gerald R. Crabtree comme un complexe transcriptionnel qui lie directement le promoteur du gène de l'interleukine 2, NFAT est une famille de facteurs impliqués dans la régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes de cytokines dans les cellules T lymphocytaires.^{120, 129}

Depuis, il a été prouvé à maintes reprises que les protéines NFAT n'étaient pas seulement cantonnées au système immunitaire. L'ensemble des données recueillies prouvent que les protéines NFAT sont impliquées dans le contrôle de l'expression de gènes impliqués dans le développement et l'adaptation de nombreux types cellulaires chez les mammifères.⁵⁰

Les protéines NFAT sont présentes et jouent un rôle important dans une grande variété d'organes incluant le cœur, les vaisseaux sanguins, le système nerveux central, le tégument, l'intestin, les poumons, les os, le cartilage et durant le développement des muscles squelettiques.¹⁴⁴ Par des expériences *in vitro* et *in vivo*, il a été prouvé que NFAT est un régulateur clé de l'ostéoclastogénèse. La voie NFAT régule négativement la différenciation des ostéoblastes et la formation des os.⁸⁹

NFAT contrôle l'équilibre entre les voies anaboliques et cataboliques dans le cartilage. Little *et al.* ont définis un rôle majeur pour les protéines NFAT dans le catabolisme du cartilage via la stimulation de l'expression des métalloprotéases impliquées dans la dégradation des agrécanes et des collagènes.⁶⁸

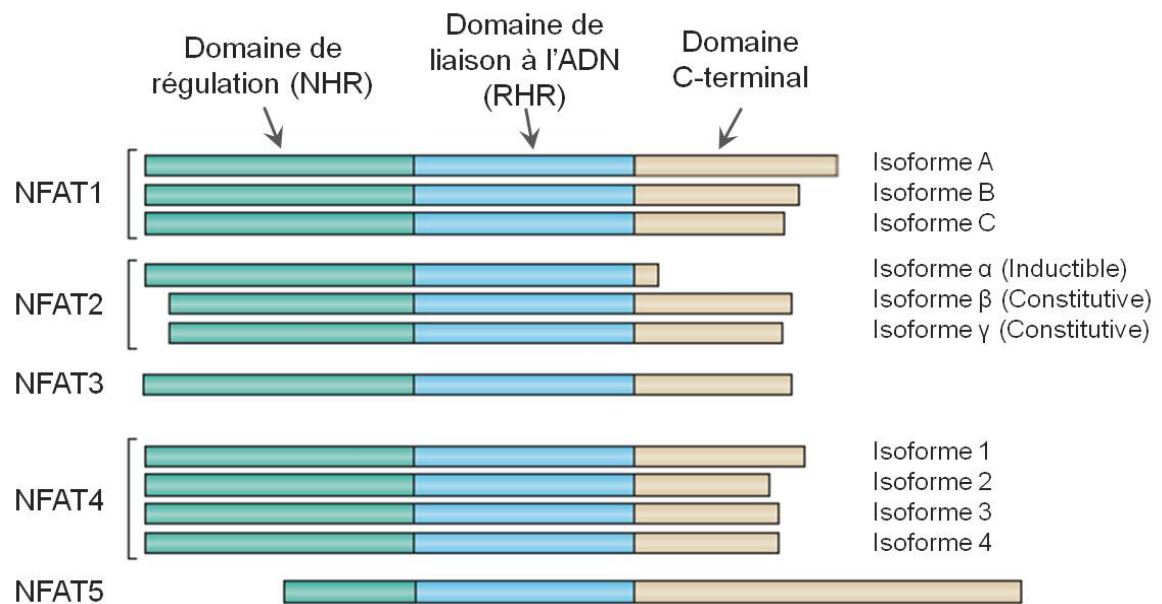
Cette famille de cinq membres : NFAT1 à NFAT5, en compte quatre dont la régulation est contrôlée par la calcineurine, une phosphatase Ca²⁺-dépendante.⁴⁹ NFAT5 est le seul membre à réguler les gènes impliqués dans le stress osmotique (tableau III).

Tableau III. Liste des protéines de la famille NFAT incluant leurs noms alternatifs et le principal mécanisme de régulation qui caractérise chaque protéine

Nom de la protéine	Autres noms	Mécanisme de régulation	Références
NFAT1	NFATp, NFATc2	Ca ²⁺ /Calcineurine	Mc Caffrey <i>et al.</i> 1993 ⁸⁸
NFAT2	NFATc, NFATc1	Ca ²⁺ /Calcineurine	Northrop <i>et al.</i> 1994 ¹⁰⁰
NFAT3	NFATc4	Ca ²⁺ /Calcineurine	Hoey <i>et al.</i> 1995 ⁴⁸
NFAT4	NFATx, NFATc3	Ca ²⁺ /Calcineurine	Hoey <i>et al.</i> 1995 ⁴⁸ ; Masuda <i>et al.</i> 1995 ⁸⁶ ; Ho <i>et al.</i> 1995 ⁴⁶
NFAT5	NFATz, TonEBP, OREBP	Stress osmotique	Miyakawa <i>et al.</i> 1999 ⁹² ; Lopez-Rodriguez <i>et al.</i> 1999 ⁷⁴ ; Jauliac <i>et al.</i> 2002 ⁵⁴

(Adapté de Hogan *et al.*, 2003)

Les gènes *NFAT* codent pour des protéines dont la taille est d'environ 700 à 1100 acides aminés. Chaque gène *NFAT* peut être alternativement épissé en un ou plusieurs isoformes qui diffèrent au niveau de leur région N- et C-terminal bien que la partie centrale reste conservée (figure 10).⁷⁸

**Figure 10. Homologie de séquences entre les membres NFAT**

(Adapté de F. Macian, 2005)

Avec 72 % d'homologie de séquence entre NFAT1 et NFAT2, la délétion de la région C-terminal de NFAT1 entrainerait une homologie presque totale entre NFAT1 et NFAT2.

Un groupe de chercheurs a même découvert que NFAT1 pouvait activer l'expression de l'IL4 dans les cellules T et que sa forme tronquée réduisait son activité.²⁵

D'autres affirment que le facteur NFAT1 (l'isoforme long, avec son domaine C-terminal) aurait un rôle suppresseur de tumeurs et le facteur NFAT2 (l'isoforme court) serait un oncogène, leur permettant ainsi d'induire des phénotypes différents. NFAT1 engendrerait l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose alors que NFAT2 favoriserait la prolifération et la transformation cellulaire.¹²³ Ces données sont assez controversées et même si Ranger *et al.* ont été les premiers à proposer que NFAT1 était un anti-oncogène, d'autres travaux sur des tumeurs cartilagineuses humaines infirment leurs conclusions.^{6, 119} Il apparaît quand même clairement que les membres NFAT sont capables d'effets antagonistes en étant spécifiquement activés dépendamment des conditions dans la cellule (stress ou non-stress) et du tissu cible.

5.1.1. Les différents domaines des protéines NFAT

La structure des protéines NFAT est divisée en trois grands domaines et plusieurs sous-domaines (figure 11). Chaque domaine est caractérisé par une fonction différente dans la voie de signalisation NFAT. Le domaine C-terminal est distinct par sa séquence et sa longueur pour chaque isoforme NFAT.⁹⁸

L'un des domaines communs à toutes les protéines NFAT est le domaine de liaison à l'ADN (domaine DBD), dont la séquence présente plus ou moins de similarités avec celle de la famille des facteurs de transcription Rel, d'où son nom domaine RHR (*Rel-Homology Region*). Il reconnaît un site consensus conservé 5'-A/TGGAAA-3'. Ce segment est aussi le site de liaison des partenaires Jun et Fos à la protéine NFAT.

Enfin, le domaine de régulation (NHR) comporte le domaine de liaison de la calcineurine (CaN) et les différents motifs de régulation SRR, SP_x, NLS et KTS où à lieu la déphosphorylation/phosphorylation de NFAT. NFAT est régulé de façon très fine au niveau de sa phosphorylation en réponse à différents signaux intracellulaires, pour réguler sa localisation subcellulaire, son attachement à l'ADN et son activité transcriptionnelle.¹⁰²

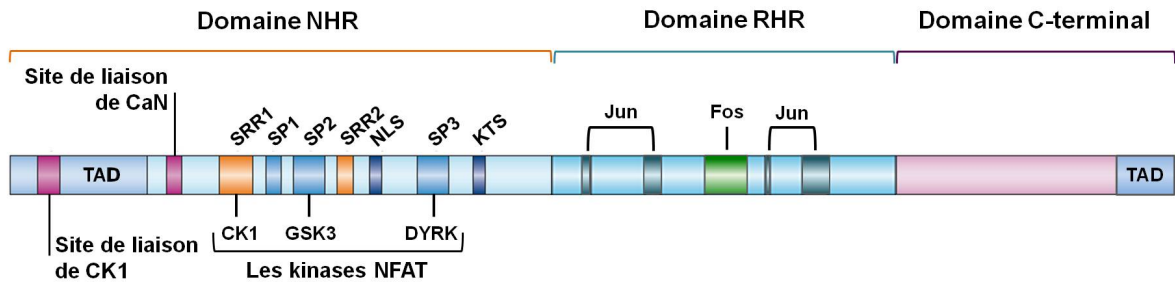


Figure 11. Schéma de la structure primaire de la protéine NFAT

Le domaine de régulation (NHR) comporte le domaine de liaison de la calcineurine (CaN) et les différents motifs de régulation SRR, SPX, NLS et KTS où a lieu la déphosphorylation /phosphorylation. Le domaine RHR (*Rel-Homology Region*) est le domaine de liaison à l'ADN et le point de liaison avec des partenaires tels que Fos et Jun. Les domaines TAD sont des domaines de transactivation dans la région N- ou C-terminal. (Adapté de M. R. Müller et A. Rao, 2010).

NFAT est gardé inactif dans le cytoplasme cellulaire par phosphorylation sur de multiples résidus sérines en attendant son activation par des signaux (ligands tissus-spécifiques) transduits par des récepteurs cellulaires de surface tel que les récepteurs RTK (*Receptor Tyrosine Kinases*) et TCR (*T Cell Receptor*). Ces sérines sont contenues dans deux types de motifs sérine riche : le SRR1 et le motif SP.

5.1.2. Le mécanisme d'activation de NFAT par la voie calcineurine calcium-dépendante

L'activation des RTK et de TCR stimule la phospholipase $C\gamma$ (PLC γ) (figure 12). Cette dernière, par une réaction d'hydrolyse, va induire le relargage du calcium provenant du réticulum endoplasmique (RE). Le calcium va s'associer à la calmoduline (CaM) couplée à la calcineurine phosphatase (CaN) et déphosphoryler le facteur cytoplasmique NFAT. Cette déphosphorylation favorise la translocation nucléaire de NFAT et la transcription des gènes cibles. Les récepteurs stimulent aussi la voie des MAP kinases activant le cofacteur AP1 (*Activator Protein 1*). NFAT collabore aussi avec des facteurs tels que le complexe Fos-Jun pour la transcription des gènes cibles.⁵³ Les protéines NFAT sont régulées par plusieurs kinases qui doivent être coordonnées pour contrôler l'activation de NFAT car aucune kinase ne régule la pleine phosphorylation de tous les motifs.¹⁰²

L'une d'elles, CK1 (*Casein Kinase 1*) forme avec NFAT un complexe de haut poids moléculaire dans les cellules T qui se dissocie seulement pour l'activation du facteur transcriptionnel. CK1 phosphoryle seulement SRR1, la région primaire nécessaire à l'import nucléaire de NFAT. CK1 s'associe à DYRK2 (*Dual-specificity tyrosine-phosphorylation Regulated Kinase 2*) pour retenir la forme hyper-phosphorylée de NFAT au cytoplasme alors que le complexe CK1, DYRK1 et GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*) favorise l'export nucléaire de NFAT.

Cette dernière, GSK3, cible la région SP2 et phosphoryle les motifs SP, une phosphorylation après l'autre. Les motifs SP sont capables de contrôler l'affinité de liaison à l'ADN et l'export nucléaire de la protéine NFAT. GSK3 agit en synergie avec CK1 pour réguler l'export nucléaire de NFAT1. Si le site de liaison de CK1 avec NFAT est muté ceci cause une localisation nucléaire permanente du facteur. À l'inverse, il existe des inhibiteurs pharmacologiques antagonistes de la calcineurine qui bloquent la déphosphorylation et l'accumulation nucléaire de NFAT, FK506 et la cyclosporine A (CsA).

Les kinases CK1 et GSK3 agissent aussi sur les protéines Wnt, Hh et celles des voies du rythme circadien (PER2) par l'intermédiaire des mêmes motifs. p38 et JNK1 (*cJun N-terminal Kinase 1*) sont aussi connues pour réguler la fonction de NFAT.¹⁰²

Ce mécanisme de régulation de NFAT par différentes kinases soulève encore quelques doutes. Deux modèles de cinétiques d'import/export ont été proposés et ne font pas l'unanimité. Le mécanisme modulaire propose que l'import et l'export soient régulés séparément par les motifs SRR1 et SP, respectivement, tandis que dans le modèle concerté tous les résidus contrôlent conjointement les deux procédés. En utilisant des simulations par ordinateur, une équipe a montré que les deux mécanismes, le modèle modulaire et le modèle concerté pourraient être compatibles à propos des cinétiques de l'import et de l'export de NFAT1. Le débat reste ouvert.¹²⁵

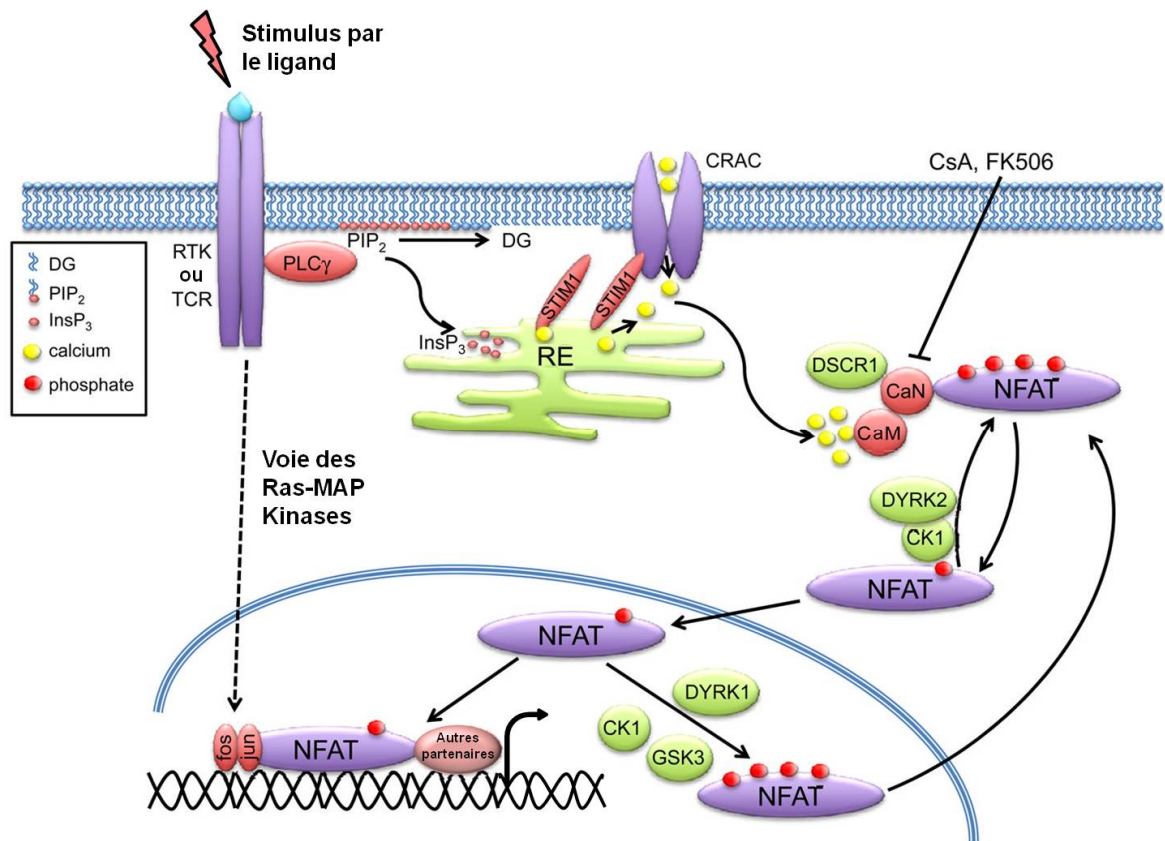


Figure 12. La voie de signalisation du calcium et l'activation de NFAT

Les récepteurs RTK (*Receptor Tyrosine Kinases*) et TCR (*T Cell Receptor*) activent la phospholipase C γ (PLC γ), qui par une réaction d'hydrolyse, va induire le relargage de calcium du réticulum endoplasmique (RE). Ce calcium va s'ajouter au calcium extracellulaire entrant et en s'associant à la calmoduline (CaM) va permettre à la phosphatase calcineurine (CaN) de déphosphoryler le facteur cytoplasmique NFAT. Cette déphosphorylation favorise la translocation nucléaire de NFAT et la transcription génique. NFAT collabore avec des facteurs tels qu'AP1 (*Activator Protein 1*) et le complexe Fos-Jun. L'activation de RTK et de TCR stimule la voie des MAP kinases activant AP1. CK1 (*Casein kinase 1*) et DYRK2 (*Dual-specificity tyrosine-phosphorylation Regulated Kinase 2*) retiennent la forme hyper-phosphorylée de NFAT au cytoplasme alors que CK1, DYRK1 et GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*) favorise l'export nucléaire de NFAT. FK506 et la cyclosporine A (CsA) sont des inhibiteurs pharmacologiques antagonistes de la calcineurine. Ils bloquent la déphosphorylation et l'accumulation nucléaire de NFAT (D'après Mancini et Toker, 2009).

Les membres de la famille NFAT ne sont pas seulement phosphorylés, ils subissent de multiples modifications post-traductionnelles dont l'ubiquitination et la sumoylation, ce qui démontre la complexité des mécanismes d'activation des protéines NFAT.

Des travaux chez la souris prouvent que NFAT1 est ubiquitinée par la ligase E3 MDM2 située en aval de la voie de signalisation d'AKT et de GSK3 pour être ensuite dégradée par le protéasome. Il n'y a pas encore de preuves que l'ensemble des isoformes NFAT subissent cette transformation.⁸²

De récentes recherches ont montré que la protéine NFAT1 pouvait être sumoylée au niveau de deux lysines, lys684 et lys897. La sumoylation de NFAT1 définirait un nouveau mécanisme de rétention nucléaire et d'activation transcriptionnelle en aval des mécanismes connus de déphosphorylation et d'import nucléaire médiés par la calcineurine. La sumoylation de la lysine 684 est nécessaire pour l'activité transcriptionnelle de NFAT1 tandis que la sumoylation de la lysine 897 est seulement requise pour l'ancrage nucléaire. La lysine 897 de NFAT1 n'est pas conservée chez les autres membres de la famille, elle pourrait donc permettre une régulation isoforme-spécifique pour la rétention nucléaire et l'activité transcriptionnelle de NFAT1.

Les résultats suggèrent que le recrutement de NFAT1 au niveau des corps SUMO-1 pourrait être nécessaire à la régulation graduelle de son activité transcriptionnelle. SUMO-1 (aussi connu sous l'appellation Sentrin, GMP1, UBL1 et PIC1) est un polypeptide de 101 acides aminés qui peut s'attacher de manière covalente aux protéines dans un procédé analogue à l'ubiquitination. L'enzyme activant SUMO-1 catalyse une réaction ATP-dépendante et transfère la protéine SUMO-1 activée à Ubc9, une enzyme E2-conjuguée. Cette sumoylation de NFAT1 régulerait son transport entre le cytoplasme et le noyau (rétention au noyau), sa localisation sub-nucléaire (au niveau des corps SUMO-1), et sa transcription, en augmentant sa stabilité.¹⁴³

5.1.3. Le facteur NFAT1

NFAT1 est un facteur de transcription qui intègre de multiples voies de transduction de signaux en coordination avec d'autres facteurs de transcription et des protéines bZIP (*basic-région leucine-zipper*). Ce sont ces différents partenaires qui influencent l'état conformationnel de la protéine NFAT1.

Ce mécanisme de régulation encore peu connu permet à NFAT1 d'agir sous sa forme monomérique ou dimérique pour cibler certains gènes. Par exemple, il est nécessaire que NFAT1 soit sous forme d'un dimère pour réguler la transcription du gène TNF impliqués dans l'inflammation. La fonction du domaine d'activation du facteur NFAT1 est spécifique à l'état de dimérisation de NFAT1. Ce sous-domaine interagit avec le co-activateur CBP (*CREB-Binding Protein*) qui est nécessaire pour l'activation transcriptionnelle NFAT1-dépendante du gène TNF.

De plus, ils ont montré que le dimère NFAT1 compétitionne avec le facteur NF- κ B pour l'attachement à l'ADN. Ces recherches ont donc permis de mieux comprendre l'importance de la dimérisation de NFAT1, de l'implication de cofacteurs spécifiques et du contexte dans la régulation transcriptionnelle des gènes cibles de NFAT1.³⁰

Des travaux, datant de l'année 2000, ont suscité un intérêt tout particulier pour NFAT1 comme facteur déterminant dans la chondrogenèse.¹¹⁹ Le groupe de Ranger *et al.* a étudié la perte de *Nfat1* (*Nfat1*^{-/-}) chez des souris BALB/c et ont pu mettre en évidence une prolifération anormale et non contrôlée de cellules pré-existantes du cartilage. L'extinction du gène *Nfat1* entraînait chez la souris une destruction des articulations cartilagineuses et l'apparition de masses extra-articulaires calcifiées (figure 13).

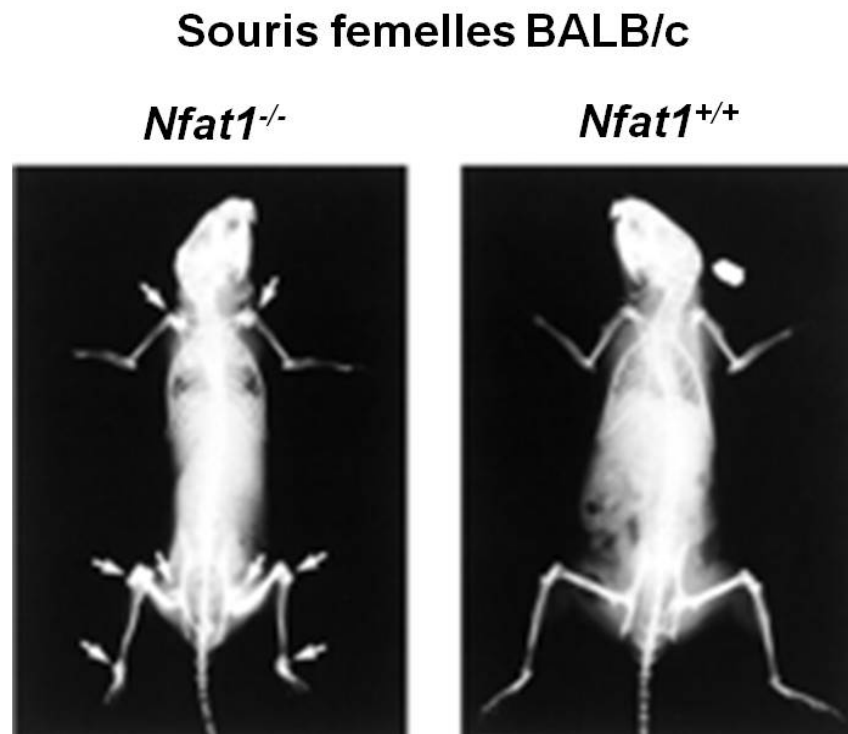


Figure 13. Destruction du cartilage articulaire et présence de nombreuses masses ossifiées au niveau des articulations d'une souris femelle *Nfat1*^{-/-} comparativement à une souris femelle *Nfat1*^{+/+}
La souris femelle *Nfat1*^{-/-} est sévèrement affectée par de multiples masses calcifiées et une destruction très développée de l'articulation au niveau des épaules, des genoux, des hanches et des chevilles. Toutes les femelles de la cohorte présentent ce phénotype alors qu'il est retrouvé chez seulement un mâle sur trois. Les femelles sont plus rapidement et plus sévèrement affectées (D'après Ranger *et al.*, 2000).

De plus, la perte de *Nfat1* dans le cartilage articulaire résulte en une augmentation de l'expression de marqueurs du cartilage. NFAT1 serait donc un répresseur de la croissance et de la différenciation cellulaire du cartilage articulaire. Finalement, NFAT1 serait le premier facteur de transcription décrit à contrôler l'induction de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) dans la chondrogenèse. Les quatre autres membres NFAT sont présents dans le cartilage mais seulement NFAT1 est retrouvé dans la chondrogenèse des CSM.¹¹⁹

5.1.4. Le facteur NFAT1 et l'OA

Peu de données existent sur le rôle de NFAT1 dans la pathologie de l'OA. Les recherches de Wang *et al.*, ont permis une avancée non négligeable dans ce domaine.¹⁵⁹ En effet, leurs travaux montrent que les souris *Nfat1*^{-/-} développent une perte du collagène de type II et des agrécanes et une surexpression des protéases et des cytokines pro-inflammatoires au niveau du cartilage articulaire. La dégradation du cartilage articulaire dans l'OA est presque toujours associée avec une surexpression de ces molécules présentes dans les chondrocytes articulaires.

D'après leurs résultats, ils observent des changements morphologiques, tels que la destruction progressive de la surface articulaire, la formation de chondro-ostéophytes et une ossification de l'os sous-chondral, semblables aux altérations arthrosiques chez l'humain. Pour confirmer l'effet de NFAT1 sur les activités cataboliques et anaboliques des chondrocytes articulaires, les niveaux d'expression de marqueurs de l'arthrose tels que *Mmp1*, *Mmp13*, *Adamts5*, *Acan*, *Col2a1* et *Col10a1* ont été mesurés par RT-qPCR chez des souris âgées de un à quatre mois. Il confirme la surexpression des métalloprotéases et de *Col10a1* et l'inhibition des agrécanes et de *Col2a1*.

C'est la première fois que des données expérimentales confirment l'implication du facteur NFAT1 dans la pathologie de l'OA (figure 14). La déficience en NFAT1 initie des transformations analogues à l'OA due semblerait-il à un dysfonctionnement des chondrocytes articulaires. Cette dérégulation mènerait à la dégradation du cartilage et à la réparation incomplète du tissu cartilagineux.

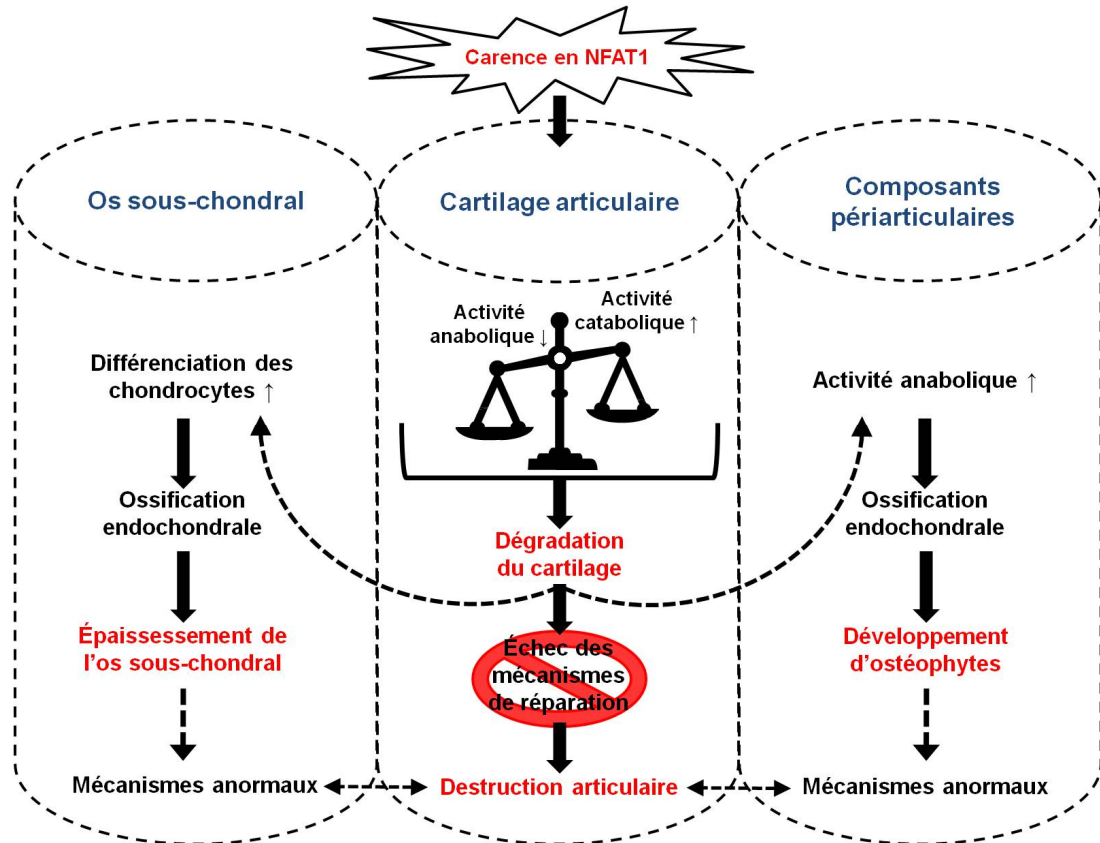


Figure 14. Diagramme représentatif des mécanismes liés à une déficience en NFAT1

Les flèches noires indiquent les observations mécanistiques de Wang et son équipe. Les flèches en pointillées indiquent les mécanismes précédemment décrits dans la littérature. Ces données conceptuelles suggèrent que la progression de l'OA n'est pas exclusivement un désordre du cartilage articulaire mais bien un ensemble de mécanismes impliquant l'os sous-chondral et la synovie (D'après Wang *et al.*, 2009).

D'un autre côté, les recherches du Docteur Moreau et de son équipe les ont amenés à s'intéresser par une approche de gènes candidats à la famille de gènes *PITX* impliquée fondamentalement dans le développement du cartilage et dans le développement de différentes pathologies. L'expression spatio-temporelle de *PITX1* et d'*IHH* suggère la possibilité que ces deux protagonistes interagissent via une voie indépendante de celle proposée précédemment avec le facteur *NFAT1*.

5.2. La famille *PITX*

La famille *PITX* est une famille de protéines à homéodomaine de la sous-classe des bicoïdes. Les facteurs de transcription de cette famille sont impliqués dans le développement des organes. Trois membres de cette famille ont été identifiés : *PITX1*, *PITX2* et *PITX3*.

PITX1 (*Pituitary Homeobox 1*, PTX1) a été découvert pour son rôle dans le développement de la glande hypophysaire ou glande pituitaire. PITX2 est connu pour son rôle dans la détermination de l'asymétrie latérale gauche/droite et le syndrome de Rieger.^{84, 153} PITX3 est une protéine impliquée dans la formation de la lentille durant le développement de l'œil.⁹⁰

5.2.1. Le facteur PITX1

PITX1 a été identifié comme un régulateur hormonal clé impliqué dans l'activation de gènes spécifiques de l'axe hypothalamo-hypophysaire comme le gène de la pro-opiomélanocortine ou POMC.⁶² D'autres rôles lui ont été attribués, incluant la spécification de l'identité morphologique des membres inférieurs.⁸⁴ L'inactivation de *Pitx1* entraîne de sévères dommages dans le développement des membres inférieurs et une chondrogenèse anormale chez la souris. Entre autres, il y a absence de cartilage articulaire au niveau des genoux et les os longs sont atrophiés.

PITX1 active aussi des facteurs spécifiques aux membres inférieurs tels que HOXC10 et TBX4 qui jouent un rôle déterminant dans la morphologie des muscles, des tendons et des os des membres inférieurs.^{26, 64} L'expression spatio-temporelle de *PITX1*, durant le développement des membres inférieurs, lui conférerait un rôle essentiel dans le contrôle de la croissance endochondrale et dans la formation des articulations.

5.2.2. Le facteur PITX1 et l'OA

Ce gène est hautement exprimé dans les chondrocytes articulaires prolifératifs et dans le péri-chondrium des os longs provenant des membres inférieurs chez la souris au cours du développement fœtal.⁶³

Les souris hétérozygotes arborant un seul allèle muté sont phénotypiquement normales à la naissance mais exhibent au cours du vieillissement une dégénérescence progressive de leurs articulations avec présence de changements semblables à ceux observés dans le cartilage humain OA. De plus, une perte de *PITX1* a été observée chez les patients souffrant de gonarthrose primaire, suggérant que *PITX1* pourrait être un gène candidat pour l'OA.¹¹⁴

Partie III : Matériel et méthodes

6. Culture cellulaire

Dans cette étude, quatre lignées cellulaires ont été utilisées : deux lignées d'ostéoblastes et deux lignées de chondrocytes (tableau IV).

Tableau IV. Liste des différentes lignées cellulaires et de leurs origines

Nom	Type cellulaire	Provenance	Références
UMR106 (P10-13)	Ostéosarcomes de rat immortalisés	Compagnie ATCC	108, 109
U2OS (P20-23)	Ostéosarcomes humains immortalisés	Compagnie ATCC	115
C28/I2 (P5-10)	Chondrocytes de côtes humaines immortalisés	Laboratoire du Dr M.J. Goldring	117, 164
tsT/AC62 (P32-34)	Chondrocytes articulaires humains immortalisés	Laboratoire du Dr M.J. Goldring	60, 122

La lignée cellulaire de rat UMR106 et humaine U2OS ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplémenté avec 10 % de sérum fœtal bovin (FBS) et 1 % antibiotique-antimycotique (Gibson, Invitrogen, ON, Canada) à 37°C sous une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂.

Les cellules C28/I2 et la lignée humaine tsT/AC62 ont été cultivées dans du milieu DMEM/F12 (1:1) supplémenté avec 10 % de sérum fœtal bovin (FBS) et 1 % antibiotique-antimycotique (Gibson, Invitrogen, ON, Canada) à 37°C sous une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂.

7. Isolation de chondrocytes primaires

Des spécimens de cartilages provenant du plateau tibial des condyles du fémur ont été obtenus de patients OA ayant subis une arthroplastie totale du genou (ou remplacement de l'articulation tibio-fémorale). Tous les patients ont été évalués, par un rhumatologue certifié, sur la base des critères de diagnostic de la pathologie de l'OA déterminé par un sous-comité du Collège Américain de rhumatologie (ACR classification).

Les tissus humains ont été obtenus via un consentement écrit des patients selon un protocole approuvé par les comités d'éthiques du Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine et de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont. 27 patients atteints de gonarthrose (17 femmes et 10 hommes) ont été choisis de façon aléatoire dans la banque d'échantillons de patients du laboratoire. Les cartilages articulaires de genoux de quatre patients (deux femmes et deux hommes) non OA ne présentant pas de problèmes osseux ou articulaires ont été utilisés comme sujets témoins. Un score a été attribué à chaque patient selon la classification de Kellgren & Laurence, 0 correspondant au stade non atteint et 4 correspondant au stade sévère de l'OA.⁵⁷ Toutes les données cliniques et démographiques de l'ensemble des patients OA et non OA sont synthétisées dans le tableau V.

Les échantillons de cartilage de tous les patients ont été sectionnés, rincés et finement ciselés. Ensuite, ils ont été digérés avec 0,25 % de trypsine pendant une heure à 37°C, rincés avec une solution de PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) et enfin digérés avec 2 mg/mL de collagénase pendant quatre à six heures à 37°C. Les cellules ont étéensemencés dans des flasques de culture Falcon à une forte concentration (10^8 cellules par flasque de 175 cm²) et ont poussé jusqu'à confluence dans du milieu de culture DMEM (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) supplémenté avec 10 % de sérum fœtal bovin non inactivé par la chaleur (FBS, Hyclone, Logan, UT) et 1 % d'antibiotique-antimycotique (Gibson, Invitrogen, Canada) à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂.

Finalement, les cellules ont été lavées dans du PBS stérile, trypsinisées pendant 10 min et resuspendues dans du milieu DMEM contenant 10 % FBS et 1 % d'Antibiotique-Antimycotique. Après centrifugation à 500xg pendant 5 min, le culot a été resuspendus dans du FBS contenant 10 % de DMSO et congelé progressivement à -80°C. Ces cellules primaires ont été pour la plus part utilisés après un premier passage uniquement.

Tableau V. Données cliniques et démographiques des patients OA et sujets témoins utilisés dans le cadre de cette étude

PATIENT	GENRE	ÂGE	GENOU AFFECTÉ	SCORE K&L ^(a)	HISTOIRE FAMILIALE ^(b)
CTRL 001	Femme	16	Droit	0	ND ^(c)
CTRL 002	Homme	18	Gauche	0	ND ^(c)
CTRL 003	Homme	34	ND ^(c)	0	ND ^(c)
CTRL 66	Femme	72	Droit	0	Oui
OA 13	Homme	78	Gauche	3	Non
OA 47	Homme	80	Gauche	4	Non
OA 49	Homme	74	Gauche	3	Non
OA 62	Femme	79	Gauche	3	Non
OA 63	Femme	79	Droit	3	Oui
OA 82	Femme	83	Gauche	2	Oui
OA 101	Femme	52	Gauche	2	Oui
OA 119	Femme	53	Droit	3	Oui
OA 125	Homme	81	Droit	4	Non
OA 126	Femme	46	Gauche	2	Non
OA 135	Femme	64	Droit	3	Oui
OA 140	Femme	78	Gauche	4	Non
OA 156	Homme	45	Droit	2	Oui
OA 176	Femme	52	Gauche	3	Oui
OA 177	Femme	78	Gauche	2	Oui
OA 183	Homme	78	Gauche	2	Non
OA 185	Homme	82	Gauche	2	Non
OA 207	Femme	64	Droit	4	Oui
OA 222	Homme	67	Gauche	3	Oui
OA 224	Femme	86	Gauche	4	Oui
OA 226	Femme	70	Gauche	1	Oui
OA 228	Femme	59	Droit	4	Non
OA 237	Femme	79	Droit	3	Oui
OA 240	Femme	61	Droit	2	Oui
OA 241	Homme	76	Droit	4	Oui
OA 265	Femme	54	Gauche	4	Non
OA 282	Homme	52	Droit	2	Non

(a) Classification de Kellgren & Lawrence pour déterminer la sévérité de l'OA chez les patients. Les différents stades radiologiques K&L de la gonarthrose : Stade 0 = radiographie normale ; stade 1 = ostéophyte de signification douteuse ; stade 2 = ostéophyte net sans modification de l'interligne articulaire ; stade 3 = ostéophyte net et diminution de l'interligne articulaire ; stade 4 = pincement sévère de l'interligne articulaire et sclérose de l'os sous-chondral.

(b) Seul les patients ayant un membre de leur famille proche atteint par la maladie ont été considéré comme ayant une histoire familiale

(c) ND : Non Disponible

8. Collection d'échantillons d'articulation de genoux de souris STR/ort et C57BL/6

Les souris STR/ort ont été obtenues du Professeur R. M. Mason (Imperial College of Medicine, Londres, UK). Toutes les manipulations et contentions des animaux ont été exécutées dans le cadre d'un protocole approuvé par le Comité Institutionnel de Bonne Pratique Animale en Recherche (CIBPAR) du CHU Sainte-Justine. Les souris ont été endormies à l'isoflurane, puis exanguinées par ponction cardiaque pour finalement récupérer les articulations des membres inférieurs débarrassées des tendons, des muscles et d'autres tissus. Cinq genoux de souris mâles et femelles provenant des membres inférieurs (gauche, droite confondus) ont été prélevés sur des souris STR/ort de 6, 10 et 15 semaines. La section a été faite au niveau de l'épiphyse fémorale et de l'épiphyse tibiale et les tissus mis immédiatement dans de l'azote liquide. Des souris C57BL/6 (Laboratoires Charles River, Montréal, QC, Canada) ont été utilisées comme souris témoins. De la même manière, cinq genoux (gauche, droite confondus) de souris mâles et femelles à 8 et 14 semaines ont été sectionnés et mis dans de l'azote liquide. L'ARN provenant de ces différents genoux a été extrait à l'aide du kit RNazol®RT (Molecular Research Center, Mediacorp, Montréal, QC, Canada) et l'homogénéisateur d'échantillons Precellys 24 (Bertin technologies, Montigny-le-Bretonneux, France). L'ADN complémentaire a été synthétisé à partir de 1 µg d'ARN et du kit Tetro (Bioline, London, UK), en suivant les consignes du manufacturier.

9. Constructions de vecteurs plasmidiques

Les constructions plasmidiques du promoteur murin du gène *Ihh* et les mutants ont été généreusement données par le Dr Benoit Saint-Jacques. Pour cloner le promoteur murin du gène *Ihh*, un fragment d'ADN génomique de 5 kpb a été isolé d'une librairie génomique de phages et sous-cloné dans le vecteur pBlueScript par digestion enzymatique (enzymes de restriction HindIII et NcoI) et par ligation (ligase à ADN T4). Ce fragment comprenant la région promotrice -5149/+119 a ensuite été inséré dans le vecteur pGL3-basic contenant le gène rapporteur de la luciférase (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

La série de quatre constructions, fragments -4360/+119, -3267/+119, -1331/+119 et -315/+119, a été obtenue en digérant le plasmide original (-5149/+119) avec les enzymes EcoRI, EcoRV, SacI et PstI, respectivement, pour enlever des parties de plus en plus grandes du fragment initial à partir de l'extrémité distale située en 5'. Les mutants M1 et M2 ont été générés par mutagenèse *in vitro* à partir de la construction -1331/+119 par la compagnie NorClone Biotech Laboratories (London, ON, Canada). Les amorces utilisées par la compagnie ont été données dans le tableau VI. Les quatre constructions, -1295/+119, -528/+119, -453/+119 et -395/+119, ont été produites par digestion à l'exonucléase III de la construction -5149/+119 en suivant les directives du fabricant (*Erase a base system*, Promega, Madison, WA, USA). Toutes les constructions plasmidiques ont été confirmées par séquençage d'ADN.

10. Transfections transitoires avec gène rapporteur luciférase

Des transfections transitoires ont été réalisées dans les lignées cellulaires UMR106 (P10-13), tsT/AC62 (P32-34) et U2OS (P20-23). Les cellules ont étéensemencées, 24 h avant la transfection, dans des plaques de 12 puits à une concentration de $1,3 \times 10^5$ cellules par puits. Dans chaque puits, 250 ng de vecteur pGL3 contenant différents fragments du promoteur murin d'*Ihh* ont été co-transfectés avec 150 ng de vecteur rapporteur β -galactosidase (utilisé comme contrôle pour normaliser le signal de luciférase *firefly*). Un vecteur d'expression pSI, contenant une région '*enhancer*' promotrice SV40, a été utilisé pour uniformiser la quantité de plasmides dans chacun des puits. Quand l'expression d'*Ihh* a été stimulée par NFAT1, 400 ng de vecteur d'expression du facteur de transcription NFAT1 ont été nécessaires. Pour transfecter ces plasmides dans des cellules, 4 μ L de Lipofectamine LTX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ont été ajoutés à chaque puits suivant les instructions du fabricant. 48 h post-transfections, les cellules ont été lavées deux fois en présence de PBS et lysées dans 200 μ L de tampon Glo-lysis (Promega, Madison, WI, USA). Les essais luciférase ont été réalisés avec 30 μ L de cellules lysées et 30 μ L de solution de Luciférine (20 mM Tricine, 1 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2,7 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 nM EDTA, 35 mM DTT, 500 nM ATP, 15,9 mg coenzyme A, 10 mg D(-)-Luciférine (Roche, Indianapolis, IN, USA), pH 7.7).

L'analyse des comptes de luciférase *firefly* a été effectuée avec un luminomètre (Lmax® Microplate luminometer, Molecular Devices, Sunnydale, CA, USA). Les essais d'activité β -galactosidase ont été faits à partir de 30 μ L de cellules lysées et 30 μ L de solution fraîche de tampon pour essais β -galactosidase (10,1 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 12 mM KCl, 137 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 50 mM β -mercaptoéthanol, 1 % 2-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG), pH 7.4) et incubés 5 à 10 min à température ambiante. L'analyse des comptes d'activité β -galactosidase a été obtenue en mesurant l'absorbance à 405 nm par spectrophotométrie (Expert 96 microplate, Asys hitech, Biochrom Ltd., Cambridge, UK). Les valeurs de luciférase *firefly* ont été normalisées avec celles des comptes β -galactosidase. Chaque expérience a été exécutée en triplicata.

11. Expériences de co-immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Des cellules U2OS (P20-23) ou C28 (P5-10) ont été mises en culture dans des pétris 10 cm (tableau IV). Elles ont été fixées avec du formaldéhyde 1 % directement ajouté dans le milieu de culture et incubées pendant 15 min, à température ambiante. La réaction de réticulation a été arrêtée en ajoutant de la glycine à une concentration de 125 mM pendant 5 min, à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois au PBS et chaque pétri a été gratté dans 1,5 mL de PBS. Pour isoler les noyaux cellulaires, les cellules ont été centrifugées 5 min, à 500xg, à 4°C et le culot a été resuspendu dans 1 mL de tampon NCP I (10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM HEPES pH 6.5, 0,25 % Triton X-100 (v/v)). L'homogénat a été centrifugé 5 min, à 500xg, à 4°C et le culot resuspendu dans 1 mL de tampon NCP II (1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM HEPES pH 6.5, 200 mM NaCl). Après centrifugation de 5 min, à 500xg, à 4°C, le culot a finalement été resuspendu dans 800 μ L de tampon RIPA (150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40 (v/v), 0,5 % NaDOC (w/v), 0,1 % SDS (w/v), 50 mM Tris-HCl pH 8.0, EDTA et un cocktail d'inhibiteurs de protéases à une concentration de 20 μ g/mL). Le lysat nucléaire a alors été soniqué, à 4°C, pendant sept fois 10 secondes, avec un temps de repos entre chaque sonication d'une minute sur glace (Sonifier S-150D provenant de Branson, Danbury, CT, USA) et centrifugé 10 min, à 17 000xg, à 4°C.

La concentration en protéines dans le surnageant clarifié a été déterminé par la méthode de Bradford en utilisant le kit d'essais provenant de Bio-Rad (Hercule, CA, USA) et par spectrophotométrie à 600 nm (Mandel, Shimadzu Scientific, Columbia, MA, USA). Les extraits nucléaires ont tous été congelés et gardés à -80°C.

Préalablement à l'immunoprécipitation, 1 mg d'extrait protéique nucléaire a été prélavé avec 30 µL de protéine G, couplée à des billes sépharose-streptavidine (GE Healthcare, Uppsala, Suède) et 6 µL d'ADN de sperme de saumon, dans un volume total de 800 µL, le tout incubé 4 h, à 4°C sur une plateforme agitatrice. Après cette étape, 5 µg d'anticorps spécifique ont été ajoutés à l'extrait protéique et l'ensemble des échantillons ont été incubés 16 h à 4°C sur une plateforme agitatrice. Les complexes protéine/ADN ont été immunoprécipités pour 1 h à 4°C en utilisant 50 µL de protéine G, couplée à des billes sépharose-streptavidine. Pour enlever les interactions non spécifiques entre billes et échantillons, les complexes ont été lavés deux fois avec du tampon RIPA, quatre fois avec une solution tampon de chlorure de lithium (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM LiCl, 1 % Nonidet P-40 (v/v), 1 % NaDOC (w/v)), deux fois avec du tampon RIPA et enfin une fois avec du tampon Tris-HCl pH 8.0 à 100 mM. Les complexes protéine/ADN ont ensuite été élués par chauffage à 65°C, pendant 10 min, dans 150 µL d'une solution de SDS à 1 %. Après centrifugation d'une minute à 17 000xg, du NaCl à 200 mM a été ajouté au surnageant. Une partie aliquote de 100 µg de lysats cellulaires non immunoprécipiter (*input*) a été ajusté à 150 µL avec du SDS 1 % et du NaCl à 200 mM. Les extraits immunoprécipités et le ou les *inputs* ont été incubés 5 h, à 65°C pour permettre la réaction inverse du formaldéhyde. Le volume des échantillons a été ajusté à 300 µL avec du Tris-HCl pH 8.0 à 100 mM et l'ADN a été purifié par extraction au phénol-chloroforme-isoamyl. L'ADN a ensuite été précipité, pendant 16 h à -20°C, avec 2,5 volumes d'éthanol 100 % en présence de glycogène à une concentration finale de 0,27 g/ L. La chromatine des échantillons de CHIP et d'*inputs* ont été resuspendus dans 50 µL et 100 µL de Tris pH 8.0 à 10 mM, respectivement. La présence de séquences d'ADN spécifique, dans les fragments de chromatine immunoprécipitée, a été évaluée par RT-qPCR comme décrit dans la section « analyse par RT-qPCR ». Les RT-qPCR faites directement sur l'ADN purifié de la chromatine avant immunoprécipitation (*input*) ont servi de contrôle.

Les données représentent la quantité d'ADN récupérée par rapport à celle contenue dans le contrôle. Les amorces utilisées pour ces expériences de ChIP sont décrites dans le tableau VI.

12. Atténuation de l'expression d'un gène par un siRNA

Des cellules UMR106 (P10-13) ou TST (P32-34) ont étéensemencées, 24 heures avant transfections, à une concentration de 700 000 cellules par pétris de 6 cm de diamètre. Chaque pétri a été transfecté avec 300 pmol de petits ARN interférents pré-validés par la compagnie (Stealth RNAiTM siRNA duplex) et 15 μ L de lipofectamine RNAi/Max (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suivant les instructions du fabricant. Un siRNA *Nfat1* (NFATC2RSS319378) reconnaissant la séquence d'ARN 5'-GCG AUG AGU AUG AAC CGU CUU UGA U-3' ainsi qu'un siRNA contrôle ont été utilisé pour l'ensemble des expériences, les deux ayant un faible taux en GC (36 %). 48, 60 ou 72 heures après transfections, les cellules ont été lysées soit dans du tampon Trizol pour étudier le niveau d'ARNm des gènes d'intérêt, soit dans du tampon RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % NaDOC et 0,1 % SDS) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases à 20 μ g/mL (Roche, IN, USA) pour la détection et la quantification de protéines spécifiques.

13. Réactifs et anticorps

Tous les réactifs ont été obtenus de la compagnie Sigma (Saint-Louis, MO, USA) et BioShop (Burlington, ON, Canada). Tous les oligonucléotides ont été conçus par BioCorp (Montréal, QC, Canada). Pour les immunotransferts, l'anticorps α -Gapdh (V-18 ; sc-20357 ; dilution 1:10 000), a été acheté à Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA), l'anticorps α -Tubuline (B-5-1-2 ; dilution 1:10 000) provient de chez Sigma, l'anticorps monoclonal de souris dirigé contre la protéine NFAT1 (Ma1-025 ; NFATc2 ; dilution 1:2000) a été obtenu de la firme Thermo scientific (Thermo Fisher scientific Open Biosystems, Rockford, IL, USA) et l'anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la protéine IHH (ab39634 ; dilution 1:1000) a été acheté chez Abcam (Cambridge, MA, USA).

L'anticorps secondaire monoclonal de chèvre dirigé contre l'IgG de souris et celui dirigé contre l'IgG de lapin provient de la compagnie Thermo scientific (Rockford, IL, USA). Enfin pour les expériences de ChIP, l'anticorps NFAT1 (M-20 ; sc-1151 ; NFATc2) a été acquis de chez Santa Cruz Biotechnologies.

14. Analyse par western blot

Sur un gel SDS-PAGE contenant 7,5 % d'acrylamide, 30 µg de protéines ont été séparés puis transférés sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (membrane de transfert Immobilon-P, Millipore, Chelmsford, MA, USA) dans du tampon de transfert contenant 20 % de méthanol. La membrane a ensuite été bloquée dans une solution de PBS contenant 0,2 % de Tween 20 et 10 % de lait. Après une nuit d'incubation avec un anticorps primaire spécifique la membrane a été incubée avec un anticorps secondaire conjuguée à la peroxydase de Raifort, dans 5 % de lait. Finalement, les protéines ont été détectées par chimiluminescence-ECL (Western Lightning® plus-ECL, Perkin Elmer Inc., Walham, MA). L'image du film radiographique a été analysée par un logiciel de densitométrie (ImageJ 1.43u) pour estimer le taux relatif de marquage de la protéine, et quantifier les résultats de façon chiffrés.

15. Préparation d'ARN et synthèse d'ADNc

L'ARN total a été isolé de cellules lysées dans du tampon Trizol (Invitrogen) conformément aux instructions du fabricant et quantifié en mesurant l'absorbance à 260 et 280 nm par spectrophotométrie (Mandel, Shimadzu Scientific, Columbia, MA, USA).

L'ADN complémentaire a été synthétisé à partir de 2 µg d'ARN et du kit Tetro (Bioline, London, UK), toujours suivant les consignes du manufacturier.

16. Analyses par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

Les RT-qPCRs ont été effectuées dans des plaques de 96 puits utilisant l'appareil Mx3000P (Stratagene, Santa Clara, CA, USA) et le kit de détection Sybr-Green (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). Chaque réaction a été réalisée avec 12,5 µL de mix Sybr-Green, 7,5 µL d'amorces à 3 µM et 5 µL d'ADN dilué au 1:50 (pour les ChIPs 5 µL d'ADN sans dilution supplémentaire) pour un volume final de 25 µL. Les conditions de PCR étaient 15 s de dénaturation à 94°C, 30 s d'appariement à 55°C, 30 s d'extension à 72°C, pendant 45 cycles. Toutes les paires d'amorces utilisées pour la détection des gènes ou de fragments de promoteur ont été choisis pour leur spécificité d'amplification et la taille du fragment a été validée sur gel d'agarose. La séquence des amorces est donnée dans le tableau VI.

17. Analyse Statistique

L'analyse *in situ* du fragment de 5 kpb de la séquence promotrice du gène *Ihh* pour identifier les régions conservées inter-espèces a été réalisée grâce au logiciel basé sur le web, ECR Browser permettant l'alignement de plusieurs séquences.^{73, 106} Les sites putatifs de liaison des différents facteurs d'intérêt ont été identifiés en utilisant le programme PROMO du serveur ALGGEN qui utilise la base de données TRANSFAC (version 8.3) et vérifiés dans la littérature reportée.^{32, 91}

L'analyse statistique des valeurs de luciférase ou de RT-qPCR a été performée en utilisant le test de Student pour des comparaisons simples de séries non appariées et ayant une distribution bilatérale. Toutes les données des figures représentent la moyenne et l'écart-type d'expériences indépendantes. Une valeur de P inférieure ou égale à 0,05 a été considéré comme statistiquement significative.

Tableau VI. Liste des amorces utilisées pour les différentes expériences *in vitro* et *in vivo*

Gène	Amorce Sens	Amorce Anti-Sens	Taille
Amorces pour mutagenèse dirigée			
Mutant 1 (M1)	5'-CCCGGATCTCA <u>ACCA</u> TTTCCCCTCTCACTCGACC-3'	5'-GGTCGAGTGAGAGGGG AAATGG <u>TT</u> GAGATCCGGG-3'	1437 pb
Mutant 2 (M2)	5'-CCCGGATCTCTTCC <u>AGTTCG</u> CCTCTCACTCGACC-3'	5'-GGTCGAGTGAGAGG <u>CGAACT</u> GGAAGAGATCCGGG-3'	1437 pb
Amorces pour sondes ChIP			
<i>hIL12Rβ2</i>	5'-AATATTATGCAGAGCTGCCGACCC-3'	5'-ACTCCCGTATAGGTCCCGTGTTAT-3'	93 pb
<i>hIHH</i>	5'-TTGCTGCAGGTTGCTGTCGAG-3'	5'-GGGAAATGGAAGAGATCCGGGCT-3'	93 pb
<i>hGAPDH</i>	5'-TCTATAAATTGAGCCCGCAGCC-3'	5'-TTTCTCTCCGCCCGTCTTCA-3'	105 pb
Amorces pour RT-qPCR			
<i>hPITX1</i>	5'-GCTACCCCGACATGAGCA-3'	5'-GTTACGCTCGCGCTTACG-3'	116 pb
<i>hNFAT1</i>	5'-CGGTGGATAAAGACAAGAG-3'	5'-CTGGGTGGTAGGTAAAGTG-3'	153 pb
<i>hIHH</i>	5'-AAAGGCCACGTGCATTG-3'	5'-AATGAGCACATCGCTGAAGG-3'	190 pb
<i>hDHH</i>	5'-TACGCGGTTCTGGAGAGTAC-3'	5'-GGCGCTTCGAGGTTTCTATGC-3'	192 pb
<i>hGLI1</i>	5'-ATCAACTCCGGCCAATAG-3'	5'-CAGTATAGGCAGAGCTGATG-3'	144 pb
<i>hHHIP</i>	5'-TCCAGGCTCTGTCGAAACG-3'	5'-GGCACTTGTTGCGTCTAACAC-3'	142 pb
<i>hPTCH1</i>	5'-AGGGATTGGAAGGTGGAAGTC-3'	5'-CCAATCTTTGGCCTCTTTGC-3'	116 pb
<i>hACTB</i>	5'-GGAAATCGTGCGTGACAT-3'	5'-TCATGATGGAGTTGAAGGTAGTT-3'	233 pb
<i>mPitx1</i>	5'-GCCTCAACCCGTGAACTGAATG-3'	5'-GCGTAAACTCCAGCAGTGATCC-3'	133pb
<i>mNfat1</i>	5'-TCTGCCAGCTTCATTTCTGACACC-3'	5'-GAGGCTGGTTGAGGTGACATTAT-3'	156 pb
<i>mlhh</i>	5'-GCTTCGACTGGGTGTATTACG-3'	5'-TCTCCTGGCTTTACAGCTGAC-3'	160 pb
<i>mDhh</i>	5'-ACCACCTTCACTCACCTCCAAAGA-3'	5'-AGAGGGTTTGAAGATCGTGCTGA-3'	105 pb
<i>mGli1</i>	5'-CCCAGCTCGTCCGCAAACA-3'	5'-CTGCTGCGGCATGGCACTCT-3'	192 pb
<i>mHhip</i>	5'-CCAGTGACCAAGCAATGGCAAGAA-3'	5'-TCCAAATCCCAAGATGTGACCCGA-3'	93 pb
<i>mPtch1</i>	5'-AGGCCCTGCCACCAAGTGA-3'	5'-CAGGTGGGGCTGTTGCCGAG-3'	121 pb
<i>mActb</i>	5'-GGAAATCGTGCGTGACAT-3'	5'-TCATGATGGAATTGAATGTAGTT-3'	233 pb
<i>rNfat1</i>	5'-TCACAGCTGAGTCCAAGGTTGTGT-3'	5'-AGCATGTTAGGCTGGCTCTTGTCT-3'	105 pb
<i>rlhh</i>	5'-AACTGAGCTGACAAGGGTGTGGTA-3'	5'-TAAAGTCACAAACCCAGGTCCCGA-3'	168 pb

IL12Rβ2: Récepteur beta-2 de l'interleukine 12 ; IHH: Indian hedgehog ; ACTB: beta-actine ; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; HHIP: Hedgehog-interacting protein ; GLI1: Glioma-associated oncogene homolog 1 ; PTCH1: Protein patched homolog 1 ; DHH: Desert hedgehog ; NFAT1: Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 2 ; PITX1: Pituitary homeobox 1

Partie IV : **R**ésultats

18. Le promoteur du gène *IHH* contient des régions régulatrices conservées contrôlant sa transcription

L'étude transcriptionnelle au promoteur murin du gène *Ihh* a pu être accomplie grâce au clonage d'un fragment de ce promoteur d'environ 5 kpb localisé immédiatement en amont de l'ATG dans un vecteur pGL3 contenant le gène rapporteur de la luciférase (figure 15A). À partir de cette construction nommée -5149/+119, quatre autres constructions luciférase ont été générées par digestions enzymatiques (de la plus grande à la plus petite : constructions -4360/+119, -3267/+119, -1331/+119 et -315/+119). Pour vérifier l'activité transcriptionnelle de ces constructions et n'ayant pas accès à des lignées ostéoblastiques ou de chondrocytes de souris, celles-ci ont été testées en transfections transitoires dans des cellules cancéreuses provenant d'un ostéosarcome de rat, les UMR106, qui arborent un phénotype de type ostéoblaste.

Dans ce système *in vitro*, toutes les constructions montrent une activité luciférase d'au moins 2,5 fois supérieure à celle du vecteur vide pGL3. Ce dernier a servi de contrôle et toutes les valeurs obtenues en utilisant les autres constructions ont été normalisées avec la valeur moyenne du vecteur vide. Les activités luciférase varient en fonction des fragments testés. La plus petite construction promotrice, -315/+119, présente la plus forte activité luciférase soit plus de 140 fois supérieure à celle du vecteur vide. Une autre analyse a permis d'identifier le site +1 probable de la transcription, l'ATG et les sites consensus des principaux facteurs de transcription connus pour réguler la transcription d'*Ihh*. Ces informations sont présentées sur la séquence du premier kpb de région promotrice en amont de l'ATG du gène *Ihh* (figure 15B).

De précédents travaux réalisés sur le promoteur du gène *Ihh* ont montré par retard sur gel qu'un complexe se formait au niveau d'un double site putatif STAT1/NFAT1 en position -241/-232 sur le promoteur d'*Ihh* (données non publiées provenant du Dr Benoit Saint-Jacques). La contribution hypothétique selon laquelle STAT1 serait le principal régulateur transcriptionnel de ce complexe n'a pas pu toutefois être confirmée. Par conséquent, une nouvelle hypothèse a été émise et propose que le facteur NFAT1 soit à l'origine de ce nouveau complexe régulateur liant le promoteur du gène *Ihh*.

Grâce à des analyses *in silico*, quinze sites putatifs NFAT1 ont pu être identifiés sur l'ensemble de la séquence promotrice de 5 kpb, à partir des séquences consensus de la base de données ALGGEN (Version 3.0.2).³² Le site NFAT1/STAT1 contient un site NFAT1, dont la séquence est CATTTC, et a été retrouvé en position -238/-232 juste en amont du +1 sur la séquence de la plus petite construction -315/+119. Par après, les recherches ont été centrées sur ce site.

Les séquences promotrices du gène *Ihh* chez l'humain, la souris et le rat provenant toutes de la base de données NCBI ont été alignées à l'aide du logiciel Clone Manager (Clone Manager Professional, Version 9.1). L'alignement de ces séquences promotrices a montré une grande conservation inter-espèces des deux sites putatifs NFAT1, -836/-832 et -238/-232, présents sur le premier kpb en amont de l'ATG (figure 16).

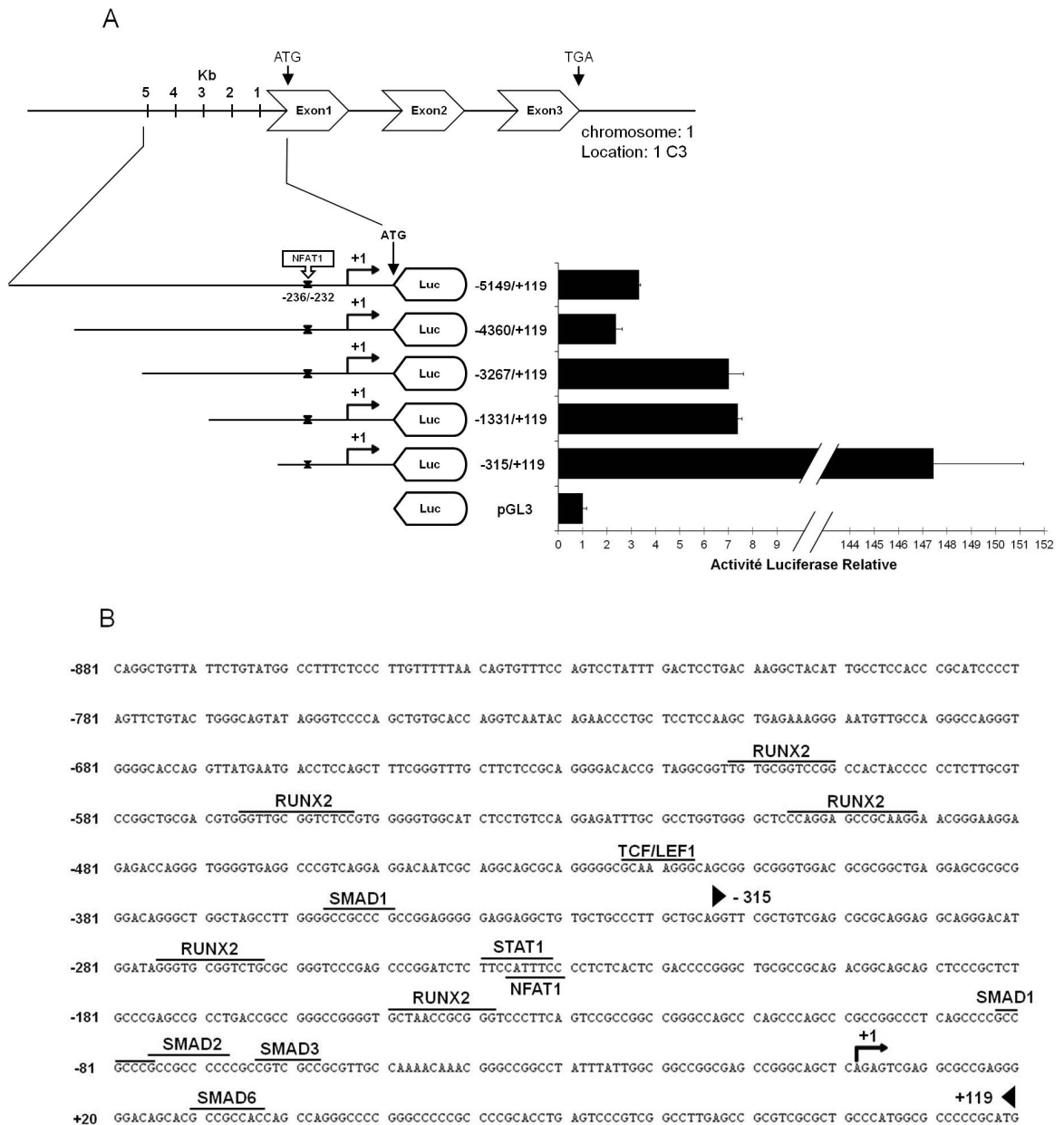


Figure 15. Étude transcriptionnelle d'un fragment du promoteur murin du gène Indian Hedgehog
(A) Représentation schématique de la séquence génomique murine du gène *Ihh* et des différentes constructions luciférase du promoteur. Des cellules d'un ostéosarcome de rat, les UMR106 (P10), ont été transfectées avec les cinq constructions promotrice du gène *Ihh* et le vecteur vide pGL3 (colonnes noires) (n=6). **(B)** Séquence promotrice du gène *Ihh*, entre -891 et +119 paires de bases, comprenant les sites de fixation des principaux facteurs de transcriptions connus pour réguler l'activité promotrice d'*Ihh*.

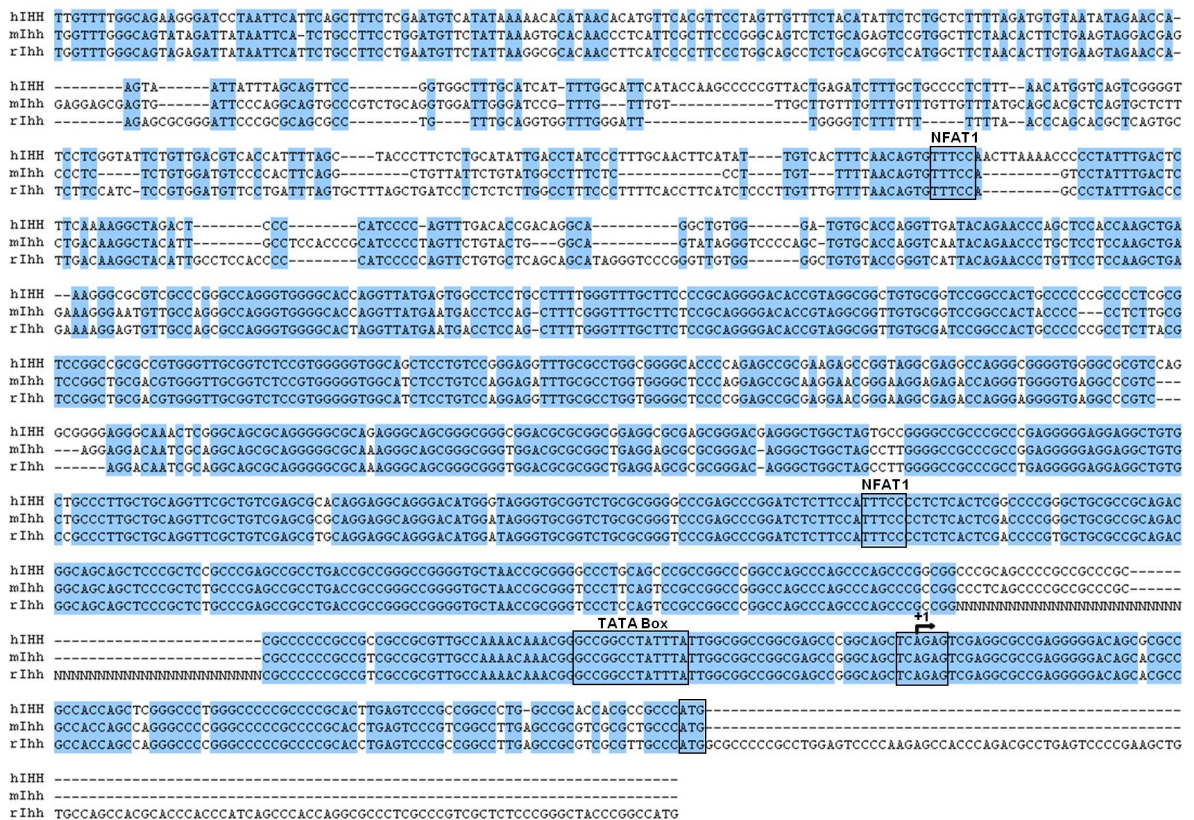


Figure 16. Alignement des séquences promotrices du gène *Ihh* chez l'humain, la souris et le rat
 La présence de deux sites putatifs conservés NFAT1 a été indiquée par un encadré noir. De même, les sites de fixation de la polymérase, du site de début de la transcription ainsi que du site du début de la traduction à l'ATG ont été définis.

19. NFAT1 régule l'expression d'*IHH* en se liant directement à son promoteur

19.1. *NFAT1* contribue à l'inhibition du gène *Ihh* dans les ostéoblastes de rat

Des expériences de co-transfections transitoires avec le gène rapporteur de la luciférase ont été réalisées dans la même lignée cellulaire que précédemment, les UMR106, dans le but de comparer les activités luciférase avec et sans NFAT1 dans le même type cellulaire (figure 17). Cette série d'expériences a été effectuée avec le vecteur vide pGL3, les différentes constructions du gène *Ihh* de la plus grande (-5149/+119) à la plus petite construction (-315/+119), en présence ou en absence du facteur NFAT1. L'activité transcriptionnelle basale quelle que soit la construction testée est plus importante que celle obtenue avec le vecteur vide telle que mentionnée précédemment. Entre la position -5149 et -4360, l'activité promotrice basale décroît ce qui tendrait à signifier que la délétion a entraîné la perte de un ou plusieurs sites pour des activateurs transcriptionnels. De la même manière, un ou plusieurs éléments de régulation positive entre la position -3267 et -1331 devraient être présents puisque la délétion de cette région entraîne une baisse importante de l'activité promotrice. Finalement, il doit y avoir des sites de liaison pour d'importants régulateurs négatifs entre la position -4360 et -3267 et entre la position -1331 et -315. En effet, la délétion de la région -1331 à -315 du promoteur du gène *Ihh* cause une augmentation de l'activité basale de la construction -315/+119 de plus de 6 fois supérieure à celle de la construction -1331/+119. Différents facteurs putatifs, activateurs et répresseurs, ont été identifiés par analyses *in silico* et listés dans le tableau VII.

D'autre part, les résultats obtenus montrent aussi que la présence de NFAT1 entraîne une inhibition de l'activité du promoteur d'*Ihh* dans les ostéoblastes de presque 50 % pour toutes les constructions sauf avec le vecteur vide.

Pour confirmer que le site conservé putatif de NFAT1 (-238/-232) est vraiment un site fonctionnel de liaison du facteur NFAT1 au promoteur du gène *Ihh*, deux mutants ont été synthétisés par mutagenèse *in vitro* à partir de la construction -1331/+119 (figure 18A).

Le mutant M1 contient une mutation sur le brin sens de deux nucléotides consécutifs sur le site consensus pour STAT (TT→AA) mais ne modifie pas théoriquement la liaison du facteur NFAT1 au site présent sur le brin anti-sens. Le mutant M2 contient une mutation de deux nucléotides sur le brin anti-sens, un nucléotide à chaque extrémité du site consensus NFAT1 (TTTCC→GTTCG). L'activité luciférase du mutant M1 de la construction -1331/+119 est 4,5 fois plus grande que l'activité de la construction -1331/+119 non mutée et celle du mutant M2 l'est 2 fois plus. STAT1 est connu pour être un activateur transcriptionnel, donc la perte de liaison de ce facteur ne semble pas être la raison de cette forte activation. Néanmoins, il est probable que cette activation soit plutôt due aux mutations qui abolissent certains sites ou créent de nouveaux sites de liaison pour d'autres facteurs de transcription. Une analyse *in silico* a permis de déterminer des sites pour quelques facteurs potentiels tels que c/EBP α , ZIC1, 2 et 3 (Zinc finger protein 1/2/3) capables d'activer la transcription de gènes et la perte du site de liaison du facteur répresseur GABP α . Le mutant M2 montre aussi une activation plus forte que celle de la construction -1331/+119. La perte du site de liaison du facteur répresseur NFAT1 dans le mutant M2 pourrait expliquer l'activation observée ainsi que la disparition de sites putatifs pour des répresseurs comme YY1. La création de nouveaux sites pour des régulateurs positifs comme cMyb (*v-Myb myeloblastosis viral oncogene homolog*), AP2 α (*Activating enhancer-binding Protein 2 alpha*), CP2 et E47/TCF3 pourrait aussi expliquer cette activation.

De plus, les résultats des co-transfections transitoires des constructions -1331/+119, -315/+119 et des deux mutants (M1, M2) révèlent que l'ajout de NFAT1 inhibe l'activité promotrice de M1 tel que prévu de la même manière que dans les constructions promotrices -1331/+119 et -315/+119 (figure 18B). Par contre, il est évident que l'élimination du site NFAT1 par la mutation de M2 abolit totalement l'effet répressif de NFAT1.

Lors de ces différentes expériences de transfections, il apparaît régulièrement que la plus petite construction -315/+119 est beaucoup plus active que la construction -1331/+119. Pour comprendre pourquoi cette construction (-315/+119) est fortement activée, des délétions fines de la séquences entre ces deux constructions ont été réalisées et devraient permettre de déterminer la région promotrice nécessaire à ce changement d'activité transcriptionnelle.

Pour ce faire, de nouvelles constructions ont été générées par une technique de digestion enzymatique à l'exonucléase III (figure 19). Pour des raisons techniques, ces quatre nouvelles constructions ont été créées à partir de la construction -5149/+119. Les différentes délétions effectuées sur cette dernière, ont permis de générer les constructions -1295/+119, -528/+119, -453/+119 et -395/+119 (figure 19A).

Les différentes constructions ont été testées en co-transfections transitoires en présence ou en absence de NFAT1 dans des cellules UMR106. L'activité promotrice des constructions -1331/+119 à -453/+119 augmente progressivement comparativement à celle de la construction -1331/+119, ce qui suggère une perte de sites de liaison pour des régulateurs négatifs comme mentionnée précédemment. Par contre la perte du site NFAT1 -836/-832 ne semble pas affecter la répression de l'activité promotrice d'*Ihh* en présence de NFAT1.

Dans tout les cas, aucune construction ne démontre une augmentation similaire à celle de la construction -315/+119 malgré qu'il ne reste que 80 pb dans la plus courte de ces nouvelles constructions (-395/+119) pour atteindre la taille de la construction -315/+119 (figure 19B). Cette région de 80 pb devrait donc être le site de liaison de plusieurs ou de forts régulateurs négatifs. Effectivement, des analyses *in silico* de cette région distale ont permis de recenser des sites de liaison pour plusieurs répresseurs connus tels que GR α (*Glucocorticoid Receptor alpha*), PAX5 (*Paired box protein Pax-5*), p53, NRF2, c/EBP et MAZ (*Myc-Associated Zinc finger protein*).

19.2. L'inhibition in vitro de NFAT1 est suffisante pour activer le gène *Ihh* dans les ostéoblastes de rat

Pour confirmer les résultats obtenus dans les expériences précédentes de surexpression de NFAT1, des expériences d'inactivation de l'ARNm de *Nfat1* ont été réalisées dans des cellules de rat UMR106 : ces cellules ont été transfectées soit avec un siRNA dirigé contre l'ARNm de *Nfat1* soit avec un siRNA contrôle ayant une séquence aléatoire. L'ARN a été extrait de ces cellules et des quantifications par RT-qPCR de l'expression de *Nfat1* et d'*Ihh* ont été réalisées sur l'ADNc.

Ces travaux ont pour but de montrer que l'inhibition de l'expression du gène *Nfat1* se solde par l'activation du gène *Ihh* dans les ostéoblastes de rat (figure 20). Plusieurs séries d'expériences de ce type ont permis tout d'abord de déterminer les meilleures conditions pour cette expérience d'inactivation par RNAi. Ainsi, la durée d'incubation entre les cellules et le siRNA *Nfat1* ne semble pas affecter l'inhibition de *Nfat1* (figure 20A) mais elle annihile l'effet inhibiteur du siRNA sur l'expression d'*Ihh* au cours du temps comme le montre les résultats à 72 heures (figure 20B). De plus, plusieurs séries de tests ont permis de confirmer que l'inhibition de l'expression endogène de *Nfat1* est proportionnelle à la quantité de siRNA *Nfat1* utilisée lors des transfections.

Après quantification par RT-qPCR du niveau d'expression de *Nfat1*, les données confirment qu'il est inhibé d'environ 20 % avec 150 ng de siRNA contre *Nfat1*, de 40 % avec 200 ng et de 60 à 80 % avec 300 ng. Plus la quantité de RNAi augmente et plus l'inhibition est forte (figure 20C et figure 20E).

En parallèle, l'expression d'*Ihh* a aussi été quantifiée par RT-qPCR dans ces cellules et les données rendent comptes d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle du gène *Ihh* proportionnelle à l'atténuation de l'expression de *Nfat1* (figure 20D et figure 20F). À 60 heures post-transfections, 150 ng de siRNA *Nfat1* induisent une augmentation de 50 % de l'expression endogène d'*Ihh* et en présence de 300 ng, celle-ci augmente de plus de 250 %.

Conjointement, des expériences de Western blot (WB) ont été réalisées sur des extraits protéiques totaux obtenus lors de la troisième série de transfections, afin de déterminer si ces variations dans les niveaux d'expression de *Nfat1* et d'*Ihh* se traduisent par des changements similaires au niveau protéique (figure 20G). Les résultats montrent une diminution de la concentration protéique en NFAT1 allant jusqu'à une perte de 85 % de NFAT1 avec 300 ng de siRNA. Parallèlement, les données démontrent une augmentation de 40 % du taux de protéines IHH dans les cellules transfectées avec 300 ng de siRNA (figure 20H). Collectivement, ces travaux montrent que l'inhibition de *Nfat1* entraîne l'activation d'*Ihh* au niveau de l'ARNm et au niveau protéique dans les ostéoblastes.

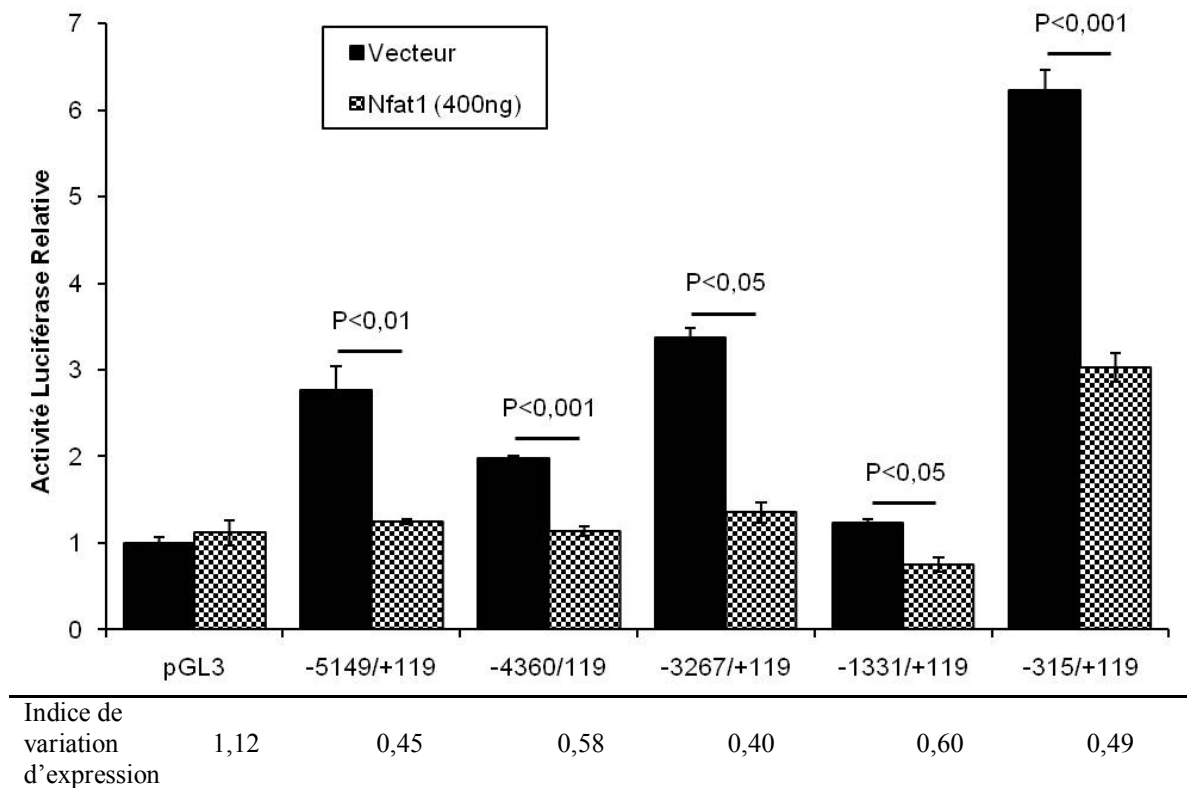


Figure 17. Transfections transitoires dans des ostéoblastes de rat des cinq principales constructions du promoteur d'*Ihh* en présence ou en absence de NFAT1

Des cellules d'un ostéosarcome de rat, les UMR106 (P13), ont été transfectées avec les cinq constructions promotrice du gène *Ihh* en absence (colonnes noires) ou en présence (colonnes en damier) de 400ng de plasmide NFAT1 (n=2).

Tableau VII. Listes non exhaustives de régulateurs potentiels de l'activité promotrice du gène *Ihh*

Position	Nom	Type de régulateurs	Fonction	Référence
-5149/-4360	SREBP1	Activateur	Exprimé dans le cartilage, il active des gènes impliqués dans l'homéostasie des lipides dont la synthèse du cholestérol nécessaire au maintien fonctionnel des membres Hedgehog	35
	USF1/2	Activateur	Rôle fonctionnel dans l'expression, RANK-dépendante, du gène TRAP durant la différenciation des ostéoclastes	71
	AP2 α	Activateur	Co-active avec p53 certains gènes impliqués dans la croissance cellulaire tels que p21	138
-4360/-3267	GR α	Répresseur	Régulateur négatif de cytokines, exprimé principalement dans les chondrocytes hypertrophique du cartilage	1
	NRF2	Répresseur	Régulateur négatif de la différenciation et de la maturation des chondrocytes	44
	ETS1/2	Répresseur	Facteurs impliqués dans la formation du cartilage et de l'os	147
-3267/-1331	CP2	Activateur	Active la transcription du gène <i>BMP4</i> lors du développement de l'os	55
	c/EBP β	Activateur	Stimule l'expression du gène <i>MMP13</i> dans les chondrocytes humains arthrosiques	42
	ROR α	Activateur	Active la différenciation des cellules Th17 médiant l'inflammation	168
-1331/-315	GATA3	Répresseur	Régule négativement la différenciation des cellules Th1 en inhibant STAT4 et IL12R β 2 Sa surexpression réduit l'inflammation de l'articulation et l'érosion de l'os chez la souris arthrosique	150
	PAX5	Répresseur	Réprime l'expression du gène p53 lors du développement embryonique	140
	HES1	Répresseur	Régulateur négatif de la croissance et de la différenciation ostéoblastique	

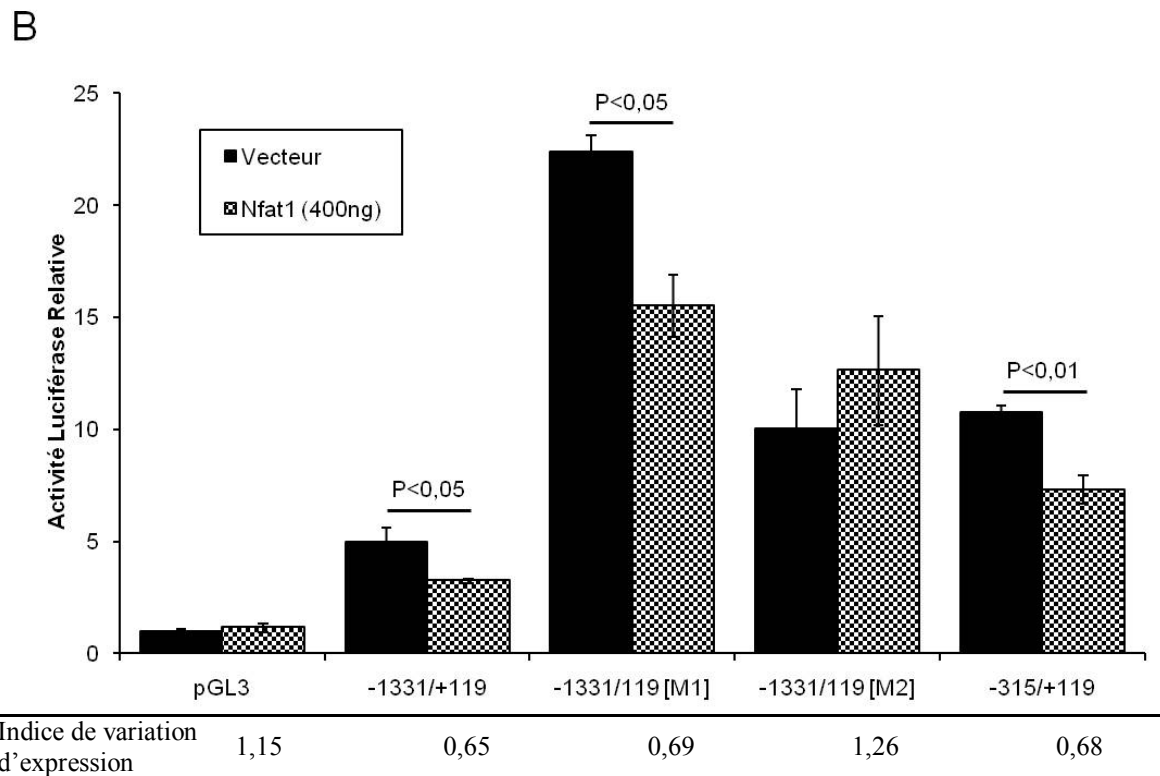
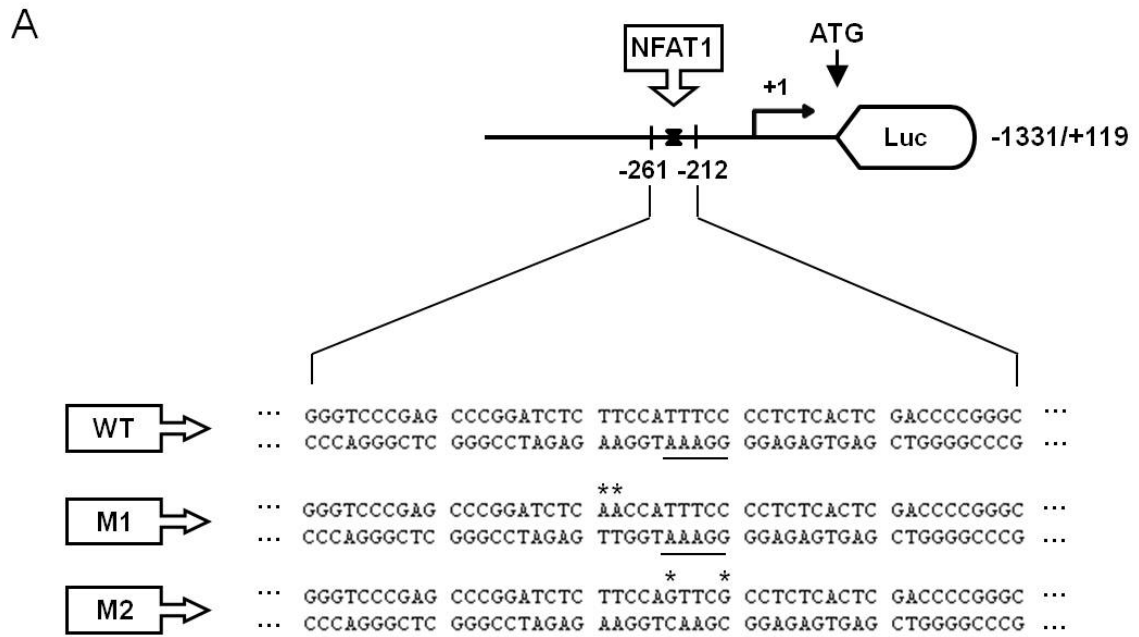


Figure 18. La mutation M2 du site putatif STAT1/NFAT1 abolit l'effet répressif de NFAT1 au promoteur d'*Ihh*

(A) Représentation schématique de la construction -1331/+119 et des mutations effectuées sur sa séquence nucléotidique (WT) donnant les mutants M1 et M2. Le site NFAT1 fonctionnel a été souligné. (B) Des cellules UMR106 (P13), ont été transfectées avec les deux plus courtes constructions et les deux mutants en absence (colonnes noires) ou en présence (colonnes en damier) de 400ng de plasmide NFAT1 (n=3).

A

```

-1340   ▶ - 1331                               ▶ - 1295
TCCAGAGCTC AAGGCTAGCC TGGACTCCGT AGGTGAGAGA CCCCATCTGT AAAGAAAGGA AGGGGTTGAG GGTGAGGGTG AGGGAGGAAG ATTGAGCTTT
-1240 CTAATTATAA CTTTATTAAA TTTGTGGAAC CCGTCGCAA CAGCACAGA TTTGACATTG TGGTGGTGAT CTGTGCCCGT TAACACACTT GCGTCTTCTG
-1140 GTTTGGGCAG TATAGATTAT AATTCATCTG CCTTCCTGGA TGTTCTATTA AAGTGCACAA CCTCATTTCG CTCCCGGGC AGTCTCTGCA GAGTCCGTTG
-1040 CTCTAACAC TTCTGAAGTA GGACGAGGAG GAGCGAGTGA TTCCAGGCA GTGCCCGTCT GCAGGTGGAT TGGGATCCGT TTGTTTGTIT GCTTGTITGT
-940  TTGTTTGTG TTTATGCAGC ACGCTCAGTG CTTTCCTCT TCTGTGGATG TCCCCTCTC AGGCTGTTAT TCTGTATGGC CTTTCTCCCT TGTITTTAAC
-840  AGTGTTCCTA GTCCATTATG ACTCCTGACA AGGCTACATT GCCTCCACCC GCATCCCCTA GTTCTGTACT GGGCAGTATA GGTCCCCAG CTGTGCACCA
      NFAT1
-740  GGTCATACA GAACCTGCT CCTCCAAGCT GAGAAAGGA ATGTTGCAG GGGCAGGGT GGGCACCAGG TTATGAATGA CCTCCAGCTT TCGGGTTTGC
-640  TTCTCCGAG GGGACACCGT AGGCGGTTGT GCGGTCCGGC CACTACCCCT CTTTGGCTG CCGCTGCGAC GTGGGTTGCG GTCTCCGTTG GGTGGGCATC
-540  TCCTGTCCAG GAGATTGCG CCTGGTGGGG CTCCAGGAG CCGCAAGGAA CGGGAAGGAG AGACCAGGGT GGGGTGAGGC CCGTCAGGAG GACAATCGCA
      ▶ - 528                               ▶ - 453
-440  GGCAGCGCAG GGGGCGCAA GGGCAGCGGG CGGGTGGACG CGCGGCTGAG GAGCGCGCGG GACAGGGCTG GCTAGCCITG GGGCCGCCCG CCGGAGGGGG
      ▶ - 395
-340  ASGAGGCTGT GCTGCCCTTG CTGCAGGTTT GCTGTGAGC GCGCAGGAG CAGGGACATG GATAGGGTGC GGTCTGCGCG GGTCCCGAGC CCGGATCTCT
      STAT1
-240  TCCATTTCCC CTCTCACTCG ACCCCGGGCT GCGCCGCAGA CCGCAGCAGC TCCCGCTCTG CCCGAGCCCG CTGACCPCCG GGGCCGGGGT CTAACCGCGG
      NFAT1
-140  GTCCCTTCAG TCCGCCGGCC GGGCCAGCCC AGCCCAGCCC GCGGGCCCTC AGCCCCGCG CCCGCCGCC CCCGCCGTCG CCGCGTTGCC AAAACAACG
      +1
-40   GCGCGCCTA TTTATGGCG GCGGCGAGC CGGGCAGCTC AGAGTCGAGG CGCCGAGGGG GACAGCACGC CGCCACCAGC CAGGGCCCCG GCGCCCCGCC
      +119
+61   CCGCACCTGA GTCCCGTCGG CCTTGAGCCG CGTCGCGCTG CCCATGGCGC CCCCAGATG

```

B

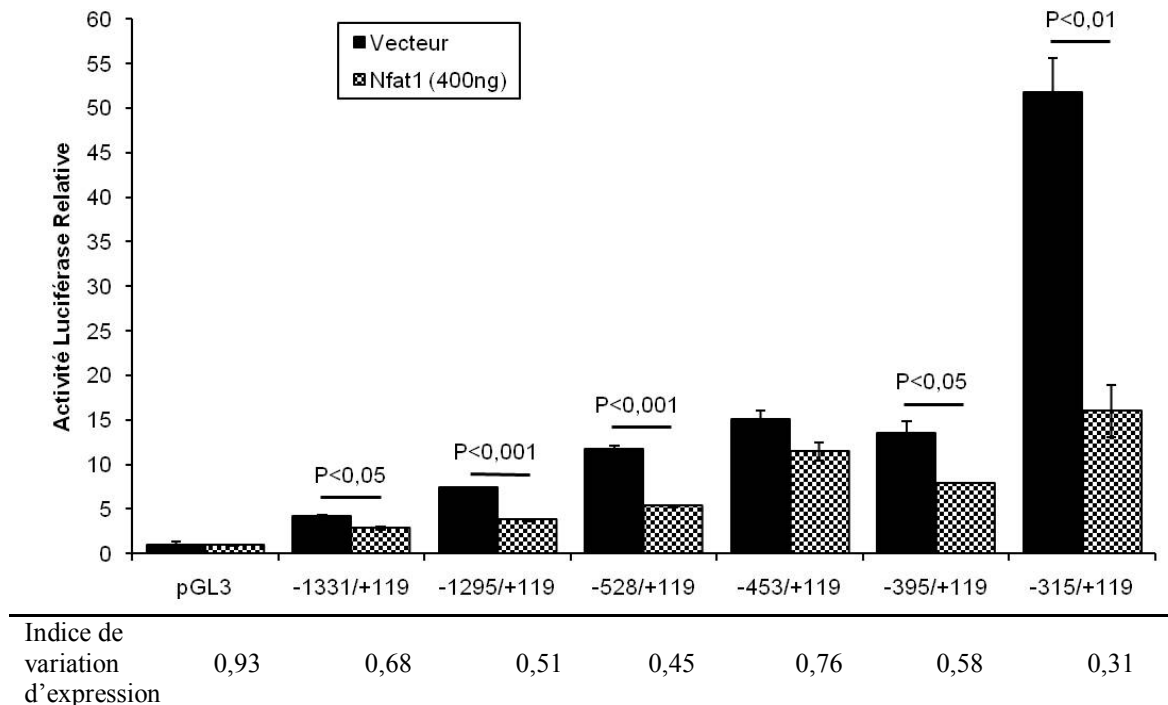


Figure 19. Clonage par la technique à l'exonucléase III de quatre nouvelles constructions de tailles comprises entre la construction -1331/+119 et -315/+119

(A) Représentation de la séquence nucléotidique des constructions murines -1331/+119, -315/+119 et des quatre nouvelles constructions intermédiaires. (B) Des cellules UMR106 (P10), ont été transfectées avec les deux plus petite constructions promotrice d'*Ihh* et les quatre nouvelles constructions intermédiaires en absence (colonnes noires) ou en présence (colonnes en damier) de 400ng de plasmide NFAT1 (n=3).

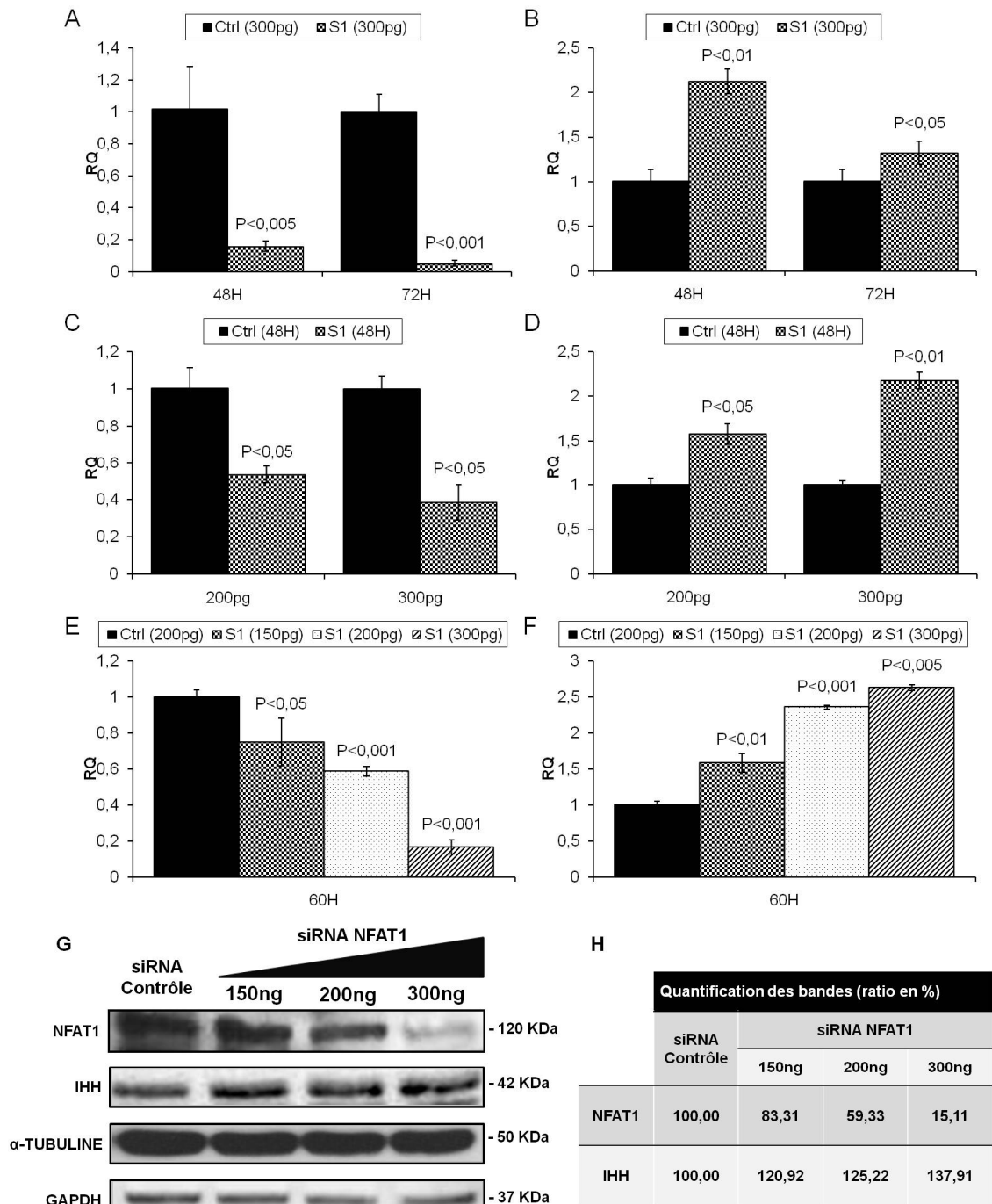


Figure 20. La perte de NFAT1 par RNAi active l'expression du gène *Ihh* au niveau transcriptionnel et au niveau protéique dans les ostéoblastes

(A, C, E) L'expression de NFAT1 dans l'ADNc de cellules UMR106 (P10-12) transfectées avec un siRNA contrôle (colonnes noires) ou un siRNA (S1) *NFAT1* (colonnes grises) a été quantifiée par RT-qPCR en présence de 150, 200 ou 300ng de siRNA *NFAT1* et pendant 48, 60 ou 72h d'incubation. (B, D, F) Dans les mêmes conditions, l'expression d'*Ihh* a été quantifiée dans les mêmes cellules. (G) Analyse par western-blot (WB) du taux de protéines NFAT1 (120 kDa) et IHH (42 kDa) dans les mêmes cellules transfectées. L' α -Tubuline et GAPDH ont servi de contrôles pour le WB. (H) Quantification de l'intensité des bandes du WB et calcul du ratio relatif de NFAT1 sur GAPDH et d'IHH sur GAPDH exprimé en pourcentage.

19.3. NFAT1 contribue à l'activation du gène IHH dans les chondrocytes articulaires humains

Afin de déterminer si le mécanisme de régulation du gène *IHH* par le facteur NFAT1 est le même dans les chondrocytes que dans les ostéoblastes, des co-transfections *IHH/NFAT1* ont été réalisées dans des chondrocytes humains, les cellules tsT/AC62 (figure 21). À l'inverse des résultats obtenus dans les cellules ostéoblastiques UMR106, l'ajout de NFAT1 entraîne une augmentation de l'expression du gène rapporteur luciférase pour toutes les constructions à l'exception du vecteur contrôle et du mutant M2 (mutation du site NFAT1). En fonction des différents fragments du promoteur testés, une activation de 25 à 70 % de l'activité transcriptionnelle a été mesurée en présence de NFAT1.

Pour confirmer ces résultats de transfections, des expériences d'inhibition par RNAi de *NFAT1* ont été effectuées dans le même type cellulaire, tsT/AC62 (figure 22). Les cellules ont été transfectées soit avec le siRNA contrôle soit avec le siRNA *NFAT1* pendant 72 heures d'incubation. Les tests ont été réalisés avec 200 et 300 ng de siRNA *NFAT1* et 300 ng de siRNA contrôle.

Les résultats d'atténuation obtenus par siRNA et mesurés par RT-qPCR montrent dans les chondrocytes transfectés une inhibition de l'expression de *NFAT1* de 40 % en présence de 200 ng de siRNA *NFAT1* et de 60 % en présence de 300 ng du même siRNA (figure 22A). Parallèlement, l'expression endogène d'*IHH* en présence de 200 et 300 ng de siRNA *NFAT1* est diminuée de plus de 60 % et de plus de 80 %, respectivement (figure 22B).

Partant du principe que ces effets opposés peuvent être le résultat de mécanismes différents entre les deux espèces (rat *versus* humain), des co-transfections entre *IHH* et *NFAT1* ont été réalisées dans des cellules ostéoblastiques humaines, les cellules U2OS (figure 23). L'ajout de NFAT1 entraîne également, comme dans les cellules UMR106, une diminution significative de 50 à 60 % de l'expression du gène rapporteur luciférase pour toutes les constructions à l'exception du vecteur vide et du mutant M2. Ces résultats indiquent donc que l'effet répresseur observé de NFAT1 sur l'expression endogène d'*IHH* ne varie pas en fonction de l'espèce mais plutôt en fonction du type cellulaire testé.

Finalement, pour valider ces résultats dans un système *in vivo*, des essais de co-immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont été effectués et ont permis de vérifier si NFAT1 est bien présent au promoteur d'*IHH* (figure 24). Ces expériences de ChIP ont été exécutées dans deux types cellulaires humain différents : des cellules ostéoblastiques U2OS et des chondrocytes C28/I2. Le gène humain du récepteur- β 2 de l'interleukine-12 (*IL12R β 2*) est connu pour être un gène cible de NFAT1. Ce gène a donc été choisi comme contrôle positif pour vérifier l'efficacité des immunoprécipitations.¹⁵¹ La région -323/-230 du promoteur humain d'*IHH* et celle contenant un site fonctionnel NFAT1 au promoteur de l'*IL12R β 2* ont été amplifiées par RT-qPCR dans les deux types cellulaires. Les données témoignent que NFAT1 est recruté au promoteur d'*IHH* aussi bien qu'au promoteur de l'*IL12R β 2*. Dans les cellules ostéoblastiques, l'enrichissement au promoteur d'*IHH* est huit fois supérieur au contrôle et de plus de quatre fois au promoteur de l'*IL12R β 2* (figure 24A). De même, l'enrichissement observé dans les chondrocytes est de plus de 2,5 fois le niveau basal contrôle pour le promoteur d'*IHH* et de presque deux fois pour le promoteur de l'*IL12R β 2* (figure 24B).

En conclusion de cette première partie, NFAT1 agit comme un activateur transcriptionnel du gène *IHH* dans les chondrocytes et un répresseur au promoteur d'*IHH* dans les ostéoblastes. Les expériences antagonistes de RNAi confirment ces données. De surcroît, l'immunoprécipitation du complexe au promoteur d'*Ihh* dans les deux types cellulaires permet aussi de conclure que le site NFAT1 -238/-232 au promoteur d'*IHH* est fonctionnel et qu'il permet la fixation du régulateur transcriptionnel NFAT1 dans les chondrocytes comme dans les ostéoblastes.

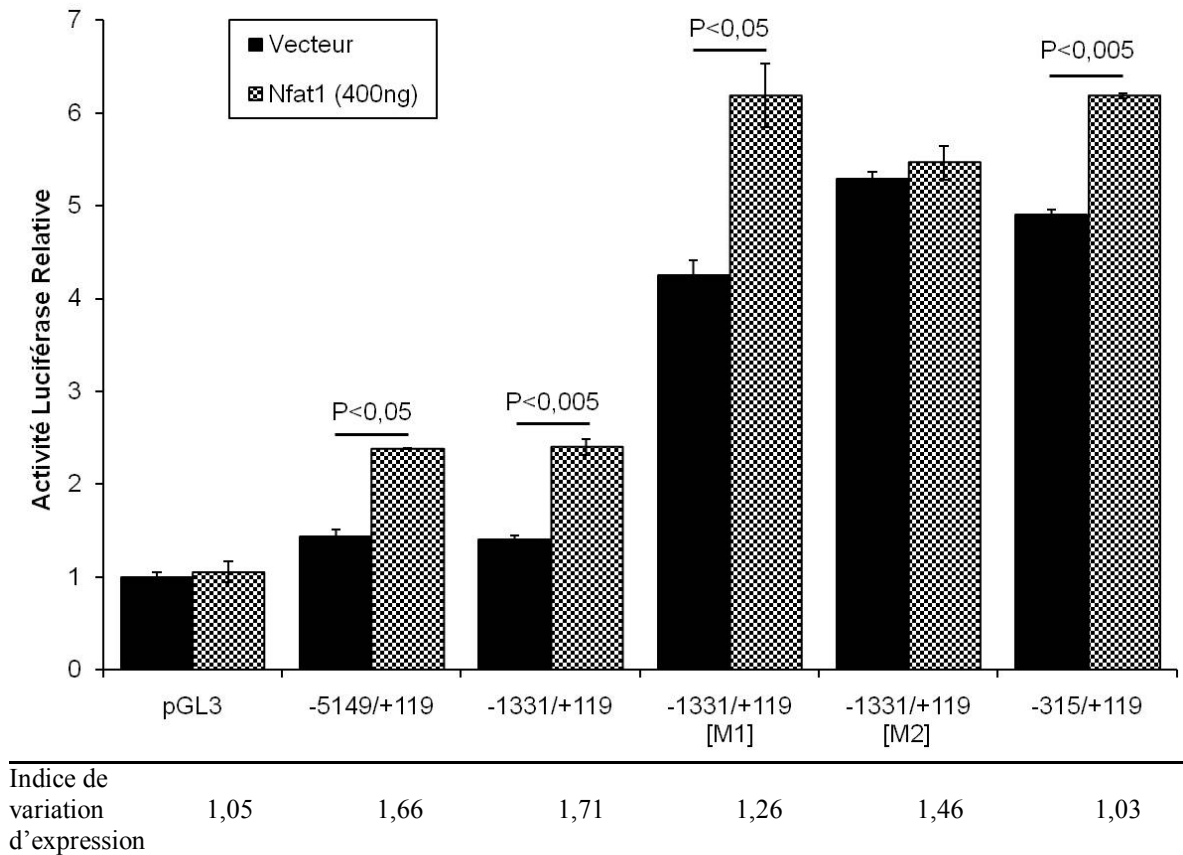


Figure 21. Co-transfections transitoires dans des chondrocytes articulaires humains du promoteur d'*IHH* et des deux constructions mutantes en présence ou en absence de NFAT1

Les cellules tsT/AC62 (P32), une lignée de chondrocytes articulaires humains, ont été transfectées avec trois constructions promotrice du gène *Ihh* et les deux mutants, en absence (colonnes noires) ou en présence (colonnes en damier) de 400ng de plasmide NFAT1 (n=2).

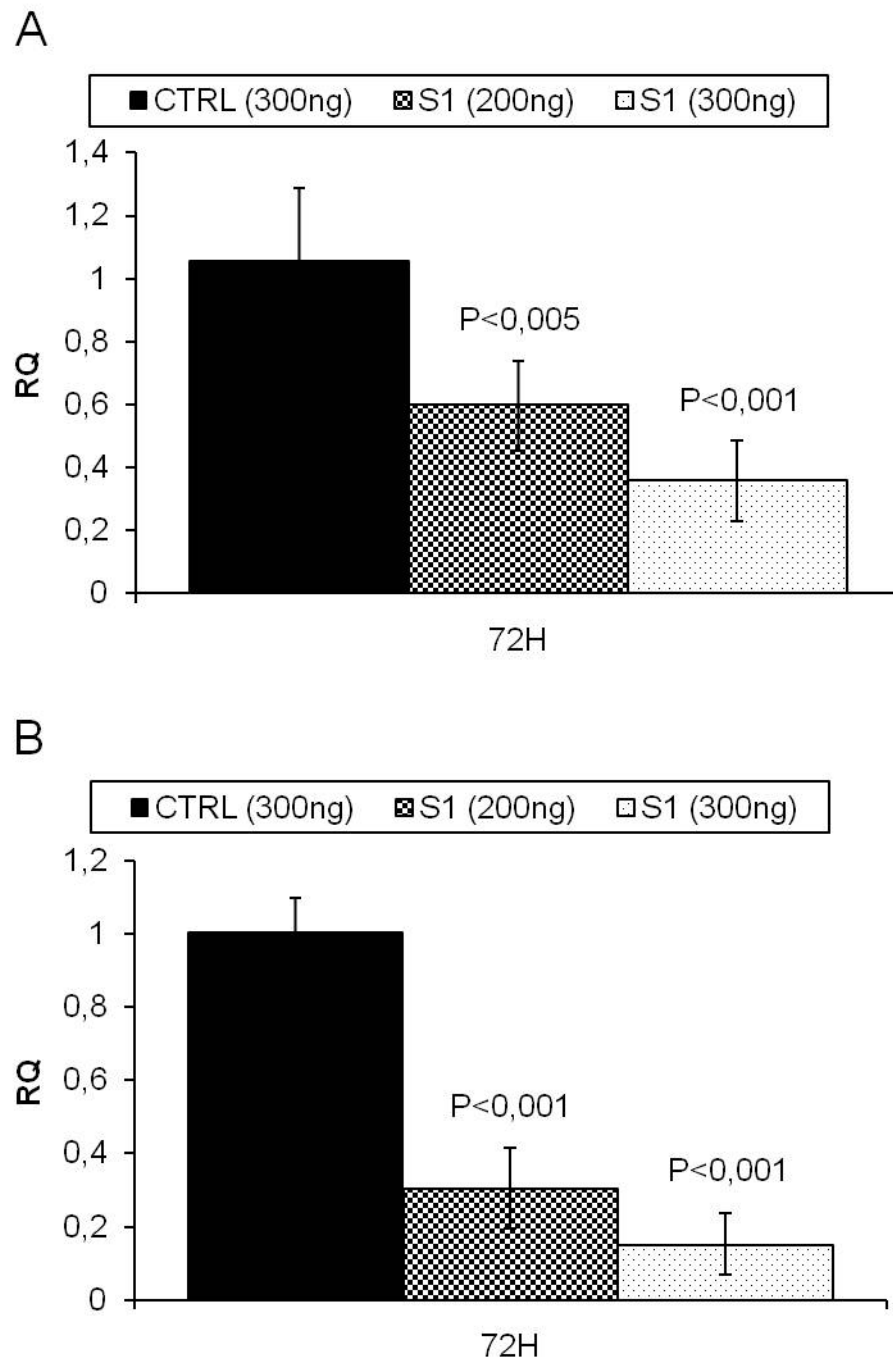


Figure 22. La perte d'expression de *NFAT1* par RNAi dans des chondrocytes articulaires humains contribue à la répression de l'expression du gène *IHH*

(A) L'expression de *NFAT1* a été analysée par RT-qPCR dans des cellules humaines tsT/AC62 (P34). Ces cellules ont été transfectées soit avec un siRNA contrôle (colonnes noires), soit avec 200ng (colonnes en damiers) ou 300ng (colonnes blanches à pois noirs) d'un siRNA (S1) dirigé contre *NFAT1* pendant 72h d'incubation. (B) Représentation graphique de l'expression d'*IHH* dans les mêmes conditions et dans les mêmes cellules.

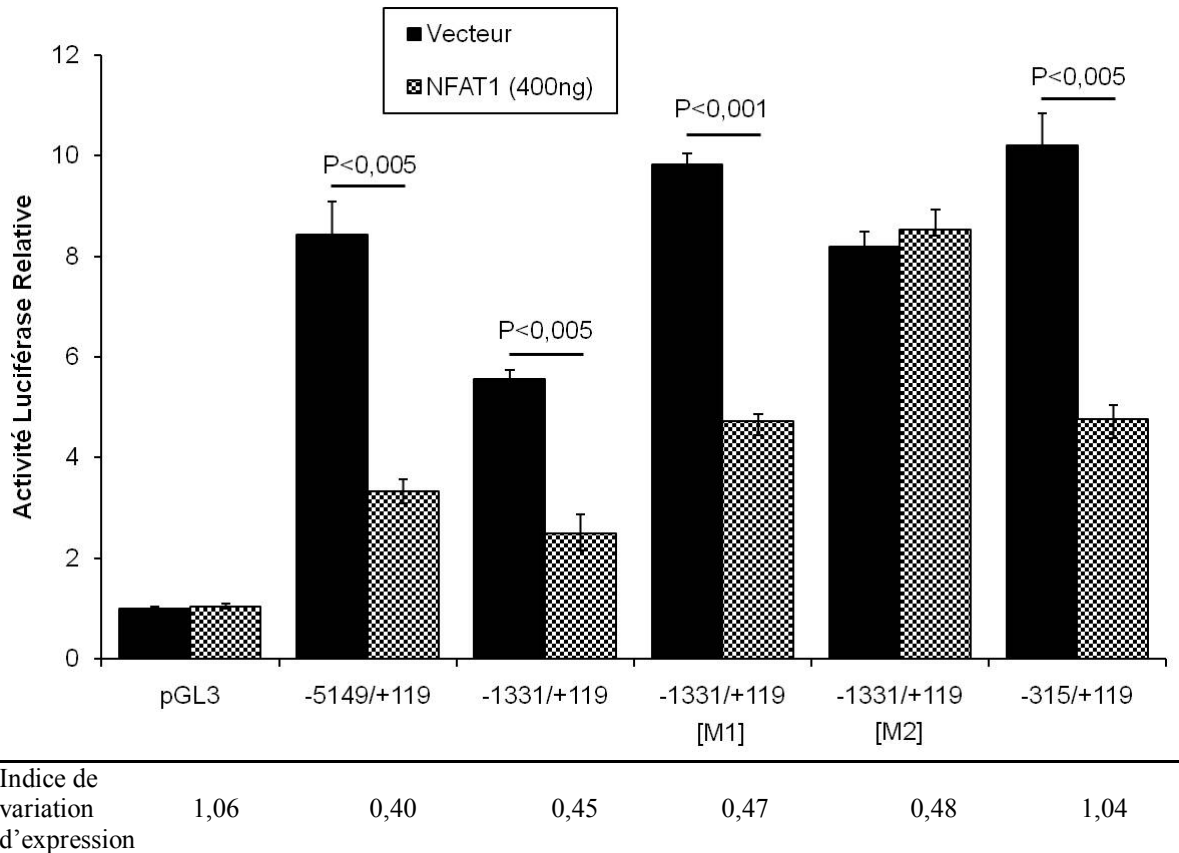


Figure 23. Transfections transitoires dans des ostéoblastes humains de trois constructions promotrices d'*IHH* et des deux mutants en présence ou en absence de NFAT1

Des cellules ostéoblastiques humaines, les U2OS (P23), ont été transfectées avec trois constructions promotrice du gène *Ihh* (-5149/+119, -1331/+119 et -315/+119) et les deux mutants (M1 et M2) en absence (colonnes noires) ou en présence (colonnes en damier) de 400ng de plasmide NFAT1 (n=2).

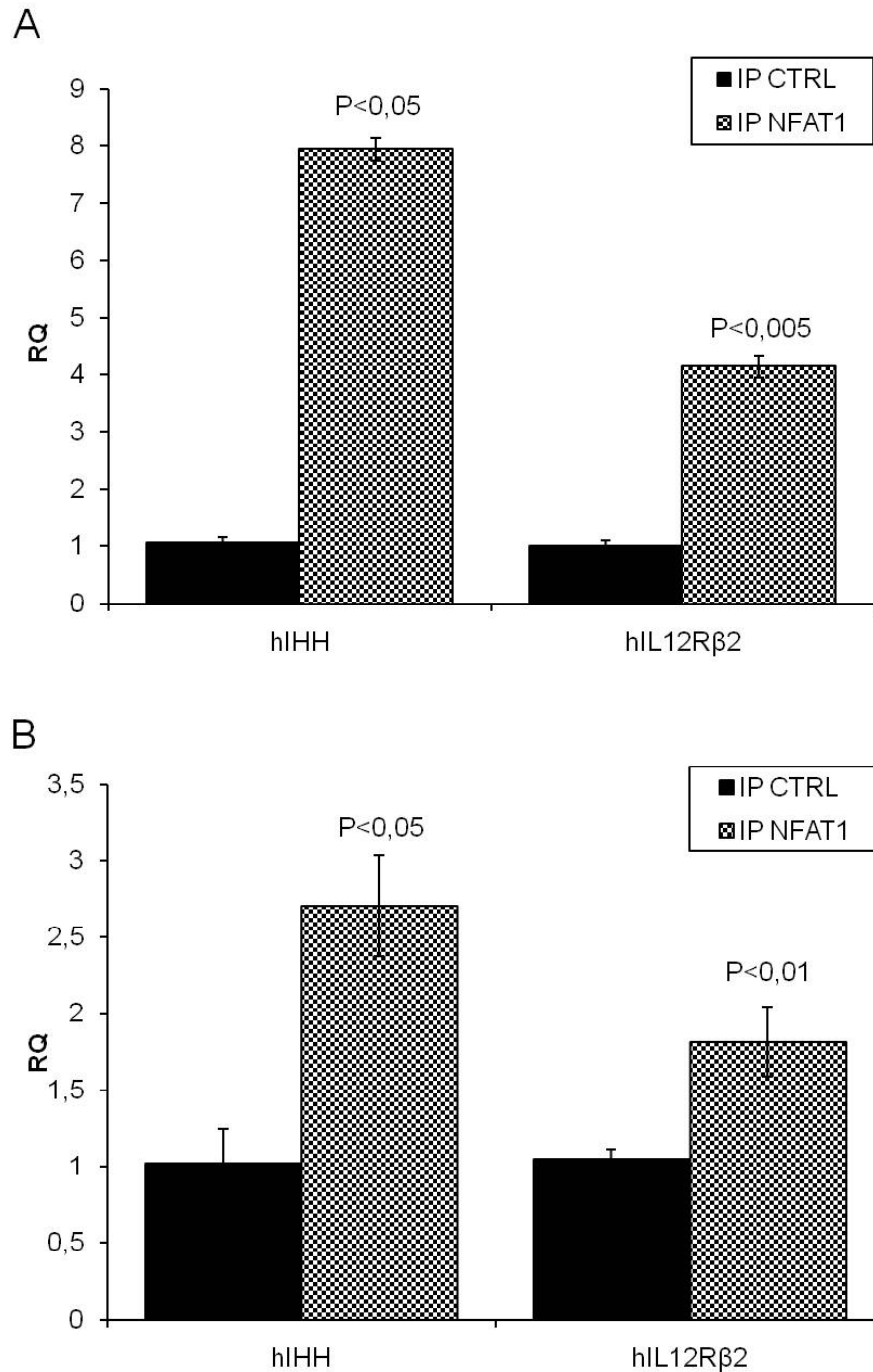


Figure 24. Analyses par RT-qPCR de la région promotrice du gène *IHH* et *IL12R β 2* après immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) contre le facteur NFAT1 dans des ostéoblastes et des chondrocytes humains

(**A**) Données relatives à l'immunoprécipitation de la région promotrice -323/-230 du gène *IHH* ou de la région promotrice contenant un site fonctionnel NFAT1 du gène de l'*IL12R β 2* dans des cellules ostéoblastiques U2OS (P22 ; n=2). (**B**) Données relatives à l'immunoprécipitation des mêmes régions d'ADN dans des cellules chondrocytaires C28/12 (P10 ; n=2).

20. Corrélations entre la perte d'expression de *NFAT1* et celle de la voie Hedgehog chez les patients ostéoarthrosiques

Dans un deuxième temps, des travaux ont été réalisés dans le but d'explorer le lien possible entre une dérégulation des mécanismes contrôlant l'expression du gène *IHH* et la pathologie de l'ostéoarthrose (OA). Des analyses d'expression du gène *NFAT1* et des gènes cibles de la voie Hh (*IHH*, *DHH*, *HHIP*, *PTCH1* et *GLI1*) dans des chondrocytes de sujets témoins et de patients OA ayant subi une arthroplastie du genou ont été effectuées par RT-qPCR (figure 25). Le groupe témoin inclut quatre patients non arthrosiques (cas d'accidents traumatiques) dont deux femmes et deux hommes (âge moyen = 35 ans). Le groupe OA englobe 27 patients ostéoarthrosiques dont 17 femmes et 10 hommes (âge moyen = 68,5 ans). La population de patients utilisée est représentative des statistiques connues sur l'OA qui affecte en moyenne deux femmes pour un homme après 55 ans.³³

Les résultats révèlent clairement une inhibition de l'expression de *NFAT1* de l'ordre de 80 % chez les patients arthrosiques par rapport aux patients non OA (figure 25A). La perte d'expression des gènes de la voie Hh ci-haut mentionnés chez les patients OA comparativement aux sujets témoins est quant à elle d'environ 50 à 80 % (figure 25).

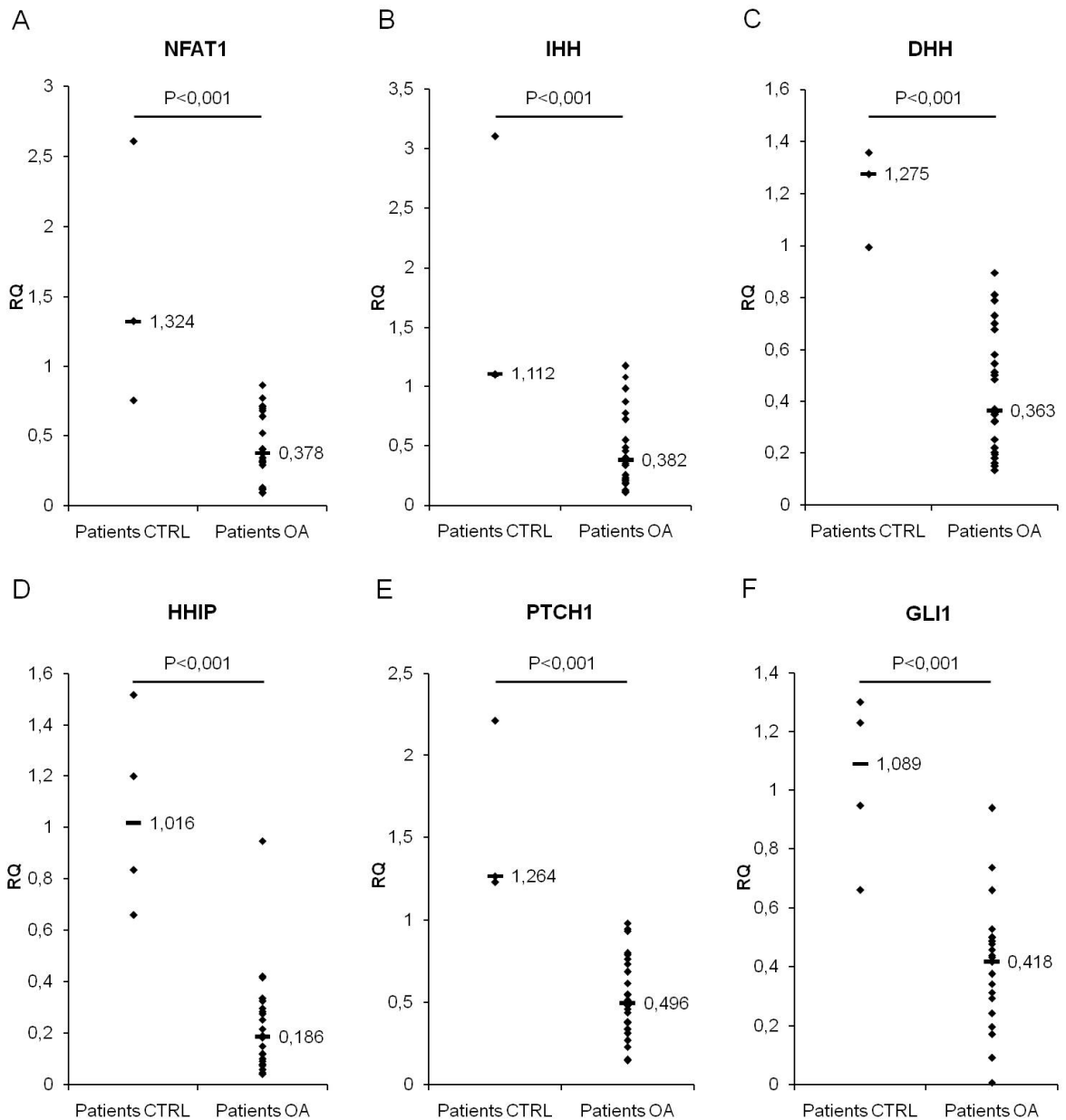


Figure 25. L'expression du gène *NFAT1* et de la voie Hh est inhibée dans des cellules chondrocytaires de patients OA versus de patients témoins

Les analyses de RT-qPCR ont été réalisées sur deux groupes de patients : quatre patients témoins (deux femmes et deux hommes) et 27 patients OA (17 femmes et 10 hommes). Chaque groupe (Patients CTRL et Patients OA) est composé de genoux gauches et droits. Les traits noirs représentent les valeurs médianes. L'expression du gène humain *NFAT1* (A), *IHH* (B), *DHH* (C), *HHIP* (D), *PTCH1* (E) et *GLI1* (F) a été quantifiée dans les patients témoins versus OA. Les valeurs RQ obtenues pour chaque gène ont été normalisées avec les valeurs de β -actine. La valeur P du test de Student a été indiquée pour chaque gène entre le groupe de sujets témoins et celui de patients OA.

21. Corrélations entre les données cliniques et démographiques des patients OA et l'expression des gènes *PITX1*, *IHH* et *DHH*

21.1. L'inactivation de *PITX1* chez les patients OA pourrait contribuer à la perte d'expression de la voie Hedgehog

Le Docteur Moreau et son équipe ont précédemment pu mettre en évidence une perte d'expression du facteur *PITX1* chez les patients OA. La possibilité que ce facteur de transcription puisse également contribuer à la régulation de la voie Hedgehog a été investiguée compte tenu que *PITX1* est exprimé dans les mêmes tissus et même cellules que plusieurs gènes de la voie Hh durant le développement et pendant la vie adulte. Pour cela, les niveaux d'expression des gènes *PITX1*, *IHH* et *DHH* mesurés et certaines des données cliniques et démographiques de tous les sujets testés ont été analysés de concert en vue de déterminer s'il existe une ou des corrélations entre la perte d'expression du facteur de transcription *PITX1* et la voie Hh dans l'OA (tableau V).

D'une part, les patients testés ont été catégorisés en fonction de la sévérité de leur pathologie. Un score de Kellgren & Lawrence (K/L) a été déterminé pour chaque patient par le chirurgien orthopédique qui les a lui-même opérés.⁵⁷ Il s'agit d'un score radiographique où le grade 0 correspond aux patients non atteints (témoins) et le grade 4 correspond aux patients les plus sévèrement atteints par l'OA.

Les données suggèrent que l'inhibition de l'expression de *PITX1* s'accroît progressivement chez les patients de grade 1, 2 et 3 comparativement aux patients témoins de grade 0 (figure 26A). Similairement, l'expression d'*IHH* et de *DHH* est aussi de plus en plus diminuée chez les patients ayant un coefficient de sévérité arthrosique compris entre 1 et 3 (figure 26C et figure 26E). Il est à noter que la variation d'expression d'*IHH* ne devient significative qu'à partir du grade 3. Le nombre de patients est inférieur pour le gène *PITX1* car la quantité de matériel n'était pas suffisante pour certains patients. De plus, l'expression des trois gènes augmente à nouveau pour les patients de grade 4, les plus fortement atteints par la pathologie. Ce point sera discuté dans la discussion de ce mémoire.

D'autre part, les corrélations effectuées entre les niveaux d'expression de ces trois gènes d'intérêt et l'âge des patients révèlent que l'expression de *PITX1*, *IHH* et *DHH* diminuent de façon proportionnelle à l'âge au cours du vieillissement (figure 26B, D, F).

Collectivement, les données obtenues suggèrent que la répression de deux des membres de la voie Hedgehog, *IHH* et *DHH* est reliée à la perte d'expression du facteur *PITX1* chez les patients OA. Le vieillissement des patients et la sévérité de leur pathologie corrélerent avec une diminution de l'expression des gènes *PITX1*, *IHH* et *DHH*.

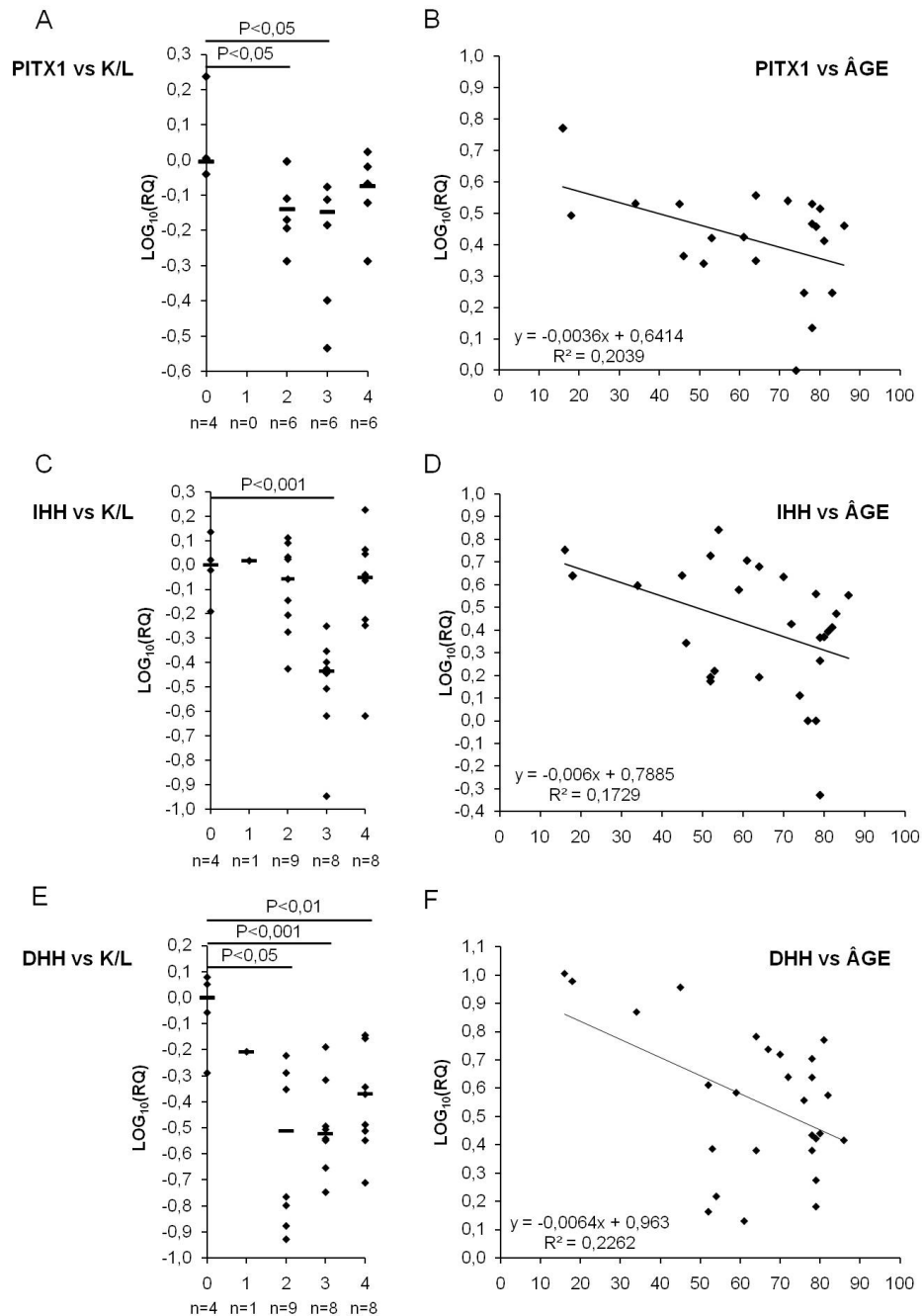


Figure 26. L'expression des gènes *PITX1*, *IHH* et *DHH* chez les patients diminue avec une augmentation du score K/L ou une augmentation de l'âge

Chaque grade de Kellgren & Lawrence (K/L) est représentatif d'un groupe de patients dont le nombre est indiqué en dessous du grade (n=X). La valeur médiane pour chaque groupe est représentée sous la forme d'une barre horizontale. (A, C, E) Graphiques représentant les valeurs RQ pour l'expression de *PITX1* (A), *IHH* (C) et *DHH* (E) en base de 10 ($\text{LOG}_{10}(\text{RQ})$) chez les patients OA et non OA en fonction des valeurs scorées K/L. (B, D, F) Graphiques représentant les valeurs RQ pour l'expression de *PITX1* (B), *IHH* (D) et *DHH* (F) en base de 10 ($\text{LOG}_{10}(\text{RQ})$) chez les patients OA et non OA en fonction de l'âge des patients. Les valeurs significatives P du test de Student ont été indiquées pour chaque grade K/L (1, 2, 3 et 4) comparativement au grade 0.

22. PITX1 régule indirectement l'expression d'*IHH*

Partant du principe que la dérégulation de l'expression du facteur de transcription PITX1 est corrélée à celle de certains gènes de la voie Hedgehog, alors l'hypothèse comme quoi PITX1 contrôlerait possiblement l'expression d'*IHH* a été émise. D'après la littérature, le facteur de transcription PITX1 est capable de lier l'ADN au niveau de plusieurs éléments de réponses dont les séquences sont les suivantes : 5'-TAATCC-3', 5'-TAAGTC-3', 5'-TAATTT-3', 5'-TAAGTG-3', 5'-TAAGTA-3' et 5'-TAAGCC-3'.

L'étude *in silico* de la séquence promotrice de 5 kpb du gène *IHH*, a permis de dénombrer neuf sites putatifs pour le facteur PITX1. Toutefois, aucun site n'est retrouvé sur la plus petite construction -315/+119, celle démontrant la plus forte activation basale. Pour confirmer ce mécanisme de régulation qui implique *IHH* et PITX1, des expériences *in vitro* de co-transfections transitoires ont été effectuées (figure 27).

22.1. *PITX1 contribue à l'activation d'IHH dans les chondrocytes*

Des co-transfections entre *IHH* et PITX1 ont été réalisées dans des cellules C28/I2, une lignée de cellules chondrocytaires dérivées du cartilage de côtes humaines. La surexpression de PITX1 entraîne une augmentation significative et proportionnelle de l'expression du gène rapporteur luciférase pour toutes les constructions du promoteur d'*IHH* (figure 27). Par exemple, l'activité de la construction -3267/+119 du promoteur d'*IHH*, en présence de 400 ng de PITX1, est plus de six fois supérieure à l'activité transcriptionnelle basale (construction seule). Enfin, l'activité luciférase de la plus petite construction -315/+119 est 3 fois et 6 fois plus activée en présence de 200 et 400 ng de PITX1, respectivement.

En conclusion, ces données suggèrent deux possibilités. Premièrement, PITX1 régulerait possiblement l'expression d'*IHH* dans les chondrocytes via la liaison directe de PITX1 au promoteur d'*IHH*. Deuxièmement, PITX1 activerait indirectement l'expression du gène *IHH* dans les chondrocytes humains. Cette dernière hypothèse est des plus probables puisque aucun site PITX1 putatif n'a été retrouvé sur la séquence de la construction -315/+119.

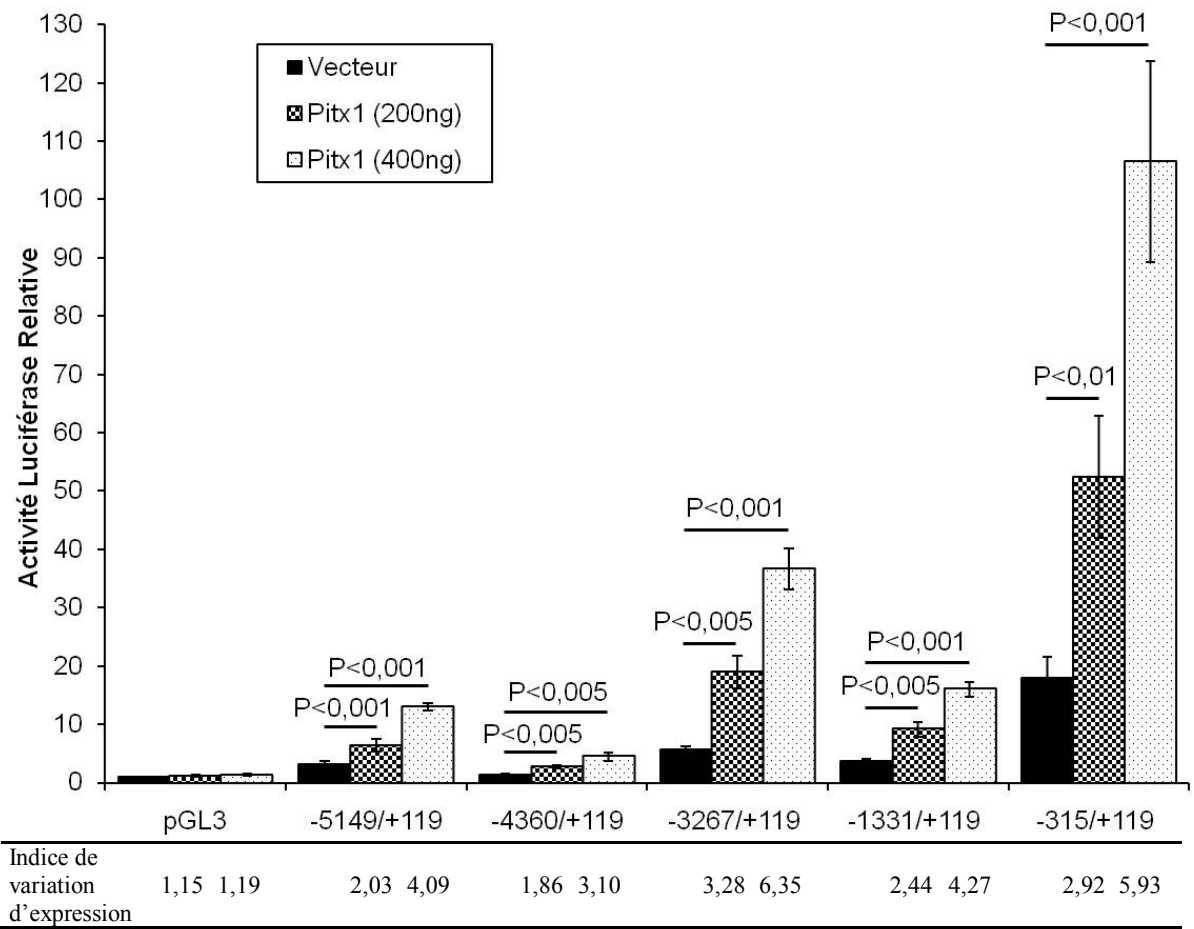


Figure 27. Transfections transitoires dans des chondrocytes humains des cinq principales constructions du promoteur *IHH* en présence ou en absence de PITX1

Des cellules chondrocytaires de côtes humaines, C28/I2 (P9) ont été transfectées avec les cinq constructions du promoteur du gène *IHH* soit en absence du facteur PITX1 (colonnes noires), soit avec 200ng (colonnes en damiers) ou 400ng de PITX1 (colonnes blanches à pois noirs) (n=3).

23. Perte d'expression de *Nfat1*, *Pitx1* et de la voie Hedgehog au cours du temps chez des souris arthrosiques STR/ort

Dans cette dernière section, les niveaux d'expression des gènes *Nfat1*, *Pitx1* et de la voie Hh ont été examinés dans un modèle animal soit la souris STR/ort, une lignée de souris bien connue pour développer spontanément avec l'âge un phénotype arthrosique très semblable à la pathologie de l'OA chez l'humain.⁸⁵ L'utilisation d'un modèle animal murin apporte plusieurs avantages. La souris est le vertébré le plus utilisé comme modèle animal pour étudier les maladies humaines car elle partage 99 % d'homologie avec le génome humain. L'intérêt premier de cet animal est qu'il permet des investigations plus poussées dans des conditions de laboratoires contrôlées et permet de mieux comprendre les mécanismes pathophysiologiques dans l'OA, notamment ceux impliqués dans les étapes précoces de l'OA puisqu'il est difficile d'en étudier les causes compte tenu de l'évolution lente et imprévisible de cette maladie chez l'homme. Une comparaison plus fine des variations de l'expression génique observées avant, pendant et après l'apparition de la maladie permettent de déterminer si ces variations précèdent et participent à l'étiopathogenèse de l'OA ou en sont la conséquence.

Dans ce but, l'expression des facteurs d'intérêt *Nfat1*, *Pitx1* et des gènes de la voie Hedgehog (*Ihh*, *Dhh*, *Hhip*, *Ptch1* et *Gli1*) a été quantifiée dans des articulations de genoux de souris STR/ort de 6, 10 et 15 semaines *versus* de souris C57BL/6 de 8 et 14 semaines (figure 28). Les résultats obtenus suggèrent que l'expression de l'ensemble des gènes mentionnés ci-dessus varie au cours du temps et corrélient avec le développement de l'OA chez les souris STR/ort et non pas chez les souris témoins C57BL/6. Effectivement, plus les souris STR/ort vieillissent et plus l'expression des gènes *Nfat1* et *Pitx1* est graduellement inhibées au cours du vieillissement (figure 28A et figure 28B).

En accord avec certaines données de la littérature qui suggèrent que les souris STR/ort développent l'arthrose à partir de dix semaines d'âge, ces résultats montrent une variation significative de l'expression à partir de dix semaines mais pas avant.^{34, 85}

De la même manière, l'expression de gènes de la voie Hh dans les différents groupes de souris a été évaluée. Les gènes *Dhh*, *Hhip* et *Gli1* sont graduellement inhibés au cours du vieillissement chez les souris STR/ort comparativement à celles des souris témoins qui maintiennent une expression stable de ces gènes au cours du temps (figure 28D, F, G). En revanche, le gène *Ptch1* voit son expression au cours du temps activée de plus de 45 fois entre les souris témoins de 14 semaines et les souris STR/ort de 15 semaines (figure 28E). Finalement, malgré l'utilisation d'une méthode sensible, précise et reproductible comme la RT-qPCR qui permet d'évaluer les niveaux d'expression génique dans un contexte plus physiologique et à un moment précis, les variations du taux d'expression du gène *Ihh* entre chaque groupe démontre seulement une tendance non significative suggérant une inhibition de l'expression d'*Ihh* au cours du temps (figure 28C). Ce point sera discuté dans la discussion.

En conclusion, cette partie confirme majoritairement les résultats d'expression génique obtenus précédemment chez les patients OA. En effet, chez les souris STR/ort de 15 semaines, l'expression des facteurs de transcription NFAT1 et PITX1 est réprimée de plus de 80 % *versus* les souris témoins C57BL/6. De plus, cette inhibition apparaît significativement probante qu'à partir de dix semaines, l'âge où les souris STR/ort commencent à développer les premiers symptômes cliniques de l'arthrose. Parallèlement, l'expression de la voie Hh tendrait elle aussi à diminuer au cours du temps. Ces résultats préliminaires confirment que cette perte d'expression coïncide avec le vieillissement des souris mais qu'elle n'est pas forcément associée à l'apparition des lésions arthrosiques.

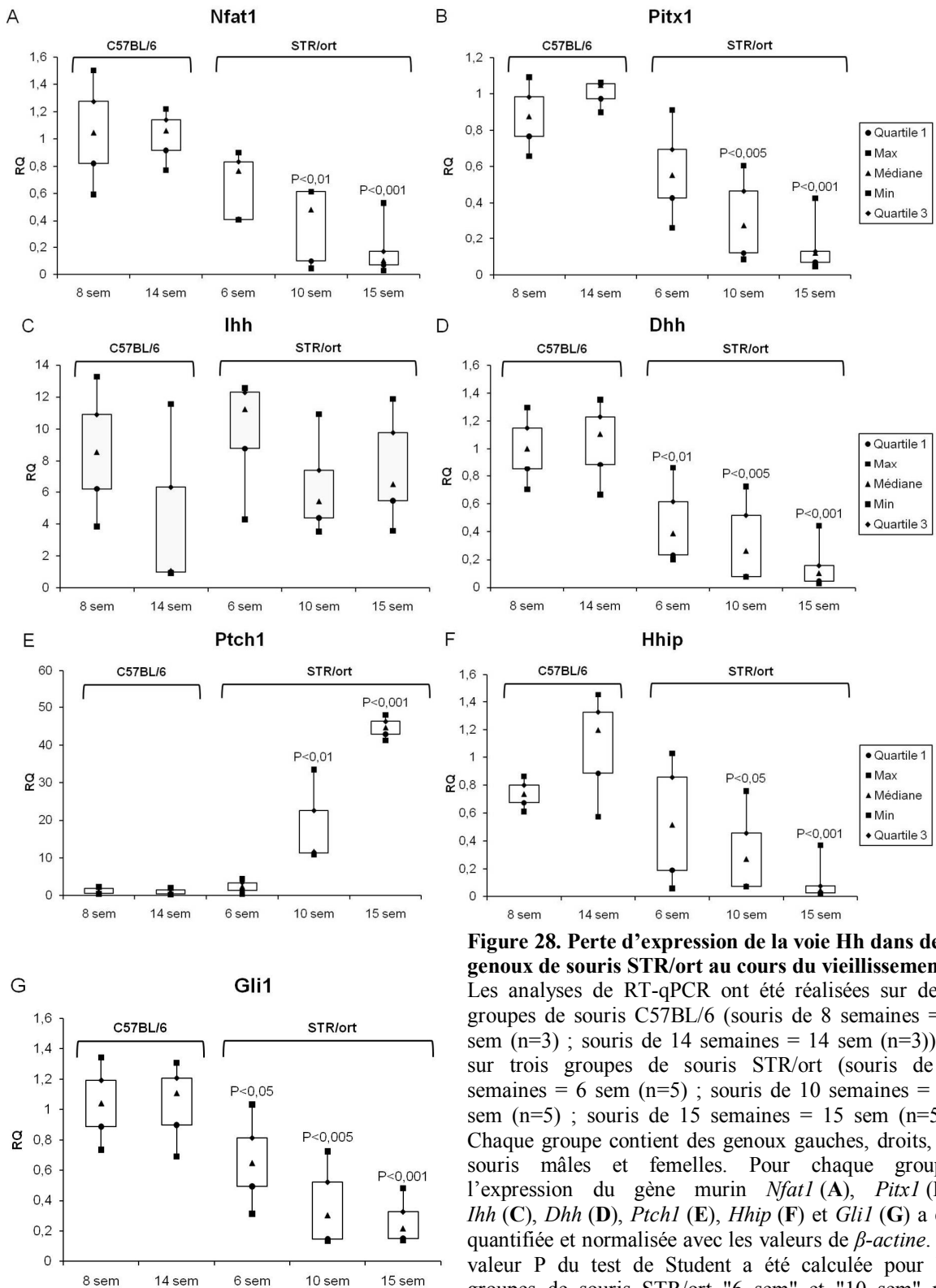


Figure 28. Perte d'expression de la voie Hh dans des genoux de souris STR/ort au cours du vieillissement
 Les analyses de RT-qPCR ont été réalisées sur deux groupes de souris C57BL/6 (souris de 8 semaines = 8 sem (n=3) ; souris de 14 semaines = 14 sem (n=3)) et sur trois groupes de souris STR/ort (souris de 6 semaines = 6 sem (n=5) ; souris de 10 semaines = 10 sem (n=5) ; souris de 15 semaines = 15 sem (n=5)). Chaque groupe contient des genoux gauches, droits, de souris mâles et femelles. Pour chaque groupe, l'expression du gène murin *Nfat1* (A), *Pitx1* (B), *Ihh* (C), *Dhh* (D), *Ptch1* (E), *Hhip* (F) et *Gli1* (G) a été quantifiée et normalisée avec les valeurs de β -actine. La valeur P du test de Student a été calculée pour les groupes de souris STR/ort "6 sem" et "10 sem" par rapport au groupe de souris C57BL/6 "8 sem" et pour le groupe "15 sem", à partir du groupe "14 sem".

Partie V : **D**iscussion

Le gène Indian Hedgehog est très connu pour son rôle dans la régulation des chondrocytes composant le cartilage articulaire et la plaque de croissance de même que dans la maturation des ostéoblastes au niveau de l'os. Ce projet visait à caractériser les mécanismes de régulation transcriptionnelle de ce gène au niveau du cartilage articulaire sain et à mettre en évidence un lien possible entre la voie Hh et la pathologie de l'OA.

24. Plusieurs régulateurs transcriptionnels du gène *Ihh* sont présents sur le premier kpb de la région promotrice en amont de l'ATG

Suite à des transfections transitoires avec différentes régions du promoteur d'*Ihh*, la plus petite construction (-315/+119) manifeste une activité transcriptionnelle de plus de 15 fois supérieure aux autres constructions promotrices (figure 15A). Ces données démontrent l'importance fondamentale de cette région pour l'activation de la transcription basale d'*Ihh* et suggèrent l'existence d'éléments de régulation sur ce fragment. Cette région proximale très conservée entre les espèces est déjà connue pour être le siège de régulateurs transcriptionnels tels que les protéines SMAD, le complexe TCF/LEF1 et le facteur RUNX2 (figure 15B).

L'analyse *in silico* des différentes constructions du promoteur du gène *Ihh* produites a montré que de nombreux régulateurs positifs ou négatifs liaient la séquence promotrice de ce gène et pourraient être à l'origine des variations d'activité obtenues lors des transfections transitoires. Cependant, il était clairement établi que la région proximale d'environ 1 kpb du promoteur d'*Ihh* était le lieu de régulation d'un plus grand et plus varié nombre de facteur de transcription. De façon non exhaustive, certains facteurs ont été mentionnés dans le tableau VII et pourraient être de nouvelles voies d'investigations dans la régulation d'*Ihh*. Dans ce mémoire, deux facteurs d'intérêt potentiel NFAT1 et PITX1 ont été étudiés suite à de précédents résultats encourageants.

25. L'activité transcriptionnelle du gène *IHH* est régulée directement par le facteur de transcription NFAT1 de façon tissu-spécifique

25.1. NFAT1 contribue à l'inhibition du gène *IHH* dans les ostéoblastes et à l'activation du gène *IHH* dans les chondrocytes articulaires

Les analyses de comparaisons croisées des séquences chez la souris, le rat et l'humain, utilisant un programme de prédictions des sites putatifs de facteurs de transcription, ont permis de mettre en évidence un site de liaison conservé pour NFAT1 dans la région proximale -315/+119 du promoteur du gène murin *Ihh*.

Les premiers résultats de transfections transitoires ont confirmé l'implication de NFAT1 comme un régulateur transcriptionnel essentiel du gène *Ihh*. Il a été mis en évidence que NFAT1 est un répresseur de l'activité transcriptionnelle d'*Ihh* dans les ostéoblastes (figure 17). Par contre dans les chondrocytes articulaires, NFAT1 agit comme un activateur de l'expression d'*Ihh* (figure 21). La mutation du site NFAT1 (M2) abolit son effet au promoteur d'*Ihh* dans les deux types cellulaires. Par ailleurs, l'inhibition de NFAT1 par une approche de RNAi active l'expression endogène d'*Ihh* dans les ostéoblastes et inhibe son expression dans les chondrocytes (figure 20 et figure 22). Donc, dépendamment du type cellulaire et vraisemblablement des partenaires présents (tissu spécifique), NFAT1 peut agir comme activateur ou inhibiteur de la transcription du gène *Ihh*. Cependant, il est à noter, au niveau des limitations expérimentales, que la surexpression de ces facteurs en transfections n'est pas représentatif des conditions physiologiques de la cellule et qu'en vérité l'affinité de NFAT1 pour le promoteur d'*Ihh* pourrait être différente *in situ*.

En conclusion, ces travaux ont pour la première fois mis en évidence un lien entre le gène *Ihh* et le facteur de transcription NFAT1. Ce dernier est capable de jouer des rôles antagonistes (activateur dans les chondrocytes *versus* répresseur dans les ostéoblastes) dans la régulation de l'expression du gène *IHH*.

D'après la littérature, NFAT1 active l'expression de plusieurs gènes dont les interleukines IL2 et IL13 et réprime d'autres gènes comme le récepteur- β de l'IL12 dans les cellules Th et la cycline A2 dans les lymphocytes mais à ce jour aucune donnée n'avait mentionnée la possibilité que NFAT1 puisse être un activateur et un répresseur pour le même gène.^{16, 96}

25.2. *NFAT1 est détecté directement in vivo sur la chromatine IHH*

Pour valider et confirmer la présence du facteur NFAT1 au site -238/-232 du promoteur du gène *IHH* dans un système *in vivo*, des expériences de co-immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont été effectuées dans des ostéoblastes (U2OS) et des chondrocytes humains (C28/I2). Les résultats attestent que le promoteur humain du gène *IHH* est une cible du facteur de transcription NFAT1 que ce soit dans les ostéoblastes ou dans les chondrocytes (figure 24). De nouvelles expériences de ChIP pourraient être effectuées chez les patients arthrosiques comparativement aux sujets témoins. Ces essais *in vivo* ont l'avantage d'être plus représentatifs des interactions de NFAT1 sur *IHH* et permettraient de déterminer si ce mécanisme de régulation est modifié chez les patients OA.

Parallèlement, des expériences de "pull-down" ont été effectuées et semblent confirmer nos données mais les résultats n'ont pas été utilisés ici car ils n'étaient pas assez probants.

25.3. *Les interactions potentielles entre NFAT1 et d'autres cofacteurs pourraient contribuer à la régulation du gène IHH*

Peu de facteurs collaborant avec NFAT1 ont été caractérisés et pourtant ils pourraient être des pistes intéressantes. Il a été rapporté que les facteurs c/EBP et NFAT1 agissent en synergie et médient la réponse à une stimulation des cytokines inflammatoires dans la phase aigüe pour activer le gène PPAR- γ 2 (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma 2*) et le gène de la phospholipase A2.^{166, 167} De plus, NFAT1 et c/EBP- β coopèrent aussi dans le contrôle des protéines régulant l'expression de la calcineurine.¹⁰¹

D'après une analyse *in silico* effectuée dans ce projet, plusieurs sites c/EBP sont présents sur le promoteur du gène *Ihh* ce qui laisserait croire que c/EBP jouerait peut-être un rôle de cofacteur dans la régulation d'*Ihh*.

Dans l'optique de caractériser certains partenaires de NFAT1 dans la régulation d'*IHH* que ce soit dans les chondrocytes ou dans les ostéoblastes, différentes expériences pourraient être réalisées. Tout d'abord, il serait profitable d'utiliser le double hybride en cellules de mammifère afin de garder un repliement correct des protéines et les mêmes modifications post-traductionnelles. Cette technique spécifique et fiable mise au point par Luo *et al.* permet l'étude des interactions protéine-protéine chez l'humain et l'identification de nouveaux facteurs potentiellement impliqués dans la pathologie de l'OA dans notre cas.⁷⁷ Cependant, cette technique *in vitro* reste complexe, onéreuse et entraîne de nombreux faux positifs. Elle pourrait donc permettre de confirmer une interaction mise en évidence par d'autres techniques telles que la co-immunoprécipitation ou le "*pull-down*". Ces deux techniques ont l'avantage d'être *in vivo* mais elles nécessitent des anticorps qui peuvent compétitionner un site de fixation des partenaires de la protéine d'intérêt, ici NFAT1. Enfin, la dernière proposition serait d'utiliser une méthode appelée TAP-tag (*Tandem Affinity Purification-tagged*). Cette technique *in vivo* de purification par immunoprécipitation de complexes protéiques basée sur l'utilisation de protéines chimériques marquées par deux domaines d'affinité permet de générer un complexe protéique suffisamment propre pour être analysé par la suite en spectrométrie de masse. Elle ne nécessite pas d'anticorps comme l'IP mais l'interaction protéine-protéine peut-être modifiée par l'utilisation de protéine de fusion.^{15, 36}

26. L'activité transcriptionnelle du gène *IHH* est régulée indirectement par le facteur de transcription PITX1

Dans un autre contexte, les expériences de surexpression ou d'inhibition du facteur PITX1 dans les chondrocytes humains ont permis de définir un nouveau mécanisme de régulation du gène *IHH* par le facteur PITX1 (figure 27 et annexe 1). D'après les résultats de transfections transitoires toutes les constructions du promoteur d'*IHH* sont activées en présence de PITX1 (figure 27).

Par contre, l'inhibition de *PITX1* dans des cellules chondrocytaires humaines (tsT/AC62) et dans des cellules de patients OA entraîne l'inhibition de l'expression du gène *IHH* (annexe 1). Ces données soutiennent l'idée que *PITX1* régule l'expression du gène *IHH*. Des co-transfections d'*IHH* et de *PITX1* dans une lignée ostéoblastique ou dans des cellules de patients OA pourraient compléter ces résultats obtenus dans des chondrocytes. Par contre, les analyses *in silico*, indiquent qu'il n'y a aucun site potentiel pour *PITX1* sur la construction -315/+119. L'explication la plus plausible est que l'activation transcriptionnelle d'*IHH* par *PITX1* se ferait vraisemblablement de manière indirecte via un ou plusieurs autres facteurs de transcription eux-mêmes régulés par *PITX1*. Pour soutenir cette hypothèse, des analyses *in silico* ont été effectuées et ont permis d'identifier 53 sites putatifs du facteur p53, une cible transcriptionnel de *PITX1*, sur la séquence promotrice de la construction -5149/+119 du promoteur d'*IHH* dont 21 sites sur celle de la construction -315/+119.

26.1. *PITX1* agirait en amont de p53 pour réguler *IHH*

Selon la littérature, *PITX1* a été identifié comme un gène suppresseur de tumeur, qui stimulerait l'activation de p53. En effet, *PITX1* induirait l'expression de p53 directement en se liant à son promoteur.⁶⁹

La protéine p53 est un régulateur clé de la mort cellulaire par apoptose mais il n'existe encore aucune certitude sur son rôle dans la pathologie de l'OA. La surexpression excessive de p53 serait impliquée dans plusieurs pathologies comme le diabète, l'Alzheimer, le Parkinson, l'arthrite rhumatoïde (AR) et l'ostéoarthrose.^{28, 99}

D'après Hashimoto et son équipe, l'expression de p53 dans des chondrocytes apoptotiques OA *versus* de sujets témoins serait activée.⁴¹ Au contraire, d'après Pennock *et al.*, l'expression de p53 est réprimée au niveau du cartilage articulaire de lapins âgés développant l'OA à un stade avancé.¹¹¹ L'ensemble de ces renseignements laisse à penser que de nombreuses voies contrôlent p53 et qu'il joue probablement un rôle dans l'OA mais il est clair que les mécanismes qui régulent son expression sont encore très mal connus.

Par contre, une étude réalisée dans le cadre de recherches sur le cancer au niveau du cartilage a démontré une convergence entre les voies Hedgehog et p53 sans pouvoir toutefois établir le mécanisme exact.⁴⁵ En conclusion, PITX1 pourrait potentiellement activer indirectement le gène *Ihh* dans les chondrocytes via le facteur p53.

Il serait utile de compléter ces travaux avec différentes co-transfections du promoteur *Ihh* et du facteur p53 dans des chondrocytes mais aussi dans des ostéoblastes. En effet, des expériences de surexpression de p53 ou d'inhibition soit avec un siRNA dirigé contre p53 soit dans des cellules p53 *knockout* pourraient être réalisées. Les résultats attendus tendraient à prouver que p53 lie le promoteur d'*IHH* et active sa transcription dans les chondrocytes.

Par la suite, le complexe transcriptionnel au promoteur d'*Ihh* contenant p53 et peut-être PITX1 pourrait être immunoprécipité par "*pull-down*" et analysé par spectrométrie de masse dans des cellules de sujets témoins ou patients OA (conditions normales ou pathologiques) ainsi que dans des types cellulaires différents (chondrocytes et ostéoblastes).

Somme toute, que ce soit par la voie NFAT1 ou PITX1, cette étude propose donc que ces deux voies activeraient le gène *IHH* dans les chondrocytes.

Des travaux de Hammond et Schulte-Merker sur des poissons-zèbre (ou *Danio rerio*) ont pu démontrer que le taux d'expression de la voie *Hh* était significativement différent entre deux populations de cellules ostéo-chondroprogénitrices : l'une à l'origine des ostéoblastes et qui requière un bas niveau d'expression de la voie de signalisation Hh et l'autre donnant naissance aux chondrocytes et qui nécessite un haut niveau d'Hh. Ils suggèrent que ce processus serait contrôlé par différentes voies et qu'il n'est pas simplement dû à une augmentation de PTCH1 mais à un accroissement général de l'expression de la voie Hh via l'augmentation d'*Ihh* dans les chondrocytes.³⁹

Il est concevable que NFAT1 et PITX1 puissent contribuer à ce processus en contrôlant spécifiquement l'expression d'*Ihh* dans les ostéoblastes et les chondrocytes.

27. D'autres facteurs pourraient potentiellement influencer l'expression transcriptionnelle du gène *IHH*

Malgré que ce mémoire se soit concentré sur ces deux facteurs, les analyses *in silico* de la région distale du promoteur du gène *IHH* ont permis de déterminer des sites potentiels pour de nombreux autres facteurs de transcription tels que c/EBP, E2F1 et HES1 (tableau VII).

Comme mentionné précédemment c/EBP est connu pour interagir avec NFAT1 mais il a aussi été établi que le facteur c/EBP est un régulateur connu du cartilage. Il induit l'expression de l'interleukine 1- β qui réprime les gènes de protéines de la matrice cartilagineuse.¹⁰³ Le facteur transcriptionnel c/EBP est impliqué dans l'activation des cellules ostéoarthritiques en interagissant avec plusieurs voies de signalisation. Entre autres, c/EBP- β est connu pour se lier directement au promoteur du gène *MMP13* et l'activer dans les chondrocytes arthritiques.⁴²

Deuxièmement, plusieurs sites pour un autre régulateur des cellules du cartilage, le facteur E2F1 ont été trouvés. Les protéines E2F régulent un grand nombre de gènes impliqués dans l'apoptose, la différenciation et le développement.⁹⁷ Deux groupes ont mis en évidence que le facteur PITX1 serait activé par les facteurs E2F. Des données suggèrent que le principal facteur de cette famille, E2F1, contrôle la différenciation des chondrocytes.¹²⁶ Au laboratoire, certaines avancées prouveraient qu'E2F1 régule l'activité transcriptionnelle du gène *PITX1* en se liant directement à son promoteur.

L'expression d'*E2F1* est inhibée par un autre régulateur de la différenciation et du développement cellulaire, le répresseur transcriptionnel HES1, lui-aussi potentiellement présent au promoteur d'*IHH*.⁴⁰

Ainsi, il serait tout aussi intéressant de poursuivre des recherches sur le facteur HES1 (*Hairy and Enhancer of Split homolog 1*), membre de la famille des bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*). C'est un régulateur négatif de la croissance et de la différenciation ostéoblastique agissant via la voie NOTCH.

HES1 régulerait directement l'activité transcriptionnelle du promoteur de l'ostéocalcine et l'expression du gène de l'ostéopontine.^{66, 130, 141, 170} Il interagit avec d'autres régulateurs transcriptionnels de façon tissu spécifique.¹⁶⁵

Des données récentes présentent HES1 comme une nouvelle cible de l'interleukine1- β dans les chondrocytes. Il régulerait des gènes impliqués dans le remodelage et la dégradation de la matrice du cartilage.¹⁰⁵

Des données suggèrent que la voie Hedgehog régulerait le facteur HES1. SHH contrôle la régulation de HES1 par l'intermédiaire de GLI2 qui se lie au promoteur de *HES1* et active ce dernier dans le développement et la prolifération des RPCs (*Retinal Progenitor Cells*). HES1 inhibe ainsi l'activité de gènes pro-neuraux et maintient l'identité des cellules progénitrices.^{156, 157}

À ce jour, aucune évidence dans la littérature n'amène à penser que ce facteur joue un rôle dans l'OA mais il semblerait que ce facteur soit un régulateur clé dans de nombreuses voies impliquées dans cette pathologie. D'après nos recherches, sept sites putatifs pour HES1 ont été identifiés sur l'ensemble du fragment de promoteur de 5 kpb à partir de la séquence consensus trouvée dans la littérature, 5'-CACCCAG-3', et 18 sites putatifs avec la base de données ALGGEN. Un site unique Hes1 (5'-CACCCAG-3') a été trouvé en position +34/+39 sur la séquence de la construction -315/+119 (annexe 2A). De plus, des co-transfections transitoires de la protéine HES1 et de plasmides contenant des fragments du promoteur d'*Ihh* montrent une répression de l'expression du gène *Ihh* par HES1 dans des cellules ostéoblastiques (annexe 2B).

En conclusion, d'autres voies de régulation pourraient être investiguées de la même manière que cela a été fait pour NFAT1 et PITX1 dans ce mémoire. Plusieurs autres facteurs de transcription montrent une expression spatio-temporelle similaire à *IHH* et des expériences de perte ou de gain de fonction pourraient être une première étape pour confirmer de nouveaux mécanismes de régulation entre ces facteurs de transcription et le gène *IHH*.

28. La voie hedgehog est dérégulée dans les chondrocytes articulaires de patients OA et dans les genoux de souris STR/ort

Suite aux travaux sur la régulation de l'activité transcriptionnelle du gène *IHH* par deux voies distinctes, la voie NFAT1 et la voie PITX1, plusieurs expériences dans ce mémoire ont montré l'implication possible de ces deux voies et de la voie Hh dans la pathologie de l'OA. Pour cela, un parallèle a été réalisé entre les résultats obtenus dans un modèle humain de cellules primaires de patients OA ou témoins avec un modèle animal murin qu'est la souris STR/ort.

L'avantage du modèle animal est qu'il permet d'examiner les événements précurseurs au développement des lésions arthrosiques et malgré la controverse que suscitent les souris STR/ort quant à savoir si oui ou non elles représentent un modèle acceptable d'OA humaine, elles restent un des modèles animaux les plus souvent acceptés et permettent des investigations plus poussées dans des conditions de laboratoires contrôlés.⁸⁵ Pour minimiser les biais, des souris C57BL/6 dont les caractéristiques se rapprochent des souris STR/ort mais qui ne développent pas d'OA prématurément ont servi de souris témoins. Les deux prochaines sections vont donc discuter des résultats croisés entre les patients et les souris STR/ort sur la dérégulation de la voie Hh que ce soit à travers la voie NFAT1 ou la voie PITX1.

28.1. Une dérégulation de la voie Hedgehog à travers la voie NFAT pourrait contribuer à la pathologie de l'OA

Tout dernièrement, une étude de Kim *et al.* basée sur un modèle de rats ostéoarthrosiques (OA) induit par chirurgie a permis d'observer des changements d'expression des gènes *Sox5*, *Sox6*, *Sox9*, *PTHrP* et *Ihh* entre des genoux OA et des genoux contrôle.⁵⁸ L'expression de tous ces gènes décroît dans le cartilage articulaire de rats OA. Les données obtenues par MSP (*Methylation Specific PCR*) révèlent une augmentation de la méthylation aux promoteurs de *Sox5* et *Sox9* ce qui, d'après les auteurs, pourrait expliquer les baisses d'expression de ces gènes dans le modèle OA.⁵⁸

Ces travaux sont en accord avec les résultats de l'étude ici présente qui montrent une inhibition de l'expression d'IHH chez les patients OA *versus* les patients témoins. Par ailleurs, Bradley *et al.* ont montré que Wnt5a par l'intermédiaire de la voie NFAT induit l'expression de *Sox9* et active ainsi la maturation et la différenciation des chondrocytes.¹¹ De plus, NFAT1 serait un régulateur clé qui peut agir avec SOX9 pour maintenir l'homéostasie des chondrocytes du cartilage articulaire adulte.

L'ensemble de ces données qui relie la voie NFAT1, le facteur SOX9 et le gène *IHH* concorde avec les travaux ici présents qui affirment que NFAT1 active le gène *IHH* dans des chondrocytes articulaires sains et que la perte de NFAT1 dans le cartilage articulaire de patients OA entraîne une inhibition d'*IHH*. Similairement, les résultats obtenus sur des souris arthrosiques STR/ort supporteraient les mêmes conclusions. L'analogie même imparfaite entre le modèle humain (patients OA) et animal (souris STR/ort) permet de croiser les résultats obtenus et tendrait à établir un mécanisme de régulation de la chondrogenèse impliquant la voie NFAT et la voie Hh.

D'autre part, les observations faites au niveau de l'os sous-chondral de cartilages arthrosiques montrent une ostéocondensation et un remodelage de l'os sous-chondral liés vraisemblablement à une activation dérégulée des ostéoblastes. En accord avec ces données, les résultats obtenus lors de la surexpression de NFAT1 dans des ostéoblastes humains révèlent que l'expression d'*IHH* est inhibée et *a contrario* une perte de NFAT1 entraîne l'activation du gène *IHH*. Ce mécanisme pourrait être à l'origine des aberrations observées lors de l'ostéoblastogenèse des patients OA.

28.2. Une dérégulation de la voie Hedgehog à travers la voie PITX1 pourrait contribuer à la pathologie de l'OA

Comme il a déjà été démontré, *PITX1* est aussi un des gènes candidats les plus prometteurs dans la compréhension des mécanismes à l'origine du développement de l'OA.¹¹⁴ D'après cette étude, une perte graduelle de l'expression des gènes *PITX1*, *IHH* et *DHH* chez les patients OA est corrélées avec les données cliniques et démographiques de ces patients (figure 26).

Effectivement, le vieillissement et l'augmentation de la sévérité de l'OA chez les patients sont corrélés avec une déficience en *PITXI* et une inhibition de deux des principaux membres de la voie Hh, *IHH* et *DHH*. Par contre, les données obtenus pour le grade 4, soit le groupe de patients le plus sévèrement atteints par la pathologie, ne concordent pas avec les autres groupes et montrent une légère ré-augmentation du taux d'expression pour les trois gènes d'intérêt.

Ce résultat pourrait être la conséquence de mécanismes de compensations intervenant à ce moment là comme une dernière tentative de réparation de l'articulation lésée. L'utilisation du score radiologique K/L reste encore un sujet de polémique tant au niveau clinique que de sa pertinence dans la compréhension de l'étiopathogénèse de l'OA. En effet, seulement 30% des patients OA et ce même à des stades très avancés de la maladie montrent des signes radiologiques de la maladie ce qui a conduit certains chercheurs à parler d'arthrose radiologique comme un phénotype *versus* les formes d'arthrose non-radiologiques. De plus, l'arthrose n'est pas une maladie linéaire mais plutôt une maladie phasique avec des périodes de progression et d'accalmie ce qui rend donc difficile l'établissement de corrélations entre les changements cellulaires et/ou moléculaires avec la progression de la maladie.⁶¹ Qui plus est, ce problème est possiblement accentué lorsqu'on tente de corréliser l'état clinique des sujets à tester avec les niveaux d'expression de certains gènes après avoir mis en culture les chondrocytes. Pour palier à cette limitation et réduire l'introduction de biais expérimentaux, il serait souhaitable d'extraire l'ARN directement du cartilage mais même cette approche représente un challenge technique à cause de la matrice extracellulaire.

Finalement, une perte graduelle de l'expression du gène *Pitx1* survient chez les souris STR/ort à partir de dix semaines alors qu'elle reste stable au cours du temps chez les souris C57BL/6 (figure 28). Les essais de quantification pour les gènes de la voie Hh sont plus ou moins concluants : les données confirment que *Dhh* et les cibles *Hhip* et *Gli1* sont inhibés avec l'âge mais l'expression d'*Ihh* n'est pas significativement modifiée. Probablement que l'augmentation du nombre d'animaux et/ou la séparation des mâles et des femelles en groupes distincts pourraient contribuer à obtenir des résultats plus probants.

Quant à *Ptch1*, le niveau d'expression retrouvé dans les cellules semble augmenter lorsque les souris STR/ort vieillissent. Ainsi, l'expression de *Pitx1* et de la voie Hh seraient dérégulées chez les souris arthrosiques.

En conclusion, PITX1 serait nécessaire au maintien du niveau d'expression de la voie Hh, à travers un ou plusieurs membres de la voie, pour prévenir le bon fonctionnement du cartilage articulaire.

Partie VI : Conclusion

Les principaux résultats de ce mémoire ont permis dans un premier temps de mettre en évidence un mécanisme de régulation entre la voie NFAT1 et la voie IHH. La dualité fonctionnelle du facteur NFAT1 permet une régulation tissu-spécifiques d'*IHH*. NFAT1 est capable d'activer le gène *IHH* dans les chondrocytes et de promouvoir son inhibition dans les ostéoblastes. Puisque aucune étude n'avait jamais relié la voie Hh et le facteur NFAT1 auparavant, ce projet a permis de mieux comprendre la relation qui existe entre ces différents protagonistes. Malgré tout, il reste encore certaines questions en ce qui concerne la formation de la cascade signalétique et les interactions entre NFAT1 et d'autres cofacteurs potentiellement présents dans le complexe transcriptionnel au promoteur d'*IHH*. De plus, l'étude quantitative sur le cartilage de genoux de patients OA *versus* non OA a permis de corrélérer une baisse d'expression du facteur NFAT1 et celles des gènes de la voie Hh chez les patients arthrosiques. Ces résultats ont aussi été confirmés chez un modèle de souris arthrosiques (STR/ort) et il semblerait que la répression de NFAT1 coïncide avec l'apparition et le développement de la pathologie.

D'autre part, la relation entre PITX1 et la voie Hh est elle aussi une nouveauté qui mériterait des recherches plus approfondies. D'après les résultats de surexpression obtenus, PITX1 active le gène *IHH* dans les chondrocytes humains et l'inhibition de ce facteur diminuerait significativement l'expression d'*IHH*. De plus, des corrélations entre l'expression de PITX1 et les données cliniques et démographiques des patients coïncident avec les corrélations faites pour deux membres de la voie Hh, IHH et DHH. Finalement, supportant les précédents résultats obtenus par l'équipe du Docteur Moreau, l'inhibition de l'expression du gène *Pitx1* augmente graduellement au cours du vieillissement chez les souris STR/ort comparativement aux souris témoins C57BL/6 qui ne montrent aucune variation significative dans l'expression de *Pitx1*. Cette étude tend à prouver que PITX1 est un régulateur clé en amont de la voie Hh et que sa déficience dans les étapes précoces de l'arthrose causerait une dérégulation de la voie Hh.

Le nombre de personnes atteintes de la pathologie de l'OA ne cesse d'augmenter. Il devient très urgent de mettre au point des techniques de réparation des tissus cartilagineux lésés. Le cartilage articulaire possède naturellement des propriétés de résistance et d'élasticité qui lui permettent de favoriser les mouvements des articulations et de protéger l'os sous-jacent contre les chocs mécaniques et traumatiques. Malheureusement lorsqu'il est endommagé, le cartilage ne se répare pas spontanément. Il n'existe à l'heure actuelle aucune médication appropriée pour guérir l'OA ou en arrêter la progression. Donc pour prévenir les lésions traumatiques du cartilage et retarder les traitements chirurgicaux prothétiques, il paraît légitime d'agir sur les causes de l'arthrose le plus tôt possible.¹⁴⁸ Les réseaux de voies de signalisation et de facteurs transcriptionnels qui régulent l'homéostasie du cartilage sont donc des axes majeurs à explorer pour le développement de traitements thérapeutiques.

Il serait donc prometteur de développer des thérapies pharmacologiques ciblant IHH ou la voie Hh à travers les voies NFAT et PITX1. Toutefois, il n'existe pas encore de drogues agissant directement sur NFAT1 ni PITX1 à ce jour. L'utilisation de thérapies géniques localisées (injections de lentivirus) permettant de stimuler des activateurs situés en amont de NFAT1 et de PITX1 pourrait aider dans le développement de traitements. En effet, il est clair que cibler un seul facteur n'est pas la solution mais qu'agir sur plusieurs en même temps pourrait être plus prometteur. Une meilleure compréhension des processus de régulation de l'homéostasie du cartilage permettrait sûrement des avancées majeures dans d'autres pathologies articulaires.

Partie VII : **B**ibliographie

1. Abu, E.O., Horner, A., Kusec, V., Triffitt, J.T. and Compston, J.E. (2000) *The Localization of the Functional Glucocorticoid Receptor {Alpha} in Human Bone*. J Clin Endocrinol Metab. **85**(2): p. 883-889.
2. Aigner, T. and Stöve, J. (2003) *Collagens: Major Component of the Physiological Cartilage Matrix, Major Target of Cartilage Degeneration, Major Tool in Cartilage Repair*. Advanced Drug Delivery Reviews. **55**(12): p. 1569-1593.
3. Akiyama, H., Chaboissier, M.-C., Martin, J.F., Schedl, A. and de Crombrughe, B. (2002) *The Transcription Factor Sox9 Has Essential Roles in Successive Steps of the Chondrocyte Differentiation Pathway and Is Required for Expression of Sox5 and Sox6*. Genes & Development. **16**(21): p. 2813-2828.
4. Akiyama, H., Shigeno, C., Hiraki, Y., Shukunami, C., Kohno, H., Akagi, M., Konishi, J. and Nakamura, T. (1997) *Cloning of a Mouse Smoothed Cdna and Expression Patterns of Hedgehog Signalling Molecules During Chondrogenesis and Cartilage Differentiation in Clonal Mouse Ec Cells, Atdc5*. Biochemical and Biophysical Research Communications. **235**(1): p. 142-147.
5. Amano, K., Ichida, F., Sugita, A., Hata, K., Wada, M., Takigawa, Y., Nakanishi, M., Kogo, M., Nishimura, R. and Yoneda, T. (2008) *Msx2 Stimulates Chondrocyte Maturation by Controlling Ihh Expression*. Journal of Biological Chemistry. **283**(43): p. 29513-29521.
6. Aoyama, T., Nagayama, S., Okamoto, T., Hosaka, T., Nakamata, T., Nishijo, K., Tsuboyama, T., Nakayama, T., Nakamura, T. and Toguchida, J. (2002) *Mutation Analyses of the Nfat1 Gene in Chondrosarcomas and Enchondromas*. Cancer Letters. **186**(1): p. 49-57.
7. Badley, E.M., Rothman, L.M. and Wang, P.P. (1998) *Modeling Physical Dependence in Arthritis: The Relative Contribution of Specific Disabilities and Environmental Factors*. Arthritis & Rheumatism. **11**(5): p. 335-345.
8. Benninghoff, A. (1925) *Form Und Bau Der Gelenkknorpel in Ihren Beziehungen Zur Funktion*. Cell and Tissue Research. **2**(5): p. 783-862.
9. Bi, W., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R. and de Crombrughe, B. (1999) *Sox9 Is Required for Cartilage Formation*. Nat Genet. **22**(1): p. 85-89.
10. Bitgood, M.J., Shen, L. and McMahon, A.P. (1996) *Sertoli Cell Signaling by Desert Hedgehog Regulates the Male Germline*. Current biology : CB. **6**(3): p. 298-304.
11. Bradley, E.W. and Drissi, M.H. (2010) *Wnt5a Regulates Chondrocyte Differentiation through Differential Use of the Can/Nfat and Ikk/Nf- κ B Pathways*. Mol Endocrinol. **24**(8): p. 1581-1593.

12. Brandt, K. (2003) *Paracetamol in the Treatment of Osteoarthritis Pain*. *Drugs*. **63**: p. 23-38.
13. Brandt, K.D. (2000) *The Role of Analgesics in the Management of Osteoarthritis Pain*. *Am J Ther*. **7**(2): p. 75-90.
14. Buckland-Wright, C. (2004) *Subchondral Bone Changes in Hand and Knee Osteoarthritis Detected by Radiography*. *Osteoarthritis Cartilage*. **12**(Suppl A): p. 10-19.
15. Burckstummer, T., Bennett, K.L., Preradovic, A., Schutze, G., Hantschel, O., Superti-Furga, G. and Bauch, A. (2006) *An Efficient Tandem Affinity Purification Procedure for Interaction Proteomics in Mammalian Cells*. *Nat Meth*. **3**(12): p. 1013-1019.
16. Carvalho, L.D., Teixeira, L.K., Carrossini, N., Caldeira, A.T., Ansel, K.M., Rao, A. and Viola, J.P. (2007) *The Nfat1 Transcription Factor Is a Repressor of Cyclin A2 Gene Expression*. *Cell Cycle*. **6**(14): p. 1789-1795.
17. Chen, X., Macica, C.M., Nasiri, A. and Broadus, A.E. (2008) *Regulation of Articular Chondrocyte Proliferation and Differentiation by Indian Hedgehog and Parathyroid Hormone-Related Protein in Mice*. *Arthritis & Rheumatism*. **58**(12): p. 3788-3797.
18. Chuang, P.-T. and McMahon, A.P. (1999) *Vertebrate Hedgehog Signalling Modulated by Induction of a Hedgehog-Binding Protein*. *Nature*. **397**(6720): p. 617-621.
19. Chun, J.S., Oh, H., Yang, S. and Park, M. (2008) *Wnt Signaling in Cartilage Development and Degeneration*. *BMB Rep*. **41**(7): p. 485-494.
20. Clark, J.M. (1990) *The Organisation of Collagen Fibrils in the Superficial Zones of Articular Cartilage*. *J Anat*. **171**: p. 117-130.
21. Colnot, C., de la Fuente, L., Huang, S., Hu, D., Lu, C., St-Jacques, B. and Helms, J.A. (2005) *Indian Hedgehog Synchronizes Skeletal Angiogenesis and Perichondrial Maturation with Cartilage Development*. *Development*. **132**(5): p. 1057-1067.
22. Corti, M.C. and Rigon, C. (2003) *Epidemiology of Osteoarthritis: Prevalence, Risk Factors and Functional Impact*. *Aging Clin Exp Res*. **15**(5): p. 359-363.
23. Cremer, M.A., Rosloniec, E.F. and Kang, A.H. (1998) *The Cartilage Collagens: A Review of Their Structure, Organization, and Role in the Pathogenesis of Experimental Arthritis in Animals and in Human Rheumatic Disease*. *J Mol Med*. **76**(3-4): p. 275-288.
24. Crockett, R., Grubel'nik, A., Roos, S., Dora, C., Born, W. and Troxler, H. (2007) *Biochemical Composition of the Superficial Layer of Articular Cartilage*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. **82A**(4): p. 958-964.

25. Cron, R.Q., Bort, S.J., Wang, Y., Brunvand, M.W. and Lewis, D.B. (1999) *T Cell Priming Enhances Il-4 Gene Expression by Increasing Nuclear Factor of Activated T Cells*. The Journal of Immunology. **162**(2): p. 860-870.
26. DeLaurier, A., Schweitzer, R. and Logan, M. (2006) *Pitx1 Determines the Morphology of Muscle, Tendon, and Bones of the Hindlimb*. Developmental Biology. **299**(1): p. 22-34.
27. Dong, Y.-F., Soung, D.Y., Schwarz, E.M., O'Keefe, R.J. and Drissi, H. (2006) *Wnt Induction of Chondrocyte Hypertrophy through the Runx2 Transcription Factor*. Journal of Cellular Physiology. **208**(1): p. 77-86.
28. Dubikov, A. and Kalinichenko, S. (2010) *Small Molecules Regulating Apoptosis in the Synovium in Rheumatoid Arthritis*. Scandinavian Journal of Rheumatology. **39**(5): p. 368-372.
29. Eyre, D.R. (1991) *The Collagens of Articular Cartilage*. Semin Arthritis Rheum. **21**(3 Suppl 2): p. 2-11.
30. Falvo, J.V., Lin, C.H., Tsytsykova, A.V., Hwang, P.K., Thanos, D., Goldfeld, A.E. and Maniatis, T. (2008) *A Dimer-Specific Function of the Transcription Factor Nfatp*. Proceedings of the National Academy of Sciences. **105**(50): p. 19637-19642.
31. Fam, H., Bryant, J.T. and Kontopoulou, M. (2007) *Rheological Properties of Synovial Fluids*. Biorheology. **44**(2): p. 59-74.
32. Farré, D., Roset, R., Huerta, M., Adsuara, J.E., Roselló, L., Albà, M.M. and Messeguer, X. (2003) *Identification of Patterns in Biological Sequences at the Algen Server: Promo and Malgen*. Nucleic Acids Research. **31**(13): p. 3651-3653.
33. Felson, D.T., Naimark, A., Anderson, J., Kazis, L., Castelli, W. and Meenan, R.F. (1987) *The Prevalence of Knee Osteoarthritis in the Elderly. The Framingham Osteoarthritis Study*. Arthritis Rheum. **30**(8): p. 914-918.
34. Gaffen, J.D., Bayliss, M.T. and Mason, R.M. (1997) *Elevated Aggrecan Mrna in Early Murine Osteoarthritis*. Osteoarthritis and Cartilage. **5**(4): p. 227-233.
35. Gentili, C., Tutolo, G., Pianezzi, A., Cancedda, R. and Descalzi Cancedda, F. (2005) *Cholesterol Secretion and Homeostasis in Chondrocytes: A Liver X Receptor and Retinoid X Receptor Heterodimer Mediates Apolipoprotein A1 Expression*. Matrix Biology. **24**(1): p. 35-44.
36. Gloeckner, C.J., Boldt, K., Schumacher, A. and Ueffing, M., *Tandem Affinity Purification of Protein Complexes from Mammalian Cells by the Strep/Flag (Sf)-Tap Tag*, in *Proteomics*, J. Reinders and A. Sickmann, Editors. 2009, Humana Press. p. 359-372.

37. Goldring, M. and Goldring, S. (2010) *Articular Cartilage and Subchondral Bone in the Pathogenesis of Osteoarthritis*. *Ann N Y Acad Sci*. **1192**: p. 230-237.
38. Goldring, S. and Goldring, M. (2010) *Bone and Cartilage in Osteoarthritis: Is What's Best for One Good or Bad for the Other?* *Arthritis Research & Therapy*. **12**(5): p. 143.
39. Hammond, C.L. and Schulte-Merker, S. (2009) *Two Populations of Endochondral Osteoblasts with Differential Sensitivity to Hedgehog Signalling*. *Development*. **136**(23): p. 3991-4000.
40. Hartman, J., Muller, P., Foster, J.S., Wimalasena, J., Gustafsson, J.-A. and Strom, A. (2004) *Hes-1 Inhibits 17[Beta]-Estradiol and Heregulin-[Beta]1-Mediated Upregulation of E2f-1*. *Oncogene*. **23**(54): p. 8826-8833.
41. Hashimoto, S., Nishiyama, T., Hayashi, S., Fujishiro, T., Takebe, K., Kanzaki, N., Kuroda, R. and Kurosaka, M. (2009) *Role of P53 in Human Chondrocyte Apoptosis in Response to Shear Strain*. *Arthritis & Rheumatism*. **60**(8): p. 2340-2349.
42. Hayashida, M., Okazaki, K., Fukushi, J., Sakamoto, A. and Iwamoto, Y. (2009) *Ccaat/Enhancer Binding Protein B Mediates Expression of Matrix Metalloproteinase 13 in Human Articular Chondrocytes in Inflammatory Arthritis*. *Arthritis & Rheumatism*. **60**(3): p. 708-716.
43. Hayes, A.J., MacPherson, S., Morrison, H., Dowthwaite, G. and Archer, C.W. (2001) *The Development of Articular Cartilage: Evidence for an Appositional Growth Mechanism*. *Anatomy and Embryology*. **203**(6): p. 469-479.
44. Hinoi, E., Takarada, T., Fujimori, S., Wang, L., Iemata, M., Uno, K. and Yoneda, Y. (2007) *Nuclear Factor E2 P45-Related Factor 2 Negatively Regulates Chondrogenesis*. *Bone*. **40**(2): p. 337-344.
45. Ho, L. and Alman, B. (2010) *Protecting the Hedgerow: P53 and Hedgehog Pathway Interactions*. *Cell Cycle*. **9**(3): p. 506-511.
46. Ho, S.N., Thomas, D.J., Timmerman, L.A., Li, X., Francke, U. and Crabtree, G.R. (1995) *Nfatc3, a Lymphoid-Specific Nfatc Family Member That Is Calcium-Regulated and Exhibits Distinct DNA Binding Specificity*. *Journal of Biological Chemistry*. **270**(34): p. 19898-19907.
47. Hockman, D., Cretokos, C.J., Mason, M.K., Behringer, R.R., Jacobs, D.S. and Illing, N. (2008) *A Second Wave of Sonic Hedgehog Expression During the Development of the Bat Limb*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **105**(44): p. 16982-16987.

48. Hoey, T., Sun, Y.-L., Williamson, K. and Xu, X. (1995) *Isolation of Two New Members of the Nf-at Gene Family and Functional Characterization of the Nf-at Proteins*. *Immunity*. **2**(5): p. 461-472.
49. Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J. and Rao, A. (2003) *Transcriptional Regulation by Calcium, Calcineurin, and Nfat*. *Genes & Development*. **17**(18): p. 2205-2232.
50. Horsley, V. and Pavlath, G.K. (2002) *Nfat: Ubiquitous Regulator of Cell Differentiation and Adaptation*. *The Journal of Cell Biology*. **156**(5): p. 771-774.
51. Huang, C.Y. and Gu, W.Y. (2007) *Effects of Tension-Compression Nonlinearity on Solute Transport in Charged Hydrated Fibrous Tissues under Dynamic Unconfined Compression*. *J Biomech Eng*. **129**(3): p. 423-429.
52. Ingham, P.W., Taylor, A.M. and Nakano, Y. (1991) *Role of the Drosophila Patched Gene in Positional Signalling*. *Nature*. **353**(6340): p. 184-187.
53. Jain, J., McCaffrey, P.G., Miner, Z., Kerppola, T.K., Lambert, J.N., Verdine, G.L., Curran, T. and Rao, A. (1993) *The T-Cell Transcription Factor Nfatp Is a Substrate for Calcineurin and Interacts with Fos and Jun*. *Nature*. **365**(6444): p. 352-355.
54. Jauliac, S., Lopez-Rodriguez, C., Shaw, L.M., Brown, L.F., Rao, A. and Toker, A. (2002) *The Role of Nfat Transcription Factors in Integrin-Mediated Carcinoma Invasion*. *Nat Cell Biol*. **4**(7): p. 540-544.
55. Kang, H.C., Chae, J.H., Kim, B.S., Han, S.Y., Kim, S.H., Auh, C.K., Yang, S.I. and Kim, C.G. (2004) *Transcription Factor Cp2 Is Involved in Activating Mbmp4 in Mouse Mesenchymal Stem Cells*. *Mol Cells*. **17**(3): p. 454-461.
56. Karp, S.J., Schipani, E., St-Jacques, B., Hunzelman, J., Kronenberg, H. and McMahon, A.P. (2000) *Indian Hedgehog Coordinates Endochondral Bone Growth and Morphogenesis Via Parathyroid Hormone Related-Protein-Dependent and -Independent Pathways*. *Development*. **127**(3): p. 543-548.
57. Kellgren, J.H. and Lawrence, J.S. (1957) *Radiological Assessment of Osteo-Arthritis*. *Ann Rheum Dis*. **16**(4): p. 494-502.
58. Kim, S.Y. and Im, G.I. (2010) *The Expressions of Sox Trio, Pthrp/Ihh in Surgically-Induced Osteoarthritis of the Rat*. *Cell Biol Int*. **35**(5): p. 529-535.
59. Kobayashi, T., Chung, U.-i., Schipani, E., Starbuck, M., Karsenty, G., Katagiri, T., Goad, D.L., Lanske, B. and Kronenberg, H.M. (2002) *Pthrp and Indian Hedgehog Control Differentiation of Growth Plate Chondrocytes at Multiple Steps*. *Development*. **129**(12): p. 2977-2986.
60. Kokenyesi, R., Tan, L., Robbins, J.R. and Goldring, M.B. (2000) *Proteoglycan Production by Immortalized Human Chondrocyte Cell Lines Cultured under*

- Conditions That Promote Expression of the Differentiated Phenotype.* Archives of Biochemistry and Biophysics. **383**(1): p. 79-90.
61. Kraus, V.B., Burnett, B., Coindreau, J., Cottrell, S., Eyre, D., Gendreau, M., Gardiner, J., Garnero, P., Hardin, J., Henrotin, Y., Heinegård, D., Ko, A., Lohmander, L.S., Matthews, G., Menetski, J., Moskowitz, R., Persiani, S., Poole, A.R., Rousseau, J.C. and Todman, M. (2011) *Application of Biomarkers in the Development of Drugs Intended for the Treatment of Osteoarthritis.* Osteoarthritis and Cartilage: p. 1-28.
 62. Lamonerie, T., Tremblay, J.J., Lanctôt, C., Therrien, M., Gauthier, Y. and Drouin, J. (1996) *Ptx1, a Bicoid-Related Homeo Box Transcription Factor Involved in Transcription of the Pro-Opiomelanocortin Gene.* Genes & Development. **10**(10): p. 1284-1295.
 63. Lanctot, C., Lamolet, B. and Drouin, J. (1997) *The Bicoid-Related Homeoprotein Ptx1 Defines the Most Anterior Domain of the Embryo and Differentiates Posterior from Anterior Lateral Mesoderm.* Development. **124**(14): p. 2807-2817.
 64. Lanctot, C., Moreau, A., Chamberland, M., Tremblay, M.L. and Drouin, J. (1999) *Hindlimb Patterning and Mandible Development Require the Ptx1 Gene.* Development. **126**(9): p. 1805-1810.
 65. Lanske, B., Karaplis, A.C., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, L.H.K., Ho, C., Mulligan, R.C., Abou-Samra, A.-B., Jüppner, H., Segre, G.V. and Kronenberg, H.M. (1996) *Pth/Pthrp Receptor in Early Development and Indian Hedgehog Regulated Bone Growth.* Science. **273**(5275): p. 663-666.
 66. Lee, J.-S., Thomas, D.M., Gutierrez, G., Carty, S.A., Yanagawa, S.-i. and Hinds, P.W. (2006) *Hes1 Cooperates with Prb to Activate Runx2-Dependent Transcription.* Journal of Bone and Mineral Research. **21**(6): p. 921-933.
 67. Lin, A.C., Seeto, B.L., Bartoszko, J.M., Khoury, M.A., Whetstone, H., Ho, L., Hsu, C., Ali, S.A. and Alman, B.A. (2009) *Modulating Hedgehog Signaling Can Attenuate the Severity of Osteoarthritis.* Nat Med. **15**(12): p. 1421-1425.
 68. Little, C.B., Hughes, C.E., Curtis, C.L., Jones, S.A., Caterson, B. and Flannery, C.R. (2002) *Cyclosporin a Inhibition of Aggrecanase-Mediated Proteoglycan Catabolism in Articular Cartilage.* Arthritis & Rheumatism. **46**(1): p. 124-129.
 69. Liu, D.X. and Lobie, P.E. (2007) *Transcriptional Activation of P53 by Pitx1.* Cell Death Differ. **14**(11): p. 1893-1907.
 70. Liu, S., Dontu, G. and Wicha, M. (2005) *Mammary Stem Cells, Self-Renewal Pathways, and Carcinogenesis.* Breast Cancer Research. **7**(3): p. 86-95.
 71. Liu, Y., Shi, Z., Silveira, A., Liu, J., Sawadogo, M., Yang, H. and Feng, X. (2003) *Involvement of Upstream Stimulatory Factors 1 and 2 in Rankl-Induced*

- Transcription of Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Gene During Osteoclast Differentiation.* Journal of Biological Chemistry. **278**(23): p. 20603-20611.
72. Long, F., Chung, U.-i., Ohba, S., McMahon, J., Kronenberg, H.M. and McMahon, A.P. (2004) *Ihh Signaling Is Directly Required for the Osteoblast Lineage in the Endochondral Skeleton.* Development. **131**(6): p. 1309-1318.
73. Loots, G. and Ovcharenko, I. (2007) *Ecrbase: Database of Evolutionary Conserved Regions, Promoters, and Transcription Factor Binding Sites in Vertebrate Genomes.* Bioinformatics. **23**(1): p. 122-124.
74. López-Rodríguez, C., Aramburu, J., Rakeman, A.S., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Thomas, S., Disteche, C., Jenkins, N.A. and Rao, A. (1999) *Nf-At5: The Nf-at Family of Transcription Factors Expands in a New Direction.* Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. **64**: p. 517-526.
75. Loret, B. and Simões, F. (2010) *Effects of Ph on Transport Properties of Articular Cartilages.* Biomechanics and Modeling in Mechanobiology. **9**(1): p. 45-63.
76. Lories, R.J. and Luyten, F.P. (2011) *The Bone-Cartilage Unit in Osteoarthritis.* Nat Rev Rheumatol. **7**(1): p. 43-49.
77. Luo, Y., Batalao, A., Zhou, H. and Zhu, L. (1997) *Mammalian Two-Hybrid System: A Complementary Approach to the Yeast Two-Hybrid System.* Biotechniques. **22**(2): p. 350-352.
78. Macian, F. (2005) *Nfat Proteins: Key Regulators of T-Cell Development and Function.* Nat Rev Immunol. **5**(6): p. 472-484.
79. Maeda, Y., Schipani, E., Densmore, M.J. and Lanske, B. (2010) *Partial Rescue of Postnatal Growth Plate Abnormalities in Ihh Mutants by Expression of a Constitutively Active Pth/Pthrp Receptor.* Bone. **46**(2): p. 472-478.
80. Mainil-Varlet, P., Aigner, T., Brittberg, M., Bullough, P., Hollander, A., Hunziker, E., Kandel, R., Nehrer, S., Pritzker, K., Roberts, S. and Stauffer, E. (2003) *Histological Assessment of Cartilage Repair: A Report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (Icrs).* J Bone Joint Surg Am. **85**(suppl_2): p. 45-57.
81. Mak, K.K., Kronenberg, H.M., Chuang, P.-T., Mackem, S. and Yang, Y. (2008) *Indian Hedgehog Signals Independently of Pthrp to Promote Chondrocyte Hypertrophy.* Development. **135**(11): p. 1947-1956.
82. Mancini, M. and Toker, A. (2009) *Nfat Proteins: Emerging Roles in Cancer Progression.* Nat Rev Cancer. **9**(11): p. 810-820.

83. Mankin, H.J. and Lippiello, L. (1971) *The Glycosaminoglycans of Normal and Arthritic Cartilage*. The Journal of Clinical Investigation. **50**(8): p. 1712-1719.
84. Marcil, A., Dumontier, É., Chamberland, M., Camper, S.A. and Drouin, J. (2003) *Pitx1 and Pitx2 Are Required for Development of Hindlimb Buds*. Development. **130**(1): p. 45-55.
85. Mason, R.M., Chambers, M.G., Flannelly, J., Gaffen, J.D., Dudhia, J. and Bayliss, M.T. (2001) *The Str/Ort Mouse and Its Use as a Model of Osteoarthritis*. Osteoarthritis and Cartilage. **9**(2): p. 85-91.
86. Masuda, E., Naito, Y., Tokumitsu, H., Campbell, D., Saito, F., Hannum, C., Arai, K. and Arai, N. (1995) *Nfatx, a Novel Member of the Nuclear Factor of Activated T Cells Family That Is Expressed Predominantly in the Thymus*. Mol. Cell. Biol. **15**(5): p. 2697-2706.
87. Maye, P., Becker, S., Kasameyer, E., Byrd, N. and Grabel, L. (2000) *Indian Hedgehog Signaling in Extraembryonic Endoderm and Ectoderm Differentiation in Es Embryoid Bodies*. Mechanisms of Development. **94**(1-2): p. 117-132.
88. McCaffrey, P., Luo, C., Kerppola, T., Jain, J., Badalian, T., Ho, A., Burgeon, E., Lane, W., Lambert, J., Curran, T. and et, a. (1993) *Isolation of the Cyclosporin-Sensitive T Cell Transcription Factor Nfatp*. Science. **262**(5134): p. 750-754.
89. McMahon, M. (2009) *Is There a Role for Nfat Inhibitors in the Prevention of Bone Destruction?* HSS Journal. **5**(2): p. 159-160.
90. Medina-Martinez, O., Shah, R. and Jamrich, M. (2009) *Pitx3 Controls Multiple Aspects of Lens Development*. Developmental Dynamics. **238**(9): p. 2193-2201.
91. Messeguer, X., Escudero, R., Farré, D., Núñez, O., Martí nez J. and Albà, M.M. (2002) *Promo: Detection of Known Transcription Regulatory Elements Using Species-Tailored Searches*. Bioinformatics. **18**(2): p. 333-334.
92. Miyakawa, H., Woo, S.K., Dahl, S.C., Handler, J.S. and Kwon, H.M. (1999) *Tonicity-Responsive Enhancer Binding Protein, a Rel-Like Protein That Stimulates Transcription in Response to Hypertonicity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **96**(5): p. 2538-2542.
93. Mobasher, A., Carter, S.D., Martín-Vasallo, P. and Shakibaei, M. (2002) *Integrins and Stretch Activated Ion Channels; Putative Components of Functional Cell Surface Mechanoreceptors in Articular Chondrocytes*. Cell Biology International. **26**(1): p. 1-18.
94. Mobasher, A., Vannucci, S.J., Bondy, C.A., Carter, S.D., Innes, J.F., Arteaga, M.F., Trujillo, E., Ferraz, I., Shakibaei, M. and Martín-Vasallo, P. (2002) *Glucose Transport and Metabolism in Chondrocytes: A Key to Understanding*

- Chondrogenesis, Skeletal Development and Cartilage Degradation in Osteoarthritis*. *Histol Histopathol.* **17**(4): p. 1239-1267.
95. Mollenhauer, J., Bee, J.A., Lizarbe, M.A. and von der Mark, K. (1984) *Role of Anchorin Cii, a 31,000-Mol-Wt Membrane Protein, in the Interaction of Chondrocytes with Type Ii Collagen*. *The Journal of Cell Biology.* **98**(4): p. 1572-1579.
 96. Monticelli, S., Solymar, D.C. and Rao, A. (2004) *Role of Nfat Proteins in Il13 Gene Transcription in Mast Cells*. *Journal of Biological Chemistry.* **279**(35): p. 36210-36218.
 97. Müller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D. and Helin, K. (2001) *E2fs Regulate the Expression of Genes Involved in Differentiation, Development, Proliferation, and Apoptosis*. *Genes & Development.* **15**(3): p. 267-285.
 98. Müller, M.R. and Rao, A. (2010) *Nfat, Immunity and Cancer: A Transcription Factor Comes of Age*. *Nat Rev Immunol.* **10**(9): p. 645-656.
 99. Nayak, S.K., Panesar, P.S. and Kumar, H. (2009) *P53-Induced Apoptosis and Inhibitors of P53*. *Curr Med Chem.* **16**(21): p. 2627-2640.
 100. Northrop, J.P., Ho, S.N., Chen, L., Thomas, D.J., Timmerman, L.A., Nolan, G.P., Admon, A. and Crabtree, G.R. (1994) *Nf-at Components Define a Family of Transcription Factors Targeted in T-Cell Activation*. *Nature.* **369**(6480): p. 497-502.
 101. Oh, M., Dey, A., Gerard, R.D., Hill, J.A. and Rothermel, B.A. (2010) *The Ccaat/Enhancer Binding Protein B (C/Ebp β) Cooperates with Nfat to Control Expression of the Calcineurin Regulatory Protein Rcan1-4*. *Journal of Biological Chemistry.* **285**(22): p. 16623-16631.
 102. Okamura, H., Garcia-Rodriguez, C., Martinson, H., Qin, J., Virshup, D.M. and Rao, A. (2004) *A Conserved Docking Motif for Ckl Binding Controls the Nuclear Localization of Nfat1*. *Mol. Cell. Biol.* **24**(10): p. 4184-4195.
 103. Okazaki, K., Li, J., Yu, H., Fukui, N. and Sandell, L.J. (2002) *Ccaat/Enhancer-Binding Proteins B and Δ Mediate the Repression of Gene Transcription of Cartilage-Derived Retinoic Acid-Sensitive Protein Induced by Interleukin-1 β* . *Journal of Biological Chemistry.* **277**(35): p. 31526-31533.
 104. Oswald, E., Chao, P.-H., Bulinski, J., Ateshian, G. and Hung, C. (2008) *Dependence of Zonal Chondrocyte Water Transport Properties on Osmotic Environment*. *Cellular and Molecular Bioengineering.* **1**(4): p. 339-348.
 105. Ottaviani, S., Tahiri, K., Frazier, A., Hassaine, Z.N., Dumontier, M.-F., Baschong, W., Rannou, F., Corvol, M.-T., Savouret, J.-F. and Richette, P. (2010) *Hes1, a New*

- Target for Interleukin 1 β in Chondrocytes*. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **69**(8): p. 1488-1494.
106. Ovcharenko, I., Nobrega, M.A., Loots, G.G. and Stubbs, L. (2004) *Ecr Browser: A Tool for Visualizing and Accessing Data from Comparisons of Multiple Vertebrate Genomes*. *Nucleic Acids Research*. **32**(suppl 2): p. 280-286.
107. Parmantier, E., Lynn, B., Lawson, D., Turmaine, M., Namini, S.S., Chakrabarti, L., McMahon, A.P., Jessen, K.R. and Mirsky, R. (1999) *Schwann Cell Derived Desert Hedgehog Controls the Development of Peripheral Nerve Sheaths*. *Neuron*. **23**(4): p. 713-724.
108. Partridge, N., Louise Opie, A., Opie, R. and John Martin, T. (1985) *Inhibitory Effects of Parathyroid Hormone on Growth of Osteogenic Sarcoma Cells*. *Calcified Tissue International*. **37**(5): p. 519-525.
109. Partridge, N.C., Alcorn, D., Michelangeli, V.P., Kemp, B.E., Ryan, G.B. and Martin, T.J. (1981) *Functional Properties of Hormonally Responsive Cultured Normal and Malignant Rat Osteoblastic Cells*. *Endocrinology*. **108**(1): p. 213-219.
110. Peffers, M.J., Milner, P.I., Tew, S.R. and Clegg, P.D. (2010) *Regulation of Sox9 in Normal and Osteoarthritic Equine Articular Chondrocytes by Hyperosmotic Loading*. *Osteoarthritis and Cartilage*. **18**(11): p. 1502-1508.
111. Pennock, A.T., Robertson, C.M., Emmerson, B.C., Harwood, F.L. and Amiel, D. (2007) *Role of Apoptotic and Matrix-Degrading Genes in Articular Cartilage and Meniscus of Mature and Aged Rabbits During Development of Osteoarthritis*. *Arthritis & Rheumatism*. **56**(5): p. 1529-1536.
112. Petersen, S.G., Saxne, T., Heinegard, D., Hansen, M., Holm, L., Koskinen, S., Stordal, C., Christensen, H., Aagaard, P. and Kjaer, M. (2010) *Glucosamine but Not Ibuprofen Alters Cartilage Turnover in Osteoarthritis Patients in Response to Physical Training*. *Osteoarthritis and cartilage/OARS (Osteoarthritis Research Society)*. **18**(1): p. 34-40.
113. Peyron, J.G., Stanescu, R., Stanescu, V. and Maroteaux, P. (1978) *Particular Electrophoretic Distribution of Proteoglycans in the Zones of Regeneration of the Arthrotic Cartilage and Study of Their Collagen*. *Rev Rhum Mal Osteoartic*. **45**(10): p. 569-576.
114. Picard, C., Azeddine, B., Moldovan, F., Martel-Pelletier, J. and Moreau, A. (2007) *New Emerging Role of Pitx1 Transcription Factor in Osteoarthritis Pathogenesis*. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. **462**: p. 59-66.
115. Ponten, J. and Saksela, E. (1967) *Two Established in Vitro Cell Lines from Human Mesenchymal Tumours*. *International Journal of Cancer*. **2**(5): p. 434-447.

116. Poole, A.R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M. and Lavery, S. (2001) *Composition and Structure of Articular Cartilage: A Template for Tissue Repair*. Clin Orthop Relat Res(391 Suppl): p. S26-33.
117. Pufe, T., Harde, V., Petersen, W., Goldring, M.B., Tillmann, B. and Mentlein, R. (2004) *Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) Induces Matrix Metalloproteinase Expression in Immortalized Chondrocytes*. The Journal of Pathology. **202**(3): p. 367-374.
118. Radin, E. and Rose, R. (1986) *Role of Subchondral Bone in the Initiation and Progression of Cartilage Damage*. Clin Orthop Relat Res. **213**: p. 34-40.
119. Ranger, A.M., Gerstenfeld, L.C., Wang, J., Kon, T., Bae, H., Gravallesse, E.M., Glimcher, M.J. and Glimcher, L.H. (2000) *The Nuclear Factor of Activated T Cells (Nfat) Transcription Factor Nfatp (Nfatc2) Is a Repressor of Chondrogenesis*. The Journal of Experimental Medicine. **191**(1): p. 9-22.
120. Rao, A., Luo, C. and Hogan, P.G. (1997) *Transcription Factors of the Nfat Family: Regulation and Function*. Annual Review of Immunology. **15**(1): p. 707-747.
121. Robbins, D.J. and Hebrok, M. (2007) *Hedgehogs: La Dolce Vita*. EMBO Rep. **8**(5): p. 451-455.
122. Robbins, J.R., Thomas, B., Tan, L., Choy, B., Arbiser, J.L., Berenbaum, F. and Goldring, M.B. (2000) *Immortalized Human Adult Articular Chondrocytes Maintain Cartilage-Specific Phenotype and Responses to Interleukin-1 β* . Arthritis & Rheumatism. **43**(10): p. 2189-2201.
123. Robbs, B.K., Cruz, A.L.S., Werneck, M.B.F., Mognol, G.P. and Viola, J.P.B. (2008) *Dual Roles for Nfat Transcription Factor Genes as Oncogenes and Tumor Suppressors*. Mol. Cell. Biol. **28**(23): p. 7168-7181.
124. Rountree, R.B., Schoor, M., Chen, H., Marks, M.E., Harley, V., Mishina, Y. and Kingsley, D.M. (2004) *Bmp Receptor Signaling Is Required for Postnatal Maintenance of Articular Cartilage*. PLoS Biol. **2**(11): p. 355.
125. Salazar, C. and Höfer, T. (2005) *Activation of the Transcription Factor Nfat1: Concerted or Modular Regulation?* FEBS Letters. **579**(3): p. 621-626.
126. Scheijen, B., Bronk, M., van der Meer, T. and Bernards, R. (2003) *Constitutive E2f1 Overexpression Delays Endochondral Bone Formation by Inhibiting Chondrocyte Differentiation*. Mol. Cell. Biol. **23**(10): p. 3656-3668.
127. Schroepel, J.P., Crist, J.D., Anderson, H.C. and Wang, J. (2011) *Molecular Regulation of Articular Chondrocyte Function and Its Significance in Osteoarthritis*. Histol Histopathol. **26**(3): p. 377-394.

128. Seki, K. and Hata, A. (2004) *Indian Hedgehog Gene Is a Target of the Bone Morphogenetic Protein Signaling Pathway*. Journal of Biological Chemistry. **279**(18): p. 18544-18549.
129. Shaw, J., Utz, P., Durand, D., Toole, J., Emmel, E. and Crabtree, G. (1988) *Identification of a Putative Regulator of Early T Cell Activation Genes*. Science. **241**(4862): p. 202-205.
130. Shen, Q. and Christakos, S. (2005) *The Vitamin D Receptor, Runx2, and the Notch Signaling Pathway Cooperate in the Transcriptional Regulation of Osteopontin*. Journal of Biological Chemistry. **280**(49): p. 40589-40598.
131. Shimoyama, A., Wada, M., Ikeda, F., Hata, K., Matsubara, T., Nifuji, A., Noda, M., Amano, K., Yamaguchi, A., Nishimura, R. and Yoneda, T. (2007) *Ihh/Gli2 Signaling Promotes Osteoblast Differentiation by Regulating Runx2 Expression and Function*. Mol. Biol. Cell. **18**(7): p. 2411-2418.
132. Shore, E.M. and Kaplan, F.S. (2010) *Inherited Human Diseases of Heterotopic Bone Formation*. Nat Rev Rheumatol. **6**(9): p. 518-527.
133. Shum, L. and Nuckolls, G. (2002) *The Life Cycle of Chondrocytes in the Developing Skeleton*. Arthritis Res. **4**(2): p. 94-106.
134. Smith, M.D., Triantafillou, S., Parker, A., Youssef, P.P. and Coleman, M. (1997) *Synovial Membrane Inflammation and Cytokine Production in Patients with Early Osteoarthritis*. J Rheumatol. **24**(2): p. 365-371.
135. Sophia Fox, A.J., Bedi, A. and Rodeo, S.A. (2009) *The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function*. Sports Health: A Multidisciplinary Approach. **1**(6): p. 461-468.
136. Später, D., Hill, T.P., O'Sullivan, R.J., Gruber, M., Conner, D.A. and Hartmann, C. (2006) *Wnt9a Signaling Is Required for Joint Integrity and Regulation of Ihh During Chondrogenesis*. Development. **133**(15): p. 3039-3049.
137. St-Jacques, B., Hammerschmidt, M. and McMahon, A.P. (1999) *Indian Hedgehog Signaling Regulates Proliferation and Differentiation of Chondrocytes and Is Essential for Bone Formation*. Genes & Development. **13**(16): p. 2072-2086.
138. Stabach, P.R., Thiyagarajan, M.M., Woodfield, G.W. and Weigel, R.J. (2005) *Ap2[Alpha] Alters the Transcriptional Activity and Stability of P53*. Oncogene. **25**(15): p. 2148-2159.
139. Stanton, L.-A. and Beier, F. (2007) *Inhibition of P38 Mapk Signaling in Chondrocyte Cultures Results in Enhanced Osteogenic Differentiation of Perichondral Cells*. Experimental Cell Research. **313**(1): p. 146-155.

140. Stuart, E.T., Haffner, R., Oren, M. and Gruss, P. (1995) *Loss of P53 Function through Pax-Mediated Transcriptional Repression*. EMBO J. **14**(22): p. 5638-5645.
141. Suh, J.H., Lee, H.W., Lee, J.-W. and Kim, J.B. (2008) *Hes1 Stimulates Transcriptional Activity of Runx2 by Increasing Protein Stabilization During Osteoblast Differentiation*. Biochemical and Biophysical Research Communications. **367**(1): p. 97-102.
142. Tang, G.H., Rabie, A.B.M. and Hägg, U. (2004) *Indian Hedgehog: A Mechanotransduction Mediator in Condylar Cartilage*. Journal of Dental Research. **83**(5): p. 434-438.
143. Terui, Y., Saad, N., Jia, S., McKeon, F. and Yuan, J. (2004) *Dual Role of Sumoylation in the Nuclear Localization and Transcriptional Activation of Nfat1*. Journal of Biological Chemistry. **279**(27): p. 28257-28265.
144. Thirunavukkarasu, K., Pei, Y., Moore, T., Wei, T., Wang, H. and Chandrasekhar, S. (2007) *Regulation of Nfatc2 Gene Expression by the Transcription Factor Runx2*. Molecular Biology Reports. **34**(1): p. 1-10.
145. Topol, L., Chen, W., Song, H., Day, T.F. and Yang, Y. (2009) *Sox9 Inhibits Wnt Signaling by Promoting B-Catenin Phosphorylation in the Nucleus*. Journal of Biological Chemistry. **284**(5): p. 3323-3333.
146. Towheed, T., Maxwell, L., Anastassiades Tassos, P., Shea, B., Houpt, J.B., Welch, V., Hochberg Marc, C. and Wells George, A. (2005) *Glucosamine Therapy for Treating Osteoarthritis*. Cochrane Database of Systematic Reviews, John Wiley & Sons, Ltd.
147. Trojanowska, M. (2000) *Ets Factors and Regulation of the Extracellular Matrix*. Oncogene. **19**(55): p. 6464-6471.
148. Valdes, A.M. and Spector, T.D. (2011) *Genetic Epidemiology of Hip and Knee Osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol. **7**(1): p. 23-32.
149. van der Kraan, P.M., Stoop, R., Meijers, T.H.M., Poole, A.R. and van den Berg, W.B. (2001) *Expression of Type X Collagen in Young and Old C57bl/6 and Balb/C Mice. Relation with Articular Cartilage Degeneration*. Osteoarthritis and Cartilage. **9**(2): p. 92-100.
150. van Hamburg, J.P., Mus, A.-M., de Bruijn, M.J.W., de Vogel, L., Boon, L., Cornelissen, F., Asmawidjaja, P., Hendriks, R.W. and Lubberts, E. (2009) *Gata-3 Protects against Severe Joint Inflammation and Bone Erosion and Reduces Differentiation of Th17 Cells During Experimental Arthritis*. Arthritis & Rheumatism. **60**(3): p. 750-759.

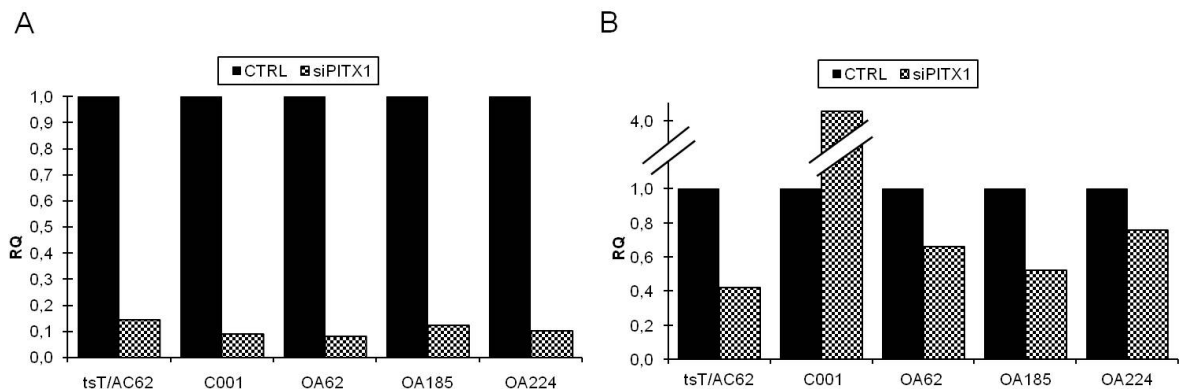
151. van Rietschoten, J.G.I., Smits, H.H., van de Wetering, D., Westland, R., Verweij, C.L., den Hartog, M.T. and Wierenga, E.A. (2001) *Silencer Activity of Nfatc2 in the Interleukin-12 Receptor B2 Proximal Promoter in Human T Helper Cells*. Journal of Biological Chemistry. **276**(37): p. 34509-34516.
152. Velasco, J., Zarrabeitia, M., Prieto, J., Perez-Castrillon, J., Perez-Aguilar, M., Perez-Nuñez, M., Sañudo, C., Hernandez-Elena, J., Calvo, I., Ortiz, F., Gonzalez-Macias, J. and Riancho, J. (2010) *Wnt Pathway Genes in Osteoporosis and Osteoarthritis: Differential Expression and Genetic Association Study*. Osteoporosis International. **21**(1): p. 109-118.
153. Volkmann, B.A., Zinkevich, N.S., Mustonen, A., Schilter, K.F., Bosenko, D.V., Reis, L.M., Broeckel, U., Link, B.A. and Semina, E. (2010) *Potential Novel Mechanism for Axenfeld-Rieger Syndrome: Deletion of a Distant Region Containing Regulatory Elements of Pitx2*. Invest Ophthalmol Vis Sci.
154. Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G.V., Kronenberg, H.M. and Tabin, C.J. (1996) *Regulation of Rate of Cartilage Differentiation by Indian Hedgehog and Pth-Related Protein*. Science. **273**(5275): p. 613-622.
155. Wada, Y., Yamauchi, K., Murakami, F. and Tanabe, Y. (2010) *Temporally- and Spatially-Regulated Generation of Distinct Descendants by Sonic Hedgehog-Expressing Progenitors in the Forebrain*. Developmental Neurobiology.
156. Wall, D.S., Mears, A.J., McNeill, B., Mazerolle, C., Thurig, S., Wang, Y., Kageyama, R. and Wallace, V.A. (2009) *Progenitor Cell Proliferation in the Retina Is Dependent on Notch-Independent Sonic Hedgehog/Hes1 Activity*. The Journal of Cell Biology. **184**(1): p. 101-112.
157. Wall, D.S. and Wallace, V.A. (2009) *Hedgehog to Hes1: The Heist of a Notch Target*. Cell Cycle. **8**(9): p. 1301-1302.
158. Wandel, S., Jüni, P., Tendal, B., Nüesch, E., Villiger, P.M., Welton, N.J., Reichenbach, S. and Trelle, S. (2010) *Effects of Glucosamine, Chondroitin, or Placebo in Patients with Osteoarthritis of Hip or Knee: Network Meta-Analysis*. BMJ. **341**.
159. Wang, J., Gardner, B., Lu, Q., Rodova, M., Woodbury, B., Yost, J., Roby, K., Pinson, D., Tawfik, O. and Anderson, H. (2009) *Transcription Factor Nfat1 Deficiency Causes Osteoarthritis through Dysfunction of Adult Articular Chondrocytes*. J Pathol. **219**(2): p. 163-172.
160. Wang, J., Verdonk, P., Elewaut, D., Veys, E.M. and Verbruggen, G. (2003) *Homeostasis of the Extracellular Matrix of Normal and Osteoarthritic Human Articular Cartilage Chondrocytes in Vitro*. Osteoarthritis and Cartilage. **11**(11): p. 801-809.

161. Wang, W., Lian, N., Li, L., Moss, H.E., Wang, W., Perrien, D.S., Elefteriou, F. and Yang, X. (2009) *Atf4 Regulates Chondrocyte Proliferation and Differentiation During Endochondral Ossification by Activating Ihh Transcription*. *Development*. **136**(24): p. 4143-4153.
162. Weiss, C., Rosenberg, L. and Helfet, A.J. (1968) *An Ultrastructural Study of Normal Young Adult Human Articular Cartilage*. *J Bone Joint Surg Am*. **50**(4): p. 663-674.
163. Wu, H., Peisley, A., Graef, I.A. and Crabtree, G.R. (2007) *Nfat Signaling and the Invention of Vertebrates*. *Trends in Cell Biology*. **17**(6): p. 251-260.
164. Xu, L., Peng, H., Wu, D., Hu, K., Goldring, M.B., Olsen, B.R. and Li, Y. (2005) *Activation of the Discoidin Domain Receptor 2 Induces Expression of Matrix Metalloproteinase 13 Associated with Osteoarthritis in Mice*. *Journal of Biological Chemistry*. **280**(1): p. 548-555.
165. Yan, B., Raben, N. and Plotz, P.H. (2002) *Hes-1, a Known Transcriptional Repressor, Acts as a Transcriptional Activator for the Human Acid [Alpha]-Glucosidase Gene in Human Fibroblast Cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **291**(3): p. 582-587.
166. Yang, T.T.C. and Chow, C.-W. (2003) *Transcription Cooperation by Nfat-C/Ebp Composite Enhancer Complex*. *Journal of Biological Chemistry*. **278**(18): p. 15874-15885.
167. Yang, T.T.C., Ung, P.M.U., Rincón, M. and Chow, C.-W. (2006) *Role of the Ccaat/Enhancer-Binding Protein Nfatc2 Transcription Factor Cascade in the Induction of Secretory Phospholipase A2*. *Journal of Biological Chemistry*. **281**(17): p. 11541-11552.
168. Yang, X.O., Pappu, B.P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H.S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A.D., Schluns, K.S., Watowich, S.S., Tian, Q., Jetten, A.M. and Dong, C. (2008) *T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by Orphan Nuclear Receptors Ror \pm and Ror 3* . *Immunity*. **28**(1): p. 29-39.
169. Yoshida, C.A., Yamamoto, H., Fujita, T., Furuichi, T., Ito, K., Inoue, K.-i., Yamana, K., Zanma, A., Takada, K., Ito, Y. and Komori, T. (2004) *Runx2 and Runx3 Are Essential for Chondrocyte Maturation, and Runx2 Regulates Limb Growth through Induction of Indian Hedgehog*. *Genes & Development*. **18**(8): p. 952-963.
170. Zhang, Y., Lian, J.B., Stein, J.L., van Wijnen, A.J. and Stein, G.S. (2009) *The Notch-Responsive Transcription Factor Hes-1 Attenuates Osteocalcin Promoter Activity in Osteoblastic Cells*. *Journal of Cellular Biochemistry*. **108**(3): p. 651-659.

Partie VIII : **A**nnexes

29. L'inhibition de PITX1 inhibe l'activité du gène *IHH* dans des chondrocytes humains

Des expériences de RNAi ont été effectuées dans des cellules tsT/AC62 (P32), de patients OA et d'un sujet témoin, dans le but de valider les résultats de transfections transitoire de la figure 27. Les cellules ont été transfectées, soit avec un siRNA contrôle, soit avec un siRNA *PITX1*, pendant 72 h d'incubation. Les tests ont été réalisés avec 300 ng de siRNA *PITX1* et 300 ng de siRNA contrôle. Les résultats de quantification de l'expression de *PITX1* obtenus par RT-qPCR dans ces cinq sortes de cellules ont permis de montrer une inhibition significative du taux d'ARNm de *PITX1* de plus de 80 % (annexe 1A). Parallèlement, les quantifications de l'expression d'*IHH* dans ces mêmes échantillons ont montrées une diminution de l'expression d'*IHH* de 25 à 45 % chez les patients arthrosiques et d'environ 60 % pour la lignée de chondrocytes tsT/AC62 mais affichent une activation d'*IHH* de 400 % chez le patient C001 (annexe 1B). Aucune analyse statistique n'a pu être réalisée faute de temps. Cette expérience nécessiterait d'être refaite plusieurs fois en quadruplicata.



Annexe1. Inhibition par siRNA de l'expression du facteur PITX1 dans des chondrocytes humains

Des cellules tsT/AC62 (P32), des cellules d'un patient contrôle C001 (P1) et de patients gonarthrosiques OA62, OA185 et OA224 (P1) ont été transfectées avec un siRNA contrôle ou dirigé contre *PITX1*. Les valeurs contrôle (CTRL) ont été arbitrairement définies à "1". Les valeurs d'expression obtenues avec le siPITX1 ont été normalisées avec les valeurs du siRNA CTRL correspondantes. (A) Les résultats de quantification du taux d'expression de *PITX1* dans les cinq sortes de cellules ont été représentés dans l'histogramme A. (B) Les résultats de quantification du taux d'expression d'*IHH* dans ces mêmes échantillons cellulaires ont été représentés dans l'histogramme B.

30. HES1 contribue à la régulation d'*Ihh* dans les ostéoblastes

Des analyses *in silico* ont permis de déterminer entre autres un site unique HES1 (5'-CACCAG-3') en position +34/+39 sur la séquence de la construction -315/+119.

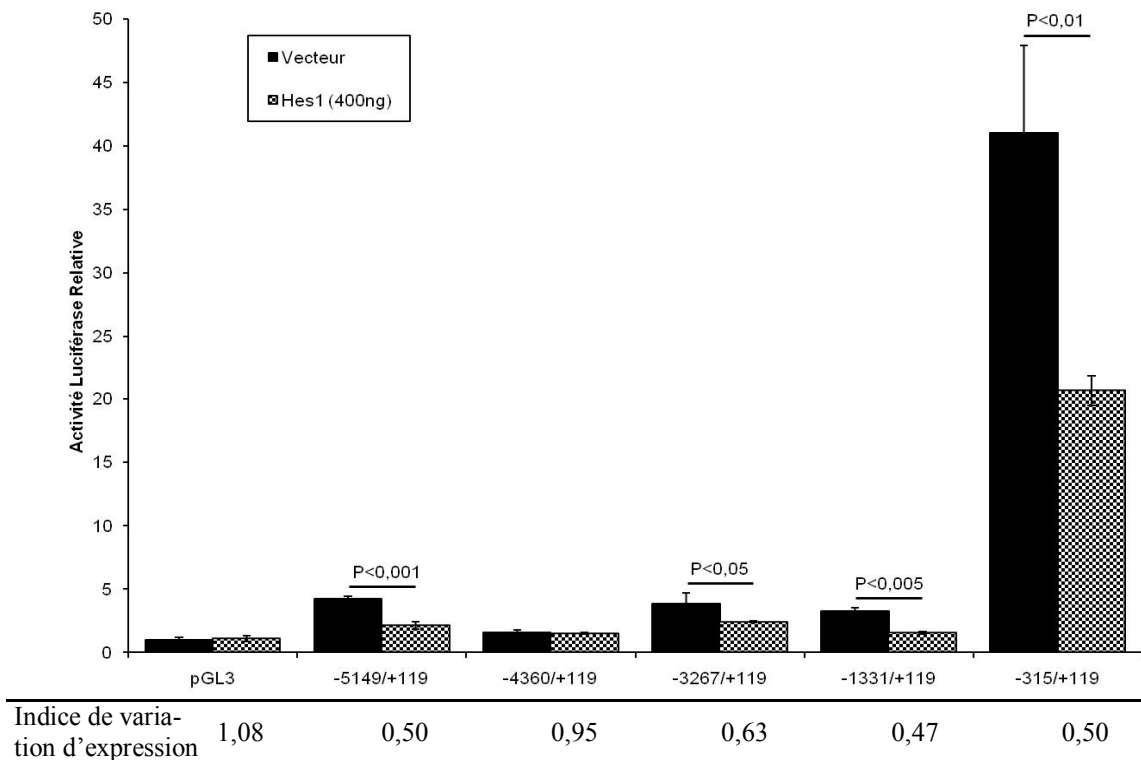
```

hIHH GGCAGCAGCTCCCGCTCGCCGAGCGCCTGACCGCGGGCGGGGTGCTAACCGGGGCCCTGAGCCGGCCGGCCAGCCAGCCAGCCGGCGGGCCCGCAGCCCCGCGCCCGC-----
mIhh GGCAGCAGCTCCCGCTGTGCCGAGCGCCTGACCGCGGGCGGGGTGCTAACCGGGGTCCCTTTCAGTCGGCCGGCCAGCCAGCCAGCCAGCCGGCCCTCAGCCCCGCGCCCGC-----
rIhh GGCAGCAGCTCCCGCTGTGCCGAGCGCCTGACCGCGGGCGGGGTGCTAACCGGGTCCCTTCAGTCGGCCGGCCAGCCAGCCAGCCAGCCGGCGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
hIHH -----CGCCCCCGCCGCGCGCGTTGCCAAAACAACCGGCGCCGCTATTTATTGGCGCCGGCCGAGCCCGGCAGCTCAGAGTCGAGGGCCCGAGGGGGACAGCGCGCC
mIhh -----CGCCCCCGCCGTCGCGCGTTGCCAAAACAACCGGCGCCGCTATTTATTGGCGCCGGCCGAGCCGGGCAGCTCAGAGTCGAGGGCCCGAGGGGGACAGCAAGCC
rIhh NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
Hes1
hIHH GGCACCAGCTCGGGCCCTGGGGCCCGCCCGCAGCTGAGTCCCGCGGGCCCTG-GCCGACACAGCCGCCATG-----
mIhh GGCACCAGCTCAGGGCCCGGGCCCGCCCGCAGCTGAGTCCCGTCGGCCCTGAGCCGGGTGCGGCTGCCCATG-----
rIhh GGCACCAGCTCAGGGCCCGGGCCCGCCCGCAGCTGAGTCCCGCGGGCTTGAGCCGGGTGCGGTTGCCCATGCGCCCGCCCGCTGGAGTCCCAAGAGCCACCCAGACGCTGAGTCCCGAAGCTG
  
```

Annexe2A. Alignement des séquences promotrices du gène *Ihh* chez l'humain, la souris et le rat

La présence d'un site putatif conservé HES1, le site de fixation de la polymérase, du début de la transcription ainsi que du site du début de la traduction à l'ATG a été indiquée par un encadré noir.

Des co-transfections entre *Ihh* et HES1 ont été réalisées dans des ostéoblastes de rat, les cellules UMR106 (annexe 2B). Les résultats de quantification de la luciférase montrent une inhibition de l'expression d'*Ihh* en présence du facteur HES1 pour les constructions -5149/+119, -3267/+119, -1331/+119 et -315/+119.



Annexe2B. Transfections transitoires dans des UMR106 (P12) des cinq principales constructions du promoteur *Ihh* en présence ou en absence de 400ng de HES1