

Université de Montréal

**Caractérisation de nouveaux mécanismes
transcriptionnels impliqués dans la biologie osseuse**

par

Martin Pellicelli

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en Biochimie

Décembre, 2010

© Martin Pellicelli, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Caractérisation de nouveaux mécanismes transcriptionnels impliqués dans la biologie
osseuse

Présentée par :
Martin Pellicelli

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Normand Brisson, président-rapporteur
Alain Moreau, directeur de recherche
Guy Boileau, co-directeur
Daniel Lajeunesse, membre du jury
Pierre Moffatt, examinateur externe
Muhammad Zafarullah, représentant du doyen de la FES

Résumé

Le développement et l'homéostasie des os requièrent l'orchestration spatio-temporelle d'un grand nombre de signaux moléculaires. Ces signaux entraînent l'activation ou l'inhibition de différents facteurs de transcription, lesquels sont en mesure de contrôler la prolifération et la différenciation des ostéoblastes et des chondrocytes. L'intégrité de ces différents mécanismes se doit d'être maintenu tout au long de la vie. Ainsi, une anomalie dans l'un de ces mécanismes conduit à l'apparition de pathologies osseuses et métaboliques telles qu'une hypophosphatémie, l'ostéoporose ou l'ostéoarthrite (OA). Afin d'en apprendre davantage sur la biologie osseuse, le projet décrit dans cette thèse a pour objectif de caractériser de nouveaux mécanismes de régulation transcriptionnelle pour deux gènes importants dans le développement des os et le maintien de leur intégrité. Il s'agit du *Paired-like Homeodomain Transcription Factor 1 (PITX1)* et du *Phosphate-regulating gene with homology to endopeptidase on the X chromosome (PHEX)*.

Le premier mécanisme présenté dans cette thèse concerne la régulation transcriptionnelle du gène *PITX1*, un facteur de transcription à homéodomaine nécessaire, notamment, au développement des os des membres inférieurs et au maintien de l'intégrité du cartilage articulaire chez l'adulte. Ainsi, dans les chondrocytes articulaires, on note que l'expression de *PITX1* est assurée par le recrutement du facteur de transcription E2F1 à deux éléments de réponse présents dans la région proximale du promoteur de *PITX1*. Aussi, dans les chondrocytes articulaires de patients souffrant d'OA, dans lesquels l'expression de *PITX1* est fortement diminuée, un mécanisme de répression transcriptionnelle, lequel implique la protéine multifonctionnelle Prohibitin (PHB1), semble être activé. En effet, dans ces chondrocytes, on note une forte accumulation nucléaire de PHB1 comparativement aux chondrocytes articulaires de sujets sains.

Le second mécanisme présenté dans cette thèse concerne la répression transcriptionnelle de *PHEX*, la peptidase mutée dans le syndrome d'hypophosphatémie lié

au chromosome X (*X-Linked Hypophosphatemia*, XLH), lequel se caractérise par une hypophosphatémie et une ostéomalacie. Le traitement d'ostéoblastes à la *Parathyroid hormone-related protein* (PTHrP) permet d'observer la répression de *PHEX*. Afin de caractériser le mécanisme responsable de cette répression, des expériences de gènes rapporteurs ont révélé la présence de deux éléments de réponse pour le répresseur transcriptionnel E4BP4 dans le promoteur de *PHEX*. La suppression de l'expression d'E4BP4 par l'utilisation d'ARN d'interférence a permis de valider que ce facteur de transcription est responsable de la répression de *PHEX* suite au traitement d'ostéoblastes à la PTHrP.

En somme ces nouveaux mécanismes de régulation transcriptionnelle permettent de mieux comprendre la régulation de l'expression de *PITX1* et de *PHEX*. Aussi, cette nouvelle implication de PHB1 dans la pathogenèse de l'OA offre de nouvelles possibilités de traitement et pourrait servir pour le diagnostic précoce de cette pathologie. Enfin, la caractérisation d'E4BP4 en tant que médiateur pour la répression de *PHEX* par la PTHrP suggère que ce répresseur transcriptionnel pourrait être impliqué dans le contrôle de la minéralisation des os et des niveaux de phosphate sanguin.

Mots-clés : os, cartilage articulaire, chondrogenèse, chondrocyte, ostéoblaste, PITX1, PHEX, prohibitin, E4BP4, NFIL3, hormone parathyroïdienne, PTHrP, ostéoarthrite, XLH, hypophosphatémie, promoteur, facteur de transcription, régulation transcriptionnelle

Abstract

Bone development and homeostasis need a large amount of molecular signals to be finely regulated in time and space. These signals lead to the activation or to the inhibition of different transcription factors, which are implicated in the control of osteoblast and chondrocyte proliferation and differentiation. The integrity of these mechanisms is required in order to have a healthy life. Indeed, if one of these mechanisms is dysfunctional, different diseases could develop such as hypophosphatemia, osteoporosis and osteoarthritis (OA). In order to contribute to the comprehension of bone biology, the present thesis describes new mechanisms for the transcriptional regulation of two genes implicated in bone development and regulation: *PITX1* (*Paired-like Homeodomain Transcription Factor 1*) and *PHEX* (*Phosphate-regulating gene with homology to endopeptidase on the X chromosome*).

The first mechanism described in this thesis relates to the transcriptional regulation of *PITX1*, a gene that encodes for a member of the homeobox family of transcription factors. *PITX1* is required in bone development of inferior members and in the maintenance of the articular cartilage integrity in adults. Thereby, we showed that in articular chondrocytes, the expression of *PITX1* is activated after the transcription factor E2F1 was recruited at two response elements in the proximal region of its promoter. Moreover, in articular chondrocytes from OA patients, we observed that the expression of *PITX1* is strongly decreased. We proposed that the mechanism responsible for this repression requires the multitask protein Prohibitin (PHB1), which is strongly accumulated in OA chondrocyte nuclei, but not in chondrocyte nuclei from healthy individuals.

The second mechanism described in this thesis reports a transcriptional mechanism by which *PHEX*, the gene that encodes for the peptidase mutated in the syndrome *X-Linked Hypophosphatemia* (XLH) and characterized by hypophosphatemia and osteomalacia, is repressed. We showed that the treatment of osteoblasts with the *Parathyroid hormone-*

related protein (PTHrP) induced a decrease in *PHEX* expression. In order to characterize the mechanism responsible for this repression, we performed gene reporter experiments and identified two response elements for the transcription factor E4BP4 in the *PHEX* promoter. The downregulation of E4BP4 by siRNA led to the validation that this repressor decreased the expression of *PHEX* in osteoblasts after their treatment with PTHrP.

In conclusion, the new transcriptional mechanisms presented in this thesis allow a better understanding of *PITX1* and *PHEX* expression. Moreover, the potential role of PHB1 in the establishment of OA presents many interesting possibilities regarding the treatment and diagnosis of this disease. Finally, the characterization of E4BP4 as a mediator of *PHEX* repression by the PTHrP suggests that E4BP4 could be implicated in the control of bone mineralization and phosphate levels in the blood.

Keywords : bone, articular cartilage, chondrogenesis, chondrocyte, osteoblast, PITX1, PHEX, prohibitin, E4BP4, NFIL3, parathyroid hormone, PTHrP, osteoarthritis, XLH, hypophosphatemia, promoter, transcription factor, transcriptional regulation

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xviii
Chapitre 1 Introduction.....	1
1.1 Le squelette.....	2
1.2 Objectif de la thèse.....	3
1.3 Formation et organisation des os.....	3
1.3.1 La formation des os.....	3
1.3.2 La formation des articulations.....	7
1.3.3 Composition et organisation du tissu osseux.....	8
1.3.4 Composition et organisation du tissu cartilagineux.....	9
1.4 Le cartilage articulaire.....	11
1.4.1 L'organisation du cartilage articulaire.....	13
1.5 La genèse des cellules nécessaires au développement des os.....	14
1.5.1 L'ostéoblastogenèse.....	14
1.5.1.1 Les facteurs de transcription qui régulent l'ostéoblastogenèse.....	15
1.5.1.1.1 RUNX2.....	17
1.5.1.1.2 OSTERIX.....	19
1.5.1.1.3 Les facteurs de transcription formant la famille AP1.....	19

1.5.1.2	Les facteurs extracellulaires contrôlant la biologie osseuse et l'ostéblastogenèse.....	21
1.5.1.2.1	L'hormone parathyroïdienne.....	22
1.5.1.2.2	La Vitamine D ₃	23
1.5.1.3	Conclusion de l'ostéoblastogenèse.....	26
1.5.2	La chondrogenèse.....	27
1.5.2.1	Les facteurs de transcription qui régulent la chondrogenèse.....	29
1.5.2.1.1	SOX9.....	29
1.5.2.1.2	ERG.....	30
1.5.2.1.3	RUNX2/3.....	31
1.5.2.2	Les facteurs extracellulaires contrôlant la biologie cartilagineuse et la chondrogenèse.....	32
1.5.2.2.1	La famille du TGFβ.....	32
1.5.2.2.1.1	Les BMPs.....	34
1.5.2.2.1.2	Le GDF5.....	35
1.5.2.2.1.3	LE TGFβ.....	36
1.5.2.2.2	L'axe IHH/PTHrP.....	37
1.5.2.2.2.1	La PTHrP.....	37
1.5.2.2.2.2	IHH.....	39
1.5.2.2.2.3	L'Axe PTHrP/IHH dans le développement et le maintien du cartilage articulaire.....	40
1.5.2.3	Conclusion de la chondrogenèse.....	41
1.6	Les gènes cibles à l'étude dans cette thèse.....	41
1.6.1	PHEX.....	42
1.6.1.1	Le syndrome d'hypophosphatémie lié au chromosome X.....	42
1.6.1.2	Les substrats de PHEX.....	44
1.6.1.3	La distribution de l'expression de PHEX dans l'organisme.....	46
1.6.1.4	Les mécanismes d'activation transcriptionnelles de <i>PHEX</i>	46
1.6.1.5	Les mécanismes de répression transcriptionnelle de <i>PHEX</i>	48

1.6.1.6	Conclusion sur <i>PHEX</i>	49
1.6.2	PITX1	49
1.6.2.1	Les partenaires de PITX1.....	52
1.6.2.2	Les mécanismes transcriptionnels contrôlant l'expression de <i>PITX1</i>	53
1.6.2.3	Le rôle de PITX1 dans les pathologies musculosquelettiques humaines ..	53
1.6.2.4	Conclusion sur <i>PITX1</i>	54
1.7	Justification du projet de recherche.....	54
Préface au chapitre 2.....		57
Chapitre 2 L'accumulation nucléaire de la Prohibitine dans les chondrocytes articulaires contribue à la pathogenèse de l'ostéoarthrite par la répression de <i>PITX1</i>		59
2.1	Article 1.....	60
2.1.1	ABSTRACT.....	61
2.1.2	INTRODUCTION.....	62
2.1.3	RESULTS	65
2.1.4	DISCUSSION.....	74
2.1.5	METHODS	79
2.1.6	ACKNOWLEDGMENTS	83
2.1.7	REFERENCES.....	84
2.1.8	FIGURES LEGENDS	89
2.1.9	FIGURES AND TABLES.....	95
2.1.10	SUPPLEMENTAL METHODS	111
Préface au chapitre 3.....		117
Chapitre 3 La PTHrP(1-34) induit la répression du gène <i>PHEX</i> dans les ostéoblastes via le répresseur transcriptionnel E4BP4		119
3.1	Article 2.....	120
3.1.1	ABSTRACT.....	121
3.1.2	INTRODUCTION.....	122

3.1.3	MATERIALS AND METHODS	125
3.1.4	RESULTS	131
3.1.5	DISCUSSION	136
3.1.6	ACKNOWLEDGEMENTS	139
3.1.7	REFERENCES.....	140
3.1.8	FIGURE LEGENDS	145
3.1.9	FIGURES AND TABLE	148
Chapitre 4	Discussion et Conclusion	155
4.1	Présentation de la discussion	156
4.2	Mécanismes de répression de <i>PITXI</i> par la PHB1 dans les chondrocytes articulaires de patients OA	157
4.2.1	Identification de la PHB1	157
4.2.1.1	Description de PHB1	158
4.2.2	Les mécanismes moléculaires de répression transcriptionnelle de <i>PITXI</i> par la PHB1.....	159
4.2.2.1	Recrutement de PHB1 au promoteur de <i>PITXI</i>	160
4.2.2.2	Effet dépendant de la région proximale du promoteur de <i>PITXI</i> pour sa répression par PHB1	162
4.2.3	Le contrôle potentiel de l'activité de PHB1 par les oestrogènes	163
4.2.4	L'accumulation nucléaire de la PHB1 dans les chondrocytes des patients OA.....	165
4.2.4.1	Les conséquences hypothétiques de la déplétion cytoplasmique de PHB1.....	165
4.2.4.2	Les mécanismes régulant l'importation et l'exportation nucléaire de PHB1.....	166
4.2.4.3	Les mécanismes hypothétiques qui permettent d'expliquer l'accumulation nucléaire de PHB1 dans les chondrocytes de patients OA.....	167

4.2.5	L'activation de l'expression de <i>PITX1</i> par les facteurs de transcription E2Fs.....	173
4.2.6	La sénescence cellulaire et la pathogenèse de l'ostéoarthrite.....	174
4.2.6.1	Caractéristiques de la sénescence cellulaire.....	174
4.2.6.2	La sénescence cellulaire dans le cartilage articulaire de patients OA	175
4.2.6.3	PHB1 et la sénescence cellulaire dans les chondrocytes articulaires de patients OA	175
4.2.7	D'autres mécanismes hypothétiques contrôlant l'expression de <i>PITX1</i> dans les chondrocytes.....	176
4.2.7.1	La régulation de la transcription de <i>PITX1</i> par les HIFs	177
4.2.7.2	La régulation transcriptionnelle de <i>PITX1</i> par SP1/EGR1	178
4.2.8	Conclusion sur la répression de <i>PITX1</i> par PHB1 dans les chondrocytes articulaires de patients OA	179
4.3	Mécanisme de répression de <i>PHEX</i> par E4BP4	180
4.3.1	Le facteur de transcription E4BP4	180
4.3.2	Le mécanisme moléculaire de répression de <i>PHEX</i> par E4BP4.....	181
4.3.2.1	Mécanisme connu impliquant DR1/DRAP1	181
4.3.2.1.1	Un mécanisme spécifique aux ostéoblastes matures ?.....	181
4.3.2.2	Mécanisme hypothétique impliquant RUNX2.....	182
4.3.2.3	Mécanisme hypothétique impliquant CREB.....	183
4.3.3	E4BP4 et le rythme circadien.....	184
4.3.3.1	Le rythme circadien et le contrôle de la masse osseuse.....	185
4.3.4	E4BP4 et le contrôle des niveaux de phosphate sanguin.....	188
4.3.5	ATF4, un potentiel activateur transcriptionnel de <i>PHEX</i>	189
4.3.6	Conclusion sur la répression de <i>PHEX</i> par E4BP4.....	190
4.4	<i>PITX1</i> et <i>PHEX</i> , deux gènes respectivement impliqués dans la minéralisation des os et l'ostéoarthrite ?	191
4.4.1	Conclusion générale	192

Liste des tableaux

Chapitre 2 Article 1

Table 2.1 Informations about patients and healthy control subject used in this study	102
Supplemental Table 2.1 OA patients classification considering PITX1 expression level and PHB1 nuclear accumulation.....	106
Supplemental Table 2.2 PITX1 SNP analyses with genomic DNA from control subject and OA patients	107
Supplemental Table 2.3 Prohibitin peptides identified by mass spectrometry.....	107
Supplemental Table 2.4 Human PHB1 SNP analysis using genomic DNA from control subject and OA patients.....	108
Supplemental Table 2.5 List of primers used in mRNA detection by real-time RT-PCR	108
Supplemental Table 2.6 List of primers used in vector constructs	109
Supplemental Table 2.7 List of primers used for real-time PCR after chromatin immunoprecipitation assay.....	109
Supplemental Table 2.8 List of probes used in DNA pull-down assay.....	110

Chapitre 3 Article 2

Table 3.1 qPCR assay primers.....	154
--	-----

Liste des figures

Chapitre 1 Introduction

Figure 1.1 Schéma du développement des os à partir de la condensation des cellules mésenchymateuses	5
Figure 1.2 Schéma d'une plaque de croissance	10
Figure 1.3 Schéma présentant l'organisation des différentes structures des os longs.....	12
Figure 1.4 Schéma résumant le contrôle de l'ostéoblastogenèse par différents facteurs de transcription.....	16
Figure 1.5 Schéma résumant le contrôle des niveaux de phosphate et de calcium sanguins par la PTH et la 1α -25(OH) $_2$ D $_3$	25
Figure 1.6 Schéma résumant le contrôle de la chondrogenèse par différents facteurs de transcription.....	28
Figure 1.7 Schéma résumant le rôle exercé par PHEX sur le contrôle des niveaux de phosphate sanguin.....	43

Chapitre 2 Article 1

Figure 2.1 Study of basal <i>PITX1</i> expression in human primary chondrocytes and in C28/I2 cell line	95
Figure 2.2 E2F1 activates <i>PITX1</i> gene in C28/I2 chondrocytes	96
Figure 2.3 <i>TFDP1</i> depletion in chondrocytes leads to decreased <i>PITX1</i> expression.....	97
Figure 2.4 PHB1 accumulates in nucleus of OA chondrocytes	98
Figure 2.5 <i>PITX1</i> gene repression by PHB1 in C28/I2 chondrocytes cell line.....	99
Figure 2.6 PHB1 is required to maintain repressive state of <i>PITX1</i> gene	100
Figure 2.7 Schematic model involving PHB1 nuclear accumulation in OA chondrocytes	101
Supplemental Figure 2.1 Linear regression between <i>PITX1</i> and <i>TFDP1</i> genes expression	103

Supplemental Figure 2.2 Electromobility shift assay (EMSA) performed using OA nuclear extract.....	104
Supplemental Figure 2.3 Immunofluorescence against PHB1 and TOM20 on primary chondrocytes.....	105
Chapitre 3 Article 2	
Figure 3.1 PTHrP(1-34) causes an up-regulation of <i>E4BP4</i> and a down-regulation of <i>PHEX</i> mRNA in UMR-106 cells.....	148
Figure 3.2 Overexpression of E4BP4 in UMR-106 cells represses <i>PHEX</i> gene	149
Figure 3.3 <i>E4bp4</i> knock down abrogate PTHrP(1-34)-mediated <i>Phex</i> repression	150
Figure 3.4 E4BP4 interacts with both E4BP4 response elements (EBPRE) on <i>PHEX</i> promoter	151
Figure 3.5 EBPREs integrity is necessary for E4BP4-mediated <i>PHEX</i> repression.....	152
Figure 3.6 E4BP4 is phosphorylated in osteoblasts.....	153
Chapitre 4 Discussion et Conclusion	
Figure 4.1 Schéma résumant les mécanismes hypothétiques contrôlant l'exportation nucléaire de PHB1	170
Figure 4.2 Schéma résumant l'action hypothétique de E4BP4 sur la minéralisation des os.....	187

Liste des abréviations

1 α -25(OH) ₂ D ₃	<i>1,25-dihydroxyvitamine D ou Vitamine D₃</i>
A	<i>Adénosine</i>
ACAN	<i>Aggrecan</i>
ACTB	<i>Actine-Beta</i>
ADAMT	<i>A Disintegrin-Like and Metalloproteinase with Thrombospondin Type 1</i>
ADCY	<i>Adenylate Cyclase</i>
ADN	<i>Acide Désoxyribonucléique</i>
ADP	<i>Adénosine Diphosphate</i>
ALP	<i>Alkaline Phosphatase</i>
AMPC	<i>Adénosine Monophosphate Cyclique</i>
AP1	<i>Activator Protein 1</i>
ARN	<i>Acide ribonucléique</i>
ASARM	<i>Acidic Serine/Aspartate-Rich MEPE-Associated</i>
ATF	<i>Activating Transcription factor</i>
bLCE	<i>bicoid-Like Cis-Element</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BMPR	<i>Bone Morphogenetic Protein Receptor</i>
BSP	<i>Bone Sialoprotein</i>
bZIP	<i>Basic-Leucine zipper domain</i>
C	<i>Cytosine</i>
CBFB	<i>Core binding factor beta</i>
CBP	<i>CREB-Binding Protein</i>
CCN	<i>Cyclin</i>
CDKN	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
ChIP	<i>Immunoprécipitation de la Chromatine</i>
CIAP	<i>Calf Intestin Alkaline Phosphatase</i>
CO-SMAD	<i>Co-mediator SMAD</i>

COL	<i>Collagen</i>
CRE	<i>cAMP Response Elements</i>
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding Protein</i>
DHH	<i>Desert Hedgehog</i>
DMP	<i>Dentin Matrix acidic Phosphoprotein</i>
DUX	<i>Double Homeobox Protein</i>
E2F	<i>E2F Transcription Factor</i>
E4BP4	<i>E4 Binding Protein 4</i>
EBPRE	<i>E4BP4-Response Element</i>
EGR	<i>Early Growth Response</i>
EMSA	<i>Essai de Retard sur Gel</i>
ER	<i>Estrogens Receptor</i>
ERG	<i>V-ETS Avian Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
FIAT	<i>Factor inhibiting activating transcription factor 4-mediated transcription</i>
FSHD	<i>Dystrophie Musculaire Facioscapulohumérale</i>
G	<i>Guanine</i>
G α q	<i>Guanine Nucleotide-Binding Protein, Q Polypeptide</i>
G α s	<i>Guanine Nucleotide-Binding Protein, Alpha-Stimulating Polypeptide</i>
GAP	<i>GTPase Activating Protein</i>
GDF	<i>Growth Differentiation Factor</i>
GDP	<i>Guanosine Diphosphate</i>
GEF	<i>Guanine Exchange Factor</i>
GH	<i>Growth Hormone</i>
GTP	<i>Guanosine Triphosphate</i>
HDAC	<i>Histone Deacetylase</i>
HYP	<i>Hypophosphatemic</i>
ICER	<i>Inducible cAMP Early Repressor</i>

IGF	<i>Insulin-Like Growth Factor</i>
IHH	<i>Indian Hedgehog</i>
IZ	<i>Zone Intermédiaire</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>
kB	<i>Kilobase</i>
KLF	<i>Krüppel-Like Factors</i>
LRP	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein</i>
MEC	<i>Matrice Extracellulaire</i>
MEPE	<i>Matrix, Extracellular Phosphoglycoprotein</i>
MME	<i>Membrane metalloendopeptidase</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
MTS	<i>Mitochondrial Targeting Sequence</i>
NaPi	<i>Sodium/Phosphate</i>
NES	<i>Signal d'Export Nucléaire</i>
NLS	<i>Signal de Localisation Nucléaire</i>
NSC	<i>Noyau Suprachiasmatique</i>
OA	<i>Ostéoarthrite</i>
OA-gr	<i>OA subgroup</i>
OC	<i>Osteocalcin</i>
OHT	<i>4OH-Tamoxifen</i>
OPN	<i>Osteopontin</i>
OSX	<i>Osterix</i>
P300	<i>E1A-Binding Protein, 300kDa</i>
pb	<i>Paire de Bases</i>
PHEX	<i>Phosphate-regulating gene with homology to endopeptidase on the X chromosome</i>
PITX	<i>Paired-like Homeodomain Transcription Factor 1</i>
PKA	<i>Protein Kinase A</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PPARGC1A	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Coactivator 1Alpha</i>

PRG	<i>Proteoglycan</i>
PTH	<i>Parathyroid Hormone</i>
PTH1R	<i>Parathyroid Hormone 1 Receptor</i>
PTHrP	<i>Parathyroid hormone-related protein</i>
Py	<i>Pyrimidine</i>
R-SMAD	<i>Receptor-regulated SMAD</i>
RANK	<i>Receptor activator of NF-kappa-B</i>
RANKL	<i>Receptor activator of NF-kappa-B Ligand</i>
RPS6KA3	<i>Ribosomal protein S6 kinase polypeptide 3</i>
RUNX	<i>Runt-Related Transcription Factor</i>
RZ	<i>Zone Radiale ou Profonde</i>
SA- β -gal	<i>Senescence-Associated β-Galactosidase</i>
SAHF	<i>Senescence-Associated Heterochromatic Foci</i>
SHH	<i>Sonic Hedgehod</i>
SMAD	<i>SMA and MAD (mothers against decapentaplegic Drosophila)-related protein</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SOX	<i>Sry-Related HMG-Box</i>
SZ	<i>Zone Superficielle</i>
T	<i>Thymine</i>
TFDP	<i>Transcription Factor E2F Dimerization Partner</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNC	<i>Tenascin C</i>
TPA	<i>12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate</i>
VDR	<i>Vitamin D Receptor</i>
VDDR	<i>Vitamin D-Dependent Rickets</i>
WNT	<i>Wingless-Type MMTV Integration Site Family</i>
XLH	<i>X-Linked Hypophosphatemia</i>
ZCC	<i>Zone de Cartilage Calcifié</i>

*À Viviane et Charles, pour votre support,
votre aide et vos sourires*

Remerciements

Au cours des dernières années, un grand nombre de personnes ont croisé mon chemin et m'ont aidé à devenir le scientifique que je suis. Je tiens donc à leur rendre hommage dans les prochaines pages.

Tout d'abord, je tiens à remercier celui qui m'a donné la chance de débiter ces études supérieures, le docteur Guy Boileau. Il est le premier à m'avoir accordé sa confiance et à m'avoir permis de me faire valoir dans ce milieu professionnel. Son enseignement et sa vision de la science me permettent continuellement de m'améliorer et, j'en suis certain, me serviront tout au long de ma vie professionnelle. Je tiens également à remercier mon directeur de thèse, le docteur Alain Moreau. Il m'a permis de poursuivre mes études supérieures en m'accueillant dans son équipe alors que le laboratoire du docteur Boileau devait fermer ses portes. Il m'a tout de suite accordé une grande confiance et m'a permis de développer mon autonomie en science. Même s'il n'était pas toujours facile de se parler entre deux rendez-vous ou appels téléphoniques, son aide et sa compréhension ont toujours été sans limites. Un troisième professeur a également contribué à ma formation, le docteur Luc Desgroseillers. Je tiens à le remercier pour les nombreux conseils et commentaires sur différents aspects du projet.

Comme j'ai travaillé dans deux laboratoires distincts au cours de mon doctorat, j'ai eu la chance de rencontrer un grand nombre de personnes que je tiens à remercier. Tout d'abord, il y a Véronique Bériault, qui a été une amie, une collègue et une mentor formidable. C'est grâce à ses précieux conseils que j'ai pu apprendre toutes les subtilités du travail en laboratoire. Ensuite, il y a Mathieu St-Louis, qui lui aussi a été un ami et un mentor précieux. Son sens de l'humour contagieux a été un atout majeur dans la motivation à répéter et répéter les mêmes expériences au quotidien. Aussi, je tiens à remercier les autres collègues des laboratoires des docteurs Desgroseillers et Ferbeyre. Plus précisément, je veux souligner l'amitié et les conseils de Karine, Laurent, Samuel, Frédéric et Vincent.

Enfin, je tiens également à dire merci à tous mes collègues présents et passés du laboratoire du docteur Alain Moreau. Tout d'abord, je tiens à remercier spécialement Cynthia Picard. C'est grâce à ses travaux et à sa générosité que je peux aujourd'hui présenter les résultats de cette thèse. Ensuite, merci au docteur Bouziane Azeddine qui a beaucoup facilité mon intégration dans l'équipe du docteur Moreau. Aussi, un merci spécial à Roxanne Doucet pour son aide et son amitié. Sa présence permettait toujours de faire passer le temps plus vite. Merci à Laurianne et Nancy pour leur amitié. Nos discussions m'auront permis d'en apprendre plus sur la France et le Liban, preuve qu'il n'y a pas seulement la science dans la vie. Aussi, un merci spécial à deux collègues qui sont passés trop vite, les docteurs Maryam Taheri et Benoît St-Jacques. Leurs connaissances, leur aide et leurs conseils ont été plus qu'appréciés et ont facilité mon quotidien à plusieurs occasions. Merci au docteur DaShen Wang. Les tonnes de chondrocytes qu'il a extraits ont permis au projet de progresser plus rapidement. Enfin, un dernier merci à deux collègues: Anita, pour sa bonne humeur et la correction de mes textes en anglais, et Isabelle, pour sa présence, simplement, qui était si agréable.

Aussi, je tiens à remercier les docteurs Daniel Lajeunesse et Gerardo Ferbeyre pour leur avis et leurs suggestions lors de mes comités de thèse. Leurs critiques ont toujours été constructives et ont permis au projet d'évoluer.

Enfin, je tiens également à remercier un collaborateur au projet PITX1, le docteur Patrick Lavigne, pour nous avoir fourni des échantillons de cartilage de patients. Aussi, un merci au personnel administratif du centre de recherche du CHU Sainte-Justine et du département de biochimie de l'Université de Montréal. Plus particulièrement, à Sylvie Beauchemin, qui est la personne capable de répondre à toutes les questions auxquelles personne n'a de réponse.

Également, je tiens à remercier mes parents pour leur support et leurs encouragements. Il est important de se sentir appuyer et c'est ce qu'ils ont toujours fait. Sans oublier mes amis Geneviève et Jordan, et François. Merci pour les encouragements!

Pour finir, je dois souligner la contribution de deux personnes bien spéciales au succès de ces études doctorales. Charles, tu ne le sais peut-être pas encore, mais ta venue a ajouté un grand bonheur dans ma vie, au cours des derniers mois de cette aventure. Ton petit rire m'a beaucoup encouragé, surtout dans les derniers milles. Viviane, ce sont ces études qui ont conduit à notre rencontre. Depuis ce jour, tu es la personne qui croit le plus en moi. Ta présence m'a apaisé et motivé à travailler toujours plus fort. Ton aide, tes conseils, ton support, ta patience et, surtout, ton amour, sont parmi les choses les plus précieuses sur lesquelles j'ai pu compter au cours des dernières années. Sans toi, ces études auraient été parfois bien longues. Il n'y a pas de mot pour exprimer toute la gratitude que j'ai envers toi. Alors, je terminerai simplement en te disant, du plus profond de mon coeur, merci!

Chapitre 1

Introduction

1.1 Le squelette

Les vertébrés forment un groupe d'espèces appartenant au règne animal qui se caractérise par un squelette cartilagineux parfois partiellement ossifié. Chez l'homme, ce squelette est composé de 206 os de divers types qui offrent une protection à certains organes vitaux tels les poumons, le cœur et le système nerveux. Aussi, ils fournissent un soutien aux différents muscles, servant donc de support pour le maintien de la posture et des mouvements. Les os exercent également une fonction métabolique en agissant comme réserve de minéraux tel le calcium et le phosphate ou par leur action sur d'autres systèmes ^[1, 2]. Ainsi, puisqu'ils exercent un large éventail de rôles et que leur morphologie est très complexe, leur développement, leur croissance et le maintien de leur intégrité requièrent l'orchestration spatio-temporelle de plusieurs mécanismes hormonaux, cellulaires et moléculaires. Aussi, puisqu'ils sont soumis à un grand nombre de stress tout au long de la vie de l'organisme, ces mécanismes se doivent d'être maintenus durant cette même période. Or, la défaillance de l'un de ces mécanismes peut, par exemple, conduire à de sévères anomalies lors du développement des os, ce qui peut engendrer une mort périnatale, ou en une perte de leur intégrité et donc un mauvais fonctionnement du squelette.

Les quinze dernières années ont permis de grandes avancées dans notre compréhension des mécanismes régulant le développement des os. Le raffinement des techniques permettant l'élaboration d'animaux génétiquement modifiés a conduit à la découverte de nouveaux facteurs essentiels à la formation des os et à leur maintien tout au long de la vie. Ainsi, plusieurs cytokines, hormones, récepteurs et facteurs de transcription sont maintenant connus pour être essentiels au bon déroulement de la squelettogenèse ^[2-4]. Notre connaissance grandissante des mécanismes impliqués dans la formation et l'homéostasie des os nous permet maintenant de prévenir et de traiter un grand nombre d'anomalies osseuses. De plus, dans un contexte où l'espérance de vie augmente constamment, il s'avère essentiel de comprendre les facteurs favorisant l'intégrité et le bon fonctionnement du squelette durant l'âge adulte afin de maintenir un haut niveau de qualité de vie dans nos populations vieillissantes.

1.2 Objectif de la thèse

Cette thèse a pour objectif de caractériser de nouveaux mécanismes transcriptionnels impliqués dans la régulation de gènes importants pour la minéralisation des os ainsi que pour le développement et le maintien de l'intégrité du cartilage articulaire. Plus spécifiquement, elle traite de la régulation transcriptionnelle de deux gènes. Le premier, PHEX, est une peptidase dont l'expression et l'activité permettent le bon déroulement de la minéralisation de la matrice extracellulaire osseuse et le contrôle de la phosphatémie. Le deuxième, PITX1, est un facteur de transcription dont l'expression est essentielle pour l'attribution de l'identité des membres inférieurs grâce à son action, notamment, lors de la chondrogenèse. Ainsi, les nouveaux mécanismes transcriptionnels caractérisés dans cette thèse permettent d'offrir de nouvelles avenues pour le diagnostic préventif et le traitement de maladies dégénératives osseuses telles l'ostéoporose et l'ostéoarthrite.

1.3 Formation et organisation des os

Afin de mieux comprendre ces nouveaux mécanismes transcriptionnels impliqués dans la biologie osseuse et de discuter des perspectives découlant de ces découvertes, la prochaine section décrira aux lecteurs les étapes essentielles du développement des os. Ainsi, une brève description des mécanismes régulant la formation des os et des articulations lors de l'embryogenèse sera suivie par une description de l'organisation du tissu osseux et cartilagineux.

1.3.1 La formation des os

Les os sont considérés comme un organe composé de deux types de tissus, le tissu minéralisé et le tissu cartilagineux, dont la synthèse est assurée respectivement par les ostéoblastes et les chondrocytes. Leur formation débute, lors de l'embryogenèse, par la

condensation de cellules mésenchymateuses (Figure 1.1A). Cette étape est initiée par l'expression de divers facteurs de croissances dont les *BMPs* (*Bone morphogenetic proteins*), les *FGFs* (*Fibroblast growth factor*) et le *TGF- β* (*Transforming Growth Factor Beta*) [2, 4-7]. Selon la nature des signaux, deux types d'ossification sont observés: l'ossification intramembraneuse, caractérisée par la différenciation des cellules mésenchymateuses directement en ostéoblastes, et l'ossification endochondrale caractérisée par un intermédiaire cartilagineux nécessaire à l'ossification. Dans cette introduction, les mécanismes responsables de l'initiation de l'ossification endochondrales seront expliqués en détail.

Ainsi, lors de l'ossification endochondrale, la condensation des cellules mésenchymateuses est suivie par la formation d'une structure pré-cartilagineuse. Cette étape nécessite l'induction, par divers facteurs de croissance, de l'expression du gène *SOX9* (aussi nommé *SRY-BOX9* pour *Sry-Related HMG-Box Gene 9*), un gène codant pour un facteur de transcription dont le rôle sera plus largement abordé plus loin. Rapidement, il y aura différenciation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes qui auront pour fonction d'assurer la formation de la matrice extracellulaire d'une structure cartilagineuse servant de gabarit à l'os (Figure 1.1B) [2, 4, 5, 9]. Il en suivra un processus de prolifération des chondrocytes, permettant l'expansion de ce gabarit cartilagineux, suivi de leur différenciation terminale, conduisant ainsi à l'apparition de chondrocytes hypertrophiques (Figure 1.1C) et à l'ossification de la diaphyse (région centrale de l'os où l'on retrouve l'os trabéculaire) (Figure 1.1D). Ce phénomène est accompagné par l'envahissement de vaisseaux sanguins et de cellules progénitrices d'ostéoblastes dans la diaphyse, conduisant à l'expansion du volume d'os trabéculaire et à la création de la niche hématopoïétique (Figure 1.1E) [2, 4, 5, 9].

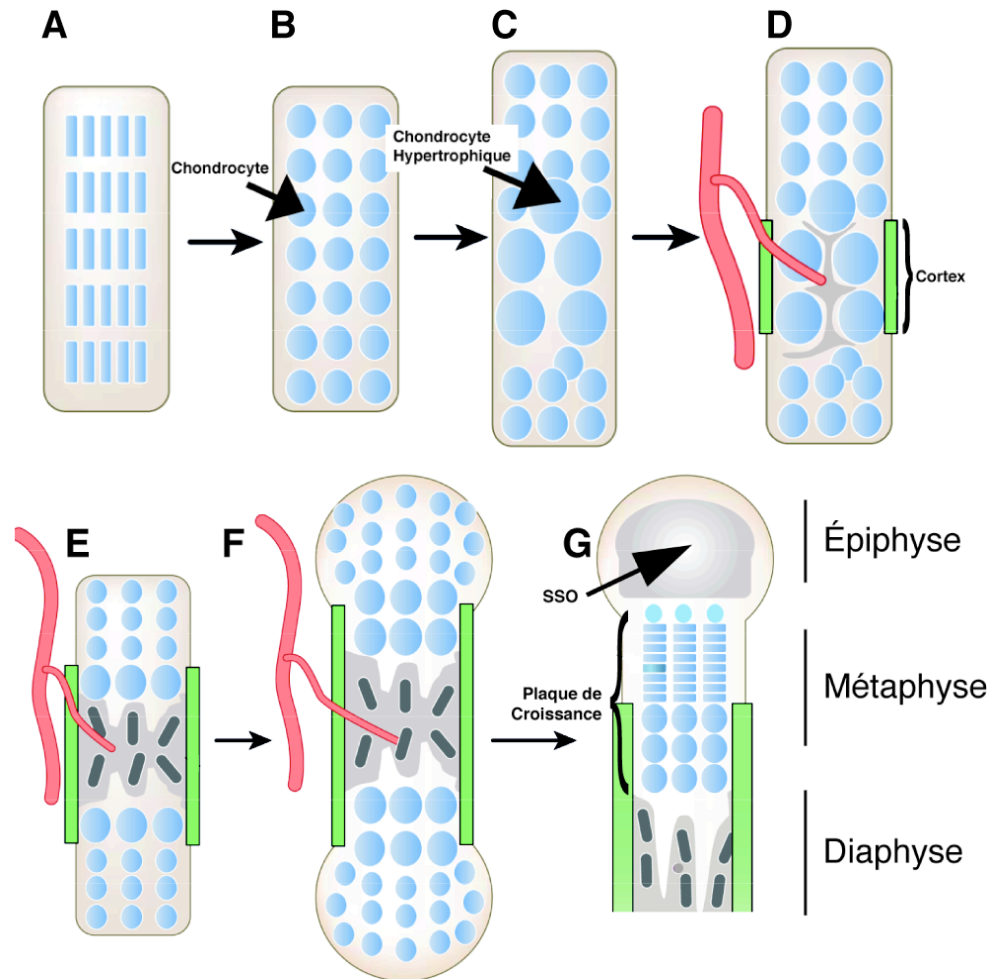


Figure 1.1 Schéma du développement des os à partir de la condensation des cellules mésenchymateuses.

(A, B) La formation des os débute par la condensation (A) et la différenciation (B) en chondrocytes de cellules mésenchymateuses afin de former un gabarit cartilagineux. (C) Les chondrocytes au centre de cette structure cartilagineuse cessent de proliférer, poursuivent leur différenciation et deviennent hypertrophiques. (La légende se poursuit sur la prochaine page)

(D) Ces chondrocytes hypertrophiques stimulent l'angiogenèse, ce qui mène à l'envahissement de l'os par des vaisseaux sanguins (représentés en rouge sur le schéma). Les chondrocytes hypertrophiques stimulent également la différenciation de cellules péri-chondriales adjacentes en ostéoblastes. Ces derniers sont responsables de la formation du cortex osseux. (E, F) Les chondrocytes hypertrophiques sont éliminés par apoptose et progressivement remplacés par des ostéoblastes (cellules représentées par un bâtonnet gris sur le schéma). Ensemble, les chondrocytes hypertrophiques et les ostéoblastes permettent la minéralisation de la matrice extracellulaire et la formation de la structure qui deviendra l'os trabéculaire (en gris sur le schéma). (G) Les chondrocytes de la métaphyse et de l'épiphyse poursuivent leur prolifération, ce qui résulte en une croissance longitudinale de l'os. Dans la métaphyse, les chondrocytes pré-hypertrophiques (représentés par un cercle aplati) s'organisent en colonnes et forment la plaque de croissance. On note la présence d'une population de chondrocytes de réserve au-dessus des chondrocytes pré-hypertrophiques. Ces chondrocytes de réserve permettront de remplacer les chondrocytes de la plaque de croissance qui disparaissent par apoptose. Au centre des épiphyses, les chondrocytes hypertrophiques et l'accumulation d'ostéoblastes actifs conduisent à la formation d'un second site d'ossification (SSO). Schéma adapté de Kronenberg, 2003 ^[8].

Dans les os longs, de part et d'autre de la diaphyse, une population de chondrocytes sera maintenue afin d'assurer la formation des plaques de croissances, l'une des deux structures cartilagineuses des os longs, l'autre étant le cartilage articulaire dont la formation sera décrite plus loin (Figure 1.1G) ^[2, 4, 5, 9]. À l'intérieur de ces plaques de croissances, les chondrocytes s'organiseront afin d'assurer la croissance longitudinale des os. Ainsi, on y retrouvera trois sous-populations distinctes de chondrocytes, classées selon leur état de différenciation (Figure 1.1G et 1.2). La première population, composée de chondrocytes pouvant proliférer, est située tout près des épiphyses (extrémité des os longs) et assure la croissance longitudinale des os et la synthèse de la matrice cartilagineuse. Sous cette population, on retrouvera des chondrocytes ayant amorcé un processus de différenciation terminale, les chondrocytes pré-hypertrophiques, lesquels assurent également la synthèse de la matrice cartilagineuse. Enfin, tout près de la diaphyse, on retrouvera une population de chondrocytes complètement différenciés, appelés chondrocytes hypertrophiques lesquels ont pour fonction la minéralisation du cartilage et, donc, la création du premier site d'ossification donnant naissance à l'os trabéculaire ^[2, 4, 5, 9]. Enfin, le développement de l'os se poursuivra également durant le développement postnatal. Très tôt au cours de cette période, un second site d'ossification, situé au centre des épiphyses, sera formé par la différenciation terminale des chondrocytes s'y trouvant (Figure 1.1G) ^[4]. Enfin, durant la poursuite du développement post-natal et tout au long de la vie adulte, la synthèse et le remodelage du tissu minéralisé seront assurés par l'activité coordonnée des ostéoblastes et des ostéoclastes (cellules permettant la dégradation du tissu calcifié) ^[2].

1.3.2 La formation des articulations

La formation des articulations synoviales (aussi nommée articulations diarthrodiales) débute elle aussi durant l'embryogenèse ^[10-12]. Ces structures sont essentielles pour le mouvement adéquat des os l'un par rapport à l'autre. Deux théories, qui font encore aujourd'hui l'objet d'un débat, tentent d'expliquer l'initiation du développement

des articulations. La première stipule que la condensation des cellules mésenchymateuses forme une structure continue entre les différents os se faisant suite et que c'est une interruption de cette différenciation, aux sites devant accueillir une structure articulaire, qui permettra le positionnement du site où le développement de l'articulation prendra place ^[11, 13-15]. La deuxième théorie suggère plutôt que le développement de deux os débute par la formation de deux gabarits cartilagineux indépendants l'un de l'autre et que, tout au long de leur expansion, une zone intermédiaire sera présente et maintenue ^[16]. Encore ici, le développement des structures articulaires tels la membrane synoviale, les ligaments et le cartilage articulaire prendra place dans cette zone intermédiaire ^[10-12]. Toutes ces structures articulaires sont essentielles au bon fonctionnement et au maintien de l'intégrité de l'articulation. Les défauts génétiques entraînant des anomalies lors du développement de l'une de ces structures ou, encore, l'accumulation au cours de la vie de dommages résulteront en une perte de la fonction des articulations plus ou moins importante selon le cas.

1.3.3 Composition et organisation du tissu osseux

Deux types de tissus osseux sont normalement retrouvés dans l'ensemble du squelette: l'os cortical (aussi nommé os compact), constituant l'enveloppe osseuse dense à l'extérieur des os, et l'os trabéculaire (aussi nommé os spongieux) qui s'organise en un réseau irrégulier de trabécules osseuses parmi lesquelles les cellules hématopoïétiques trouveront leur niche. Comme il a été mentionné plus tôt, ce sont les ostéoblastes qui sont responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire et de sa minéralisation ^[2-4, 7]. Ainsi, avant la minéralisation, les ostéoblastes synthétiseront une matrice extracellulaire (MEC) composée de grandes quantités de *Collagen Type 1, Alpha-1* et *Alpha-2* (COL1A1 et COL1A2) ainsi que de certaines autres protéines qui assisteront la minéralisation telles *Osteopontin* (OPN), *Bone Sialoprotein* (BSP), *Dentin Matrix acidic Phosphoprotein 1* (DMP1) et *Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein* (MEPE). Une fois cette MEC mature, l'expression de l'enzyme *Alkaline Phosphatase* (ALP ou ALPL pour *Alkaline*

Phosphatase Liver/Bone/Kidney type), elle aussi assurée par les ostéoblastes, induira la formation de cristaux d'hydroxyapatite ^[2-4, 7].

La matrice osseuse est un tissu très dynamique qui est en constant remodelage tout au long de la vie. Ce remodelage consiste en une réorganisation de la matrice minéralisée par des rondes de dégradation et de synthèse du tissu minéralisé ^[2, 7]. Ce processus est nécessaire afin d'assurer la croissance des os, leur réparation et leur intégrité. Ce sont les ostéoclastes qui assurent la dégradation de la matrice minéralisée. Ces cellules géantes et multinucléées, provenant de la différenciation de monocytes, sont capables, lorsqu'activées, d'induire la dégradation du tissu minéralisé par l'effet d'acides et de protéases tels que la Cathepsin K (CTSK) ^[2, 7]. Ce remodelage osseux nécessite une étroite régulation puisqu'une mauvaise coordination des taux de synthèse et de dégradation résultera en une augmentation ou en une diminution anormale de la masse osseuse, comme par exemple dans les cas d'ostéopétrose et d'ostéoporose, respectivement.

1.3.4 Composition et organisation du tissu cartilagineux

Tel que mentionné précédemment, le tissu cartilagineux est le tissu de base, durant l'embryogenèse, permettant le développement des os. Un total de trois structures cartilagineuses, transitoires ou permanentes, sont observées dans les os. La première de ces structures cartilagineuses est présente uniquement durant l'embryogenèse et sert de gabarit lors de l'ossification endochondrale ^[5, 17]. La seconde est le cartilage que l'on retrouve dans les plaques de croissance et qui est nécessaire à la croissance longitudinale des os ^[8, 9, 18].

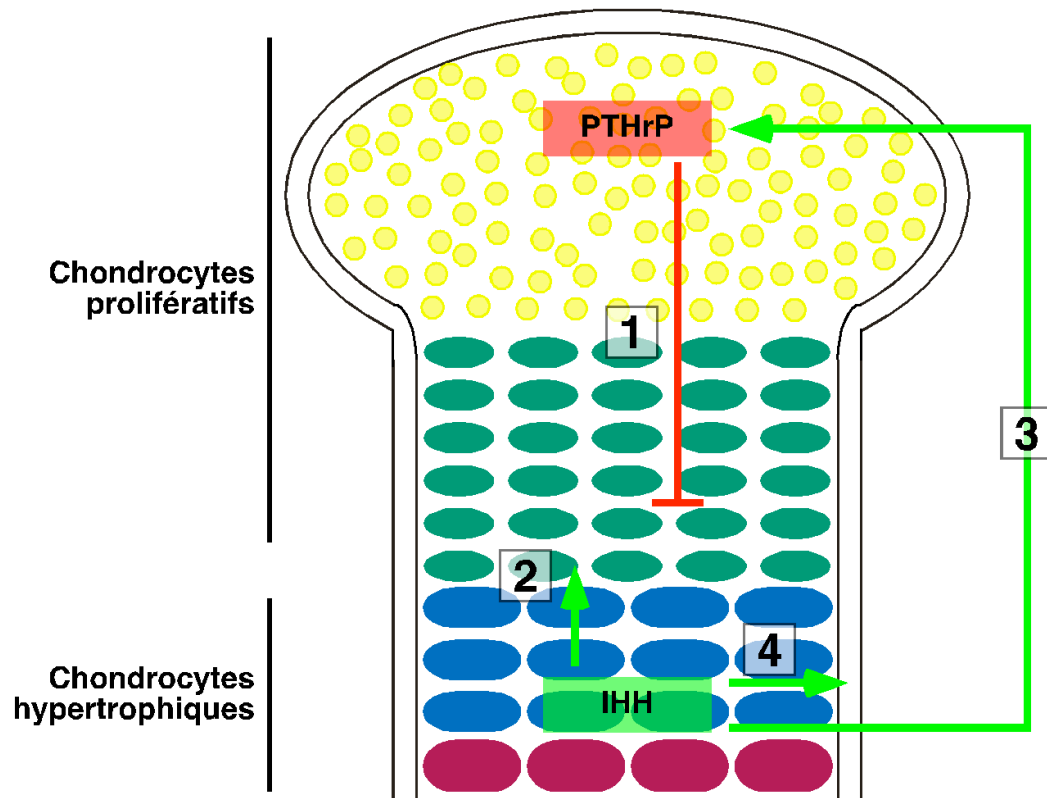


Figure 1.2 Schéma d'une plaque de croissance.

Dans le schéma, les chondrocytes prolifératifs sont représentés par de petits cercles jaunes, les chondrocytes pré-hypertrophiques par des cercles verts aplatis et les chondrocytes hypertrophiques par de gros cercles bleus et mauves. (1) Impact de la PTHrP, produite par une population de chondrocytes prolifératifs (représentés par des cercles rouges), sur l'inhibition de la différenciation terminale des chondrocytes. (2-4) Impact de IHH, produit par une population de chondrocytes hypertrophiques (représentés par de grands cercles mauves) sur la stimulation de la différenciation des chondrocytes (2), de la synthèse de la PTHrP (3) et de la minéralisation (4). Schéma inspiré de Kronenberg, 2003 ^[8].

Enfin, la troisième structure est le cartilage articulaire, qui enrobe la surface des épiphyses, nécessaire au bon fonctionnement des articulations ^[9, 18, 19]. Ces trois cartilages de type hyalin sont essentiellement composées de *Collagen Type II, Alpha-1* (COL2A1) et de divers protéoglycanes tel que *Aggrecan* (ACAN) dont la synthèse est assurée uniquement par les chondrocytes ^[9, 18, 19]. De ces trois structures, une seule est maintenue tout au long de la vie adulte, le cartilage articulaire, tandis que les deux autres sont transitoires. Il n'est pas rare d'observer des défauts dans la composition et l'organisation de ces trois structures cartilagineuses engendrant ainsi de graves conséquences sur le développement et la fonction des os.

1.4 Le cartilage articulaire

Dans l'articulation, lors des mouvements, le cartilage articulaire offre une surface lisse et libre de friction. De plus, par sa souplesse, il permet la dispersion des forces lors d'impact et protège ainsi les épiphyses contre différents stress mécaniques. Bien que les chondrocytes peuplant le cartilage articulaire ont la même origine et ressemblent à ceux retrouvés dans la plaque de croissance, certains points les distinguent ^[9, 19, 20]. Ainsi, les chondrocytes du cartilage articulaire seront beaucoup moins susceptibles de proliférer. De plus, puisque l'intégrité du cartilage articulaire doit être maintenu tout au long de la vie, il est nécessaire que leur population soit elle aussi maintenue durant cette période ^[19, 20]. Ces deux traits les distinguent donc des chondrocytes de la plaque de croissance, lesquels sont appelés à entreprendre un cycle de prolifération, différenciation terminale et apoptose durant les premières années de la vie. Un grand nombre de découvertes permettent maintenant de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de ces deux populations uniques de chondrocytes. Parmi ceux-ci, on retrouve les *Growth Differentiation Factor 5/6/7* (GDF5/6/7) et le facteur de transcription *V-ETS Avian Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog* (ERG) dont les rôles seront abordés dans la section décrivant les mécanismes moléculaires contrôlant la chondrogenèse ^[21, 22].

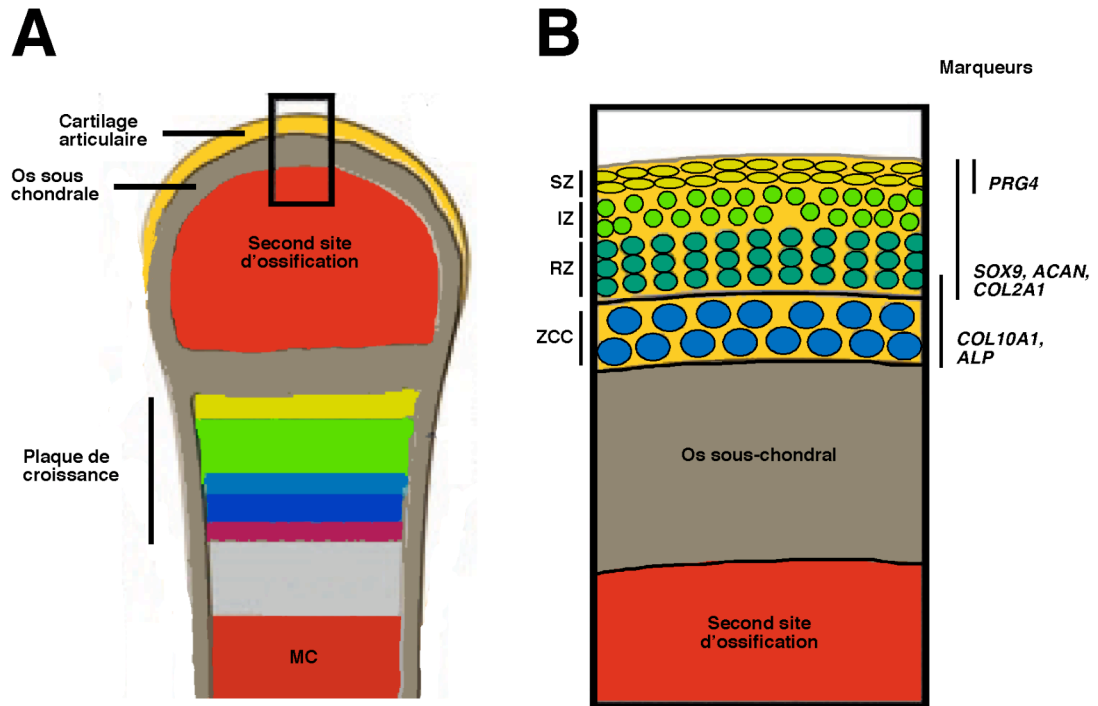


Figure 1.3 Schéma présentant l'organisation des différentes structures des os longs.

(A) La cavité renfermant les cellules hématopoïétiques (MC) et le site d'ossification secondaire sont représentés en rouge. La section du cartilage articulaire schématisé en **B** est encadrée en noire. (B) Schéma des différentes zones retrouvées dans le cartilage articulaire. À droite du schéma, une liste de différents marqueurs exprimés par les cellules constituant ces zones. SZ, zone superficielle ; IZ, zone intermédiaire ; RZ, zone radiale ou profonde ; ZCC, zone de cartilage calcifié. Schéma inspiré de Zuscik et al., 2008 ^[9].

1.4.1 L'organisation du cartilage articulaire

Une fois formé, le cartilage articulaire adoptera une organisation qui lui est propre (Figure 1.3). Cette organisation, qui rappelle celle du cartilage formant les plaques de croissance, est essentielle au bon fonctionnement de l'articulation. Ainsi, il est possible de diviser le cartilage articulaire en quatre zones distinctes caractérisées par le stade de différenciation des chondrocytes les composant et la nature des protéines composant la MEC : la zone superficielle (SZ), la zone intermédiaire (IZ), la zone radiale ou profonde (RZ) et la zone de cartilage calcifié (ZCC) (Figure 1.3B) ^[9, 23]. Dans la première, la SZ, située en surface de l'articulation, on retrouve une population de chondrocytes aplatis qui sécrètent un protéoglycane unique au cartilage articulaire, le PRG4, permettant une lubrification optimale de la surface cartilagineuse (Figure 1.3B) ^[9, 23-26]. Située sous cette zone, dans la IZ, on retrouve une population de chondrocytes ayant une forme plus arrondie rappelant les chondrocytes prolifératifs de la plaque de croissance. Cette population de chondrocytes exprime tous les marqueurs typiques de chondrocytes nouvellement formés tel *SOX9*, *COL2A1* et *ACAN* (Figure 1.3B) ^[9, 18, 19]. Enfin, sous-jacentes à cette zone, on retrouve la RZ et la ZCC, lesquelles sont composées respectivement des chondrocytes pré-hypertrophiques et hypertrophiques (Figure 1.3B). Ces deux populations cellulaires sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription *Runt-Related Transcription Factor 2* (RUNX2), un régulateur transcriptionnel jouant un rôle clé de la calcification et dont les fonctions spécifiques seront abordées plus loin dans cette introduction. Aussi, ces populations de chondrocytes se caractérisent par leur capacité à produire *Collagen Type X, Alpha-1* (COL10A1) et l'enzyme ALP, deux protéines associées à la calcification du cartilage (Figure 1.3B) ^[9, 18, 19]. La composition en collagène et en protéoglycane ainsi que le nombre et l'état de différenciation des chondrocytes peuplant le cartilage articulaire sont essentiels à son bon fonctionnement et à son maintien tout au long de la vie adulte. Un simple changement peut induire une cascade d'événements entraînant la dégradation de ce tissu et la perte de sa fonction. Enfin, quelques uns de ces changements seront abordés plus loin afin de discuter de leur rôle dans l'ostéoarthrite (OA).

1.5 La genèse des cellules nécessaires au développement des os

Maintenant que le développement et l'organisation des différentes structures osseuses ont été décrits, les mécanismes régulant la différenciation des cellules retrouvées dans ces structures seront abordés. Tel que mentionné plus tôt, trois types cellulaires sont responsables du développement, du maintien de l'intégrité et de la réparation des différentes structures osseuses: les ostéoblastes, les ostéoclastes et les chondrocytes. Les ostéoblastes, responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire du tissu osseux et de sa minéralisation, et les chondrocytes, responsable de la synthèse de la matrice extracellulaire du cartilage, ont tous deux une origine mésenchymateuse^[2-4]. Cette origine commune fait en sorte que ces cellules partagent un grand nombre de caractéristiques quant aux mécanismes moléculaires participant à leur différenciation et à leur activité. Enfin, la différenciation des ostéoclastes, dont le rôle est, tel que mentionné plus tôt, d'assurer la dégradation (résorption) du tissu minéralisé, ne sera pas décrite dans cette section^[2, 7].

1.5.1 L'ostéoblastogenèse

L'ostéoblastogenèse se divise en trois étapes : l'état de pré-ostéoblaste, d'ostéoblaste immature et d'ostéoblaste mature (Figure 1.4)^[6, 7, 27]. Ce processus doit être parfaitement régulé étant donné que le nombre d'ostéoblastes et leur activité se doit d'être optimal afin assurer un développement normal des os et un maintien de leur qualité. Certaines voies de signalisation et facteurs de transcription sont essentiels à l'initiation de la différenciation des ostéoblastes et à la synthèse et la minéralisation du tissu minéralisé. Ces voies de signalisation et facteurs de transcription sont, pour leur part, contrôlés par divers hormones et facteurs de croissance, permettant ainsi une réponse du tissu osseux à des changements systémiques ou locaux. Parmi ces facteurs solubles régulant la différenciation des ostéoblastes, on retrouve la *Parathyroid Hormone* (PTH), la *Parathyroid hormone-related protein* (PTHrP), les hormones stéroïdiennes, la 1,25-dihydroxyvitamine D (1α -25(OH)₂D₃

ou communément nommé vitamine D3), les *Growth Hormone* (GHs), les BMPs, notamment BMP2 et BMP4, les FGFs, notamment FGF2 et FGF18, l' *Insulin-Like Growth Factor 1* (IGF1) et les *Wingless-Type MMTV Integration Site Family* (WNTs), notamment WNT3a, 5a et 10 [6, 7, 27]. Les prochains paragraphes détailleront le rôle de différents facteurs de transcription ainsi que de certaines hormones et facteurs de croissance impliqués dans la différenciation des ostéoblastes.

1.5.1.1 Les facteurs de transcription qui régulent l'ostéoblastogenèse

Au cours des dernières années, le raffinement des techniques de biologie moléculaire et d'élaboration d'animaux transgéniques ont permis la caractérisation d'un grand nombre de facteurs de transcription et de voies de signalisation impliqués dans les processus de différenciation des ostéoblastes et de la minéralisation de la matrice extracellulaire des os (Figure 1.4). Parmi tous ces nouveaux facteurs de transcription identifiés, certains se sont avérés être plus importants que d'autres. En fait, trois facteurs de transcription sont maintenant connus comme étant au centre du processus de l'ostéoblastogenèse, un processus qui comprend la différenciation des cellules mésenchymateuses pluripotentes en ostéoblastes ainsi que la maturation de ces pré-ostéoblastes en cellules matures fonctionnelles.

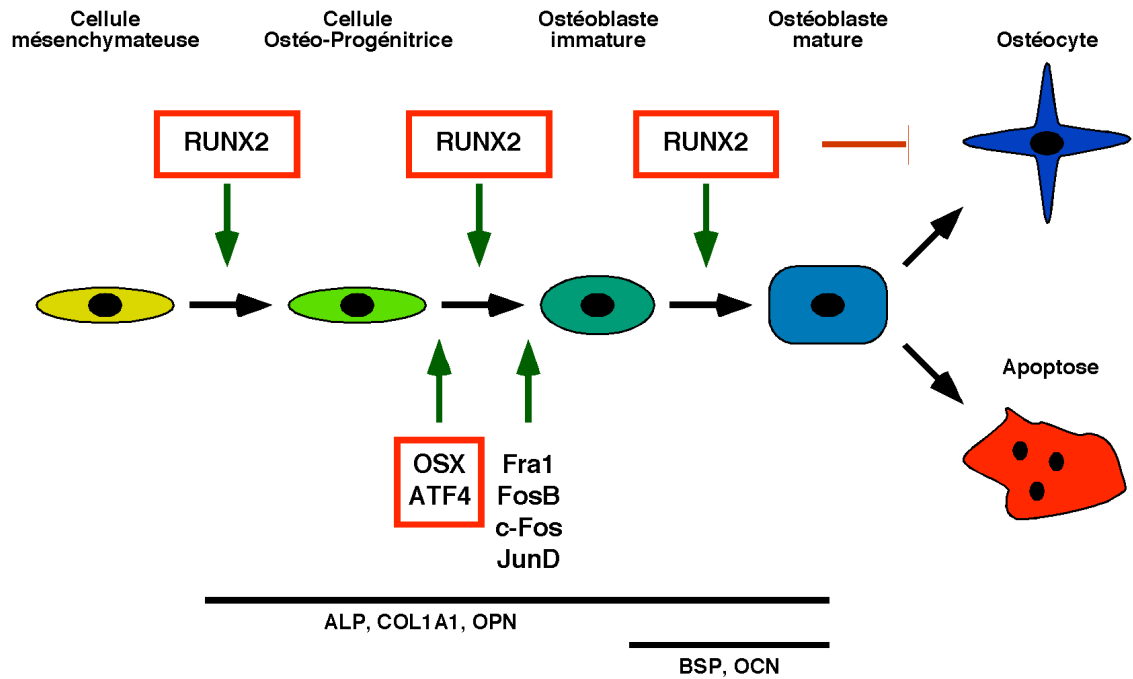


Figure 1.4 Schéma résumant le contrôle de l'ostéoblastogenèse par différents facteurs de transcription.

Schématisation des différents stades de différenciation des ostéoblastes et les facteurs de transcription essentiels à cette différenciation. Au bas du schéma figure le nom des gènes qui sont exprimés aux différentes étapes de la différenciation des ostéoblastes et qui sont importants pour le bon déroulement de la minéralisation. Schéma inspiré de Marie, 2008 ^[27].

1.5.1.1.1 RUNX2

Le plus important facteur de transcription de l'ostéoblastogenèse, RUNX2, aussi appelé CBFA1, AML3 ou OSF2, appartient, comme RUNX1 et RUNX3, à la famille des facteurs de transcription à domaine Runt (*Runt box*, RUNX) (Figure 1.4) [28]. RUNX2, identifiée pour la première fois comme un facteur de transcription liant le promoteur du gène *Osteocalcin* (OC, maintenant nommé *Bone gamma carboxyglutamate protein* ou BGLAP) et permettant son expression dans les ostéoblastes, s'est rapidement présenté comme une protéine essentielle à la différenciation des cellules du mésenchyme en pré-ostéoblaste [29-31]. Chez la souris, *Runx2* apparaît tôt durant l'embryogenèse. Dès le stade E10.5 chez la souris, stade correspondant à la condensation des cellules mésenchymateuses et au début de la minéralisation du squelette, il est possible d'y détecter la présence de *Runx2* [32]. La délétion de ce gène chez les souris empêche l'initiation de la différenciation des cellules mésenchymateuses en pré-ostéoblastes, lors de l'embryogenèse. Ainsi, aucun ostéoblaste n'est formé chez de tels animaux, résultant en une minéralisation osseuse déficiente et en une mort embryonnaire [30, 31]. La délétion post-natale de *Runx2* entraîne, quant à elle, une ostéopénie sévère, suggérant également un rôle de *Runx2*, non pas seulement dans l'initiation de la différenciation, mais également dans l'expression de gènes associés au bon fonctionnement des ostéoblastes matures et, donc, dans la différenciation tardive des ostéoblastes [33]. Chez l'homme, la mutation du gène *RUNX2* est responsable de la dysplasie cléidocrânienne présentant, entre autres, un retard de la fermeture des os formant les fontanelles ainsi qu'une hypoplasie des clavicules, phénotype retrouvé chez les souris *Runx2*^{+/-} [30, 31, 34].

Afin de promouvoir la différenciation de cellules mésenchymateuse en ostéoblastes, RUNX2 induit l'expression de gènes spécifiques aux ostéoblastes par la liaison de leur promoteur via des éléments de réponse nommés OSE2 présentant la séquence consensus 5'-PyGPyGGT-3' [29]. Cette liaison à l'ADN nécessite une hétérodimérisation avec la protéine co-activatrice *Core binding factor beta* (CBFB). Cette dernière n'est impliquée dans aucune

interaction protéine/ADN, mais est nécessaire au bon fonctionnement de RUNX2 puisque la délétion de ce gène, dans les cellules mésenchymateuses de souris, induit un phénotype osseux s'apparentant à celui observé lors du knock-out du gène *Runx2* [35]. Ainsi RUNX2 permet l'expression de gènes impliqués dans d'importantes étapes de la minéralisation de la matrice extracellulaire des os tels *OC*, *OPN*, *ALP* et *Matrix Metalloproteinase 13 (MMP13)* [29-31, 34]. Enfin, en plus du rôle joué par RUNX2 dans l'ostéoblastogenèse, cette protéine est également importante pour l'hypertrophie des chondrocytes. Cette fonction, qui sera plus largement abordée plus loin, est importante pour comprendre la minéralisation du squelette puisque l'hypertrophie des chondrocytes, suite à leur condensation au stade embryonnaire, est une étape essentielle du processus initiateur de la minéralisation des os nouvellement formés [36-38].

Les rôles cruciaux joués par RUNX2 lors de la différenciation et le fonctionnement des ostéoblastes, nécessitent que son activité soit sous le contrôle de mécanismes moléculaires afin d'accroître ou d'inhiber son activité. C'est le cas, par exemple, de la protéine TWIST1 qui empêche, par son interaction avec le domaine de liaison à l'ADN de RUNX2, son recrutement au promoteur de ses gènes cibles, ce qui permet de freiner la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes [39]. L'importance de ce mécanisme d'inhibition est illustrée par le phénotype obtenu lorsqu'une forme inactive de TWIST1 est exprimée ou lorsque TWIST1 est exprimé de manière haploinsuffisante, comme c'est le cas pour les patients souffrant du syndrome Saethre-Chotzen [40-43]. Dans les deux cas, une différenciation prématurée des ostéoblastes est observée conduisant, entre autres, à une augmentation du volume osseux, une fermeture précoce des plaques de croissance et une crâniosynostose [39]. Enfin, d'autres facteurs auront une fonction activatrice sur RUNX2, tel *Activating Transcription factor 4 (ATF4)*, dont la fonction sera décrite plus loin dans cette section.

1.5.1.1.2 OSTERIX

Le second facteur de transcription impliqué dans la différenciation des ostéoblastes est la protéine *Osterix* (OSX, maintenant nommé *Transcription Factor Sp7*) (Figure 1.4). Dans les pré-ostéoblastes, l'expression de ce facteur de transcription, membre de la famille des facteurs de transcription SP à doigt de zinc de type C₂H₂, est assurée par RUNX2^[44]. Cette induction de *Osx* est nécessaire à la bonne formation d'ostéoblastes fonctionnels puisque la délétion de ce gène chez la souris entraîne l'arrêt de la différenciation des pré-ostéoblastes à un stade précoce sans toutefois affecter leur nombre ou leur distribution^[45]. Cette interruption de la différenciation est illustrée par la présence de cellules exprimant de hauts niveaux de *Runx2*, mais n'exprimant aucun marqueur précoce de différenciation des ostéoblastes tel *Colla1* ou la glycoprotéine *Bsp*^[45]. Ainsi, ces expériences ont démontré que *Osx* agit en aval de *Runx2* afin de poursuivre la différenciation des ostéoblastes et de permettre l'expression de gènes exerçant une fonction de minéralisation.

1.5.1.1.3 Les facteurs de transcription formant la famille AP1

Enfin, le troisième facteur de transcription jouant un rôle majeur dans l'ostéoblastogenèse se nomme AP1 (*Activator Protein 1*) (Figure 1.4). Ce facteur de transcription est formé par l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation de protéines présentant un domaine basique et un domaine riche en leucine (bZIP) appartenant à l'une des trois sous-familles suivantes: JUN (c-JUN, JUNB, JUND), FOS (c-FOS, FOSB, FOSL1, FOSL2) et CREB/ATF (ATF1, CREB/CREM, CREB314, BREF-H, ATF2, ATF3, ATF4, ATF6, ATF7, ATFb, ATFx)^[46, 47]. Ces facteurs de transcription présentent un domaine basique et un domaine riche en leucine (bZIP) permettant respectivement leur liaison à l'ADN et leur dimérisation. Suite à leur association en dimère (souvent JUN/JUN, JUN/FOS ou JUN/ATF) ces protéines interagissent avec le promoteur de gènes cibles via des éléments CRE (*cAMP Response Elements*) présentant la séquence nucléotidique 5'-TGAG/CG/CTCA-3'^[48].

À ce jour, une fonction plus ou moins importante a été identifiée, dans l'ostéoblastogenèse, pour presque toutes ces protéines. Toutefois, parmi celles-ci, cinq semblent y jouer un rôle plus important. Tout d'abord, vraisemblablement par leur interaction avec un membre de la famille Jun, c-Fos, Fos11(Fra1), Fosl2 (Fra2) et Δ FosB ou $\Delta\Delta$ FosB (deux protéines provenant de l'épissage alternative du gène *FosB*) promeuvent la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (Figure 1.4) ^[49-54]. De ce fait, la surexpression de ces protéines, chez la souris, conduit à de l'ostéosclérose ou à l'apparition de tumeurs osseuses ^[55-60]. Enfin, le cinquième facteur de transcription AP1 ayant un rôle central lors de la maturation des ostéoblastes est ATF4 (Figure 1.4) ^[61-63]. Bien que cette protéine soit capable d'homodimériser et d'hétérodimériser avec des protéines bZIPs membres de la famille JUN ou FOS ^[64, 65], il semble que c'est par le biais de son interaction avec le facteur de transcription Runx2 qu'elle participe à l'expression de gènes spécifiques aux ostéoblastes ^[61, 66].

À l'instar de Runx2, le contrôle étroit de l'activité d'ATF4 est nécessaire afin que le fonctionnement des ostéoblastes ne soit compromis. Ainsi, il a été montré que la kinase *Ribosomal protein S6 kinase polypeptide 3* (RPS6KA3) phosphoryle ATF4 sur deux résidus sérines (sérine 245 et 251) permettant ainsi l'activation d'ATF4 ^[61]. Cette stimulation d'ATF4 par RPS6KA3 est indispensable pour le bon fonctionnement des ostéoblastes puisque l'inactivation de l'un ou l'autre de ces gènes chez la souris entraîne une ostéopénie, un retard de croissance des os ainsi qu'un délai dans la suture des fontanelles ^[61]. Ces mêmes expériences ont permis de constater qu'ATF4 et RPS6KA3 sont tous deux impliqués dans la différenciation tardive des ostéoblastes. Cette idée est supportée par l'analyse des gènes contrôlés par ces deux protéines, soit les gènes *Oc*, *Colla1* et *Phosphate-regulating gene with homology to endopeptidase on the X chromosome* (PHEX), trois marqueurs de la différenciation tardive des ostéoblastes ^[61, 62, 66].

En plus des mécanismes permettant l'activation d'ATF4, deux autres mécanismes permettant son inactivation ont également été caractérisés chez les ostéoblastes. Il s'agit de

deux protéines bZIP, soit *Factor inhibiting activating transcription factor 4-mediated transcription* (FIAT, aussi nommé *Taxilin Gamma*) et *Inducible cAMP Early Repressor* (ICER), lesquels, par leur interaction avec ATF4, inhibent son activité^[67, 68]. Comme dans le cas des souris knock-out pour *Atf4*, les souris transgéniques surexprimants *Fiat* ou *Icer* souffrent d'ostéopénie sévère, soutenant ainsi l'idée qu'ATF4 est indispensable à l'acquisition de la masse osseuse normale après la naissance^[61, 67, 68].

Bien que RUNX2, OSX et AP1 (JUN, FOS, ATF4) représentent trois facteurs de transcription clés de l'ostéoblastogenèse, il est important de souligner qu'ils ne sont pas les seuls (Figure 1.4). Plusieurs autres protéines présentent des fonctions permettant la différenciation et le bon fonctionnement des ostéoblastes. Ainsi l'absence de l'un ou l'autre de ces mécanismes aura souvent de sévères conséquences sur le développement du tissu osseux.

1.5.1.2 Les facteurs extracellulaires contrôlant la biologie osseuse et l'ostéoblastogenèse

Comme il a été mentionné précédemment, les facteurs de transcription contrôlant l'ostéoblastogenèse et l'activité des ostéoblastes sont finement contrôlés par des mécanismes moléculaires impliquant la régulation de leur transcription, des modifications post-traductionnelles et par des interactions avec d'autres protéines. Toutefois, il est important de savoir que ces mécanismes moléculaires sont eux aussi contrôlés afin d'être activés ou inactivés aux moments opportuns. Cette régulation est assurée principalement par deux groupes de facteurs : les hormones, telles la PTH, et les hormones stéroïdiennes, notamment la vitamine D₃ et les œstrogènes, ainsi que certains facteurs locaux tels les BMPs, les WNTs, *Indian Hedgehog* (IHH) et la PTHrP.

1.5.1.2.1 L'hormone parathyroïdienne

La PTH est une petite protéine de 84 acide aminés synthétisée et sécrétée par les glandes parathyroïdes en réponse à une diminution des niveaux de calcium circulant (Figure 1.5). Elle a donc pour fonction le maintien de la concentration sanguine en calcium et en phosphate à des niveaux standards. Cette action de la PTH est assurée par l'interaction de sa région amino-terminale (acides aminés 1 à 34) avec un récepteur membre de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G, le *Parathyroid Hormone 1 Receptor* (PTH1R). Une fois activé, ce récepteur stimule deux voies de signalisation. La première conduit à l'augmentation de la synthèse d'AMPc et l'activation de la *Protein Kinase A* (PKA) via l'activation d'une sous-unité $G_{\alpha s}$. La seconde mène à la production d'inositol-3-phosphate et l'activation des *Protein Kinase C* (PKC) via l'activation d'une sous-unité $G_{\alpha q}$ [69-71]. PTH exerce son action hypercalcémiant à trois niveaux: par l'augmentation de l'absorption du calcium au niveau de l'intestin (via l'augmentation de l'expression de la 1α -hydroxylase menant à l'activation de la vitamine D_3 , comme décrit plus loin), par l'accroissement de la réabsorption du calcium excrété par le rein et par l'activation des ostéoclastes entraînant ainsi une résorption accrue des os et une libération du calcium les formant (Figure 1.5) [72-74]. Étant donné que la PTH a pour conséquence la réduction de la masse osseuse, elle a rapidement été décrite comme une hormone ayant une fonction catabolique sur l'os. Toutefois, il est maintenant connu que la PTH exerce également une fonction anabolique sur l'os, c'est-à-dire qu'elle peut augmenter la masse osseuse. Cette seconde propriété de la PTH explique son utilisation dans le traitement de l'ostéoporose [75-77]. Ces fonctions diamétralement opposées de la PTH ne sont, encore à ce jour, pas totalement bien comprises. Malgré tout, nous savons que la période d'exposition des cellules osseuses à cette hormone dicte sa fonction. La fonction catabolique de la PTH nécessite une activité accrue des ostéoclastes qui sont les cellules responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire minéralisée des os. Donc, lorsque les ostéoblastes sont longuement exposés à la PTH, il y aura augmentation de la synthèse de *Receptor activator of NF-kappa-B Ligand* (RANKL) et, ainsi, stimulation du récepteur *Receptor*

activator of NF-kappa-B (RANK), exprimé par les ostéoclastes, conduisant à leur activation ^[72]. De plus, la PTH est également en mesure d'inhiber la différenciation des ostéoblastes, réduisant donc le taux de synthèse et de minéralisation de la matrice extracellulaire osseuse ^[78]. Ces actions combinées résulteront en une nette augmentation des niveaux de calcium sérique.

Pour ce qui est de la fonction anabolique de la PTH, plusieurs mécanismes sont également impliqués. Par exemple, suite à une exposition intermittente des ostéoblastes à de grandes concentrations de cette hormone, on observe une stimulation de leur différenciation au détriment des autres cellules ayant une origine mésenchymateuse, soit les adipocytes et les chondrocytes ^[79, 80]. Cette action de la PTH fait intervenir une augmentation de l'expression de deux facteurs de croissance capables d'induire la différenciation des ostéoblastes, par exemple *IGF1* et *FGF2*, ainsi que par l'augmentation de l'expression des facteurs de transcription *RUNX2* et *OSX* ou encore par la stimulation de la voie de signalisation WNT ^[81-88]. Également, le traitement d'ostéoblastes à la PTH de manière intermittente favorise leur survie, ce qui leur permet d'exercer leur fonction sur une plus longue période et, aussi, d'inhiber la différenciation des ostéoclastes par une interaction cellule/cellule via le récepteur *EPHRIN B1* (EFNB1) ^[89-91].

1.5.1.2.2 La Vitamine D₃

À l'instar de la PTH, la vitamine D₃ est une hormone permettant le maintien des taux de calcium et de phosphate sanguin à des niveaux normaux (Figure 1.5) ^[92, 93]. Cette vitamine, lorsque synthétisée au niveau de la peau, sous l'action des rayons ultraviolets B à partir du 7-dehydrocholestérol, ou lorsqu'absorbée par l'intestin, nécessite deux hydroxylations afin d'être activée et, ainsi, d'être biologiquement fonctionnelle. La première hydroxylation a lieu dans le foie et, la deuxième, dans les reins, par les enzymes 25-hydroxylase (aussi nommée CYP27A1) et 1 α -hydroxylase (aussi nommée CYP27B1) respectivement, résultant en la formation du métabolite actif de la vitamine D₃, la 1 α -

25dihydroxyvitamine D₃ (1 α -25(OH)₂D₃)^[92, 93]. C'est cette deuxième hydroxylation qui est l'étape limitante dans le contrôle des niveaux de calcium et de phosphate sanguin. En effet, la disponibilité de la 1 α -25(OH)₂D₃ sera influencée par l'expression de la 1 α -hydroxylase qui voit son expression augmentée en condition d'hypocalcémie et d'hypophosphatémie et réduite en condition d'hypercalcémie, d'hyperphosphatémie et par le FGF23, dont le rôle détaillé sera abordé plus loin (Figure 1.5)^[94].

Les rôles de la 1 α -25(OH)₂D₃ et de son récepteur, le *Vitamin D Receptor* (VDR), sont multiples dans l'organisme^[95-98]. Toutefois, leur fonction première reste, tel que mentionné précédemment, le maintien des niveaux standards de calcium et de phosphate sanguin. Cette fonction est illustrée par le phénotype observé chez les personnes ayant une atteinte génétique inactivant le VDR ou ne permettant plus l'activation de la 1 α -25(OH)₂D₃, le Rachitisme dépendant de la vitamine D de type 1 et 2 (*Vitamin D-Dependent Rickets 1/2*, VDDR1 et VDDR2)^[92]. En effet, ces personnes présentent une hypocalcémie et une hypophosphatémie dus au défaut d'absorption du calcium et du phosphate intestinal. Également, on observe chez ces personnes de sévères anomalies de croissance et de minéralisation des os^[73, 92, 99-101].

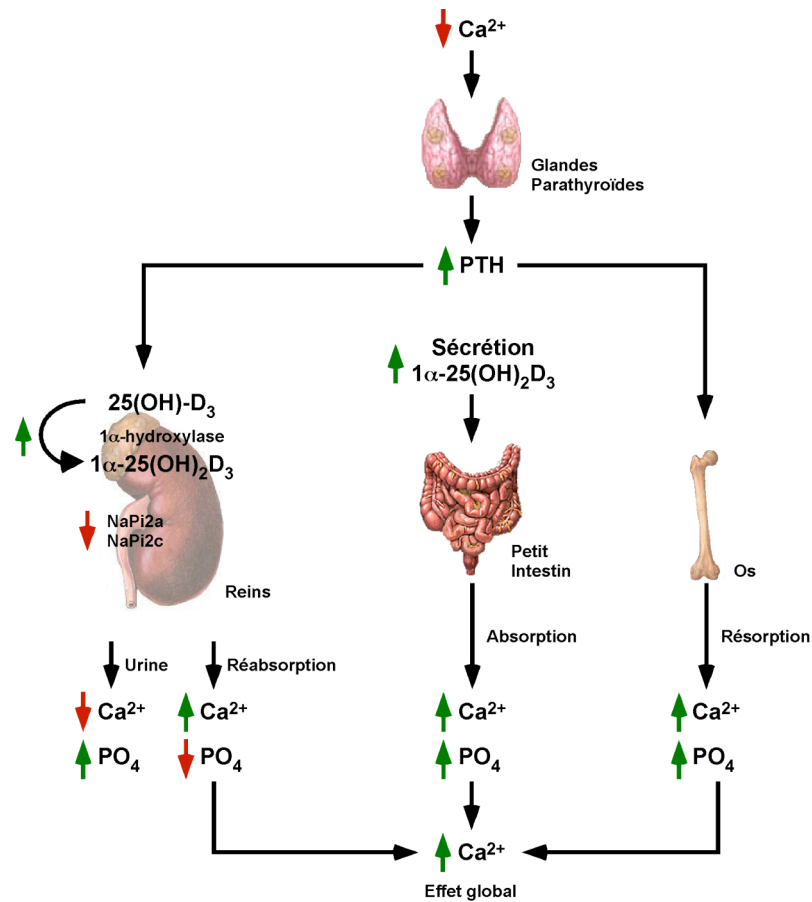


Figure 1.5 Schéma résumant le contrôle des niveaux de phosphate et de calcium sanguins par la PTH et la $1\alpha\text{-}25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

En réponse à la diminution des niveaux de calcium circulant, on observe une augmentation (flèches en vert) de la synthèse et de la sécrétion de la PTH par les glandes parathyroïdiennes. Cette augmentation entraîne une augmentation de la synthèse de la $1\alpha\text{-}25(\text{OH})_2\text{D}_3$ laquelle, à son tour, entraîne une réabsorption du calcium au niveau du tubule proximal des reins et une absorption au niveau de l'intestin. Également, la PTH agit au niveau des os afin d'y stimuler l'activité de résorption des ostéoclastes, ce qui conduit au relâchement de calcium dans le sang. Enfin, l'augmentation de la PTH engendre une diminution (flèches en rouge) de l'expression des cotransporteurs $\text{NaPi-}2\text{a}$ et $\text{NaPi-}2\text{c}$, ce qui entraîne une diminution de la réabsorption du phosphate par les reins et, par conséquent, une perte de phosphate dans l'urine. Schéma inspiré de Quarles, 2008 ^[1].

Bien qu'une large part des anomalies osseuses observées chez les patients souffrant de VDDR1 et VDDR2, ou chez les souris modifiées génétiquement afin qu'elles présentent un défaut du métabolisme de la 1α -25(OH) $_2$ D $_3$, soit due à l'hypocalcémie et l'hypophosphatémie, il est important de mentionner que la 1α -25(OH) $_2$ D $_3$ est également capable d'agir directement sur les ostéoblastes. Encore ici, comme il l'a été précisé dans le cas de la PTH, la 1α -25(OH) $_2$ D $_3$ peut exercer une action catabolique sur le tissu osseux par l'inhibition de la différenciation des pré-ostéoblastes et une fonction anabolique favorisant l'activité des ostéoblastes matures. Ainsi, la 1α -25(OH) $_2$ D $_3$ est en mesure d'inhiber ou d'augmenter l'expression des gènes telle *ALP*, *OC*, *RUNX2*, *COL1A1*, *PHEX*, *FGF23*, *BSP*, *Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5 (LRP5)* ainsi que les gènes cibles de la voie des WNTs et ce, selon leur état de différenciation^[102-115]. Cette fonction particulière de la 1α -25(OH) $_2$ D $_3$ illustre bien le rôle qu'a cette hormone à moduler la résorption et le remodelage osseux^[103, 116].

1.5.1.3 Conclusion de l'ostéoblastogenèse

La liste de facteurs de croissance et transcription nécessaires à l'ostéoblastogenèse et à la minéralisation osseuse est loin d'être exhaustive. Bien d'autres facteurs produits localement ou provenant de la circulation systémique sont essentiels à l'homéostasie osseuse et peuvent stimuler bien d'autres voies de signalisation afin de moduler l'ostéoblastogenèse et changer l'activité des ostéoblastes matures. Il n'y a qu'à penser à la voie des WNTs, laquelle a été mentionnée à quelques occasions précédemment, aux hormones sexuelles telles les estrogènes ou, encore, au système nerveux, via la leptine, qui sont toutes des voies nécessaires à un développement correct et au maintien de l'intégrité du tissu minéral de l'os.

1.5.2 La chondrogenèse

Tous les chondrocytes retrouvés dans les os ont la même origine, les cellules mésenchymateuses. Tel que mentionné plus tôt, c'est sous l'influence des BMPs et du TGF- β , que ces cellules entreprennent un processus de différenciation ^[117, 118]. Toutefois, malgré cette origine commune, il est important de mentionner que les chondrocytes retrouvés dans les plaques de croissance sont différents de ceux qui sont retrouvés dans le cartilage articulaire ^[18, 119]. Cette différence, tant du point de vue de leur activité métabolique que de leur état de prolifération ou de différenciation, est essentielle à leur rôle joué dans ces deux structures osseuses. Ainsi, les chondrocytes de la plaque de croissance seront constamment stimulés pour proliférer et se différencier, ce qui entraînera, au début de l'âge adulte, leur disparition et la calcification de la plaque de croissance. Inversement, les chondrocytes articulaires prolifèrent et se différencient peu, résultant en une longue survie dans le cartilage articulaire et expliquant ainsi leur présence jusqu'à la fin de la durée de vie d'un organisme ^[18, 19, 119]. Dans cette section, les mécanismes à la base de la chondrogenèse ainsi que ceux permettant la régulation de leur différenciation terminale seront décrits.

Trois stades de différenciation sont observés lors de la chondrogenèse (Figure 1.6). Le premier stade est caractérisé par de petits chondrocytes prolifératifs permettant le maintien de leur population, le deuxième par de plus gros chondrocytes, normalement organisés en colonnes, pouvant rapidement proliférer et étant capables de synthétiser de grandes quantités de collagène et de protéoglycane, composants de la MEC essentiels au bon fonctionnement du cartilage. Enfin, au troisième stade, on retrouve de très gros chondrocytes dits hypertrophiques, ayant atteint l'étape ultime de la différenciation terminale et rapidement sujets à l'apoptose, se caractérisant par leur capacité à sécréter certaines protéines associées à la calcification de la MEC du cartilage, soit le collagène de type X, la protéase MMP13 et l'enzyme ALP ^[9, 18].

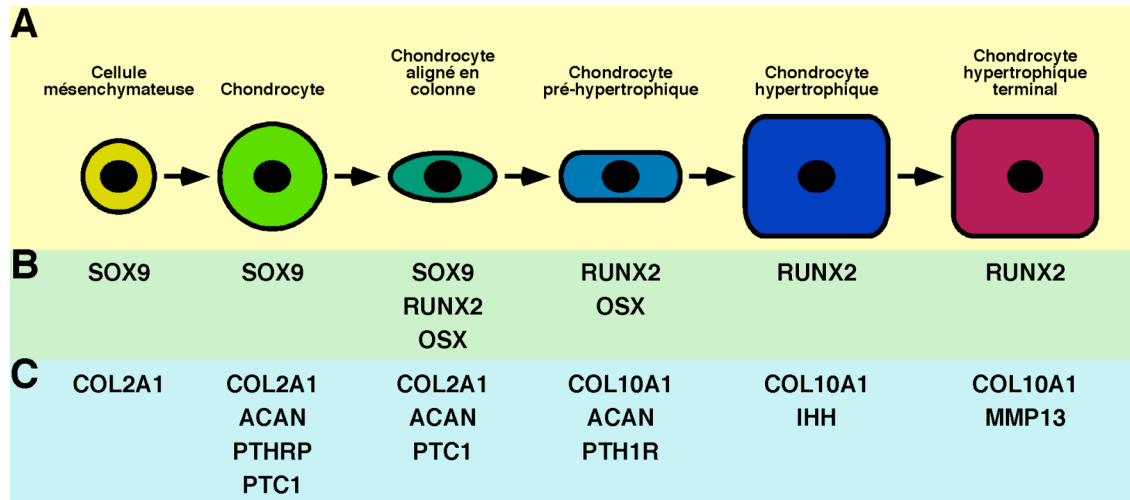


Figure 1.6 Schéma résumant le contrôle de la chondrogenèse par différents facteurs de transcription.

(A) Schématisation des différents stades de différenciation des chondrocytes. Trois stades de différenciation sont observés. Dans le premier, on retrouve de petites cellules pouvant proliférer et renouvelant le bassin de cellules pouvant amorcer un processus de différenciation (cellule mésenchymateuse et chondrocyte). Dans le deuxième, on retrouve des cellules de grosseur moyennes ayant amorcées un processus de différenciation, proliférant rapidement et s'organisant en colonne. Dans le troisième, on retrouve de grosses cellules ayant cessé de proliférer et ayant atteint un état de différenciation terminale (cellules pré-hypertrophique, hypertrophique et hypertrophique terminal). (B et C) Gènes exprimés à ces différentes étapes de la différenciation sont indiqués. Parmi ceux-ci, on note, en B, les facteurs de transcription SOX9, RUNX2 et OSX. Schéma inspiré de Zuscik, 2008 ^[9].

Afin d'assurer un développement osseux normal et de générer des structures cartilagineuses durables et fonctionnelles plusieurs mécanismes sont nécessaires pour le contrôle spatial et temporel de la chondrogenèse. La section qui suit a donc pour but de décrire et d'expliquer certains de ces mécanismes.

1.5.2.1 Les facteurs de transcription qui régulent la chondrogenèse

1.5.2.1.1 SOX9

SOX9 (*SRY-related HMG-box gene 9*) est un facteur de transcription appartenant au groupe E des gènes SRY (*Sex-determining region*) et présentant une boîte HMG (High mobility group) lui permettant de lier l'ADN. Essentiel à la détermination du sexe et au développement des os, ce facteur de transcription se lie aux promoteurs de gènes via la séquence nucléotidique 5'-AGAACAATG-3' ^[120]. Dans les os, SOX9 est aux chondrocytes ce que RUNX2 est aux ostéoblastes, c'est-à-dire le facteur de transcription clé permettant l'initiation de la chondrogenèse (Figure 1.6) ^[121-123]. Ainsi, lors de la formation des os, durant l'embryogenèse, SOX9, à l'instar de RUNX2, est fortement exprimé par les cellules mésenchymateuses ^[29, 124-126]. L'expression du gène *Sox9* est nécessaire afin d'assurer la différenciation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes. Ainsi, chez la souris transgénique, où on a aboli l'expression de *Sox9* des cellules mésenchymateuses avant leur condensation dans les membres supérieurs et inférieurs, on observe une absence du développement des membres, ce qui illustre bien le rôle essentiel de Sox9 dans la chondrogenèse et l'initiation du développement des os ^[125, 127]. Outre le rôle de SOX9 dans la condensation des cellules mésenchymateuses et leur différenciation en chondrocytes, ce facteur de transcription favorise également le maintien des chondrocytes dans un état prolifératif, permettant un agrandissement des structures cartilagineuses, et assure la synthèse de la MEC du cartilage en activant les gènes *Col2a1*, *Coll1a1*, *Acan* via le recrutement de co-activateurs tel *Creb-Binding Protein/E1A-Binding Protein, 300kDa* (CBP/P300) ^[127-133]. Ainsi, chez les souris, la délétion du gène *Sox9* des cellules

mésenchymateuses, suite à leur condensation, conduit à un arrêt de l'expansion du gabarit cartilagineux, dû à l'arrêt de la prolifération des chondrocytes, et à sa calcification prématurée, dû à l'hypertrophie prématurée de ces mêmes chondrocytes ^[127]. Ce phénotype cellulaire induit par la délétion du gène *Sox9* s'explique par la levée de l'inhibition qu'il exerce sur la protéine RUNX2, un facteur de transcription essentiel à la différenciation terminale des chondrocytes dont le rôle sera discuté dans le prochain paragraphe ^[37, 134, 135]. En plus de SOX9, d'autres gènes membre de la famille SRY participent à la chondrogenèse. Ainsi, SOX5 et SOX6, lesquels appartiennent au groupe D de cette famille, sont eux aussi exprimés suite à la condensation des cellules mésenchymateuses et coopèrent, avec SOX9, à l'expression des gènes *Col2a1* et *Acan* ^[136-138]. Plus récemment, une étude a démontré que ces deux protéines semblent avoir pour rôle de diriger la chondrogenèse, autant dans la plaque de croissance que dans le cartilage articulaire, en assurant un bon déroulement des étapes subséquentes menant à l'hypertrophie des chondrocytes. Ainsi, la délétion de *Sox5* et *Sox6* dans les chondrocytes peuplant le cartilage articulaire entraîne une désorganisation importante de cette structure et est caractérisée par une absence d'expression du gène *Prg4* ^[139].

1.5.2.1.2 ERG

Bien que les chondrocytes composant le cartilage articulaire et ceux de la plaque de croissance semblent, à la base, être régulés par les mêmes mécanismes lors de l'initiation de leur différenciation, leur phénotype et leur fonction divergent grandement. Il apparaît donc probable que certains facteurs de transcription soient impliqués dans cette spécificité cellulaire. Plus tôt il a été mentionné que SOX5 et SOX6 participent, en collaborant avec SOX9, à la chondrogenèse et à l'expression de marqueurs cartilagineux ^[136-138]. De plus, bien que d'autres expériences s'imposent, il semble que SOX5 et SOX6 permettent de spécifier un phénotype plutôt qu'un autre et ce, autant pour les chondrocytes de la plaque de croissance que ceux du cartilage articulaire ^[136-138]. Aussi, l'implication d'un nouveau facteur de transcription a récemment été démontrée dans l'établissement de cette spécificité

cellulaire. Il s'agit de la protéine *ETS-Related gene* (ERG), un membre de la famille des gènes *ETS* présentant tous un domaine de 85 acides aminés responsable de la liaison à l'ADN via des séquences présentant le motif 5'-GGA(A/T)-3' ^[140]. L'expression d'ERG peut être détectée dans les chondrocytes nouvellement différenciés suite à la condensation des cellules mésenchymateuses et est maintenue seulement dans les chondrocytes peuplant le cartilage articulaire ^[22, 139, 141]. L'extinction d'ERG de la plaque de croissance, qui semble dépendante de l'expression de Sox5/6, et son maintien uniquement dans les chondrocytes articulaires suggère qu'elle ait un rôle unique dans cette population cellulaire ^[22, 139]. Cette idée est supportée par les résultats obtenus lors de la surexpression d'une isoforme humaine d'ERG (ERG3Δ81) sous le contrôle du promoteur de *Col2a1* chez la souris. Les animaux ainsi générés présentent des plaques de croissance complètement désorganisées dans lesquelles aucun chondrocyte hypertrophique n'est détectable ce qui, par conséquent, compromet l'ossification endochondrale ^[22]. Enfin, tous les chondrocytes de la métaphyse et de la diaphyse de ces animaux transgéniques présentent un phénotype de chondrocytes articulaires, illustré par leur expression de marqueur spécifique tel *Col9a1* et *Tenascin C* (TNC), confirmant ainsi que le facteur de transcription ERG participe à la spécification du phénotype lors de la chondrogenèse ^[22].

1.5.2.1.3 RUNX2/3

Comme il a été mentionné auparavant, le rôle du facteur de transcription RUNX2 n'est pas restreint aux ostéoblastes ^[36-38]. En effet, lui et un autre membre de la famille, la protéine RUNX3, sont également requis pour le bon déroulement de la chondrogenèse (Figure 1.6) ^[38]. Bien que RUNX2 et RUNX3 soient exprimés dès la condensation des cellules mésenchymateuses, leur activité et leur expression sont réprimées dans les chondrocytes prolifératifs. Ce n'est qu'au moment où s'amorce la différenciation terminale des chondrocytes que l'expression et l'activité des deux facteurs de transcription reviennent à des niveaux élevés. Ainsi, une fois réactivés, RUNX2 et RUNX3 participent à l'induction de l'expression de marqueurs des chondrocytes hypertrophiques comme *COL10A1*,

MMP13, *ALP* et *OPN* ^[36-38, 142], lesquels assurent la dégradation du cartilage et son ossification. Ce rôle de RUNX2 et RUNX3 est illustré par le phénotype obtenu lors de la délétion de ces deux gènes, ensemble ou indépendamment l'un de l'autre, chez la souris. De ce fait, aucune différenciation terminale de chondrocytes prolifératifs, calcification du cartilage ou ossification endochondrale ne sont observées chez ces animaux ^[143-145]. Inversement, le phénotype contraire est observé lorsque l'activité de RUNX2 et RUNX3 est maintenue élevée de manière artificielle ^[36, 146] ou par la délétion de gènes réprimant leur activité comme *Histone Deacetylase 4* (*HDAC4*), *Cyclin D1* (*CCND1*) et *Sox9* ^[37, 38, 142]. Chez tous ces animaux, on observe, dû à la différenciation rapide des chondrocytes au détriment de leur prolifération, une accélération de l'ossification endochondrale et un défaut de formation de toutes les articulations caractérisées, entre autres, par une calcification du cartilage articulaire ^[36-38, 142]. Enfin, dans le cartilage articulaire, il est anormal de détecter RUNX2 dans les chondrocytes situés dans les zones superficielles ^[147, 148]. Par conséquent, de hauts niveaux de RUNX2 pourront être observés dans le cartilage articulaire de patients souffrant d'anomalie du cartilage articulaire telle que l'OA. Cette observation suggère donc que la différenciation anormale des chondrocytes du cartilage articulaire pourrait être un aspect important de cette maladie. Supportant cette idée, il a été montré que la délétion de RUNX2 de chondrocytes provenant de cartilage OA permet de restaurer l'expression de marqueurs associés au cartilage sain, tels *SOX9*, *COL2A1* et *ACAN*, tout en diminuant l'expression d'enzymes associées à la dégradation du cartilage comme *MMP13* ^[149].

1.5.2.2 Les facteurs extracellulaires contrôlant la biologie cartilagineuse et la chondrogenèse

1.5.2.2.1 La famille du TGFβ

Comme il a été mentionné auparavant, le contrôle spatio-temporel de la condensation des cellules mésenchymateuses, de leur différenciation en chondrocytes, de la prolifération de ces nouveaux chondrocytes et de leur différenciation terminale nécessite la

parfaite orchestration de divers facteurs solubles et voies de signalisation afin que toutes les structures osseuses soient parfaitement formées et fonctionnelles. Parmi les facteurs solubles participant à l'initiation du développement osseux, certains membres de la superfamille du TGFbeta y jouent un rôle crucial. Cette famille de cytokines est constituée de divers gènes pouvant être divisés en deux groupes basés sur les voies de signalisation qu'ils peuvent stimuler : le groupe TGFbeta/Activin/Nodal et le groupe BMP/GDF/AMH (Anti-mullerian hormone aussi nommé MIS pour Mullerian-inhibiting substance) ^[150, 151]. Afin d'induire leurs effets cellulaires, ces ligands homodimérisent et lient un récepteur sérine/thréonine kinase. Ces derniers sont des tétramères composés d'un hétérodimère d'un récepteur de type I et de type II qui eux sont composés d'un homodimère de deux protéines transmembranaires ^[150, 151]. La liaison du ligand au récepteur facilite le rapprochement des récepteurs de type I et de type II, engendrant ainsi la phosphorylation de résidus sérine du domaine GS (domaine riche en glycine et en sérine) du premier récepteur par le second ^[150, 151]. Lorsque ce domaine est activé, il y aura recrutement de protéines SMADs (SMA and MAD (mothers against decapentaplegic *Drosophila*)-related protein) afin qu'elles y soient phosphorylées, entraînant par la suite leur translocation au noyau de la cellule pour qu'elles puissent exercer leur rôle de facteur de transcription ^[150, 151]. Les SMADs forment une petite famille de facteur de transcription se divisant en trois groupes. Le premier, les R-SMADs (Receptor-regulated SMADs), sont les SMADs activées directement par les récepteurs de type I lorsque ceux-ci sont stimulés. On divise ces R-SMADs en deux sous-groupes selon quel récepteur est stimulé, soit les SMAD1/5/8 et les SMAD2/3. Le deuxième groupe nommé CO-SMAD (Co-mediator SMAD), ne comporte qu'un seul membre, SMAD4. Celui-ci agit comme co-facteur et est souvent requis pour la translocation au noyau et le bon fonctionnement des R-SMADs. Enfin, le troisième groupe, les I-SMADs (Inhibitory SMADs) regroupant les SMAD6 et 7, peuvent inhiber l'activité des R-SMADs de diverses manières ^[150, 151]. Dans les prochains paragraphes, la participation des BMPs, des GDFs et des TGFβs à la formation et à l'entretien des structures cartilagineuses sera décrite.

1.5.2.2.1.1 Les BMPs

Les BMPs, notamment BMP2, 4, 5, 6 et 7, exercent de multiples fonctions permettant le bon déroulement du développement des os par leur action sur les ostéoblastes et les chondrocytes. Dans la voie classique, ils activent les SMAD1, 5 et 8, via la liaison de trois différents récepteurs de type I et de type II: le BMPR-IA (aussi nommé ALK-3), le BMPR-IB (aussi nommé ALK-6), l'ACTR-IA (Type IA activin receptor aussi nommé ALK-2), le BMPR-II, le ACTR-IIA et le ACTR-IIB ^[150, 151]. Leur action débute dès la condensation des cellules mésenchymateuses où elles stimulent la chondrogenèse via la stimulation de l'expression et l'activité transcriptionnelle de SOX9. Pour ce faire, les BMPs favorisent l'interaction de SOX9 avec *cAMP Response Element-Binding protein* (CREB) et, probablement, avec CBP/p300 et *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Coactivator 1Alpha* (PPARGC1A) ^[133, 152-160]. Outre ce rôle des BMPs tôt dans la chondrogenèse, leur présence est également requise pour la prolifération et la différenciation terminale des chondrocytes ^[160-163]. Ainsi, globalement, les BMPs orchestrent le bon développement des os dans l'espace et dans le temps par leur contrôle exercé sur les différentes étapes de la chondrogenèse ^[160-165]. Un défaut dans cette voie de signalisation aura par conséquent, de lourdes conséquences sur le développement des os. En effet, la suppression de cette voie de signalisation chez la souris, via la délétion des gènes codant pour les récepteurs, comme BMPR-IA et BMPR-IB, ou les SMADs, notamment les SMAD1 et 5, résulte en une chondrodysplasie de sévérité variable. Ainsi, dans les cas les plus sévères, comme chez les souris knock-out conditionnelles, dans les chondrocytes, pour les gènes *Smad1/5* ou *Bmpr1a/b*, on observe un très faible taux de condensation de cellules mésenchymateuse, ce qui compromet le développement des os nécessitant une ossification endochondrale fonctionnelle ^[160, 165]. Aussi, dans les cas les moins sévères, comme lors de la délétion de *Bmpr1b* chez la souris, on observe un problème de développement de certaines articulations, notamment celles des membres supérieurs ^[166].

1.5.2.2.1.2 Le GDF5

L'implication de *GDF5*, aussi nommé *Cartilage-derived morphogenetic protein 1* (CDMP1), dans le développement de l'articulation et la chondrogenèse du cartilage articulaire, est elle aussi bien établie. Ce gène forme, avec *GDF6* et *GDF7*, un sous-groupe de gènes membres de la superfamille *TGFβ* et partageant certains récepteurs avec les BMPs [150, 151, 167]. Lorsqu'inactivé chez l'humain, *GDF5* est responsable de la dysplasie acromésomélique de type Hunter-Thompson, présentant une forme de nanisme sévère dû à un défaut du développement des structures cartilagineuses et osseuses [21]. Chez la souris, tôt dans le développement osseux, *GDF5/6/7* sont essentiellement exprimés par les chondrocytes formant le gabarit cartilagineux [168-171]. Plus tard, leur expression n'est maintenue que dans la zone intermédiaire leur permettant ainsi de participer à l'initiation du développement des articulations, notamment via leur action positive exercée sur la chondrogenèse [168-172]. Ainsi, les GDFs, notamment *GDF5*, permettent de spécifier le rôle des chondrocytes articulaires. Cette fonction est illustrée par une étude montrant que *GDF5* permet d'augmenter l'expression d'ERG, un facteur de transcription qui, rappelons-nous, permet également de spécifier les fonctions des chondrocytes articulaires [22]. Puisque le *GDF5* possède une grande similarité au niveau protéique avec les BMPs, il partage donc certains récepteurs transmembranaires. Ainsi, il a été démontré que *GDF5* active préférentiellement les récepteurs sérine/thréonine kinases contenant une sous unité BMPRII [167]. Étant donné cette spécificité pour ce type de récepteur, il n'est pas étonnant que l'expression de ces deux gènes soit adjacente lors du développement des os et que la suppression de l'un ou l'autre engendre des anomalies articulaires semblables [166]. Enfin, il est maintenant clair que *GDF5* joue un rôle essentiel dans la spécification de la fonction des chondrocytes articulaires et, par conséquent, dans le développement du cartilage articulaire. Puisqu'un grand nombre d'études a montré qu'un développement normal de l'articulation synoviale est nécessaire pour le maintien du cartilage articulaire tout au long de la vie, on peut penser que *GDF5* pourrait, directement ou non, être impliqué dans l'apparition et la progression de maladies dégénératives telle l'OA. Cette hypothèse est appuyée par la

découverte de polymorphisme nucléotidiques (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) dans le promoteur de GDF5 réduisant son expression et associés à un diagnostic OA chez l'humain ^[173-177]. Cependant, beaucoup d'éléments sont encore à découvrir concernant les gènes ciblés par le GDF5 afin de spécifier la fonction des chondrocytes articulaires. De nouvelles études sont donc nécessaires afin de mieux comprendre le rôle joué par cette cytokine dans le maintien du cartilage articulaire.

1.5.2.2.1.3 LE TGF β

Trois isoformes de TGF β ont été caractérisées à ce jour : TGF β 1, 2 et 3. Leur action lors de la formation des os est indéniable et s'effectue par leur interaction avec le récepteur TGFBR-I(ALK5)/TFGBR-II et stimulation subséquente des SMAD2 et 3 ^[150, 151]. À l'instar des autres membres de la famille, les BMPs et GDF5, TGF β semble participer à la condensation des cellules mésenchymateuses sans toutefois y avoir un rôle aussi important, puisque la délétion de TFGBR-II des membres inférieurs et supérieurs chez la souris ne compromet pas la chondrogenèse tôt lors du développement ^[178, 179]. Malgré tout, de telles souris voient leur développement osseux compromis plus tard dans leur développement embryonnaire. Ainsi, on observe que l'inactivation de cette voie de signalisation conduit à une réduction de l'expression de GDF5 dans la zone intermédiaire et à son expression ectopique, entraînant un défaut dans le développement de certaines articulations synoviales ainsi qu'une fusion de certaines d'entre elles ^[179, 180]. En plus de participer au développement, le TGF β , probablement par la stimulation du facteur de transcription Smad3, participe au maintien du cartilage articulaire de souris après leur naissance ^[181, 182]. Ainsi, les souris exprimant une forme tronquée et non fonctionnelle de Smad3 ou d'un récepteur capable de l'activer, le TGFBR-II, présentent une dégradation progressive, mais rapide, de leur cartilage articulaire. Les caractéristiques de cette détérioration du cartilage articulaire sont une diminution du contenu en protéoglycanes et l'augmentation de l'expression de *Coll10a1*. Ce phénotype semble être dû à l'augmentation du taux de différenciation terminale des chondrocytes articulaires et s'apparente à la dégradation du

cartilage articulaire de patients souffrant d'OA ^[181, 182]. Enfin, un SNP dans une région intronique de *SMAD3* a récemment été associé au risque de développement de lésions OA au niveau du genou et de la hanche ^[183]. Malgré notre ignorance de l'impact de ce SNP sur le fonctionnement de ce gène, cette étude, combinée à celle identifiant une mutation Asp197Ile dans *SMAD3* chez un patient souffrant d'OA du genou, suggère qu'une variation génétique de la voie de signalisation TGF β /SMAD3 pourrait être un facteur de risque de l'OA ^[183, 184].

1.5.2.2.2 L'axe IHH/PTHrP

Bien que les TGF β , BMPs et GDFs soient considérés comme des facteurs clés pour l'initiation de la chondrogenèse et le développement subséquent des os, leur fonction requiert, malgré tout, l'appui d'une multitude d'autres facteurs afin de bien coordonner dans l'espace et le temps ce développement osseux. Parmi ces autres facteurs, on retrouve certains ligands WNT, participant notamment au développement de l'articulation, certains FGF, appuyant le rôle des BMPs durant la chondrogenèse, ainsi que IHH et PTHrP. Ces deux derniers, IHH et PTHrP, sont les principaux facteurs qui permettent l'orchestration de la prolifération et de la différenciation des chondrocytes de la plaque de croissance (Figure 1.2). Par conséquent, leur inactivation résulte inévitablement en un lourd déficit osseux. Donc, afin de mieux comprendre et de conclure sur le développement des structures cartilagineuses, la fonction de ces deux gènes sera brièvement décrite dans le prochain paragraphe.

1.5.2.2.2.1 La PTHrP

Le *PTHrP* code pour un peptide possédant, lorsque activé, 141 acides aminés. Sa région amino-terminale présente une très forte homologie avec la PTH ^[71, 185, 186]. En fait, huit des treize premiers résidus sont identiques entre les deux peptides. Cette similarité permet à ces deux peptides d'activer le même récepteur, le PTHR1, et donc d'avoir certaines fonctions communes. Contrairement à la PTH qui exerce ses fonctions de manière

systémique, la PTHrP les exerce de manière autocrine et paracrine. Ainsi, par la stimulation du PTHR1, la PTHrP favorise la prolifération des chondrocytes et empêche leur différenciation terminale (Figure 1.2). Ces fonctions s'exercent de deux manières. Premièrement, la PTHrP induit l'expression de *CCND1*, gène essentiel à la transition G1/S du cycle cellulaire, et supprime l'expression de *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C* (CDKN1C, aussi nommé p57(KIP2)), un inhibiteur de plusieurs complexes Cyclin/CDK exprimé en G1 [187-189]. Deuxièmement, la PTHrP augmente l'activité de SOX9 par l'augmentation de sa phosphorylation en sérine 181 et en induisant la dégradation de RUNX2/3 [38, 190, 191]. Ensemble, ces effets favorisent le maintien d'un état prolifératif et empêchent le déclenchement du processus de différenciation terminale. Ainsi, dans la plaque de croissance, la PTHrP est exprimée selon un gradient décroissant allant des épiphyses vers la diaphyse. Cette diminution des niveaux de PTHrP près des diaphyses permet aux chondrocytes préhypertrophiques de former des chondrocytes hypertrophiques qui seront éventuellement éliminés et remplacés par des ostéoblastes. L'importance du contrôle de la prolifération des chondrocytes par la PTHrP est illustrée par le phénotype engendré suite à la délétion de ce gène ou de son récepteur chez la souris. Ainsi, on observe que ces délétions causent une diminution du ratio des chondrocytes prolifératifs par rapport aux chondrocytes hypertrophiques [192-195]. Ce changement conduit à une diminution de la longueur des plaques de croissance, entraînant un nanisme chez ces animaux, et une augmentation de l'ossification endochondrale. Aussi, l'abolition de la prolifération des chondrocytes entraîne le même type de conséquences sur l'organisation des os. Par exemple, la délétion de *Ccnd1* ou d'*E2f1* et *E2f3a*, deux gènes codants pour deux facteurs de transcription contrôlant l'expression de gènes essentiels à la progression du cycle cellulaire, conduit à une différenciation terminale prématurée des chondrocytes et, par conséquent, en une plaque de croissance plus courte [188, 196-198].

1.5.2.2.2 IHH

Le rôle joué par la PTHrP sur le contrôle de la prolifération/différenciation des chondrocytes est indissociable de celui exercé par IHH, une protéine synthétisée et sécrétée par les chondrocytes pré-hypertrophiques (Figure 1.2) ^[199-201]. Membre d'une petite famille de gènes comprenant aussi *Sonic Hedgehog* (SHH) et *Desert Hedgehog* (DHH), IHH participe au développement des structures cartilagineuses à deux niveaux : par la stimulation de la prolifération des chondrocytes de réserve et en supportant la différenciation terminale des chondrocytes pré-hypertrophiques (Figure 1.2) ^[199, 200, 202]. Ce premier rôle d'IHH est exercé de deux façons, soit l'augmentation de synthèse du PTHrP par les cellules adjacentes et par la stimulation directe de la prolifération des chondrocytes (Figure 1.2) ^[202-204]. Globalement, ces deux effets ont pour conséquence une forte stimulation de la prolifération des chondrocytes et une inhibition, assurées par le PTHrP, de leur différenciation ^[202, 203]. La deuxième fonction d'IHH, la stimulation de la différenciation terminale des chondrocytes, ne s'exerce que sur la population de chondrocytes matures dit préhypertrophiques (Figure 1.2). Ici, cette fonction semble dépendre de la stimulation de deux autres voies de signalisation qui sont les voies Wnt/ β -catenin et BMPs ^[205]. Ainsi, la délétion de *Ihh* ou son récepteur *Patched 1* (*Ptch1*) n'engendre que très peu d'effets lors du développement initial des os, c'est-à-dire lors de la condensation des cellules mésenchymateuses et la formation d'un gabarit cartilagineux. Toutefois, lorsque la croissance des structures osseuses devient nécessaire, on observe un sévère retard de croissance et un défaut d'ossification endochondrale, illustrant la diminution de la prolifération et de la différenciation terminale des chondrocytes, respectivement ^[202].

1.5.2.2.3 L'Axe PTHrP/IHH dans le développement et le maintien du cartilage articulaire

Bien que la plupart des études concernant la PTHrP et IHH aient permis de caractériser leurs fonctions dans le développement de la plaque de croissance, il est important de mentionner que leurs rôles s'étendent également au cartilage articulaire. Dans ces deux structures, il semble que la PTHrP et IHH aient des fonctions similaires. En effet, dans les deux cas, leur distribution est similaire, c'est-à-dire que la PTHrP est exprimée par les chondrocytes en surface de l'articulation tandis que IHH est présent au niveau des chondrocytes pré-hypertrophiques [206-210]. De plus, ces deux gènes semblent ne pas participer à la formation de la structure, mais plutôt au développement et au maintien du cartilage articulaire, comme ils le font dans la plaque de croissance [210]. Appuyant cette idée, il a été démontré que les chondrocytes se trouvant dans la SZ sont capables d'inhiber la différenciation terminale des chondrocytes de la RZ et, qu'en retour, ces chondrocytes hypertrophiques permettent l'augmentation de l'expression du PTHrP par les cellules de la SZ [211]. Cette fonction de la PTHrP et d'IHH pour le développement et le maintien du cartilage articulaire suggère qu'un défaut de synthèse ou d'activité de l'un ou l'autre pourrait conduire à un état pathologique, comme celui observé chez les individus souffrant d'OA. Cette hypothèse est appuyée par les observations faites chez des souris âgées de trois mois haploinsuffisantes pour le *Pthrp* et chez les souris *Pthrp*^{-/-} et qui présentent, toutes deux, un amaigrissement du cartilage articulaire et une diminution du nombre et du taux de prolifération des chondrocytes qui s'y trouvent [212, 213]. Également, il a été montré que la voie de signalisation IHH est fortement activée dans les chondrocytes peuplant une zone endommagée du cartilage articulaire de patients souffrant d'OA ou de souris chez lesquelles un phénotype OA a été induit [214]. Cette stimulation de la voie IHH est associée à une augmentation de marqueurs typiques de l'OA, tel *Adamts5* (*A Disintegrin-Like and Metalloproteinase with Thrombospondin Type 1 Motif 5*), *Coll10a1* et *Mmp13*, puisque la suppression de la signalisation IHH, de manière pharmacologique ou génétique, permet une

diminution de l'expression de ces marqueurs et empêche l'apparition de lésions du cartilage articulaire chez les animaux ^[214].

1.5.2.3 Conclusion de la chondrogenèse

Comme nous avons pu le voir dans cette section, l'initiation de la formation des os par la condensation des cellules mésenchymateuses et, subséquemment, la chondrogenèse et la croissance des structures cartilagineuses nécessitent l'orchestration, dans le temps et l'espace, d'une multitude de signaux activateurs et inhibiteurs. Le dérèglement de l'un de ces signaux conduit bien souvent à une désorganisation des diverses structures cartilagineuses composant l'os s'illustrant par des articulations fusionnées, des os anormalement courts, déformés ou tout simplement absents. Même à l'âge adulte, lorsque le développement et la croissance des os sont terminés et que les plaques de croissance ont été remplacées par du tissu osseux, le bon fonctionnement des chondrocytes demeure nécessaire. Il s'avère donc essentiel de connaître et de comprendre tous les mécanismes régulant la chondrogenèse et le développement des structures cartilagineuses afin d'être mieux outillé pour détecter et traiter les divers troubles osseux découlant d'une anomalie de ces structures.

1.6 Les gènes cibles à l'étude dans cette thèse

Cette dernière section présente les deux gènes dont la régulation transcriptionnelle est à l'étude dans cette thèse. Le premier, *PHEX*, assure une minéralisation adéquate de la matrice extracellulaire par les ostéoblastes et est nécessaire pour le maintien du phosphate à des niveaux normaux dans le sang. Le deuxième, *PITX1*, participe au développement de certains os lors de l'embryogenèse. Aussi, ces deux gènes sont essentiels, chez l'adulte, au maintien de l'homéostasie du tissu osseux. Ainsi, leur expression, autant durant l'embryogenèse qu'à l'âge adulte, se doit d'être parfaitement régulée afin qu'ils puissent exercer leurs fonctions au moment opportun.

1.6.1 PHEX

Phosphate-regulating gene with homology to endopeptidase on the X chromosome (PHEX, à l'origine nommé PEX) est situé, comme son nom l'indique, sur le chromosome X et code pour une glycoprotéine transmembranaire de type II. Cette protéine est membre de la famille M13 des métallopeptidases dont l'activité dépend du zinc ^[215]. Cette famille, qui comprend également les gènes *MME* (*Membrane metalloendopeptidase*, aussi nommé *NEP*) ^[216, 217], *ECE1*, *ECE2* (*Endothelin-converting enzyme 1 and 2*) ^[218, 219], *KEL* (*Kell blood group metallo-endopeptidase*) ^[220, 221], *ECEL1* (*Endothelin-converting enzyme-like 1*) ^[222] et *MMEL1* (*Membrane metallo-endopeptidase-like 1*, aussi nommé *SEP*, *NLI* ou *MMEL2*) ^[223], est caractérisée par la présence d'un domaine HExxH et un motif consensus ExxA/GD permettant la liaison du zinc ^[224, 225]. Ces peptidases exercent un grand nombre de fonctions dans l'organisme, allant de la dégradation de neurotransmetteurs jusqu'au contrôle des niveaux sanguins de sodium et de calcium.

1.6.1.1 Le syndrome d'hypophosphatémie lié au chromosome X

Dans le passé, il a été démontré qu'une mutation empêchant l'expression membranaire ou l'activité de *PHEX* cause un syndrome, chez l'homme, nommé Hypophosphatémie lié au chromosome X (*X-linked hypophosphatemia*, XLH). Cette maladie dominante est essentiellement caractérisée par deux types d'anomalie : l'une osseuse et l'autre métabolique. Les anomalies osseuses sont illustrées par un retard de croissance, un défaut de la minéralisation des dents et des os (ostéomalacie), spécialement dans les régions entourant les ostéocytes. Les anomalies métaboliques, elles, se caractérisent par une hypophosphatémie due à une perte excessive de phosphate dans les urines et par une concentration anormalement faible en $1\alpha\text{-}25(\text{OH})_2\text{D}_3$, considérant que l'hypophosphatémie devrait normalement augmenter ses niveaux (Figure 1.7) ^[226].

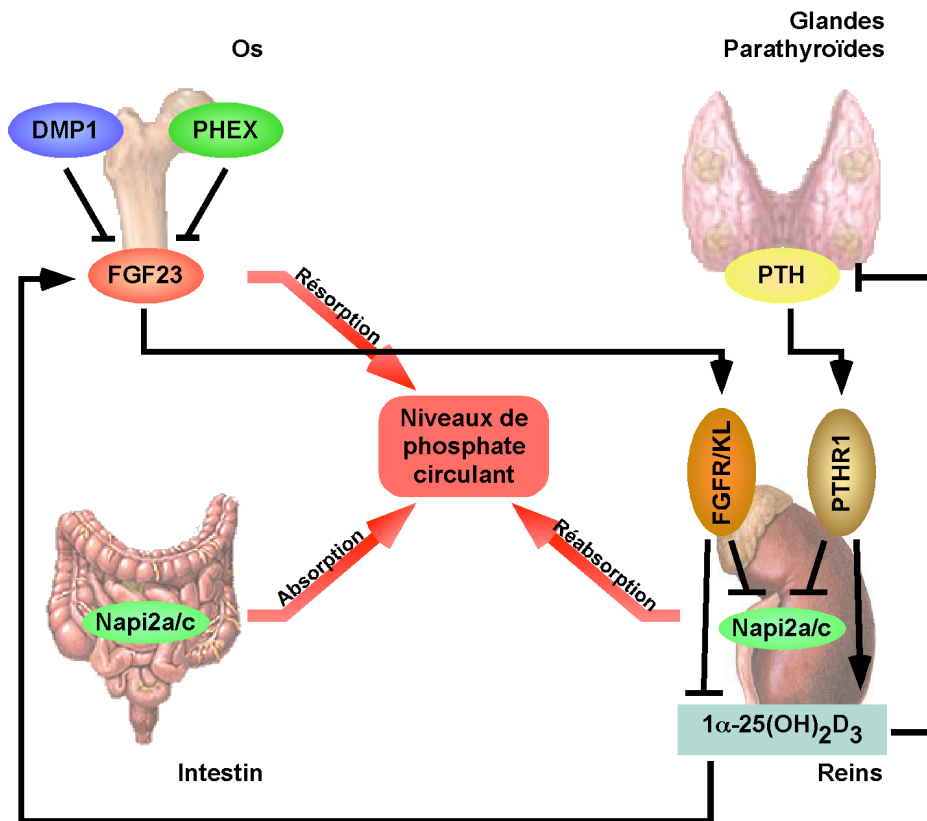


Figure 1.7 Schéma résumant le rôle exercé par PHEX sur le contrôle des niveaux de phosphate sanguin.

En réponse à une diminution du phosphate, les niveaux normaux sont rétablis par trois principaux moyens. Il y a absorption du phosphate au niveau du tube digestif, réabsorption du phosphate, via les cotransporteurs Napi-2a et NaPi-2c, au niveau des reins et extraction du phosphate, via l'activité résorbitive des ostéoclastes, au niveau des os. Dans le cas d'une mutation du gène *PHEX*, on observe une augmentation de l'expression de FGF23 circulant qui conduit à la diminution de l'expression de Napi-2a et NaPi-2c et, par conséquent, à une perte anormalement élevée de phosphate dans les urines. Schéma inspiré de Bergwitz et Jüppner, 2010 ^[73].

Ainsi, bien que les fonctions spécifiques de PHEX ne soient pas encore parfaitement définies, il reste clair que ce gène occupe une fonction importante dans la régulation du phosphate sanguin et lors de la minéralisation des os et des dents (Figure 1.7). Cette idée est aussi supportée par la découverte de souris présentant le même type d'anomalie que le syndrome XLH. Ces souris, nommées Hyp, Gy, Ska1, Phex^{Hyp-J2}, Phex^{Hyp-Duk} et Phex(pug), présentent toutes des mutations ou délétions du gène *Phex* et sont maintenant utilisées comme modèle pour l'étude de cette maladie^[227-231].

Au cours des dernières années, bon nombre d'études ont tenté de comprendre quels étaient les événements entraînant cette sévère hypophosphatémie et ostéomalacie lors de la perte d'activité de PHEX. Ainsi, quelques gènes candidats ont été considérés, en raison du fait qu'ils sont induits lors du XLH et/ou qu'ils entraînent une excrétion anormale de phosphate par les reins. Ainsi, parmi les protéines potentielles, soit FGF23, FGF7, sFRP4 (*Secreted Frizzled-Related Protein 4*) et MEPE, deux ont plus particulièrement été étudiées, c'est-à-dire MEPE et FGF23^[232-235]. Ici, le principe général veut que PHEX soit en mesure de cliver et d'inactiver de tels substrats et, par le fait même, d'augmenter l'absorption du phosphate par les reins, ce qui permet la minéralisation de la matrice extracellulaire osseuse.

1.6.1.2 Les substrats de PHEX

Le premier substrat potentiel de PHEX est MEPE^[236]. MEPE, dont l'expression est augmentée dans les cas de XLH et chez les souris Hyp, est capable d'inhiber la minéralisation des os par son interaction avec les cristaux d'hydroxyapatite^[232, 236-239]. Plus précisément, cette action inhibitrice est assurée par un peptide MEPE contenant un motif ASARM (peptide MEPE/ASARM) libéré par l'action de la cathepsine B^[237]. Ainsi, PHEX est capable de cliver ce peptide empêchant ainsi son action inhibitrice sur la minéralisation^[236]. Plus récemment, il a également été montré que PHEX est capable de dégrader un autre peptide ASARM, mais celui-ci dérivé de la protéine OPN (peptide OPN/ASARM), une

autre protéine dont l'expression est augmentée dans le syndrome XLH ^[240, 241]. Puisque ce peptide semble inhiber la minéralisation de la même manière que MEPE/ASARM, ces deux études suggèrent que l'ostéomalacie observée lors du XLH et chez les souris *Hyp* est due à leur accumulation anormale dans le tissu osseux ^[236, 240]. Malgré tout, cette accumulation, dans le tissu osseux, de peptides contenant un motif ASARM, notamment celle de MEPE/ASARM, ne semble pas expliquer tous les éléments phénotypiques caractéristiques du XLH puisque l'inhibition du clivage de MEPE pleine longueur par la Cathepsin B, qui permet de générer le peptide MEPE/ASARM, ne corrige qu'en partie les anomalies osseuses ^[239]. Aussi, la délétion du gène *Mepe* chez la souris *Hyp* (Souris *Mepe*^{-/-}*Hyp*) ne permet pas de corriger l'hypophosphatémie et l'ostéomalacie observée chez la souris *Hyp* ^[242]. Ensemble, ces résultats suggèrent que MEPE n'est pas le principal facteur mis en cause dans le syndrome XLH. Ainsi, d'autres substrats de PHEX restent à être découverts.

La seconde protéine ayant été considérée comme un substrat potentiel de PHEX est le FGF23. Cette protéine agit essentiellement au niveau des cellules du tubule proximal du rein via un récepteur tétramérique composé de deux sous-unités *Klotho* et deux *FGFR1c*, *FGFR3c* ou *FGFR4* ^[243, 244]. Chez ces cellules, le FGF23 entraîne une diminution de l'expression des cotransporteurs *Napi-2a* et *NaPi-2c*, conduisant à une diminution de la réabsorption du phosphate et à sa perte dans les urines (Figure 1.5 et 1.7) ^[245-247]. Étant donné cette fonction et puisque cette protéine est anormalement élevée dans le sang des patients souffrant du XLH, il n'est pas étonnant qu'elle soit largement responsable du phénotype typique de cette maladie ^[248, 249]. En effet, la délétion de *Fgf23* ou de son co-récepteur *Klotho* chez les souris *Hyp* permet de rétablir les niveaux de phosphates sanguin ainsi que certaines anomalies osseuses caractéristiques du XLH ^[250-252]. Pour toutes ces raisons, FGF23 à longterm a été considéré comme un substrat potentiel de PHEX. Toutefois, bien qu'un groupe ait observé que le FGF23 puisse servir de substrat à la peptidase, cette hypothèse semble être fautive puisque d'autres, par des études plus complètes, ont démontré le contraire ^[253-255]. Ainsi, encore à ce jour, le lien entre

l'augmentation anormale de FGF23 et la perte d'activité ou d'expression de PHEX demeure obscur et nécessite de plus amples recherches.

1.6.1.3 La distribution de l'expression de PHEX dans l'organisme

Le rôle de PHEX dans le métabolisme osseux et le processus de minéralisation du tissu osseux est également soutenu par la distribution tissulaire de cette protéine à travers l'organisme. En effet, diverses études ont montré que PHEX est majoritairement exprimée dans les structures minéralisées tels les dents et les os, et ce, essentiellement par les odontoblastes (cellules semblable aux ostéoblastes permettant la minéralisation des dents) et les ostéoblastes, respectivement [231, 256, 257]. Aussi, il semble que dans ce tissu, la régulation de *PHEX* soit sous le contrôle de mécanismes participant à la différenciation et à la minéralisation des ostéoblastes, puisque l'expression de ce gène corrèle avec le début de la minéralisation osseuse durant l'embryogenèse ainsi qu'avec la minéralisation de cultures d'ostéoblastes *in vitro* [256, 258]. Toutefois, il est important de mentionner que la distribution de PHEX à travers l'organisme n'est pas restreinte au tissu osseux. En effet, il est possible de détecter *PHEX* dans les ovaires, les glandes parathyroïdes, le cerveau, les poumons, le foie ainsi que les muscles [231, 259, 260]. Bien que les niveaux de PHEX détectés dans ces autres tissus restent rares par rapport à ceux trouvés dans le tissu osseux, cette observation suggère néanmoins que PHEX puisse participer à d'autres fonctions physiologiques.

1.6.1.4 Les mécanismes d'activation transcriptionnelles de *PHEX*

Aussi, toujours dans le but de mieux comprendre le rôle de PHEX dans la minéralisation osseuse et dans le contrôle du calcium et du phosphate sanguin, plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes transcriptionnels contrôlant son expression. Puisque l'expression de PHEX est induite lors de la différenciation d'ostéoblastes et qu'elle culmine au moment où la minéralisation s'amorce, la plupart des études entreprises ont évalué l'impact de facteurs capables de réguler la minéralisation osseuse sur l'expression de PHEX [258]. Ainsi, il a été démontré que l'exposition d'ostéoblastes de rat au

dexaméthasone, un glucocorticoïde affectant l'activité des ostéoblastes, entraîne une élévation des niveaux de *PHEX* via le recrutement de RUNX2 à son promoteur ^[261-263]. Cette étude suggère donc que RUNX2 pourrait participer à l'induction de l'expression de *PHEX* lors de la différenciation des ostéoblastes. Également, d'autres études ont permis d'identifier *PHEX* comme une cible transcriptionnelle de deux hormones exerçant une fonction anabolique sur le tissu osseux, l'IGF1 et la GH ^[264-266]. Il est intéressant de mentionner que cette régulation n'est pas spécifique au tissu osseux, puisque les auteurs ont découvert que *PHEX* voyait aussi son expression augmentée dans les poumons. Bien qu'aucun mécanisme d'activation précis n'a été découvert pour expliquer cette régulation, ces résultats suggèrent l'implication de facteurs ubiquitaires et non pas tissus-spécifiques comme RUNX2. Aussi, bien que l'expression de *PHEX* dans le tissu osseux soit, tel que mentionné plus tôt, assurée essentiellement par les ostéoblastes et les odontoblastes, il est possible de détecter cette protéine dans les chondrocytes prolifératifs et, plus fortement, dans les chondrocytes hypertrophiques de la plaque de croissance et du cartilage ^[267-269]. Les mécanismes transcriptionnels responsables de la présence de *PHEX* dans ces cellules ne sont toujours pas clairs, mais il est vraisemblable que SOX9 puisse participer à cette régulation, puisque ce facteur de transcription est capable d'induire l'expression de *PHEX in vitro* ^[107]. De plus, étant donné que l'activité de SOX9 soit nulle dans les chondrocytes hypertrophiques, il est possible que RUNX2, comme il le fait dans les ostéoblastes, participe à cette régulation transcriptionnelle ^[263]. La présence de *PHEX* dans les chondrocytes de la plaque de croissance suggère qu'elle exerce un rôle dans le développement de cette structure et pourrait être impliquée dans le processus d'ossification endochondrale. Cette idée est supportée par le rachitisme observé chez les individus souffrant du XLH et la souris *Hyp* ^[226, 227, 231]. De plus, l'impossibilité de corriger le phénotype osseux des souris *Hyp* en les croisant avec des souris surexprimant *Phex* dans leurs ostéoblastes soutient l'hypothèse voulant que *PHEX* exerce une fonction spécifique au niveau des chondrocytes ^[270-272]. Il a aussi été tenté de corriger les anomalies de la plaque de croissance des souris *Hyp* en les croisant avec une souris transgénique exprimant *Phex*

sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression ubiquitaire, comme celui de *Actin Beta* (ACTB) ^[273]. Encore ici, la correction n'est que partielle. Cependant, il demeure important de considérer l'état hypophosphatémique dont souffrent ces animaux, puisque le niveau circulant normal en phosphate semble nécessaire pour le bon déroulement du processus d'apoptose des chondrocytes hypertrophiques ^[274]. Ensemble, ces études suggèrent un rôle spécifique de PHEX au niveau des chondrocytes de la plaque de croissance et du processus d'ossification endochondrale.

1.6.1.5 Les mécanismes de répression transcriptionnelle de *PHEX*

Outre les mécanismes d'activations de *PHEX*, d'autres capables de réprimer son expression ont aussi été découverts. Ainsi, il a été observé que la 1α -25(OH)₂D₃ réduit l'expression de *PHEX* ^[110, 115, 258]. Le mécanisme responsable de cette répression n'est toutefois pas encore clair. En effet, dans le passé un groupe a observé qu'un traitement à la 1α -25(OH)₂D₃ induit le départ d'une protéine de 110 kDa d'un élément poly-adénine présent sur le promoteur de PHEX ^[110]. Récemment, ce même groupe a caractérisé cette protéine de 110 kDa pour découvrir qu'elle est la *Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1* (PARP1), une ADP ribosyltransférase impliquée, entre autres, dans la régulation transcriptionnelle de divers gènes ^[275, 276]. Toutefois, selon le même groupe, il s'avère que PARP-1 est associée, aidée de NF-KB, à la répression de PHEX lorsque les ostéoblastes sont exposés au TNF α ^[276]. De plus, étrangement, la délétion de PARP1 d'ostéoblastes murins ne semble pas affecter les niveaux endogènes de PHEX ^[276]. D'autres expériences sont donc nécessaires afin de valider cette implication de PARP1 dans la répression de PHEX par la 1α -25(OH)₂D₃. Enfin, il a également été montré que la PTH et la PTHrP sont aussi capables de réprimer l'expression de *PHEX* ^[276-278]. Cette répression nécessite l'activation d'une protéine G α s par le PTHR1 et, donc, une stimulation des *Adenylate cyclases* (ADCYs) suivie d'une augmentation des niveaux d'AMPc. Ici, la stimulation de la G α q par le PTHR1 n'est pas requise pour transmettre cet effet ^[277]. Néanmoins, mise à part la stimulation des ADCYs, les autres détails mécanistiques découlant de cet effet restent

inconnus pour expliquer cette répression. Puisqu'une activité normale de PHEX est nécessaire pour la minéralisation du tissu osseux, cette observation suggère que cette répression soit nécessaire afin que la PTH et la PTHrP puisse exercer leur l'action catabolique sur le tissu osseux. De plus, ce contrôle de PHEX pourrait être un mécanisme de rétro-répression suite à l'augmentation du phosphate sanguin induit par une hausse du PTH. Toutefois, ces fonctions sont toutes spéculatives et d'autres études s'avèrent nécessaires pour attribuer une fonction physiologique à cette régulation de PHEX.

1.6.1.6 Conclusion sur *PHEX*

Bien que le ou les rôles spécifiques de PHEX restent à être définis, son implication dans la minéralisation osseuse et le contrôle des niveaux de phosphate sanguin est indéniable. Concordant avec ses fonctions, la régulation de PHEX semble classique lorsqu'on la compare avec d'autres gènes exerçant des fonctions similaires. En effet, son expression précède l'apparition de tissu minéralisé et est probablement sous le contrôle de l'activité du facteur de transcription RUNX2. De plus, son contrôle par des hormones et protéines impliquées dans le développement et le remodelage osseux suggère qu'un contrôle fin de cette protéine est nécessaire pour un développement normal des os. Supportant cette hypothèse, la perte d'expression d'un allèle de PHEX chez les souris femelles est suffisante pour induire un phénotype osseux semblable à celui retrouvé chez les mâles^[279]. Il s'avère donc important de bien connaître la régulation de PHEX afin de mieux définir ses fonctions et, ainsi, de comprendre la régulation complexe de la minéralisation et du contrôle du phosphate sanguin.

1.6.2 PITX1

Le gène *PITX1* (*Paired-like homeodomain transcription factor 1*), ainsi que ses deux homologues *PITX2* et *PITX3*, codent pour des facteurs de transcription à homéodomaine semblables au morphogène *bicoid* chez la Drosophile^[280]. Lors de l'état

embryonnaire, PITX2 joue un rôle très large en participant au développement de plusieurs structures, tandis que PITX1 et PITX3 exercent des rôles plus spécialisés, restreints à quelques tissus ^[280]. Plus spécifiquement, *PITX1* est nécessaire pour le développement adéquat de la glande hypophyse, des dents, de la mâchoire et des membres inférieurs ^[281-285]. Ainsi, les souris *Pitx1*^{-/-} présentent un phénotype caractérisé par une courte mandibule, notamment due à une mauvaise croissance de la région proximale de celle-ci, ainsi que par des membres inférieurs anormalement courts et présentant de sévères perturbations du développement des articulations ^[283, 285]. Aussi, chez ces souris, on note que le membre inférieur droit est plus sévèrement atteint que le membre gauche, un phénomène attribuable à PITX2, dont le patron d'expression est asymétrique (expression plus forte du côté gauche, au niveau de la plaque latérale du mésoderme chez l'embryon en développement) et dont la fonction est redondante à celle de PITX1 ^[283, 284]. Il faut aussi mentionner que les anomalies du squelette périphérique observées chez les souris *Pitx1*^{-/-} sont restreintes aux membres inférieurs ^[283, 284].

L'apparence des membres inférieurs des souris *Pitx1*^{-/-} en dit beaucoup sur la fonction de ce gène. La taille du tibia, de la fibula et du fémur est réduite, ce qui engendre une morphologie des membres inférieurs proche de celle des os longs des membres supérieurs ^[283, 284]. Cette diminution de la croissance longitudinale est la conséquence d'une hypertrophie prématurée des chondrocytes de la plaque de croissance ^[283]. De plus, on note que l'architecture du genou est simplifiée, ce qui lui donne une apparence de coude ^[283]. En effet, les genoux des souris *Pitx1*^{-/-} présentent moins de cartilage dans les régions distales du fémur et proximale du tibia et une absence de la patella et de la fibula ^[283]. Globalement, ces observations suggèrent que PITX1 permet l'attribution de l'identité des membres inférieurs et qu'il est essentiel au développement normal des os et des articulations de ceux-ci. Cette fonction de PITX1 est aussi appuyée par les résultats obtenus lorsque l'on force l'expression de PITX1 dans les membres supérieurs. Ainsi, chez ces animaux, l'ulna adopte une morphologie s'apparentant au tibia, notamment en raison de l'absence de l'olécrâne (extrémité proximale de l'ulna) et les poignets adopteront une morphologie semblable à

celle des chevilles ^[286]. De plus, lors du développement de ces membres supérieurs on observe l'expression atypique de marqueur normalement détectés dans les membres inférieurs uniquement tels *Hoxc10* et *Tbx4* ^[286]. Dans l'ensemble, ces changements supportent un rôle de PITX1 dans l'attribution de l'identité des membres inférieurs.

Les animaux haploinsuffisants pour *Pitx1* présentent aussi quelques anomalies des membres inférieurs. En effet, on observe chez des souris *Pitx1*^{+/-} âgées une augmentation du volume de l'os sous-chondral et l'amincissement et la calcification anormale du cartilage articulaire ^[287]. Cette calcification est aussi accompagnée par une accumulation de chondrocytes hypertrophiques dans cette structure, rappelant le phénotype retrouvé dans les cas d'OA ^[287]. À cet égard, les chondrocytes extraits du cartilage articulaire de patients souffrant d'OA présentent des niveaux anormalement bas de PITX1, indiquant une probable implication de cette protéine dans l'apparition et/ou la progression de cette maladie ^[287]. Ainsi, ces anomalies cartilagineuses, combinées aux observations réalisées chez les souris *Pitx1*^{-/-} présentant une chondrodysplasie, suggèrent que ce gène est essentiel pour assurer le déroulement normal de la chondrogenèse ^[283, 285, 287]. En support à cette hypothèse, les anomalies des structures cartilagineuses retrouvées chez les souris *Pitx1*^{-/-} sont semblables à celles qui sont observées chez les souris *Sox9*^{fllox/fllox}; *Col2a1-Cre* (ablation de *Sox9* dans les chondrocytes après la condensation des cellules mésenchymateuses) et qui présentent, elles aussi, une sévère chondrodysplasie ^[127]. Malgré tout, d'autres études sont nécessaires afin d'attribuer un rôle spécifique à PITX1 dans le contrôle direct de la prolifération et de la différenciation des chondrocytes.

Lors des dernières années, un nouveau rôle attribué à PITX1, supportant son implication dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire, a été caractérisé. Ainsi, il a été démontré que PITX1 peut agir en tant que suppresseur tumoral en inhibant l'activation de l'oncogène RAS via l'activation de la transcription de *RASAL1*, une GAP (*GTPase activating protein*), et par la stimulation transcriptionnelle de *p53*, un autre suppresseur tumoral ^[288, 289]. Enfin, supportant toujours l'implication de PITX1 dans le

contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules, deux groupes ont identifié, par l'utilisation de micro-puces d'ADN, que les facteurs de transcription E2F1, E2F2 et E2F3 sont capables de stimuler la transcription de *PITX1*. De plus, dans ces cellules, la même stimulation est aussi capable d'induire l'expression de *SOX9* et d'*EGR1*, ce dernier étant un partenaire de PITX1 dont le rôle sera plus largement abordé dans le paragraphe suivant ^[290]. Ces résultats, combinés aux observations réalisées chez les animaux *E2f1*^{-/-} et *E2f3a*^{-/-} ^[198], suggèrent un rôle pour PITX1 dans l'orchestration de la chondrogenèse.

1.6.2.1 Les partenaires de PITX1

PITX1 active et réprime ses gènes cibles par son interaction avec leur promoteur via des éléments de réponses nommés bLCE (un élément de réponse s'apparentant à celui de *bicoid*, *bicoid*-like cis-elements) présentant généralement la séquence 5'-TAAT/GCC/T-3' ^[291-293]. Sa fonction d'activateur et de répresseur transcriptionnel peut être régulée par son interaction avec divers partenaires tels EGR1, SEDLIN, SF1, c-JUN, IRF3, IRF4, SMAD2, SMAD3 et SMAD4 ^[294-301]. À l'instar de PITX1, certains de ces partenaires, comme EGR1 et les SMADs, se sont vus attribuer un rôle dans le développement et l'homéostasie des os. Ainsi, les SMADs, tel que décrit plus tôt dans cette introduction, sont essentiels pour le bon déroulement de toutes les étapes de la chondrogenèse et ils sont requis pour le maintien de l'intégrité du cartilage articulaire durant l'âge adulte. Pour ce qui est d'EGR1, il est également exprimé tout au long de la chondrogenèse et une diminution de son expression dans les chondrocytes pré-hypertrophiques est associée à un diagnostic d'OA ^[302, 303]. De plus, dans les cellules musculaires, ce facteur de transcription est capable d'augmenter l'expression de p57(Kip2), ce qui entraîne un arrêt de croissance et favorise donc une différenciation cellulaire ^[304]. Même si d'autres études sont nécessaires, un tel rôle dans les chondrocytes serait probable puisque EGR1 est capable de diminuer l'expression de marqueurs de chondrocytes prolifératifs tels *COL2A1* et *ACAN* ^[305, 306].

1.6.2.2 Les mécanismes transcriptionnels contrôlant l'expression de *PITX1*

À ce jour, les mécanismes régulant la transcription de *PITX1* restent méconnus. En fait, la plupart des informations disponibles ne sont que des associations entre l'expression d'un activateur ou répresseur potentiel et celle de *PITX1*. Par exemple, il a été démontré que l'expression de BMP4 dans les cellules mésenchymateuses de la mandibule est accompagnée d'une disparition de l'ARNm de *PITX1* dans ces mêmes cellules ^[285, 307]. L'inverse a également été démontré pour FGF8 dont l'expression semble associée à une forte expression de *PITX1* ^[307]. Toutefois, tel que mentionné plus haut, il ne s'agit que de corrélations entre deux événements et il serait précipité de considérer ces effets comme directs. En effet, ces changements dans l'expression de *PITX1* pourraient n'être que le résultat de l'activation d'une cascade de voies de signalisation ou, encore, le reflet d'un changement de la spécification des cellules peuplant cette structure. Or, la seule démonstration d'un régulateur transcriptionnel agissant directement sur *PITX1* est venue d'une étude portant sur la dystrophie musculaire facioscapulohumérale (FSHD) ^[308]. Les résultats présentés par Dixit et ses collègues montrent que *Double Homeobox Protein 4* (DUX4) est recruté au promoteur de *PITX1* et induit son expression dans une lignée cellulaire de myoblastes, les cellules C2C12 ^[308]. Cette interaction entre DUX4 et le promoteur de *PITX1* se fait via un élément de réponse, dont la séquence est 5'-TAATTA-3', situé à environ 700 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription ^[308].

1.6.2.3 Le rôle de *PITX1* dans les pathologies musculosquelettiques humaines

Afin de mieux définir les rôles du facteur de transcription *PITX1*, la plupart des études ont été, dans le passé, réalisées avec des modèles animaux. Comme il a été décrit dans les paragraphes précédents, l'ensemble de ces travaux montrent que *PITX1* est impliqué dans l'identité des membres inférieurs et le bon développement de ceux-ci. Récemment, trois nouvelles études ont permis de confirmer que *PITX1* joue également un tel rôle chez l'humain. Ainsi, un gain ou une perte d'expression et d'activité de *PITX1* est associé à un défaut dans le développement et le maintien des différentes structures

musculoquelettiques tels les os, le cartilage articulaire et les muscles ^[287, 308, 309]. Cette fonction de PITX1 chez l'humain permet donc de l'associer à des pathologies comme l'OA, la FSHD et une malformation congénitale nommée *Clubfoot* (aussi nommée *Talipes Equinovarus*) ^[287, 308, 309]. Par conséquent, ces études, combinées à celles réalisées chez les modèles animaux, montrent que le contrôle spatio-temporel de l'expression de *PITX1* s'avère une étape cruciale dans le développement et l'homéostasie des membres inférieurs.

1.6.2.4 Conclusion sur *PITX1*

On connaît à la fois, beaucoup et peu de choses à propos de PITX1. Les études réalisées chez les animaux knock-out ont apporté beaucoup d'information sur l'implication de ce facteur de transcription dans la genèse et l'identité des membres inférieurs ainsi que dans le développement des os. Toutefois, étant donné la sévérité du phénotype des animaux *Pitx1*^{-/-} et celui très léger présenté par les souris hétérozygotes, beaucoup de questions demeurent quant à ses rôles spécifiques. L'élaboration d'animaux knock-out spécifiques à certains types cellulaires tels les chondrocytes de la plaque de croissance ou de l'articulation pourrait nous en apprendre davantage sur ses fonctions. Aussi, comme le démontrent les études forçant l'expression ectopique de *Pitx1* dans les membres supérieurs, le contrôle spatio-temporel de ce facteur de transcription semble nécessaire pour assurer le développement adéquat des membres. Une telle conclusion peut aussi être tirée des observations faites dans certaines pathologies où on note une perte ou un gain d'expression de *PITX1*. Ainsi, une meilleure connaissance des régulateurs transcriptionnels agissant directement sur *PITX1* apparaît essentiel pour la compréhension de sa fonction.

1.7 Justification du projet de recherche

Les dernières décennies ont permis de caractériser un large éventail de mécanismes impliqués dans le développement, le maintien de l'intégrité, la réparation et les fonctions métaboliques des os. Parmi ces mécanismes, nous savons maintenant que le facteur de

transcription *PITX1* exerce d'importantes fonctions dans le développement et l'homéostasie du cartilage articulaire, et que la peptidase *PHEX* joue un rôle dans la minéralisation des os et le contrôle des niveaux de phosphate circulant.

L'expression et l'activité des protéines sont régulées à différents niveaux. En effet, les niveaux d'expression d'une protéine peuvent être régulés au niveau transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel. Ces différents mécanismes permettent la variation de l'expression des protéines dans l'ensemble de la cellule ou dans un compartiment cellulaire spécifique comme le noyau, le cytoplasme, la membrane cytoplasmique ou la mitochondrie. Cette régulation de l'expression/localisation des protéines est important puisqu'un défaut dans l'un de ces mécanismes de contrôle peu engendrer de sévères conséquences sur l'homéostasie ou le développement d'un tissu. Par exemple, dans le cas de *PITX1*, une diminution de son expression dans les chondrocytes articulaires conduit à une détérioration prématuré de ce tissu. Pour ce qui est de *PHEX*, son absence conduit à une sévère hypophosphatémie et une ostéomalacie. Puisque peu de choses sont connues sur les mécanismes qui conduisent à une diminution de l'expression de ces deux gènes, cette thèse propose de caractériser certains d'entre eux.

Comme il a été démontré dans cette introduction, la régulation transcriptionnelle joue un rôle centrale dans plusieurs étapes du développement et de l'homéostasie des os. Aussi, nous croyons que des complexes répresseurs sont responsables de la diminution de l'expression de *PITX1* dans les chondrocytes OA et de *PHEX* en réponse à la PTHrP. Ainsi, l'objectif général de cette thèse est de caractériser de nouveaux mécanismes transcriptionnels impliqués dans le développement et l'homéostasie des os. Plus précisément, le premier objectif spécifique est de découvrir les mécanismes transcriptionnels qui entraînent la répression de *PITX1* dans les chondrocytes articulaires provenant de patients souffrant d'OA. Par la suite, le deuxième objectif spécifique est de découvrir les mécanismes transcriptionnelles impliqués dans la répression de *PHEX* par la PTHrP(1-34).

Les deux prochains chapitres de cette thèse correspondent au manuscrit décrivant le mécanisme impliqué dans la répression de *PITXI* dans les chondrocytes OA et à celui décrivant le mécanisme responsable de la répression de *PHEX* par la PTHrP. Ces deux chapitres sont précédés par une préface dans laquelle chaque manuscrit est présenté et où la contribution technique de chaque auteur est décrite. Ces deux chapitres sont suivis de la discussion. La discussion est divisée en trois sections. La première section discute des résultats de l'étude portant sur la répression de *PITXI* dans les chondrocytes OA. La deuxième section discute des résultats de la répression de *PHEX* par la PTHrP. Enfin, la troisième section propose des hypothèses permettant d'unifier ces deux études. Il est important de souligner que ces deux études ont été effectuées dans deux laboratoires différents où les intérêts de recherche sont différents. Il s'avère donc difficile de formuler une seule conclusion. Toutefois, puisque les mécanismes agissant sur le tissu osseux sont capables d'agir à différents niveaux, il est possible d'émettre quelques hypothèses qui permettent d'unifier ces deux études. Ainsi, les mécanismes découverts, notamment ceux contrôlant l'expression de *PHEX*, pourrait s'avérer intéressants dans le contexte de l'OA.

Préface au chapitre 2

L'OA est une pathologie caractérisée par une détérioration du cartilage articulaire. L'âge, le sexe, le poids et certains facteurs génétiques peuvent augmenter son incidence, ce qui en fait une maladie multifactorielle. Les modèles animaux ont servi à l'identification de nouveaux gènes impliqués dans l'apparition ou la progression de l'OA. L'étude présentée dans ce chapitre est née d'une telle observation. En effet, dans une étude précédente à celle-ci, il a été démontré que les souris *Pitx1*^{-/-} âgées de 7 mois présentent des changements, au niveau du cartilage articulaire, semblables à ceux observés chez les patients souffrant d'OA. Aussi, dans cette même étude, il a été observé que les chondrocytes articulaires de patients OA présentent une forte diminution de l'expression du facteur de transcription *PITX1* comparativement aux sujets sains chez qui les niveaux de *PITX1* demeurent détectables. Ces résultats ont amené à formuler l'hypothèse selon laquelle un mécanisme transcriptionnel unique est responsable de la répression de *PITX1* dans les chondrocytes de patients OA. L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre est donc d'identifier les mécanismes responsables de l'expression de *PITX1* dans un contexte sain et de sa répression dans un contexte d'OA.

Ce chapitre est présenté sous forme d'article. Cet article a été soumis pour la première fois au *Journal of Clinical Investigation* en août 2010 avant d'être refusé quelques jours plus tard. En date du 10 avril 2011, cet article n'a toujours pas été soumis une seconde fois. Une nouvelle soumission est prévue pour mai 2011 dans le *Journal EMBO*. Ce projet a été entrepris dans le laboratoire du docteur Alain Moreau et c'est déroulé de mai 2007 à décembre 2010. Il a été initié suite à la découverte, par Cynthia Picard, d'un recrutement de la protéine PHB1 au promoteur de *PITX1* dans les chondrocytes de patients OA. Ma contribution aux résultats de cet article est équivalente à celle de Cynthia Picard. Nous devons donc être chacun considérés comme premier auteur. Dans l'ensemble, j'ai effectué toutes les expériences de gène rapporteur, tous les essais de capture par l'ADN (*DNA pull-down*), toutes les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), les expériences de siRNA contre *TFDPI*, certaines expériences de siRNA contre *PHB1* et certaines expériences de PCR

en temps réel réalisées dans les chondrocytes de sujets sains et de patients OA. Cynthia Picard a exécuté toutes les immunohistochimies, certaines immunofluorescences, certaines expériences de PCR en temps réel réalisées dans les chondrocytes de sujets sains et de patients OA, quelques expériences d'isolement de noyaux, l'essai de capture par l'ADN qui a mené à l'identification de PHB1 par spectrométrie de masse, les expériences de retard sur gel et toutes les analyses de SNP de *PITXI* et *PHB1*. Le docteur Maryan Taheri a réalisé quelques expériences de siRNA contre *PHB1* et a aidé à l'extraction des chondrocytes articulaires des échantillons de cartilage articulaire. Roxanne Doucet a réalisé quelques expériences d'immunofluorescence et quelques expériences d'isolement de noyaux. Le docteur DaShen Wang a extrait la majorité des chondrocytes articulaires des échantillons de cartilage articulaire OA. Le docteur Patrick Lavigne est le chirurgien qui a fourni les échantillons de cartilage articulaire OA. Enfin, le docteur Alain Moreau est le superviseur principal du projet.

Chapitre 2

L'accumulation nucléaire de la Prohibitine dans les chondrocytes articulaires contribue à la pathogenèse de l'ostéoarthrite par la répression de *PITX1*

2.1 Article 1

NUCLEAR ACCUMULATION OF PROHIBITIN IN HUMAN ARTICULAR CHONDROCYTES CONTRIBUTES TO OSTEOARTHRITIS PATHOGENESIS THROUGH PITX1 REPRESSION

Martin Pellicelli,^{1,2} Cynthia Picard,^{1,2} Maryam Taheri,¹ Roxanne Doucet,¹ DaShen Wang,¹ Patrick Lavigne,^{3,4} and Alain Moreau^{1,2,5}

¹Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases Sainte-Justine University Hospital Research Center, Montréal, Québec, Canada. ²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. ³Orthopedic Division, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montréal, Québec, Canada. ⁴Department of Surgery, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. ⁵Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Corresponding address: Alain Moreau, PhD, Sainte-Justine University Hospital Research Center, Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases (room 4734), 3175 Côte-Sainte Catherine Road, Montréal, Quebec, H3T 1C5. Phone: 514-345-4931 ext: 3476. Fax: 514-345-4801. Email: [REDACTED]

Authorship note: Martin Pellicelli and Cynthia Picard contributed equally to this work.

Conflict of interest: This work led to a submission of a patent (WO/2008/049225). No other potential conflict of interest relevant to this article was reported.

2.1.1 ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is one of the most common age-related chronic disorders of articular cartilage. We have previously demonstrated the occurrence of a loss of PITX1, a homeobox transcription factor, in primary knee joint OA. To decipher the mechanism leading to PITX1 down-regulation in primary knee joint OA, transcriptional regulation studies were undertaken and demonstrated that E2Fs were able to activate PITX1 expression in human articular chondrocytes using two proximal response elements while negative regulatory regions were located more distally within the human PITX promoter. Functional *in vitro* analysis using nuclear extracts obtained from OA articular chondrocytes combined with peptide sequencing analysis and tandem mass spectrometry allowed the identification of Prohibitin (PHB1) bound to a distal E2F-like site, which was confirmed by ChIP assays. The pathophysiological relevance of PHB1 in primary OA pathogenesis was strengthened by its nuclear accumulation in OA articular chondrocytes. PHB1 overexpression was sufficient to inhibit endogenous PITX1 expression at the mRNA and protein levels. Conversely, knockdown of PHB1 by siRNA in OA articular chondrocytes resulted in an up-regulation of PITX1 expression. Collectively, these data define an unrecognized and crucial role for PHB1 in primary OA pathogenesis and a novel transcriptional mechanism switching off PITX1 expression in OA.

2.1.2 INTRODUCTION

Osteoarthritis (OA) is a major and much neglected cause of disability in the elderly, which represents an increasing problem for the aging population. Since OA develops and changes very slowly in human, it is difficult to follow this disease over any length of time. Besides that, the heterogeneity of the disease results in controversy as its etiology and progression. Although the multifactorial nature of primary OA is well recognised, genetic factors have been found to be strong determinants of the disease (1-6). Evidence of a genetic influence of OA comes from a number of sources, including epidemiological studies of family history and family clustering, twin studies, and exploration of rare genetic disorders. These studies have also highlighted potential differences in the degree of OA heritability between different joint sites (i.e. hand versus knee) and genders (7, 8). This suggests a high level of heterogeneity in the nature of the encoded susceptibility genes, which is reflected in the increasing number of loci and candidate genes identified in OA linkage and association studies and the discrepancies among those studies (2). The functional importance of susceptibility genes has yet to be confirmed, and this illustrates our incomplete knowledge of the biology and genetics of OA. Indeed, primary knee OA is an end phenotype that can be a consequence of multiple genetic defects in conserved biological pathways that are involved in the formation of knee joints and skeletal elements, maintenance of cartilage integrity and stability. Identification of genes and biological pathways involved in OA is critical for understanding its etiopathogenesis and better studying the gene-environment interactions in modulating the incidence and severity of the phenotype. In this context, we have previously identified PITX1, a homeobox transcription factor, as a relevant OA candidate gene (9). *Pitx1* is highly expressed in proliferative articular chondrocytes and in the perichondrium of long bones from hind limb during mouse development (10). Heterozygous mice harbouring only one mutated *Pitx1* allele are phenotypically normal at birth, but exhibit progressive degenerative changes of knee joints reminiscent of clinical features usually observed in human OA cartilage (9). Indeed, a loss of PITX1 expression was determined in patients suffering from primary knee joint OA (9).

Little is known about the transcriptional regulation of the *PITX1* gene in normal and pathological conditions. Expression analyses using microarrays showed that E2F1, E2F2 and E2F3 up-regulate *PITX1* expression by several folds in the human osteoblast cell line U2OS (11, 12). E2F transcription factors may play a pivotal role in the transcriptional regulation of several cellular processes far beyond the originally described scope of cell cycle and proliferation (13-15). To date, eight different mammalian E2Fs have been cloned, each of which can heterodimerize with either TFDP1 or TFDP2/3 proteins (16, 17) (with the exception of E2F7 and E2F8). The E2F components contain a central DNA binding and dimerization domain and (except for E2F6, E2F7 and E2F8) a C-terminal transactivation domain (11, 18, 19). These factors could be broadly divided into two classes: activators (E2F1-3) (20-22) and repressors (E2F4-8) (18, 19, 22) of transcription (23). The DNA binding domains of all the E2Fs are very similar, and *in vitro* DNA binding assays suggest that most, if not all, of the E2F/DP heterodimers bind with similar affinity to the same collection of target sites (24, 25). Therefore, the cause of these differential functions is unclear, but one possibility is that sequence differences in the binding site may determine the versatility of E2F family members. Inactivation of E2F targets was shown to be mediated in part by PHB family members but a direct role of E2F or PHB family members has never been reported in OA development and progression.

The Prohibitins, PHB1 and PHB2, are highly conserved proteins in eukaryotic cells that are present in multiple cellular compartments (reviewed in (26, 27)). PHB1 is localised to the mitochondria where it might have a role in the maintenance of mitochondrial function (28-30) as well as in the nucleus where it plays an important role in the transcriptional regulation of various genes. The latter role of PHB1 is accomplished by its interaction with proteins such as E2F, pRb, Brg-1/BRM, RNF2 and p53 (31-35). PHB1 facilitates cellular senescence by recruiting specific co-repressors to inhibit E2F1 target genes (31, 33, 36), through a direct interaction with the highly conserved marked box region of E2F1 (34). This repression occurs either concomitantly with the recruitment of pRB, or independently (31).

In this study, we present a novel transcriptional mechanism turning off PITX1 expression in human primary OA cartilage. This repression occurs in two-thirds of primary knee joint OA patients tested and is triggered by a nuclear accumulation of PHB1 in articular chondrocytes, while the remaining OA patients do not display any changes in PITX1 expression level nor in the localization of PHB1, which remains mainly mitochondrial. This unique molecular stratification of OA patients could have potential implications in OA diagnosis, prevention and treatment.

2.1.3 RESULTS

Study populations. Between January 2009 and June 2010, a group of 29 consecutive patients suffering from primary knee OA and 4 healthy control subjects suffering from a traumatic condition without any family history for OA were investigated. Clinical and demographic characteristics of OA patients are shown in Table 1. All subjects were Caucasians and patients with OA were divided into two subgroups. Patients classified in OA subgroup-1 (OA-gr1) exhibited no significant changes in *PITX1* expression level when compared to age-matched control subjects, contrasting with those classified in OA subgroup-2 (OA-gr2) who displayed a greater than 30% reduction in *PITX1* expression levels (Figure 1A). There was no significant gender and age difference between the two OA subgroups (P=0.11) (Supplemental Table 1).

PITX1 promoter contains critical regulatory regions governing its expression in articular chondrocytes. In order to identify the cause of *PITX1* gene down-regulation in patients suffering from primary knee joint OA, we first proceeded by sequencing a 10 Kb region located upstream of the transcription initiation site of the *PITX1* gene. No significant single nucleotides polymorphisms or novel mutation associated with knee joint OA were detected in either OA subgroups when compared to matched control subjects. In order to identify key regulatory regions of the human *PITX1* promoter, a fragment of 3895 nucleotides of human *PITX1* promoter located upstream of the initiation site was cloned in a luciferase reporter vector (fragment -3895/+61) and smaller fragments of this promoter region were also subcloned by deleting a variable portion at the 5' extremity (fragments -3034/+61, -1577/+61, -729/+61, -524/+61, -374/+61 and -89/+6). *PITX1*-promoter-luciferase reporter constructs were transfected in C28/I2 human chondrocyte cell line and their effect on promoter activity was analyzed. Results showed that luciferase activity remained relatively high for all constructs (Figure 1B). However, deletion of a large distal portion of the promoter (nucleotides -3895 to -729) led to a 6-fold increase in basal luciferase activity, suggesting that the region -3895/-729 contains negative regulatory elements. Promoter deletion analysis also revealed that the region -729/-89 acts as an enhancer because progressive deletions at its

5' end lead to a reduction in luciferase activity. To identify potential response elements for specific transcription factors in the region -729/+61, *in silico* analysis was performed with MatInspector software from Genomatix software suite (37). The sequence analysis of this region identified many potential response elements, whose conserved putative binding site for the homeobox transcription factor DUX4 is known to be an activator of PITX1 expression (Figure 1C) (38). Interestingly, we also found several potential response elements for E2F1, a potential transcriptional activator of PITX1 (11, 12).

E2F1 regulates PITX1 expression by binding two different response elements in the proximal region of its promoter. To characterize the functionality of those putative E2F1 sites, PITX1-promoter-luciferase reporter constructs were transfected along with a 4OH-tamoxifen (OHT)-inducible form of E2F1 in C28/I2 cells. Results showed that E2F1 induction activates luciferase reporter gene in all constructs containing the -374/+61 bp promoter region (Figure 2A). Deletion of the -374/-84 bp region completely abrogated E2F1-mediated PITX1 promoter activation (Figure 2A, fragment -84/+61), suggesting that functional E2F1 response element(s) could be present in this region. To identify more precisely which binding-elements were used by E2F1 to activate PITX1, similar co-transfection assays were performed with three new PITX1-promoter-luciferase reporter constructs housing smaller part of this promoter region (fragments -279/+61, -214/+61 and -169/+61). Results showed that when the region -214/-169 is deleted, an important reduction in the luciferase activity is observable (Figure 2B, fragment -169/+61). Nevertheless, the activation by E2F1 remains significant and was totally abrogated only when the region -169/-84 was removed (Figure 2B, fragment -84/+61). Collectively, these results suggest that E2F1 uses two different regions to activate PITX1 promoter: the region -214/-169, which induces a strong activation, suggesting the presence of critical response elements, and the region -169/-84, which induces a weak activation of the promoter. Because E2F transcriptional activator family members are known to have redundant roles in cells, we also analyzed the effect of E2F2 and E2F3 on human PITX1 promoter activity. Results showed that both E2F2 and E2F3 induce the activation of the promoter (Figure 2C). It is worth mentioning that OHT used alone to

induce E2Fs had no effect on PITX1 expression in C28/I2 cells transfected with the PITX1(-3895/+61)-promoter-luciferase reporter construct (Figure 2D).

To identify precisely which response element is bound by endogenous E2Fs to activate the PITX1 promoter, we incubated five different double stranded biotinylated probes corresponding to the E2F sequences found at positions -195/-165, -180/-150, -170/-140, -115/-85 and -100/-70 in the promoter, respectively named probe -195, -180, -170, -115 and -100, (Figure 2E) with nuclear extracts from C28/I2 cell. Analysis by immunoblotting with E2F1-, E2F2- and E2F3-specific antibodies showed that E2F2 does not interact with any probes, that E2F3 interacts weakly with -195 probe and strongly with the -180 probe, and finally, that endogenous E2F1 interacts with all probes except with the -170 (Figure 2F). Results also showed that interaction between E2F1 and PITX1 promoter is stronger when the -180 probe is used, as well as the -195 and the -115 probes. Since several E2F1 response elements are present in the -195/-70 region of the PITX1 promoter, we performed new DNA pulldowns using point mutations in the probes in order to identify specifically which one is used by E2F1 to activate PITX1 promoter. We first mutated three regions of the -180 probe, referred as m1, m2, and m3, and we observed that mutation m3 completely abolished the interaction between E2F1 and the probe, but that mutations m1 and m2 did not affect the E2F1/DNA interaction (Figure 2G). This result led us to identify the sequence 5'-GGCGGGAA-3' as the first response element used by E2F1 to activate the PITX1 promoter. We next mutated four regions of the -115 probe, referred to as m4, m5, m6 and m7 (Figure 2H), and we noticed that mutation m5 and m6 disrupt partially the interaction between E2F1 and the probe while mutation m7 abrogated it. The partial interaction disruption observed with mutation m5 and m6 is probably because these mutations affect only a small portion of this response element. This result indicated that E2F1 used a second response element to activate the PITX1 promoter, corresponding to the sequence 5'-GCGGCGGC-3'. Consistent with the luciferase experiments, these results confirmed that E2F1 activates the PITX1 promoter by interacting with two response elements. In addition, the response element 5'-GGCGGGAA-3' seems more important for the activation of the PITX1 promoter by E2F1 since deletion of the region -214/-169 induced an important reduction of both basal and E2F1-inducible luciferase activity (Figure 2B) and the strongest

interaction between E2F1 and the PITX1 promoter is observed when the probe -180 is used (Figure 2F and G).

Finally, to validate these results *in vivo*, we verified if E2F1 was present at the PITX1 promoter using chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays in C28/I2 cells. We amplified the region -272/-218 of *PITX1* gene promoter and the proximal promoter of *TK* gene as a positive control for E2F1 (33). Results showed that endogenous E2F1 was recruited to PITX1 promoter as well as to TK promoter (Figure 2I). Moreover, overexpression of E2F1 in C28/I2 cells leads to a twofold increase of endogenous PITX1 mRNA level (Figure 2J). Taken together, these results showed that E2F1 acts as a transcriptional activator of *PITX1* gene by binding two different response elements on its proximal promoter.

E2F1 is essential to activate basal expression of PITX1 gene in articular primary chondrocytes. Because PITX1 expression was considerably reduced in patients classified in OA subgroup-2 when compared to those in OA subgroup-1 as well as the control group, this suggested a possible differential expression defect of E2F's transcriptional activators in OA subgroup-2. To address that hypothesis, we compared the expression levels of *E2F1*, *E2F2*, *E2F3* and *TFDP1*, an obligate E2F dimeric partner, in chondrocytes from the same subjects. We observed no significant variation in *E2F*'s expression in both OA subgroups. However, a trend was observed in OA subgroup-1 showing an elevation in E2F1 and E2F2 expression levels (Figure 3A). Moreover, we noticed that the expression of *TFDP1*, a gene essential for the binding of E2Fs to DNA, was significantly reduced in the second OA subgroup when compared to control subjects or the OA subgroup-1 (Figure 3A, right graph). Because it was reported that *TFDP1* knockdown in fibroblast resulted in total loss of interaction between E2Fs and their cognate DNA-binding sites and, consequently, a reduction of E2F's target gene expression (39), we investigated the importance of TFDP1 in the regulation of PITX1 expression by E2Fs. Depletion of TFDP1 in C28/I2 cells with specific siRNA resulted in decrease in PITX1 protein level (Figure 3B). Interestingly, PITX1 level reduction reached 66% when TFDP1 level reduction was reduced by only 50%. (Figure 3B, lane 4). We next verified the effect of TFDP1 depletion on PITX1 promoter activity via

luciferase assays. Results showed a reduction of 75% and 60% in luciferase activity, respectively, when PITX1-promoter-luciferase reporters -3895/+61 or -214/+61 were respectively co-transfected with siRNA against TFDP1 (Figure 3C). However, when PITX1-promoter-luciferase reporter -84/+61 was co-transfected with TFDP1 siRNA, no variation was observed in luciferase activity, suggesting that the region -214/-84 is essential to mediating the effect of TFDP1 (Figure 3C). This result is concordant with Figure 2B which showed that E2F1 primarily uses this same region to activate PITX1 promoter. Finally, we evaluated the effect of TFDP1 depletion on PITX1 expression in primary chondrocytes from control subjects. Results showed that transfection of TFDP1 siRNA induced a reduction of 50% in PITX1 mRNA level (Figure 3D). Interestingly, PITX1 expression correlates with TFDP1 expression only in chondrocytes from the second OA subgroup (Supplemental Figure 1). Finally, we tested the recruitment of E2F1 on PITX1 promoter. Results showed that E2F1 levels were the same on the human PITX1 promoter, as well as on the TK promoter, when patients from different OA subgroups were compared between themselves or with healthy subjects (Figure 3E). This result indicates that the reduction of TFDP1 in articular chondrocytes from OA patients could not explain the decreased PITX1 expression detected in two-thirds of patients suffering from primary knee joint OA.

PHB1 interacts with human PITX1 promoter through a distal E2F-like element. PITX1 promoter analysis showed that the distal part of human PITX1 promoter contains putative negative regulatory elements. The search for mechanisms leading to PITX1 repression in OA led us to identify a SNP (rs6867012) located within an E2F-like site in -3753/-3748 region of the human PITX1 promoter (Supplemental Table 2). However this SNP was not statistically associated with primary knee joint OA. Nevertheless, functional analysis by EMSA revealed the presence of a bound complex but no supershift was detected when anti-E2F or anti-TFDP1 antibodies were added in EMSA (Supplemental Figure 2). In order to characterize the nature of this complex, a DNA pull-down method with a biotinylated double-stranded oligonucleotide harboring this distal E2F-like site was performed and followed by a peptide sequencing analysis combined with tandem mass spectrometry. This experiment led to the identification of

peptides corresponding to PHB1 (Supplemental Table 3). The presence of PHB1 in the repressor complex attracted our attention because PHB1 has been shown to repress E2F1 target genes (31, 33, 34, 36).

Nuclear PHB1 accumulation occurs only in OA articular chondrocyte. To further clarify the pathophysiological relevance of PHB1 in OA pathogenesis and its role in the transcriptional repression of PITX1, we first compared PHB1 expression level and its cellular localization in normal and OA articular chondrocytes by IHC assays. This experiment revealed a strong positive signal for PHB1 in the nuclei of articular chondrocytes in OA patients tested (Figure 4A and B). To confirm these results, subcellular compartment distribution of PHB1 was visualized by first separating nuclei from cytoplasm using a saccharose gradient and then verified by immunoblotting, the distribution of PHB1 in the two cellular fractions isolated from control and OA primary chondrocyte cultures. PHB1 was detected in both fractions in OA chondrocytes, whereas in control chondrocytes, it was detectable in the cytoplasmic fraction only (Figure 4C). GAPDH, F1-ATPase and Lamin A/C were used as cytoplasmic, mitochondrial and nuclear markers respectively, and they were used to ensure that there was no contamination between the different fractions. Next, we compared the nuclear localization of PHB1 in control and OA chondrocytes by indirect immunofluorescence against PHB1 and confocal microscopy. Results showed a stronger signal of PHB1 in nuclei from OA chondrocytes compared to nuclei from control chondrocytes (Figure 4D, E and Supplemental Figure 3). It is worth mentioning that the punctiform signal detected with TOM-20, a mitochondrial marker, was reminiscent of a mitochondrial fission phenotype (40) often seen in primary OA (41) (Figure 4D).

Since PHB1 features both MTS (mitochondrial targeting sequence) (42) and NES (nuclear export signal) domains (43), we investigated whether PHB1 nuclear accumulation in OA articular chondrocytes was due to mutations affecting those domains by direct sequencing (data not shown). Three known SNP were also assessed (Supplemental Table 4) and no anomalies were found. Finally, to determine whether nuclear accumulation of PHB1 in OA chondrocytes was due to an increased PHB1

expression, quantitative real-time RT-PCR and immunoblot analyses were performed to quantify PHB1 expression levels. No variation in *PHB1* expression, at either the mRNA and protein level, was detected between the control and OA subgroups (Figure 4F and G). Taken together, these results showed that PHB1 accumulates specifically in nuclei from OA chondrocytes and this, without any change in total PHB1 expression.

PHB1 over-expression is sufficient to repress Pitx1 expression in normal articular chondrocytes. To evaluate the contribution of PHB1 in PITX1 repression, a Flag-tagged PHB1 protein was over-expressed in C28/I2 human chondrocytes resulting in a strong repression of PITX1 at the mRNA (Figure 5A) and protein levels (Figure 5B). Similarly, over-expression of PHB1 in co-transfection assays with the PITX1-promoter-luciferase construct -3895/+61 harboring a distal E2F-like site showed a strong repression of luciferase reporter gene (Figure 5C, fragment -3895/+61). The same effect was observed when PHB1 was over-expressed with other PITX1-promoter-luciferase reporter construct, but the reduction in luciferase activity was less important (Figure 5C, fragments -3034/+61, -1577/+61, -729/+61, -524/+61 and -374/+61). Based on these results, PHB1 represses PITX1 expression essentially by acting at the distal region of the promoter. However, it seems that the proximal region was also required for a total repression of the gene. To verify if the repression mediated by PHB1 can be counteracted in presence of E2F1, we over-expressed E2F1 along with PHB1 and analyzed their effect on the activity of the PITX1-promoter-luciferase reporters -3895/+61 and -729/+61. Results showed that PHB1 represses 50 % of the PITX1-promoter-luciferase reporter construct -3895/+61 basal activity and blocks the effect of E2F1 on this construct. When region -3895/-729 was removed (PITX1-promoter-luciferase reporter construct -729/+61), the repression induced by PHB1 was almost completely abrogated with less than 10% repression still detectable. These results suggested that distal promoter region is necessary for PHB1 to induce a strong *PITX1* promoter repression. Finally, ChIP assays were performed to determine more precisely where PHB1 interacts within the human PITX1 promoter *in vivo*. This experiment confirms our previous findings obtained by mass spectrometry showing that only distal PITX1 promoter region (-3746/-3643) corresponding to an E2F1-like response element,

recruits PHB1 while no interaction were detected with other promoter regions (Figure 5E). This result is also consistent with the luciferase results showing that the distal promoter part was essential to mediating a strong PITX1 repression.

Endogenous PHB1 is recruited to PITX1 promoter in OA primary chondrocytes and is essential for PITX1 repression. Because endogenous PHB1 accumulates in nuclei of OA articular chondrocytes under pathological conditions (Figure 4), we verified where PHB1 was recruited within the PITX1 promoter in OA patients. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays against PHB1 in chondrocytes from two control subjects and nine OA patients were performed, and amplified the region -3746/-3643 of human PITX1 promoter confirming of previous findings obtained with C28/I2 human chondrocytes (Figure 6A). As expected, the presence of PHB1 at the -272/-218 region of the PITX1 promoter was not detected nor the negative control corresponding to the proximal region of TK promoter harboring classical E2F1 sites, showing the selectivity of PHB1 for specific E2F1 response elements. To evaluate whether PHB1 depletion in OA primary chondrocytes could rescue PITX1 expression, PHB1 knockdown was carried-out using PHB1 siRNA. Selection of siPHB1 to reduce PHB1 expression was validated first in BJ cells, a non-transformed fibroblast cell line. Efficiency of our selected siPHB1 was demonstrated by a 80% reduction in PHB1 proteins level at 48 and 72 hours after transfection when compared to siCTRL-transfected cells (Figure 6B). We next knocked down PHB1 on articular chondrocytes of four OA patients classified in OA subgroup-2 and observed a 3 to 25-fold increase in PITX1 expression (Figure 6C). Because it was reported that PHB1 is a general repressor of E2F1 target genes, we also evaluated the expression levels of other known E2F1 target genes by real time RT-PCR. Results showed that expression of *BRCA1*, *DDB2*, *CCNA2* and *CCNE1* were decreased in OA chondrocytes in which PITX1 expression was reduced (Figure 6D). However, there was no difference in the expression of other E2F1 target genes, such as *BM11*, *CASP3*, *CDKN1A*, *IL1R1*, *RAD51* and *SERPINE1* in chondrocytes from OA patients compared to chondrocytes from control subjects (data not shown). Interestingly, knockdown of PHB1 by siRNA also rescued the expression of *CCNA2* and *CCNE1*

indicating that specific E2F1 target genes were repressed by nuclear PHB1 in OA primary chondrocytes (Figure 6E).

2.1.4 DISCUSSION

A major challenge to identifying the causes of primary OA is its genetic and phenotypic heterogeneity. Although we do not know *a priori* the source of such heterogeneity, lessons from previous OA linkage and association studies have been hampered by disease heterogeneity and quite unsuccessful in explaining primary OA etiopathogenesis. In that context, our molecular classification of primary knee joint OA patients according to PITX1 expression levels appears to be a clinically relevant endophenotype since two-thirds of OA patients in our cohort exhibited a loss of PITX1 expression in their cartilage (OA subgroup-2), while others remained unaffected (OA subgroup-1). This stratification of OA patients into two endophenotypes led us to further investigate the transcriptional regulatory mechanisms governing PITX1 expression in normal and OA cartilage.

Our data showed that E2Fs are essential to maintain basal *PITX1* expression in human articular chondrocytes and interact with the human *PITX1* promoter through two proximal E2F-binding elements (5'-GGCGGGAA-3' (site 1) and 5'-GCGGCGGC-3' (site 2)) separated by 62 bp. The first E2F1 response element appears more important for the activation of the *PITX1* promoter by E2F1 since deletion of the region -214/-169 induced a more severe reduction in luciferase activity, which can be explained by the fact that this site matches perfectly with consensus E2F1 and TFDP1 binding sites while the second site displays more dissimilarities. Furthermore, the transcriptional activation of *PITX1* by E2Fs is further supported by the fact that *TFDP1* knockdown, an obligate E2F DNA binding partner, leads to a severe decrease of *PITX1* expression both in C28/I2 human chondrocytes cell line and primary chondrocytes derived from control subject cartilage. Our results clearly demonstrate that *PITX1* is a downstream target of E2Fs and that such a transcriptional relationship may explain the similarities observed previously in transgenic mice devoid of either *E2Fs* or *Pitx1*. Indeed, E2F transcriptional activators (mostly E2F1 and E2F3a) play an important role in growth plate chondrocyte proliferation from mice lower limb bones. Inactivation of both genes in compound *E2f1*^{-/-}*E2f3a*^{-/-} mice showed dysplastic growth plates and an increased amount of hypertrophic

chondrocytes when compared to wild type animals (15). Interestingly, this phenotype is very similar to the one observed previously with *Pitx1*^{-/-} mice where animals also present chondrocyte proliferation defects leading to growth plate dysplasia and a premature hypertrophic chondrocyte phenotype (44), thus arguing that *PITX1* is a downstream transcriptional target of E2Fs. Nevertheless, it is unlikely that decreased *PITX1* expression detected in OA patients could be caused by simultaneous inactivation of *E2F1* and related family members since no changes were detected either in *E2F1*, *E2F2* and *E2F3* expression levels or in E2F1 interaction with proximal *PITX1* promoter region when compared to articular chondrocytes isolated from control subjects. This prompted us to investigate more closely the contribution of the distal part of the human *PITX1* promoter.

Promoter deletion analysis showed that the distal part of human *PITX1* promoter contains putative negative regulatory elements. The search for mechanisms leading to *PITX1* repression in OA led us to identify an E2F-like site where a repressor complex containing PHB1 was recruited in OA articular chondrocytes, as demonstrated in our DNA-pulldown and ChIP assays (Figure 7). Moreover, the pathophysiological relevance of PHB1 in primary OA pathogenesis was strengthened by the discovery of its nuclear accumulation in OA articular chondrocytes. The mechanism used by PHB1 to shuttle between mitochondria, the cytoplasm and the nucleus is still not fully understood. Although the nucleocytoplasmic shuttling of proteins that are smaller than 50 kDa can occur by passive diffusion through aqueous channels that exist around the perimeter of the nuclear pore complex (45), PHB1, which is only 32 kDa, may require active transport because it is frequently bound to multiprotein complexes like E2F transcription factor family, pRb, p53, RNF2, Brg-1/Brm and HDACs to perform their nuclear functions (31-35). Active nuclear export of PHB1 is mediated by a short amino acid sequence stretch (257-ITYLPAGQSVVLQL-270) termed nuclear export signal (NES) (43). It was reported that the NES of PHB1 form a ternary complex with CRM-1/Exportin 1 in conjunction with GTP-bound form of Ran in the nucleus and is exported as a trimeric complex to the cytoplasm (43). We did not find any mutations or post-translational modifications masking/interfering with the NES or altering the conformation of PHB1 in any OA patients tested. Nevertheless, it has been proposed in

other diseases that PHB1 could be released from mitochondria, along with cytochrome c, following mitochondrial damage, consequently leading to PHB1 cytoplasmic accumulation (46).

In the mitochondria, PHB1 is located in the inner membrane in tandem with PHB2, forming a high molecular weight complex of 1.2 MDa, where it participates in small membrane folds called cristae (29, 47). Newly synthesized mitochondrial proteins were found to bind to this complex, being held there prior to their assembly in the respiratory chain (29). Disruption of the PHB complex was shown to decrease replicative lifespans of cells and nematode longevity, which is accompanied by defects in mitochondrial membrane potential (48, 49). Interestingly, in OA chondrocytes, a reduction in the mitochondrial membrane potential associated with mitochondria swelling was demonstrated, suggesting a disorganization of the mitochondrial inner membrane (41). Our data demonstrate that cytoplasm/nuclear PHB1 expression ratio in OA chondrocytes is decreased when compared to PHB1 expression level in control subjects. Because mitochondria is the principal location of PHB1 in the cell, decreasing PHB1 levels in the cytoplasm also suggested a corresponding decreasing amount in mitochondria, consequently leading to mitochondrial inner membrane disorganization, abnormal cristae formation and mitochondrial fission and fragmentation (28). Indeed, the fission and fragmentation of mitochondria in OA articular chondrocytes is illustrated by the immunofluorescence localization of TOM-20, a known mitochondrial marker, and contrast with the mitochondrial web-shaped network seen in control cells. PHB1 is also implicated in the stabilization of the mitochondrial oxidative phosphorylation system (OXPHOS) (28). Disruption of OXPHOS leads to a reduction of its activity and consequently to an increasing NO production (28). This NO overproduction has been shown to play a major role in matrix degradation and calcification in OA articular cartilage (50).

The aberrant nuclear accumulation of PHB1, a molecular chaperone in mitochondria, could provide a first molecular mechanism to reconcile the origin of mitochondria's abnormalities and the articular chondrocyte senescence phenotype associated with primary OA. Indeed, OA chondrocytes present telomere shortening, overproduction of cytokine and MMP, decreased growth factor response and increased

cell death when compared with chondrocytes from healthy patients (reviewed in (51)). Interestingly, many studies also reported that PHB1 could contribute to the establishment of a senescent phenotype (36, 52, 53). This role of PHB1 is mostly due to its nuclear localization where it interacts with RB, E2F1 and p53 to decrease E2F target expression and increase p53 transcriptional activity (32-34). We observe in this study that PHB1 strongly accumulates in the nucleus of OA chondrocytes while it is mostly cytoplasmic in chondrocytes from healthy subjects. This phenomenon suggests that OA chondrocytes undergo a growth-arrest program induced by PHB1 protein. This hypothesis is further supported by the fact that PHB1 knockdown in OA chondrocytes leads to an increasing expression of three different E2F1 target namely *PITX1*, *CCNA2* and *CCNE1* gene. To attest this, it would be interesting to perform cell proliferation assay and an evaluation of senescence markers, such as *p21*, *p16*, *IL-6*, *IL-8*, *MMP1*, *MMP3* and *MMP10* expression or p53, pRB and histone H2AX phosphorylation, on OA chondrocytes after knocking down PHB1 by siRNA. If PHB1 is responsible of a senescence phenotype, PHB1 deletion will allow chondrocytes to proliferate and catabolic enzyme production, such as cytokines and protease, will be reduced.

Previous reports suggested that PHB1 could be recruited to E2F1 target gene promoter by interacting with E2F1 (31, 36). Our results suggest that PHB1 recruitment to *PITX1* promoter is independent of E2F since PHB1 did not co-localize with the proximal E2F elements found in human *PITX1* promoter neither in healthy nor in OA articular chondrocytes. Moreover, distal *PITX1* promoter deletion abrogated the majority repression effect by PHB1. Because PHB1 cannot bind the DNA directly, more experiments are needed to further identify PHB1 interacting nuclear partners leading to PHB1 recruitment on *PITX1* promoter.

Based on results presented in this study, we propose a model where PHB1 is preferentially located into the inner mitochondrial membrane, in non-pathological conditions (Figure 7). However, in OA articular chondrocytes, PHB1 presence is strongly detected inside the nucleus. When bound to distal region of *PITX1* promoter (region -3746/-3643 bp, based on ChIP results), PHB1 and probably its other repressive partners, such as BRG1/BRM, RNF2, HP1 γ , NCoR and HDAC1, can efficiently repress *PITX1* expression (Figure 7). Moreover, since the total pool of PHB1 protein does not

seem to increase, it is tempting to hypothesize that it might be depleted from the mitochondria. This could contribute to explain the functional and morphological changes reported in mitochondria of OA patients (41, 50).

OA is a heterogeneous disease and its pathomechanism is complex. Here we report a molecular mechanism that can help to better stratify OA patients and which has the merit of unifying previous concepts and findings proposed to better define OA pathogenesis, such as mitochondrial dysfunction or cellular aging. PHB1 is apparently a central point in OA chondrocyte phenotype development and pathogenesis. Taking into account the postulated role for PHB1 in cellular senescence and mitochondrial functions, it is conceivable that aberrant nuclear accumulation of PHB1 in primary OA could be naturally triggered with aging, although it cannot be ruled out that aging exacerbates pre-existing genetic conditions causing OA. Both mechanisms could explain the increasing number of elderly people suffering from OA and the fact that OA is usually a late onset disease. Elucidation of the mechanism underlying the nuclear accumulation of PHB1 is important for the development of effective treatments for OA and may lead to the development of better molecular tools to assess the risk of developing OA and monitor disease progression.

2.1.5 METHODS

Reagents and antibody. All reagents were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and BioShop (Burlington, On, Canada). All oligonucleotides were purchased from BioCorp (Montréal, Qc, Canada) except for oligonucleotides used in DNA pull-down experiments, which were obtained from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). For Western blots, α -E2F1 (KH95; sc-251x; 1:2000), α -E2F2 (L-20; sc-632x; 1:2000), α -E2F3 (C-18; sc-878; 1:2000x), α -F1ATPase (R-20; sc-16689; 1:500), α -GAPDH (V-18; sc-20357; 1:5000), α -PHB1 (H-80; sc-28259; 1:500) and α -TFDP1 (K-20; sc-610x; 1:2000) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA), α -PITX1 (ab70273; 1:5000) antibody was purchased from Abcam (Cambridge, MA, USA), α -Lamin A/C (1:2000) antibody was purchased from Cell Signaling (Danvers, MA, USA) and α -FLAG (1:5000) and α -Tubulin (B-5-1-2; 1:10000) antibodies were purchased from Sigma. For immunofluorescence, α -PHB1 (Ab-1; 1:50) and α -TOM20 (FL-145; sc-11415; 1:50) antibodies were respectively purchased from Lab Vision (Fremont, CA, USA) and Santa Cruz Biotechnologies. Lastly, for chromatin immunoprecipitation assay, α -PHB1 (N-20; sc-18196) antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnologies.

Primary chondrocyte isolation and cellular culture and infection. Cartilage specimens from tibial plateaus and femoral condyles were obtained from OA patients undergoing total knee joint replacement. All OA patients were evaluated by a certified rheumatologist based on the American College of Rheumatology Diagnostic Subcommittee for OA criteria. Human tissues were collected with the written consent of patients and the study protocol was approved by The Institutional Ethics Committees of Sainte Justine University Hospital, and Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montréal, Canada.

For primary chondrocyte extraction and culture, human OA and normal cartilage were sectioned, rinsed and finely minced. They were digested first with 0.25 % trypsin for 1 hour at 37 °C, rinsed with phosphate-buffered saline, and then digested with 2 mg/ml collagenase for 4 to 6 hours at 37 °C. The cells were seeded in Falcon culture flasks at high density (10^8 cells per 175-cm² flask) and grown to confluence in Dulbecco's Modified

Eagle's Medium (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) containing 10 % heat-inactivated fetal calf serum (Hyclone, Logan, UT) and 1% penicillin and streptomycin.

C28/I2 cell line was provided by Dr. Mary Goldring, (Hospital for Special Surgery, New York, NY, USA) and cultured as previously described (54). To generate stable C28/I2 cells overexpressing PHB1 or E2F1, retroviral infection using PHOENIX cells (a gift from Dr. Gerardo Ferbeyre, Université de Montréal).

Immunohistochemistry. Cartilage sections were embedded in paraffin and 5 µm sections were fixed onto microscopic slides. After proper dehydration, tissues were heated at 80 °C for 15 minutes in 0.01 M citrate buffer, rinsed in PBS and then put in 0.3% Triton-PBS solution for 30 minutes. After washing in PBS, tissue sections were soaked in a solution containing 2 % hydrogen peroxide in methanol for 30 minutes. Sections were washed again, blocked for 15 minutes in PBS with 1% BSA and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies anti-PHB1 (AB-2) from Lab Vision, at a dilution of 1:100. Following PBS washes, tissue sections were incubated with an anti-rabbit biotinylated antibody for 45 minutes and the staining was revealed using avidin-biotin complex method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and DAB detection system (Dako Diagnostics Inc, Mississauga, ON, Canada). Sections were counterstained with Harris Modified Hematoxylin (Fisher Scientific, FairLawn, NJ, USA).

Immunofluorescence. Human chondrocytes From OA patients and healthy subjects were plated on 8-wells culture glass slides from BD Biosciences (Bedford, MA, USA) with 10^4 cells per well. After 24 to 48 hours of incubation, cells were washed with PBS and were fixed with 3.7 % solution paraformaldehyde followed by permeabilization with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 minutes. After blocking with 1 % bovine serum albumin in PBS (PBSA) for 30 minutes at room temperature, cells were incubated with the primary antibodies for 2 hours at 37 °C. Secondary antibodies (Alexa fluor from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was diluted in PBSA and applied for 1 hour at 37 °C. After washing with PBS, slides were assembled using Prolong Gold, an adhesive containing DAPI (from Invitrogen) and visualized by confocal microscopy.

Gene knockdown using siRNA. Sixteen hours before transfection, 1×10^6 cells were plated in 6 cm plates. Each plate was transfected using 300 pmol of pre-validated Stealth RNAiTM siRNA duplex and 15 μ l of RNAi/Max Lipofectamine, both from Invitrogen, following the manufacturer's instructions. PHB1 siRNA recognized the sequence GAUGGACGCAAACACUUUGGCAGCC and TFDP1 siRNA recognized the sequence GCAGACGAGCUGGUUGCGGAGUUCA. For control siRNA, medium GC Stealth RNAiTM Negative Control Duplex (Invitrogen) has been used. Forty-eight or 72 hours post transfection, cells were lysed in RIPA buffer or in TRIZOL reagent from Invitrogen to respectively study protein or mRNA gene level.

RNA extraction and real time PCR analysis. Total RNA was isolated using Trizol Reagent from Invitrogen according to the manufacturer's instructions. Prior to real time PCR, cDNA synthesis was performed on 1 μ g of total RNA using Tetro cDNA synthesis kit from Bioline (London, England) according to the manufacturer's instructions. cDNA was then diluted 1:25 in water and real-time PCR was performed.

Real-time PCR was performed in a 96-well plate format using the Mx3000P from Stratagene (Santa Clara, CA, USA) and the SsoFast Evagreen detection kit from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Each reaction was performed using 7.5 μ l of Evagreen master mix, 3.75 μ l of 2 μ M concentrated primer pair and 3.75 μ l of diluted cDNA (final dilution 1:100) or Ch.I.P DNA sample (final dilution 1:4) for a final volume of 15 μ l. All primer sets used to gene or promoter fragment detection were tested for amplification specificity and the size of fragments was validated on agarose gels. Sequence of each primer is given in supplemental Table 7.

Vector Constructs. See Supplemental Methods section

Luciferase assay. See Supplemental Methods section

Nuclear Extract and DNA Pull-Down. See supplemental Methods section

Electromobility Shift Assay. See Supplemental Methods section

Chromatin Immunoprecipitation Assay. See Supplemental Methods section.

Immunoblot. See Supplemental Methods section

2.1.6 ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the subjects and families who participated in this study. Thanks are also owed to Mrs. Ginette Lacroix and Mrs. Anne-Marie Châtelain for the clinical coordination, Dr. Jean-François Lavoie, Ms. Anita Franco, Mrs. Josée Dépôt and Mrs. Isabelle Turgeon for their technical support and helpful assistance and Mr. Guoruey Wong and Ms. Viviane Calabrese for the critical review of the manuscript. This work was supported by a research grant from The Canadian Institute of Health Research (MOP-62791) to Dr. Moreau). Mr. Martin Pellicelli is a recipient of RSBO-FRSQ doctoral Scholarship, Mrs. Cynthia Picard is a recipient of a Canadian Institute of Health Research/MENTOR training program PhD Scholarship and is also a recipient of FRSQ doctoral Scholarship, Ms. Roxanne Doucet was a recipient of FRSQ master Scholarship.

2.1.7 REFERENCES

1. Jordan, J.M., Kraus, V.B., and Hochberg, M.C. 2004. Genetics of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 6:7-13.
2. Loughlin, J. 2001. Genetic epidemiology of primary osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 13:111-116.
3. Mertens, F., Palsson, E., Lindstrand, A., Toksvig-Larsen, S., Knuutila, S., Larramendy, M.L., el-Rifai, W., Limon, J., Mitelman, F., and Mandahl, N. 1996. Evidence of somatic mutations in osteoarthritis. *Hum Genet* 98:651-656.
4. Peach, C.A., Carr, A.J., and Loughlin, J. 2005. Recent advances in the genetic investigation of osteoarthritis. *Trends Mol Med* 11:186-191.
5. Spector, T.D., and MacGregor, A.J. 2004. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage* 12 Suppl A:S39-44.
6. Yao, J.Y., Wang, Y., An, J., Mao, C.M., Hou, N., Lv, Y.X., Wang, Y.L., Cui, F., Huang, M., and Yang, X. 2003. Mutation analysis of the Smad3 gene in human osteoarthritis. *Eur J Hum Genet* 11:714-717.
7. Jones, G., Ding, C., Scott, F., and Cicuttini, F. 2004. Genetic mechanisms of knee osteoarthritis: a population based case-control study. *Ann Rheum Dis* 63:1255-1259.
8. Loughlin, J. 2003. Genetics of osteoarthritis and potential for drug development. *Curr Opin Pharmacol* 3:295-299.
9. Picard, C., Azeddine, B., Moldovan, F., Martel-Pelletier, J., and Moreau, A. 2007. New emerging role of pitx1 transcription factor in osteoarthritis pathogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 462:59-66.
10. Lanctot, C., Lamolet, B., and Drouin, J. 1997. The bicoid-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* 124:2807-2817.
11. Muller, 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 Dev* 15:267-285.

12. Young, A.P., Nagarajan, R., and Longmore, G.D. 2003. Mechanisms of transcriptional regulation by Rb-E2F segregate by biological pathway. *Oncogene* 22:7209-7217.
13. Chen, H.Z., Tsai, S.Y., and Leone, G. 2009. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer* 9:785-797.
14. McClellan, K.A., and Slack, R.S. 2007. Specific in vivo roles for E2Fs in differentiation and development. *Cell Cycle* 6:2917-2927.
15. Tsai, S.Y., Opavsky, R., Sharma, N., Wu, L., Naidu, S., Nolan, E., Feria-Arias, E., Timmers, C., Opavska, J., de Bruin, A., et al. 2008. Mouse development with a single E2F activator. *Nature* 454:1137-1141.
16. Kohn, M.J., Bronson, R.T., Harlow, E., Dyson, N.J., and Yamasaki, L. 2003. Dp1 is required for extra-embryonic development. *Development* 130:1295-1305.
17. Kohn, M.J., Leung, S.W., Criniti, V., Agromayor, M., and Yamasaki, L. 2004. Dp1 is largely dispensable for embryonic development. *Mol Cell Biol* 24:7197-7205.
18. Di Stefano, L., Jensen, M.R., and Helin, K. 2003. E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *EMBO J* 22:6289-6298.
19. Trimarchi, J.M., Fairchild, B., Verona, R., Moberg, K., Andon, N., and Lees, J.A. 1998. E2F-6, a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2850-2855.
20. Field, S.J., Tsai, F.Y., Kuo, F., Zubiaga, A.M., Kaelin, W.G., Jr., Livingston, D.M., Orkin, S.H., and Greenberg, M.E. 1996. E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* 85:549-561.
21. Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, H.I., Sang, L., Chong, G.T., Nuckolls, F., Giangrande, P., Wright, F.A., Field, S.J., et al. 2001. The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* 414:457-462.
22. Yamasaki, L., Jacks, T., Bronson, R., Goillot, E., Harlow, E., and Dyson, N.J. 1996. Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* 85:537-548.
23. Takahashi, Y., Rayman, J.B., and Dynlacht, B.D. 2000. Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev* 14:804-816.

24. Attwooll, C., Lazzerini Denchi, E., and Helin, K. 2004. The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J* 23:4709-4716.
25. Zheng, N., Fraenkel, E., Pabo, C.O., and Pavletich, N.P. 1999. Structural basis of DNA recognition by the heterodimeric cell cycle transcription factor E2F-DP. *Genes Dev* 13:666-674.
26. Mishra, S., Murphy, L.C., and Murphy, L.J. 2006. The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J Cell Mol Med* 10:353-363.
27. Mishra, S., Murphy, L.C., Nyomba, B.L., and Murphy, L.J. 2005. Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends Mol Med* 11:192-197.
28. Artal-Sanz, M., and Tavernarakis, N. 2009. Prohibitin and mitochondrial biology. *Trends Endocrinol Metab* 20:394-401.
29. Nijtmans, L.G., Artal, S.M., Grivell, L.A., and Coates, P.J. 2002. The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease. *Cell Mol Life Sci* 59:143-155.
30. Osman, C., Merkwirth, C., and Langer, T. 2009. Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *J Cell Sci* 122:3823-3830.
31. Choi, D., Lee, S.J., Hong, S., Kim, I.H., and Kang, S. 2008. Prohibitin interacts with RNF2 and regulates E2F1 function via dual pathways. *Oncogene* 27:1716-1725.
32. Fusaro, G., Dasgupta, P., Rastogi, S., Joshi, B., and Chellappan, S. 2003. Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling. *J Biol Chem* 278:47853-47861.
33. Wang, S., Fusaro, G., Padmanabhan, J., and Chellappan, S.P. 2002. Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression. *Oncogene* 21:8388-8396.
34. Wang, S., Nath, N., Fusaro, G., and Chellappan, S. 1999. Rb and prohibitin target distinct regions of E2F1 for repression and respond to different upstream signals. *Mol Cell Biol* 19:7447-7460.
35. Wang, S., Zhang, B., and Faller, D.V. 2002. Prohibitin requires Brg-1 and Brm for the repression of E2F and cell growth. *EMBO J* 21:3019-3028.

36. Rastogi, S., Joshi, B., Dasgupta, P., Morris, M., Wright, K., and Chellappan, S. 2006. Prohibitin facilitates cellular senescence by recruiting specific corepressors to inhibit E2F target genes. *Mol Cell Biol* 26:4161-4171.
37. Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., and Werner, T. 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21:2933-2942.
38. Dixit, M., Anseau, E., Tassin, A., Winokur, S., Shi, R., Qian, H., Sauvage, S., Matteotti, C., van Acker, A.M., Leo, O., et al. 2007. DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18157-18162.
39. Maehara, K., Yamakoshi, K., Ohtani, N., Kubo, Y., Takahashi, A., Arase, S., Jones, N., and Hara, E. 2005. Reduction of total E2F/DP activity induces senescence-like cell cycle arrest in cancer cells lacking functional pRB and p53. *J Cell Biol* 168:553-560.
40. Bossy-Wetzel, E., Barsoum, M.J., Godzik, A., Schwarzenbacher, R., and Lipton, S.A. 2003. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol* 15:706-716.
41. Blanco, F.J., Lopez-Armada, M.J., and Maneiro, E. 2004. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion* 4:715-728.
42. Tatsuta, T., Model, K., and Langer, T. 2005. Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. *Mol Biol Cell* 16:248-259.
43. Rastogi, S., Joshi, B., Fusaro, G., and Chellappan, S. 2006. Camptothecin induces nuclear export of prohibitin preferentially in transformed cells through a CRM-1-dependent mechanism. *J Biol Chem* 281:2951-2959.
44. Lanctot, C., Moreau, A., Chamberland, M., Tremblay, M.L., and Drouin, J. 1999. Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development* 126:1805-1810.
45. Allen, T.D., Cronshaw, J.M., Bagley, S., Kiseleva, E., and Goldberg, M.W. 2000. The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J Cell Sci* 113 (Pt 10):1651-1659.

46. Kartha, G.K., Moshal, K.S., Sen, U., Joshua, I.G., Tyagi, N., Steed, M.M., and Tyagi, S.C. 2008. Renal mitochondrial damage and protein modification in type-2 diabetes. *Acta Diabetol* 45:75-81.
47. Merkwirth, C., and Langer, T. 2009. Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1793:27-32.
48. Artal-Sanz, M., and Tavernarakis, N. 2009. Prohibitin couples diapause signalling to mitochondrial metabolism during ageing in *C. elegans*. *Nature* 461:793-797.
49. Coates, P.J., Jamieson, D.J., Smart, K., Prescott, A.R., and Hall, P.A. 1997. The prohibitin family of mitochondrial proteins regulate replicative lifespan. *Curr Biol* 7:607-610.
50. Johnson, K., Jung, A., Murphy, A., Andreyev, A., Dykens, J., and Terkeltaub, R. 2000. Mitochondrial oxidative phosphorylation is a downstream regulator of nitric oxide effects on chondrocyte matrix synthesis and mineralization. *Arthritis Rheum* 43:1560-1570.
51. Loeser, R.F. 2009. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartilage* 17:971-979.
52. Liu, X.T., Stewart, C.A., King, R.L., Danner, D.A., Dell'Orco, R.T., and McClung, J.K. 1994. Prohibitin expression during cellular senescence of human diploid fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 201:409-414.
53. Piper, P.W., and Bringlee, D. 2002. Loss of prohibitins, though it shortens the replicative life span of yeast cells undergoing division, does not shorten the chronological life span of G0-arrested cells. *Mech Ageing Dev* 123:287-295.
54. Finger, F., Schorle, C., Zien, A., Gebhard, P., Goldring, M.B., and Aigner, T. 2003. Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/I2. *Arthritis Rheum* 48:3395-3403.

2.1.8 FIGURES LEGENDS

FIGURE 1

Study of basal *PITX1* expression in human primary chondrocytes and in C28/I2 cell line. (A) Real time RT-PCR against *PITX1* gene in chondrocytes from four healthy subjects and nineteen OA patients. OA patients were distributed in two groups. In the first one, OA-gr1, there is no significant reduction in *PITX1* gene expression (n=9). In the second one, OA-gr2, patients showed an important reduction in *PITX1* gene expression (n=10). Black marks represent the median value for each group. Asterisks represent a significant decrease in *PITX1* expression (paired t test: * p<0,002) compared to control cells. (B) Luciferase assay in C28/I2 cells transiently transfected with a *PITX1* (-3895/+61 bp)-promoter-luciferase reporter or with luciferase plasmids containing smaller promoter fragments (fragment -3034/+61 bp, -1577/+61 bp, -729/+61 bp, -524/+61 bp, -374/+61 bp or -84/+61 bp) or with the empty vector containing the *firefly* luciferase gene (pGL4). Data was shown as the fold change of luciferase counts when compared to the control pGL4 vector and represents mean and standard deviation of three independent experiments. (C) Sequence of *PITX1* promoter between -700/+100 bp. Response elements were predicted by MatInspector program from Genomatix Software Suite. Predicted response elements found on positive or complementary strand are represented by a bar above or under nucleotide sequence respectively. Arrow shows transcriptional initiation start site.

FIGURE 2

E2F1 activates *PITX1* gene in C28/I2 chondrocytes. (A-D) Luciferase assays in C28/I2 cell line transiently transfected with different constructions of *PITX1* promoter or with the empty vector containing the *firefly* luciferase gene (pGL4). Cells were co-transfected with pBabe plasmids expressing ER fused to E2F1, E2F2, E2F3 or with the empty control vector and induced with OHT or vehicle (ethanol) for 24 hours. Data was shown as the fold change of luciferase counts when compared to the control pGL4 vector and represents mean and standard deviation of three independent experiments. Asterisks represent a significant increase of luciferase activity (paired t test: * p<0.01) compared

to control cells. **(E)** Sequence of *PITX1* promoter between -225/+75 bp. Predicted E2F1 response elements are in grey. The probes -180 bp and -115 bp used in F are underlined with a dark and a dash line, respectively. Asterisks represent the nucleotides that are essential for the binding of E2F1 on *PITX1* promoter. **(F-H)** Immunoblot (IB) against E2F1, E2F2 or E2F3 on DNA pull-down performed with nuclear extract from C28/I2 cell line. Biotinylated double stranded probes representing different wildtype or mutated regions of *PITX1* promoter were used. A non-specific 30 bp biotinylated double stranded probe was used as negative control and Lamin A/C was used as a loading control for nuclear extract. **(I)** Chromatin immunoprecipitation assay against E2F1 on *PITX1* and *TK* promoters in C28/I2 chondrocyte cell line. Data is presented as the DNA relative quantification after immunoprecipitation when compared to the negative control. Error bars represents standard deviation of a triplicate (* $p < 0,01$). **(J)** Real time RT-PCR performed against *PITX1* gene in C28/I2 chondrocytes stably expressing pBabe-ER-E2F1 fusion plasmids or the empty control vector treated with OHT or vehicle 24 hours prior to RNA extraction. Data represents mean and standard deviation of three independent experiments. Asterisks represent a significant increase between vehicle (ethanol) and OHT treated cells (paired t test: * $p < 0,01$). (OHT, 4OH-tamoxifen ; IB, Immunoblot)

FIGURE 3

TFDP1 depletion in chondrocytes leads to decreased *PITX1* expression. **(A)** Real time RT-PCR against *E2F1*, *E2F2*, *E2F3* and *TFDP1* genes in chondrocytes from four healthy subjects and nineteen OA patients. OA patients were distributed in two subgroups as described in Figure 1A. Black marks represent the median value for each group. Asterisks represent a significant decrease in *TFDP1* expression (paired t test: * $p < 0,002$; ** $p < 0,01$) compared to control cells. **(B)** Immunoblots (IB) of TFDP1 and *PITX1* in C28/I2 cells transfected with control siRNA or increasing amounts of TFDP1 siRNA. Percentage of the relative reduction in TFDP1 and *PITX1* expression are indicated. **(C)** Luciferase assays in C28/I2 cell line transiently transfected with different construction of *PITX1* promoter or with the empty vector containing the *firefly* luciferase gene (pGL4). Cells were co-transfected with pBabe plasmid expressing ER

fused to E2F1 or the empty control vector and with control siRNA or TFDP1 siRNA, and induced with 4OH-tamoxifen (OHT) for 24 hours. Data was shown as the fold change of luciferase counts when compared to the control pGL4 vector and represents mean and standard deviation of three independent experiments. Asterisks represent a significant decrease in luciferase activity (paired t test: * $p < 0,01$) compared to control cells. **(D)** Real time RT-PCR against *PITX1* mRNA in chondrocytes from healthy subjects transfected with control siRNA or TFDP1 siRNA. Data represents mean and standard deviation of three independent experiments. Asterisks represent a significant decrease between control and siTFDP1 transfected cells (paired t test: * $p < 0,02$). **(E)** Real-time PCR analysis on -272/-218 bp PITX1 promoter region or on proximal TK promoter region after chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay against E2F1. Data is presented as DNA relative quantification in comparison with the mean amount of DNA present after immunoprecipitation of control healthy cells.

FIGURE 4

PHB1 accumulates in nucleus of OA chondrocytes. **(A)** PHB1 immunostaining performed on cartilage sections from control (top pannels) or OA (bottom pannels) subjects. Arrows show cells with positive nuclear PHB1 signal. Cartilage sections were counterstained with Harris Modified Hematoxylin. Original magnification: left 100X, right 400X. **(B)** Quantification of the percentage of cells from three control subjects and five OA patients showing PHB1 nuclear signal. Asterisks represent a significant increase in PHB1 nuclear signal (Mann-Whitney U test: * $p < 0.05$). **(C)** Cytoplasmic (C) and nuclear (N) protein extracts from primary chondrocytes of one control subject and three different OA patients. Proteins were resolved by SDS-PAGE and PHB1 protein was detected using anti-PHB1 antibody. GAPDH, F1-ATPase and Lamin A/C were used as cytoplasmic, mitochondrial and nuclear markers respectively. **(D)** Immunofluorescence against PHB1 and TOM20, a mitochondrial marker, on primary chondrocytes from one control subject and two different OA subjects. PHB1 signal appears in green and TOM20 signal in red. DAPI was used as a DNA marker. Omission of primary antibodies served as negative control. Original magnification: 630X, scale bar: 10 μm . **(E)** PHB1 signal quantification of immunofluorescence results. Data is presented as the percentage

of the signal which co-localizes with DAPI signal when compared with to total PHB1 signal. (F) Real-time RT-PCR against *PHB1* gene in chondrocytes from four healthy subjects and nineteen OA patients, separated in two subgroups as previously described. Black marks represent the median value for each group. (G) Immunoblot (IB) against PHB1 on total cell lysis performed with primary chondrocytes from two control subjects and five OA patients. α -tubulin was used as a loading control.

FIGURE 5

PITX1 gene repression by PHB1 in C28/I2 chondrocytes cell line. (A) *PITX1* mRNA or (B) protein levels from C28/I2 cells stably overexpressing Flag-PHB1 or vector alone. In A, real time RT-PCR where data is presented as *PITX1* mRNA relative quantification and error bars represents standard deviation of triplicates (paired t test: * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$). In B, immunoblots (IB) of FLAG epitop and PITX1. α -tubulin protein was used as a loading control. (C-D) Luciferase assays in C28/I2 cell line transiently transfected with different construction of PITX1 promoter or with the empty vector containing the *firefly* luciferase gene (pGL4). In C, cells were co-transfected with Flag-PHB1 expressing vector or an empty control vector. In D, cells were co-transfected with Flag-PHB1 expressing vector or an empty control vector and with pBabe plasmid expressing ER fused to E2F1 or the empty control vector, and induced with OHT for 24 hours. Data was shown as the fold change of luciferase counts when compared to the control pGL4 vector and represents mean and standard deviation of three independent experiments. Asterisks represent a significant decrease in luciferase activity (paired t test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) compared to control cells. (E) Real-time PCR analysis after chromatin immunoprecipitation assay against PHB1. Different primers were used to amplify specific PITX1 promoter regions. Data is presented as DNA relative quantification compared to the mean amount of DNA present after immunoprecipitation of control cells.

FIGURE 6

PHB1 is required to maintain repressive state of *PITX1* gene. (A) Real-time PCR analysis on -3746/-3643 bp and -272/-218 bp region of *PITX1* promoter or on proximal TK promoter region after ChIP assay against PHB1. Data is presented as DNA relative quantification (RQ) compared to the mean amount of DNA present after immunoprecipitation of control cells. (B) Immunoblots (IB) against PHB1 or GAPDH (loading control) on total cell lysis of BJ fibroblastic cells transiently transfected with control siRNA or PHB1 siRNA for 24, 48 or 72 hours. (C) Real time RT-PCR performed against *PITX1* gene in chondrocytes from four different OA patients, belonging to subgroup 2, transfected with control siRNA or PHB1 siRNA. Data represents mean and standard deviation of three independent experiments. Asterisks represent a significant increase between control and siPHB1 transfected cells (paired t test: * $p < 0.02$). (D) Real time RT-PCR performed against E2Fs targets genes (*CCNA2*, *CCNE1*, *BRCA1* and *DDB2*) in chondrocytes from four healthy subjects and nineteen OA patients. OA patients were distributed in two subgroups as described in Figure 1A. Black marks represent the median value for each group. Asterisks represent a significant decrease in *CCNA2*, *CCNE1*, *BRCA1* and *DDB2* expression (paired t test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.005$) compared to control cells. (E) Real time RT-PCR performed against *CCNA2*, *CCNE1*, *BRCA1* and *DDB2* genes in chondrocytes from four different OA patients transfected with control siRNA or PHB1 siRNA. Data represents mean and standard deviation of three independent experiments. Asterisks represent a significant increase in *CCNA2* and *CCNE1* expression between control and siPHB1 transfected cells (paired t test: * $p < 0.02$).

Figure 7

Schematic model involving PHB1 nuclear accumulation in OA chondrocytes. In non-pathological conditions, PHB1 is preferentially located into the inner mitochondrial membrane. Due to its shuttling, a small proportion can be detected in the nucleus but, according to our results, not on *PITX1* promoter. In this case *PITX1*, along with other E2F targets like *CCNA2* and *CCNE1*, is normally expressed. However, in OA articular chondrocytes, PHB1 presence is strongly detected inside the nucleus. When bound to

distal region of PITX1 promoter, PHB1 and its other repressive partners can efficiently repress PITX1 expression. Since the total pool of PHB1 protein does not seem to increase, it is tempting to hypothesize that it might be depleted from the mitochondria.

Supplemental Figure 1. Linear regression between *PITX1* and *TFDP1* genes expression in primary chondrocytes from OA subgroup 1 (solid triangle) and OA subgroup 2 (solid dot).

Supplemental Figure 2. Electromobility shift assay (EMSA) performed using OA nuclear extract and wild type or mutant probe with sequence corresponding to the E2F-like response element on PITX1 promoter. Antibodies used for supershift assay are listed in the EMSA section.

Supplemental Figure 3. Immunofluorescence against PHB1 and TOM20, a mitochondrial marker, on primary chondrocytes from one control subject and five different OA patients. PHB1 signal appears in green and TOM20 signal in red. DAPI, shown in blue, was used as a DNA marker. (Magnification 630X; Scale bar: 10 μm).

2.1.9 FIGURES AND TABLES

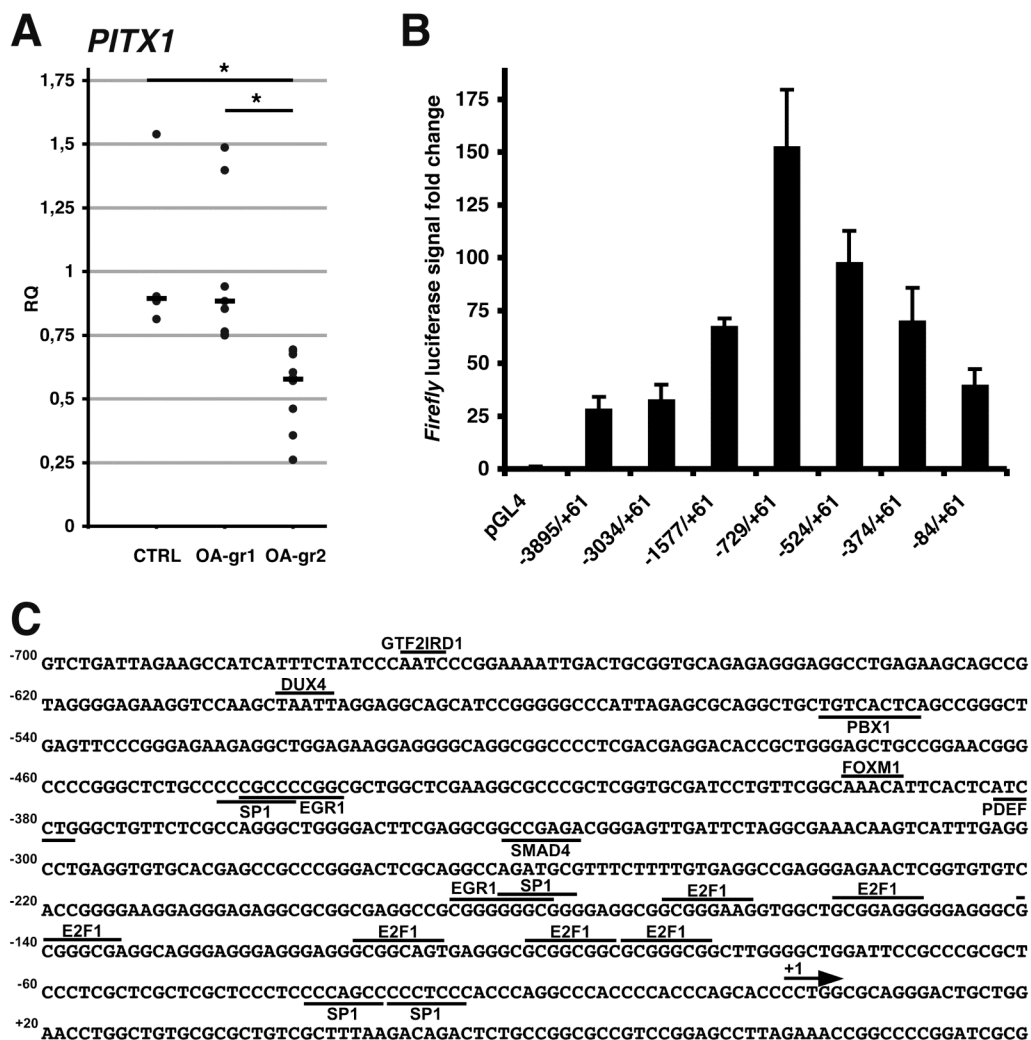


Figure 2.1 Study of basal PITX1 expression in human primary chondrocytes and in C28/I2 cell line

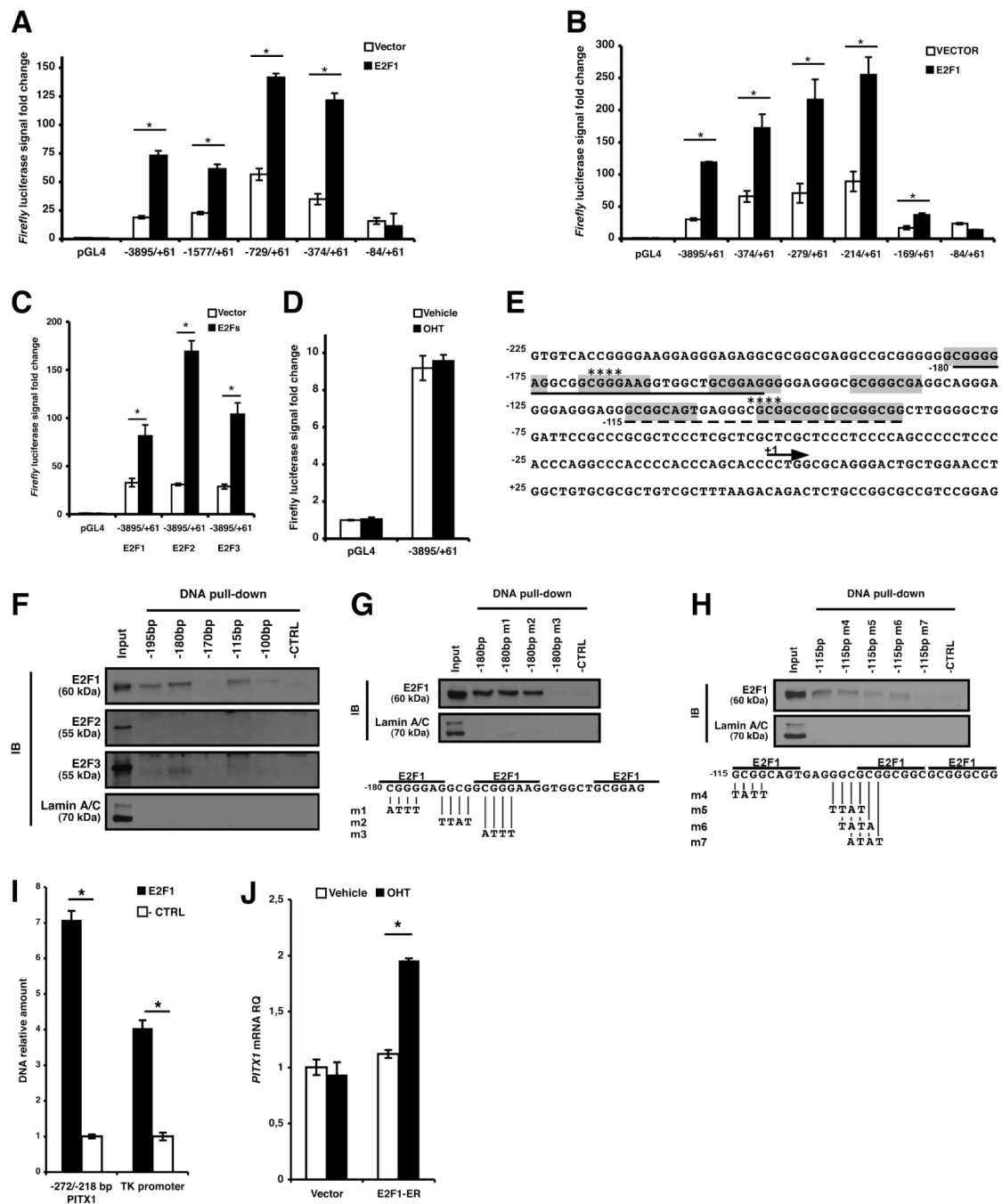


Figure 2.2 E2F1 activates *PITX1* gene in C28/I2 chondrocytes

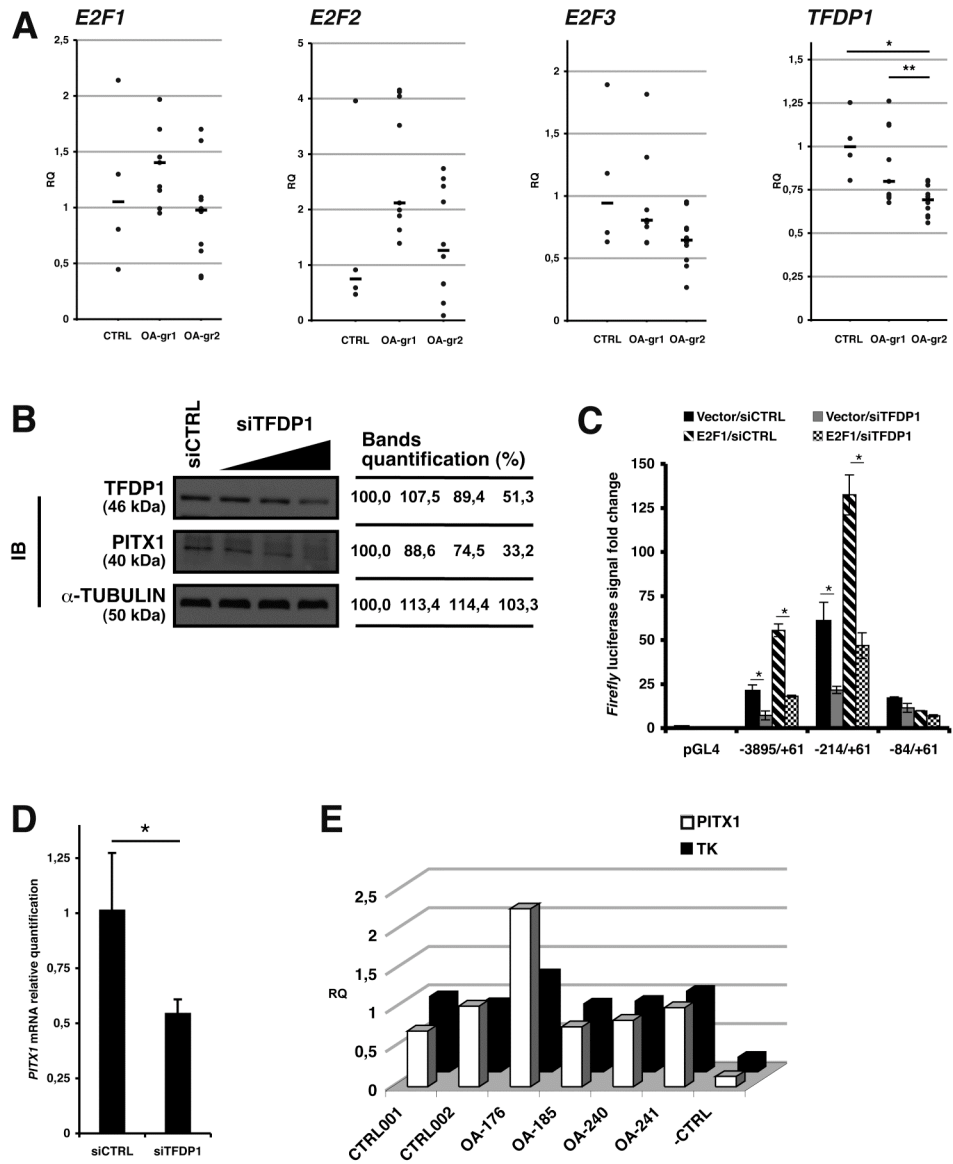


Figure 2.3 *TFDP1* depletion in chondrocytes leads to decreased *PITX1* expression

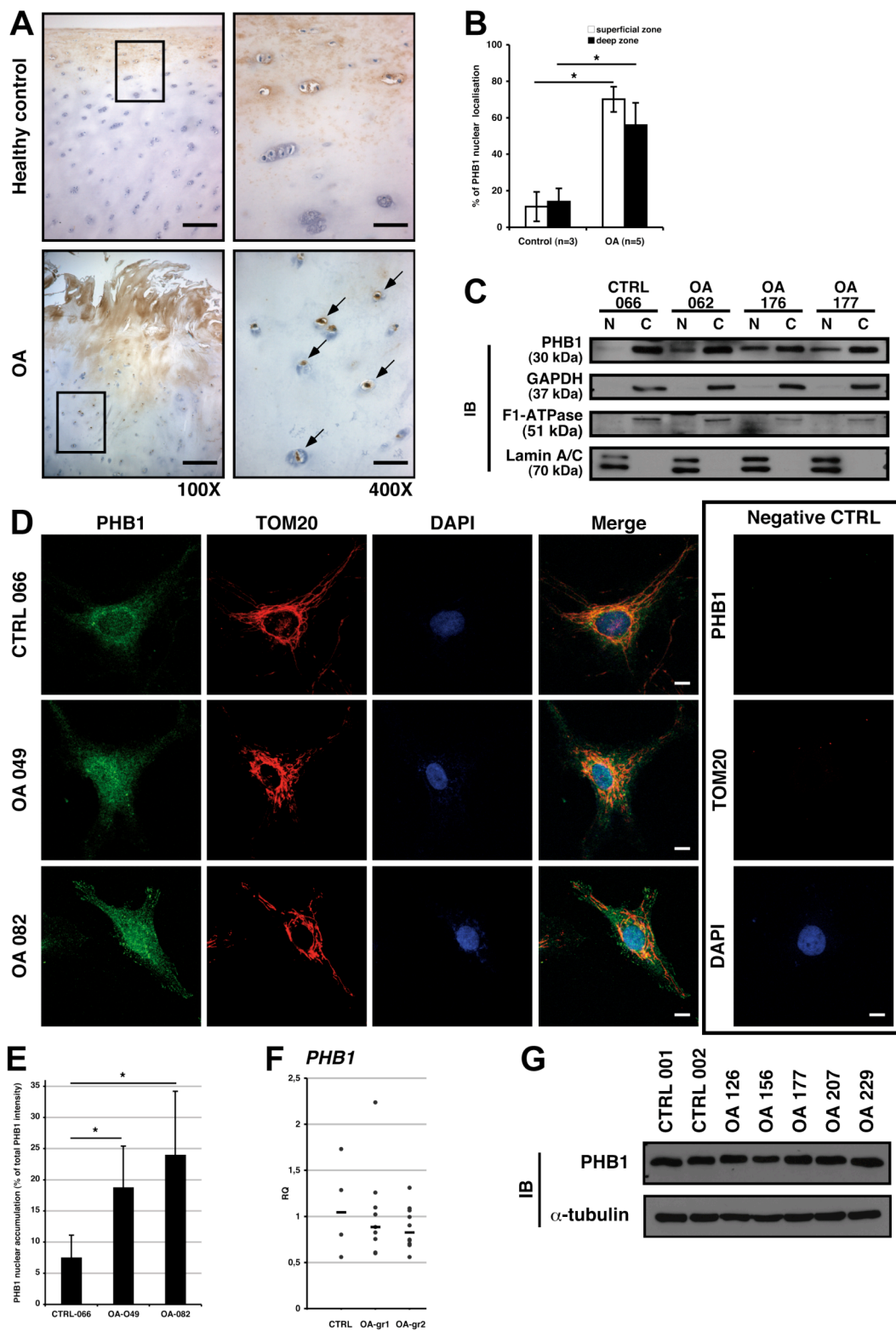


Figure 2.4 PHB1 accumulates in nucleus of OA chondrocytes

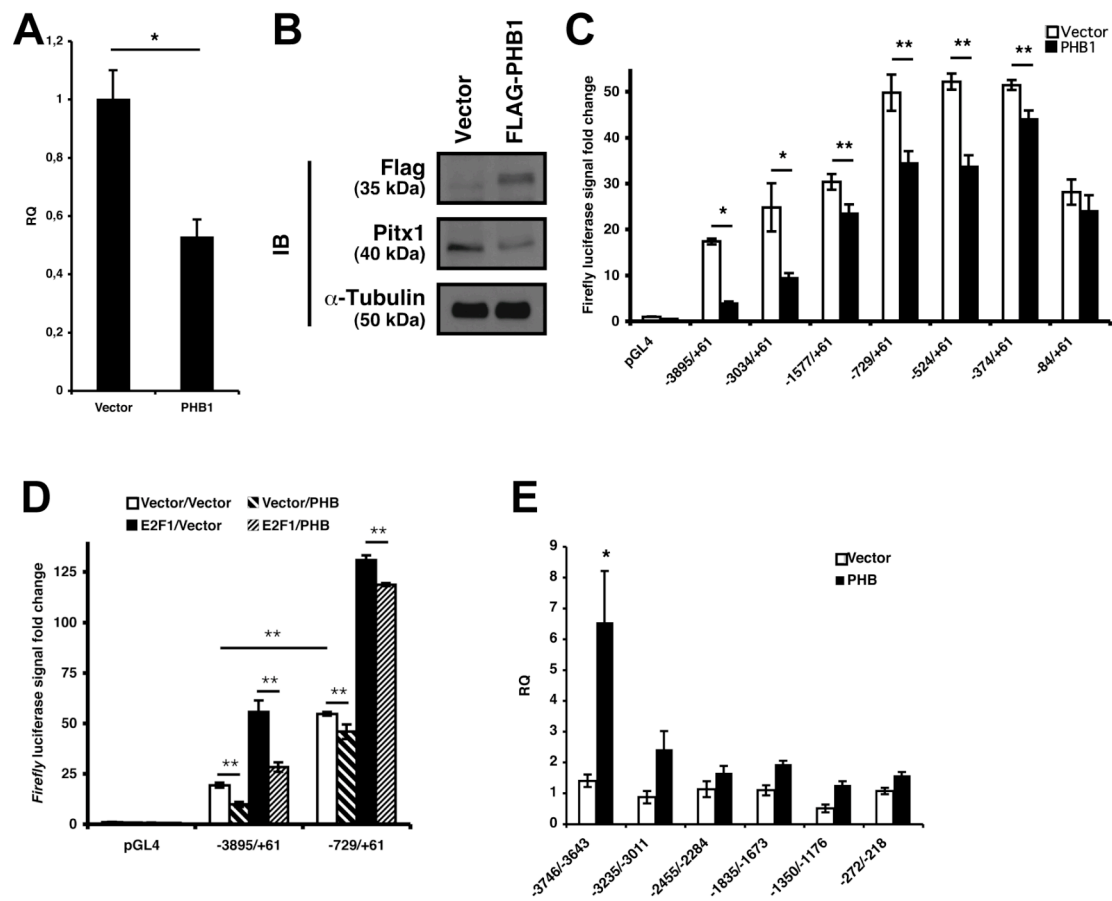


Figure 2.5 *PITX1* gene repression by PHB1 in C28/I2 chondrocytes cell line

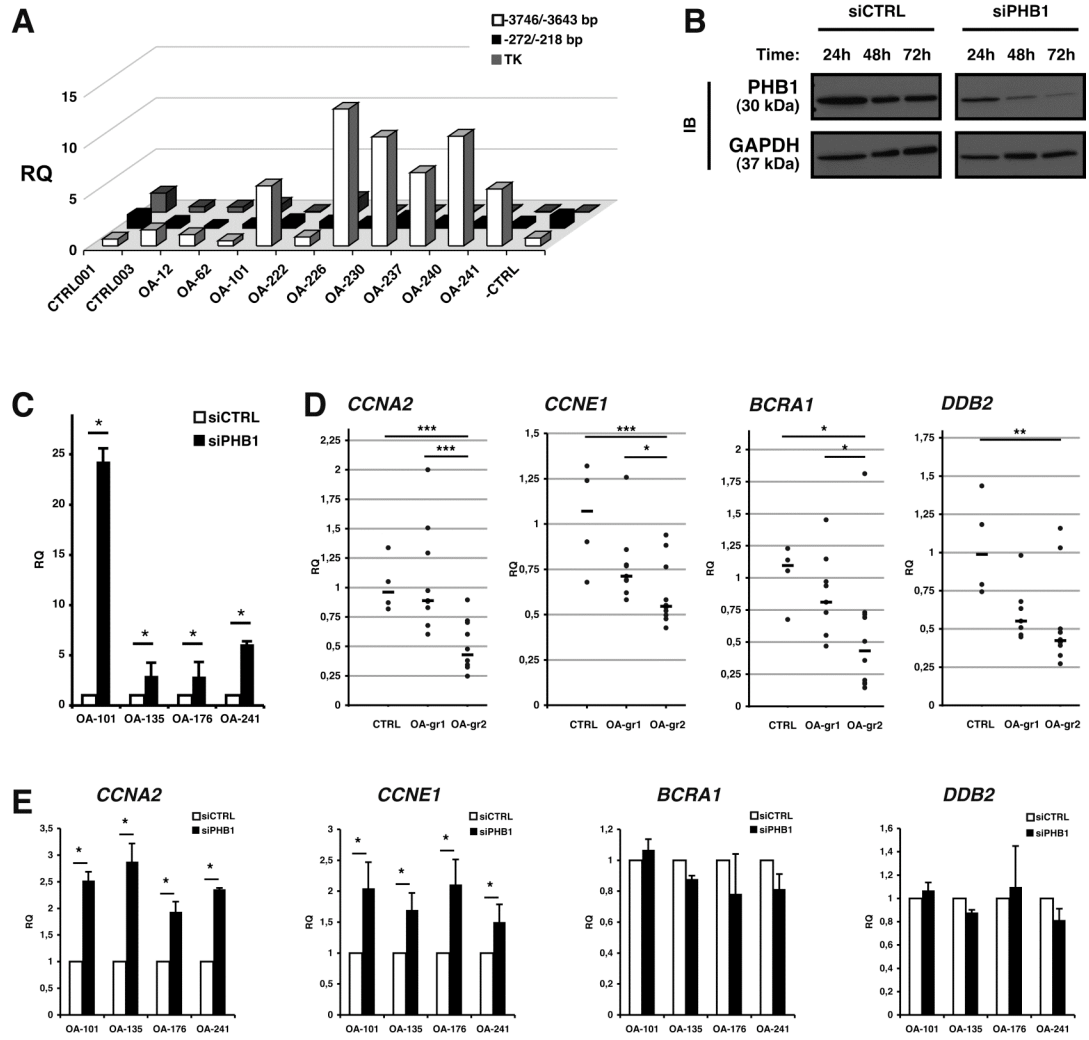


Figure 2.6 PHB1 is required to maintain repressive state of *PITX1* gene

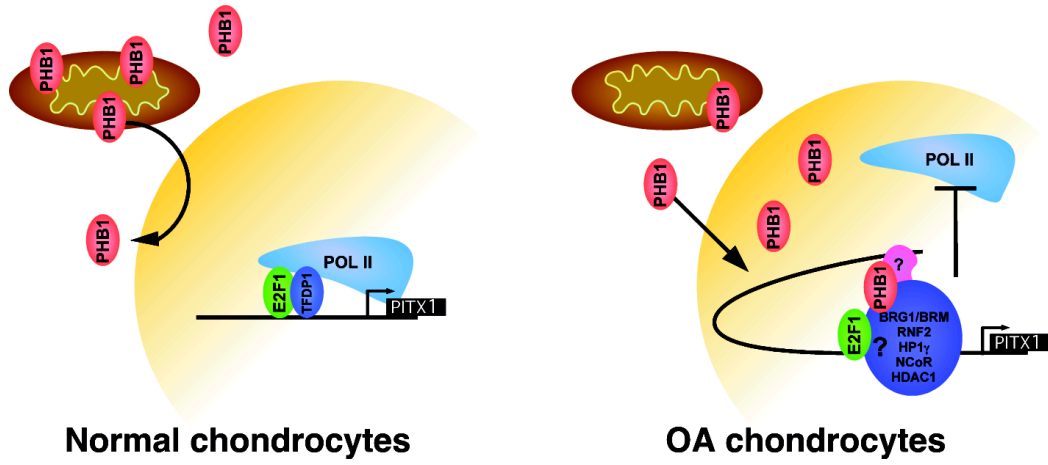


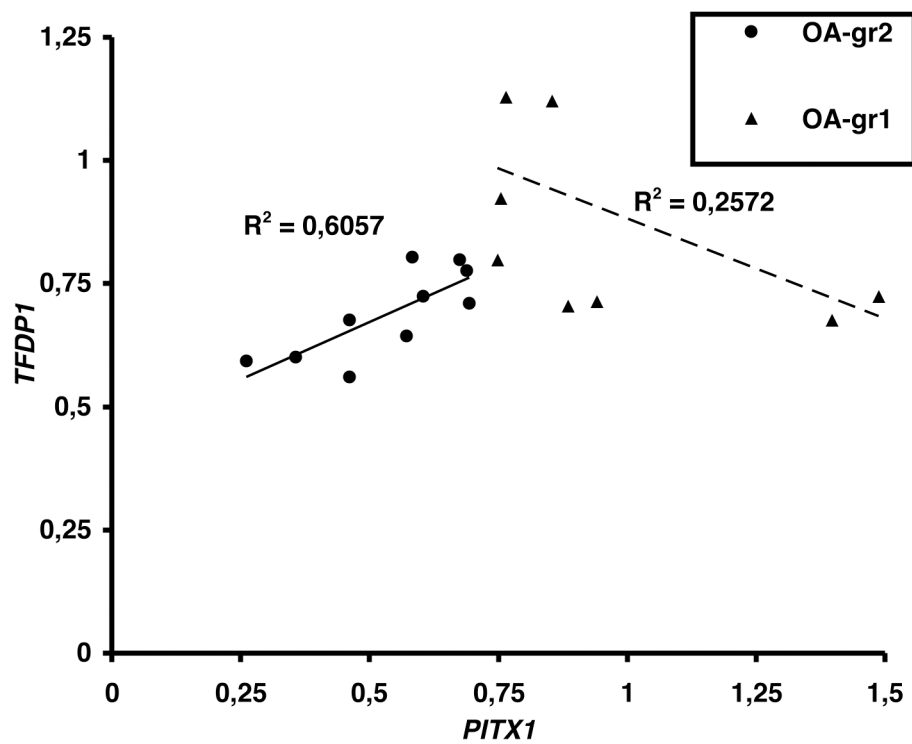
Figure 2.7 Schematic model involving PHB1 nuclear accumulation in OA chondrocytes

Table 2.1 Informations about patients and healthy control subject used in this study

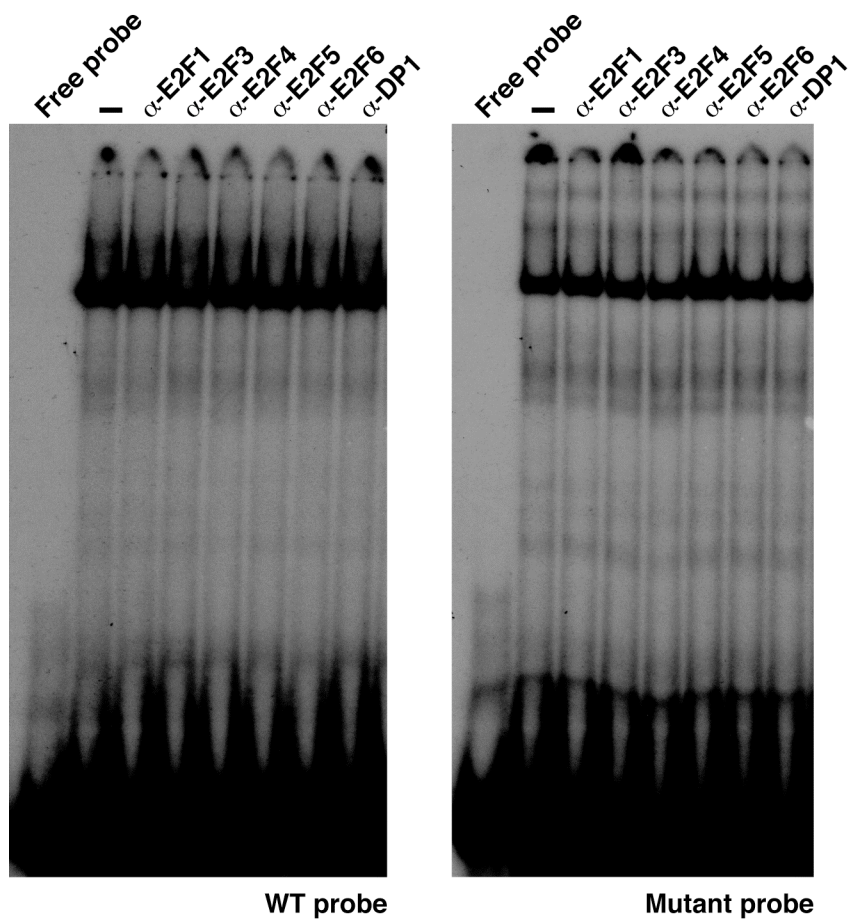
PATIENTS	GENDER	AGE	AFFECTED KNEE	FAMILY HISTORY^A
CTRL 001	Female	16	Right	N/A ^B
CTRL 002	Male	18	Left	N/A ^B
CTRL 003	Male	34	N/A ^B	N/A ^B
CTRL 066	Female	72	Right	Yes
OA 012	Female	81	Right	Yes
OA 013	Male	78	Left	No
OA 047	Male	80	Left	No
OA 049	Male	74	Left	No
OA 062	Female	79	Left	No
OA 063	Female	79	Right	Yes
OA 082	Female	83	Left	Yes
OA 101	Female	51	Left	Yes
OA 119	Female	53	Right	Yes
OA 125	Male	81	Right	No
OA 126	Female	46	Left	No
OA 135	Female	64	Right	Yes
OA 140	Female	78	Left	No
OA 156	Male	45	Right	Yes
OA 176	Female	52	Left	Yes
OA 177	Female	78	Left	Yes
OA 183	Male	78	Left	No
OA 185	Male	82	Left	No
OA 207	Female	64	Right	Yes
OA 222	Male	67	Left	Yes
OA 224	Female	86	Left	Yes
OA 226	Female	70	Left	Yes
OA 229	Female	64	Left	Yes
OA 230	Male	84	Right	No
OA 237	Female	79	Right	Yes
OA 240	Female	61	Right	Yes
OA 241	Male	76	Right	Yes
OA 265	Female	54	Left	No
OA 282	Male	52	Right	No

^AOnly patients with a close family member was considered to have family history.

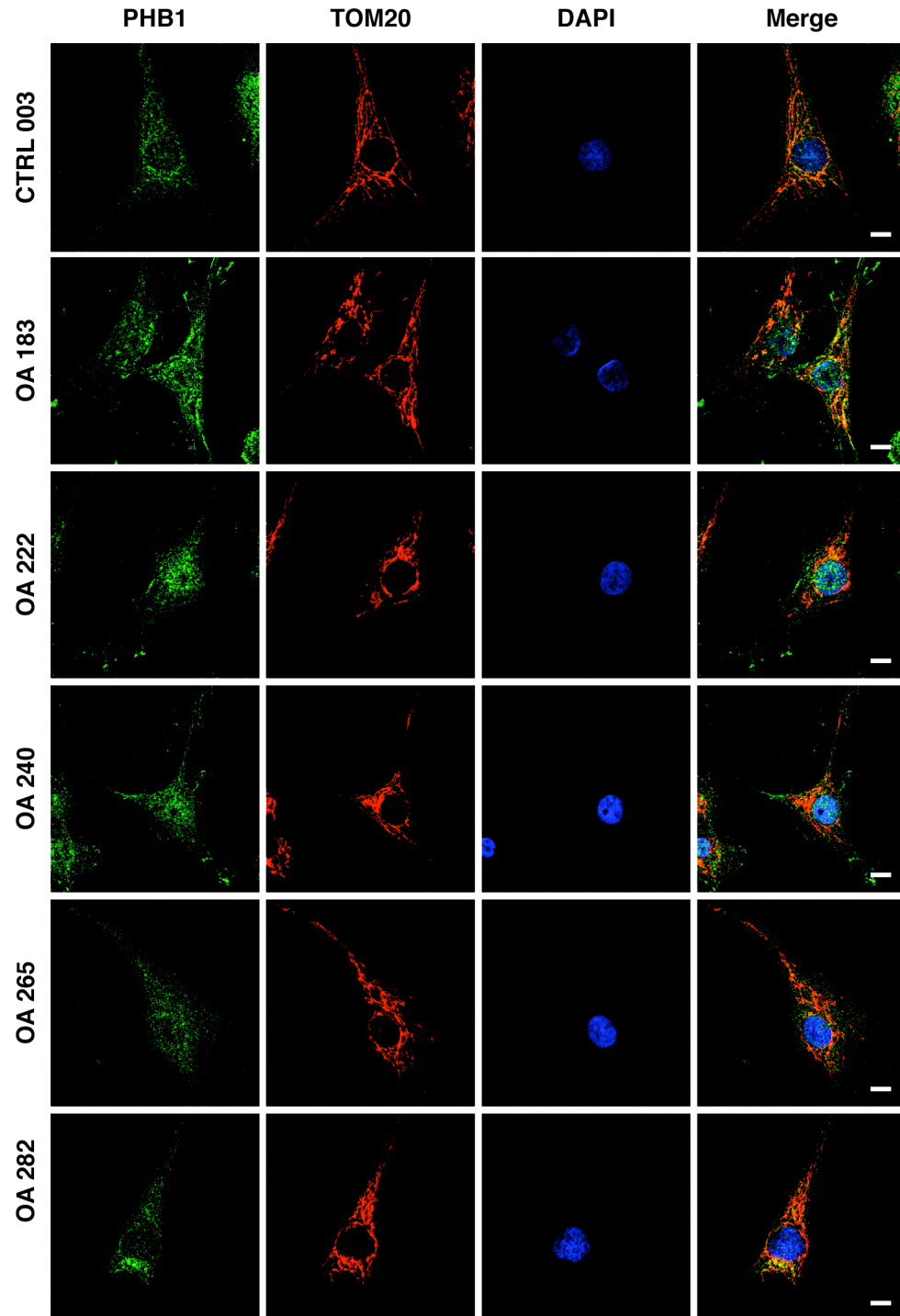
^BThese healthy subjects are anonymous donors with no additional information.



Supplemental Figure 2.1 Linear regression between *PITX1* and *TFDP1* genes expression



Supplemental Figure 2.2 Electromobility shift assay (EMSA) performed using OA nuclear extract



Supplemental Figure 2.3 Immunofluorescence against PHB1 and TOM20 on primary chondrocytes

Supplemental Table 2.1 OA patients classification considering PITX1 expression level and PHB1 nuclear accumulation

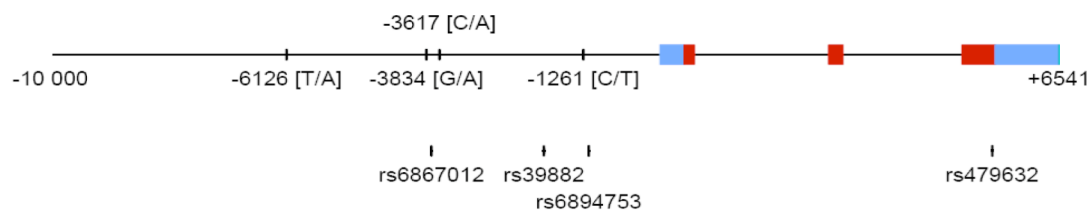
Patient ID	Nuclear accumulation^A	Gender	Age^B
OA subgroup-1			
OA 12	+	Female	81
OA 47	N/A	Male	80
OA 63	+	Female	79
OA 140	+	Female	78
OA 156	-	Male	45
OA 176	+	Female	52
OA 177	+	Female	78
OA 185	-	Male	82
OA 207	+	Female	64
OA 224	+	Female	86
OA 230	+	Male	84
OA subgroup-2			
OA 13	N/A	Male	78
OA 49	+	Male	74
OA 62	+	Female	79
OA 82	+	Female	83
OA 101	+	Female	51
OA 119	+	Female	53
OA 125	+	Male	81
OA 126	+	Female	46
OA 135	-	Female	64
OA 183	+	Male	78
OA 222	+	Male	67
OA 226	+	Female	70
OA 240	+	Female	61
OA 241	+	Male	76
OA 237	+	Female	79
OA 265	+	Female	54
OA 282	-	Male	52

^AQualitative evaluation of nuclear accumulation based on immunoblot, immunofluorescence or chromatin immunoprecipitation assay results.

^BThey are no significant age difference between OA subgroup 1 and OA subgroup 2 (paired t test: p=0.11)

^{N/A} Data not available.

Supplemental Table 2.2 PITX1 SNP analyses with genomic DNA from control subject and OA patients



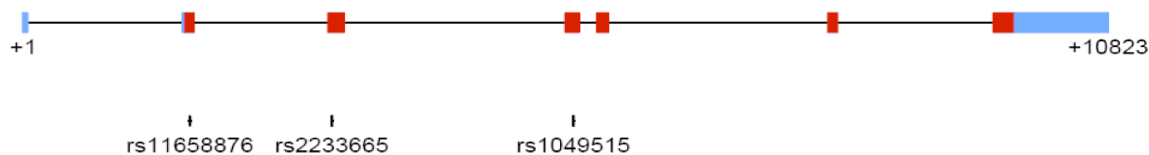
Position	SNP id	Genotype Ctrl (n=92)				Genotype OA (n=91)			
		TT	TA	AA	nd	TT	TA	AA	nd
-6126	n/a	91	1	0	0	91	0	0	0
-3834	n/a	GG	GA	AA	nd	GG	GA	AA	nd
		92	0	0	0	91	0	0	0
-3751	rs6867012	GG	GA	AA	nd	GG	GA	AA	nd
		73	17	2	0	69	20	2	0
-3617	n/a	CC	CA	AA	nd	CC	CA	AA	nd
		92	0	0	0	91	0	0	0
-1906	rs39882	GG	GT	TT	nd	GG	GT	TT	nd
		33	47	11	1	32	46	13	0
-1261	n/a	CC	CT	TT	nd	CC	CT	TT	nd
		92	0	0	0	89	0	0	2
-1173	rs6894753	CC	CG	GG	nd	CC	CG	GG	nd
		92	0	0	0	90	0	0	1
		GG	GC	CC	nd	GG	GC	CC	nd
+5447	rs479632	46	42	4	0	49	36	6	0

Positions are calculated with +1 corresponding to the transcription initiation site of human PITX1 gene, represented by the beginning of the first blue box. The red boxes represent coding regions within the exons. (nd = not detected)

Supplemental Table 2.3 Prohibitin peptides identified by mass spectrometry

Peptide number	Peptide sequence	MW (Da)
1	(R)FDAGELITQR(E)	1149.590 ± 0.202
2	(R)NITYLPAGQSVLLQLPQ(-)	1855.033 ± 0.359
3	(K)DLQNVNITLR(I)	1185.659 ± 0.013
4	(R)SRNITYLPAGQSVLLQLPQ	2098.166 ± 0.568
5	(K)AAELIANSLATAGDGLIELR(K)	1998.087 ± 1.325

Supplemental Table 2.4 Human PHB1 SNP analysis using genomic DNA from control subject and OA patients



SNP	Position (aa)	Residue	Genotype Ctrl (n=92)			Genotype OA (n=91)		
			CC	CA	AA	CC	CA	AA
rs11658876	17	Ala->Ser	92	0	0	91	0	0
rs2233665	43	Arg->Leu	GG	GT	TT	GG	GT	TT
rs1049515	111	Gly->Glu	91	1	0	90	1	0
			GG	GA	AA	GG	GA	AA
			92	0	0	91	0	0

The black lines represent introns whereas the boxes represent exons, blue for non-coding regions and red for coding regions.

Supplemental Table 2.5 List of primers used in mRNA detection by real-time RT-PCR

Gene symbol	GeneID	Orientation	Nuclotide sequence
<i>ACTB</i>	60	Forward	5'_GGAAATCGTGCGTGACAT_3'
		Reverse	5'_TCATGATGGAGTTGAAGGTAGTT_3'
<i>BRCA1</i>	672	Forward	5'_AGGAAATGGCTGAACTAGAAG_3'
		Reverse	5'_TCTGGATTCTGGCTTATAGGG_3'
<i>CCNA2</i>	890	Forward	5'_CGTGGACTGGTTAGTTGAAG_3'
		Reverse	5'_CAAACCTCTGCTACTTCTGGG_3'
<i>CCNE1</i>	898	Forward	5'_GGCCTTGTATCATTTCTCGTC_3'
		Reverse	5'_TGTCTCTGTGGGTCTGTATG_3'
<i>DDB2</i>	835990	Forward	5'_GCATCAAGGACAAAACCCAC_3'
		Reverse	5'_CCAGGCTACAAAACCCAGATG_3'
<i>E2F1</i>	1869	Forward	5'_GTCCAAGAACCACATCCAGTG_3'
		Reverse	5'_TCCTGGGTCAACCCCTCAAG_3'
<i>E2F2</i>	1870	Forward	5'_TGGGTAGGCAGGGGAATGTTG_3'
		Reverse	5'_AGTCACATAGGCCAGCCTCTTG_3'
<i>E2F3</i>	1871	Forward	5'_AAGCGGTCATCAGTACCTCTCAG_3'
		Reverse	5'_CAAGAGACGTATCATAACCGCGTT_3'
<i>PHB (PHB1)</i>	5245	Forward	5'_TTCACAGAAGCGGTGGAAG_3'
		Reverse	5'_CGCCTTTTTCTGTTGCTCA_3'
<i>PITX1</i>	5307	Forward	5'_GTAACCCGACATGAGCA_3'
		Reverse	5'_GTTACGCTCGCGCTTACG_3'
<i>TFDP1</i>	7027	Forward	5'_ACGTCTAACGGCACAAGGTT_3'
		Reverse	5'_CTGAGACCCATTGGAGCTTG_3'

Supplemental Table 2.6 List of primers used in vector constructs

Primer name	Nucleotide Sequence
PHB1_EcoRI_(forward)	5'_GCGAATTCTGCTGCCAAAGTGTTTGAG TCCATTGGC_3'
PHB1_XhoI_(reverse)	5'_GCCTCGAGTCACTGGGGCAGCTGGAGGA_3'
PITX1promoter_-	5'_GGGTACCGCTCAGCCATTCTCAGGAAC_3'
3895bp_KpnI_(forward)	
PITX1promoter_-	5'_GGGTACCCAAGTGAGCTGATGCTGAA_3'
3034bp_KpnI_(forward)	
PITX1promoter_-	5'_CACTCGAGAGGCTGGAGAAGGAGGGGCA_3'
524bp_XhoI_(forward)	
PITX1promoter_-	5'_CACTCGAGTGTCTCGCCAGGGCTGGGGACTTC_3'
374bp_XhoI_(forward)	
PITX1promoter_-	5'_CACTCGAGACTCGCAGGCCAGATGCGTTTC_3'
279bp_XhoI_(forward)	
PITX1promoter_-	5'_CACTCGAGGAAGGAGGGAGAGGCGCG_3'
214bp_XhoI_(forward)	
PITX1promoter_-	5'_CACTCGAGAAGGTGGCTGCGGAGGGGGA_3'
169bp_XhoI_(forward)	
PITX1promoter_-84bp_XhoI_(forward)	5'_CACTCGAGTTGGGGCTGGATTCCGCCCGCGCT_3'
PITX1promoter_+61bp_EcoRV_(reverse)	5'_GGATATCGGCAGAGTCTGTCTTAAAGCGA_3'
pGL4_3'MCS_(reverse)	5'_GTCTTCGAGTGGGTAGAAATGGCG_3'

Supplemental Table 2.7 List of primers used for real-time PCR after chromatin immunoprecipitation assay

Primer name^A	Orientation	Nucleotide Sequence
PITX1_-3746/-3643	Forward	5'_CGGCACAGAGTCCTGAGTTCATA_3'
	Reverse	5'_CTCACTGGCTCCTTTAGGCTTCCT_3'
PITX1_-3235/-3011	Forward	5'_AGGAAGGGTCCTCATGGTGACTAC_3'
	Reverse	5'_CTGCTTCAGCATCCAGCTCACTTG_3'
PITX1_-2455/-2284	Forward	5'_GACTAACAGTGAGGAAACACGCC_3'
	Reverse	5'_GAATGGTCTGTCTGTGGGCCTCTA_3'
PITX1_-1835/-1673	Forward	5'_TCATGGAGGGAGATCTCAGCTTGG_3'
	Reverse	5'_GTGGAGAGACAGCACAGCTCCTTA_3'
PITX1_-1350/-1176	Forward	5'_GCTTCTTTCCAGGCAGACAATCC_3'
	Reverse	5'_GACCTCAGCGTCTTGAGCAAACAG_3'
PITX1_-272/-218	Forward	5'_TCGCAGGCCAGATGCGTTTCTTT_3'
	Reverse	5'_GGTGACACACCGAGTTCTCCCTC_3'
TK_promoter ^B	Forward	5'_TCCCGGATTCCCTCCACGAG_3'
	Reverse	5'_TGCGCCTCCGGGAAGTTCAC_3'

^AThe primer names are composed of gene names and amplified promoter region respectively.

^BWang S. et al. 2002

Supplemental Table 2.8 List of probes used in DNA pull-down assay

Probe name and PITX1 promoter region	Probe sequence
-195 (-195/-165 bp)	5'-CGAGGCCGCGGGGGGCGGGGAGGCGGCGGG-3' 5'-(biotin)CCCGCCGCCTCCCCGCCCCCGCGGCCTCG-3'
-180 (-180/-150 bp)	5'-CGGGGAGGCGGCGGGAAGGTGGCTGCGGAG-3' 5'-(biotin)CTCCGCAGCCACCTTCCCGCCGCCTCCCCG-3'
-170 (-170/-140 bp)	5'-GCGGAAGGTGGCTGCGGAGGGGAGGGCG-3' 5'-(biotin)CGCCCTCCCCCTCCGCAGCCACCTTCCCGC-3'
-115 (-115/-85 bp)	5'-GCGGCAGTGAGGGCGCGGCGGCGGGGCGG-3' 5'-(biotin)CCGCCC GCGCCGCCGCGCCCTCACTGCCGC-3'
-100 (-100/-70 bp)	5'-CGGCGGCGCGGGCGGCTTGGGGCTGGATTC-3' 5'-(biotin)GAATCCAGCCCCAAGCCGCCGCGCCGCCG-3'
-180m1 (-180/-150 bp)	5'-ATTTGAGGCGGCGGGAAGGTGGCTGCGGAG-3' 5'-(biotin)CTCCGCAGCCACCTTCCCGCCGCCTCAAAT-3'
-180m2 (-180/-150 bp)	5'-CGGGGATTATGCGGGAAGGTGGCTGCGGAG-3' 5'-(biotin)CTCCGCAGCCACCTTCCCGCATAATCCCCG-3'
-180m3 (-180/-150 bp)	5'-CGGGGAGGCGGATTTAAGGTGGCTGCGGAG-3' 5'-(biotin)CTCCGCAGCCACCTTAAATCCGCCTCCCCG-3'
-115m4 (-115/-85 bp)	5'-TATTCAGTGAGGGCGCGGCGGCGGGGCGG-3' 5'-(biotin)CCGCCC GCGCCGCCGCGCCCTCACTGAATA-3'
-115m5 (-115/-85 bp)	5'-GCGGCAGTGAGTTATCGGCGGCGCGGGGCGG-3' 5'-(biotin)CCGCCC GCGCCGCCGATAACTCACTGCCGC-3'
-115m6 (-115/-85 bp)	5'-GCGGCAGTGAGGTATAGGCGGCGCGGGGCGG-3' 5'-(biotin)CCGCCC GCGCCCTATACCTCACTGCCGC-3'
-115m7 (-115/-85 bp)	5'-GCGGCAGTGAGGGATATGCGGCGCGGGGCGG-3' 5'-(biotin)CCGCCC GCGCCCATATCCCTCACTGCCGC-3'

2.1.10 SUPPLEMENTAL METHODS

Vector constructs. To clone human PITX1 promoter, -3895/+61 and -3034/+61 bp regions were amplified using genomic DNA extracted from MG-63 osteoblast cell line and specific primers containing KpnI restriction site in 5' end and EcoRV restriction site in 3' end (see Supplemental Table 6 for primer sequences). Using these restriction sites, fragments were cloned into pGL4 vector containing the luciferase gene (Promega). To generate -1577/+61 PITX1-promoter-luciferase reporter constructs, the -3895/+61 construct was digested with KpnI and SphI restriction enzymes and cohesive ends were made blunt using T4 DNA polymerase and the vector was finally closed by ligating these blunt ends. To generate -729/+61 PITX1-promoter-luciferase reporter constructs, the -3895/+61 constructs was digested with KpnI and cohesive ends were made blunt using T4 DNA polymerase. This DNA was then digested with XmnI restriction enzyme and the vector was closed by ligating the two blunt ends. To generate PITX1-promoter-luciferase reporter -524/+61, -374/+61, -279/+61, -214/+61, -169/+61 and -84/+61 constructs, the -729/+61 constructs was amplified with different forward primers containing a XhoI restriction site in 5' end and a single reverse primer binding the 3' side of pGL4 vector multicloning site (MCS) (see Supplemental Table 6 for primer sequences). By using the XhoI restriction site generated by the forward primer and the HindIII restriction site from the multicloning site, we next cloned this fragment into pGL4 vector containing the luciferase gene.

For the Flag-PHB1 construct, human PHB1 cDNA was purchased from OriGene (Rockville, MD, USA). PHB1 cDNA was then amplified from the second codon to the stop codon with specific primer pairs containing EcoRI and XhoI restriction sites in 5' and 3' ends of the insert respectively (see Supplemental Table 6 for primer sequences). These inserts were than cloned in frame, using these two restriction enzyme sites in a pLPC vector containing three-time repeated Flag epitop (a kind gift from Dr. Gerardo Ferbeyre's laboratory).

Luciferase assay. Luciferase assays were performed in C28/I2 cells. Sixteen hours before transfection, 1.35×10^5 cells were seeded in 12-well plates. In each well 250 ng of pGL4 vector containing PITX1 promoter fragments was co-transfected with 100 ng of β -gal reporter vector (used as a control to normalize *firefly* luciferase signal). When PITX1 repression by PHB1 was studied, 100 ng of pLPC-Flag-PHB1 vector or an equivalent empty vector was used. When PITX1 stimulation by E2Fs was studied, 50 ng of ER tagged E2F transcriptional activator expressing vector was used. To transfect these DNAs into cells, 5 μ l of Lipofectamine 2000 (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) per well was used according to the manufacturer's instructions. 48 hours post-transfection, cells were washed twice with PBS and lysed in 200 μ l of glo-lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA). To study *PITX1* gene regulation by E2Fs, cells were treated 24 hours prior to cell lysis with 500 nM of TMX.

Luciferase assays were performed using 30 μ l of cell lysis and 30 μ l of Luciferin solution (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(-)-Luciferin (Roche, Indianapolis, IN, USA), pH 7.7). *Firefly* counts were obtained using Wallac VICTOR² from Perkin Elmer. β -gal assays were performed using 30 μ l of cell lysis and 30 μ l of fresh β -gal assay buffer (10.1 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , 12 mM KCl, 137 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 50 mM 2-mercaptoethanol, 1 % 2-nitrophenyl β -D-galactopyranoside, pH 7.4) and incubated 5-10 minutes at room temperature. β -gal counts were obtained by measuring at 405 nm absorbance using DTX 880 Multimode Detector Microplate Reader from Beckman Coulter (Brea, CA, USA). *Firefly* luciferase counts were normalized using the β -gal values. Each experiment was performed in triplicate.

Nuclear extract and DNA Pull-Down. Five 10cm-dishes of confluent C28/I2 cells were washed three times and cells scraped in cold PBS. Cells were centrifuged at 500xg for 5 minutes at 4 °C. They were then resuspended in 2 ml of buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 1 % NP-40, 500 nM DTT and 1X Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche, Indianapolis, IN, USA)) and incubated for 25

minutes on ice with short vortexing pulses every 3 minutes, to allow cytoplasm disruption. This homogenate was centrifuged at 600xg for 10 minutes at 4 °C to pellet crude nuclear fraction. This fraction was resuspended in buffer B (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.1 % TritonX-100 and 1X Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail), layered over 30 % sucrose (w/v in buffer B without TritonX-100), and centrifuged at 3500xg for 60 minutes at 4 °C. The pellet containing the pure nuclear fraction was resuspended in buffer C (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 500 nM DTT, 5 % glycerol, 0.4 % NP-40 and 1X Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail) and sonicated on ice for three 15-second pulses with an output of 7, using Sonifier S-150D from Branson (Danbury, CT, USA). The nuclear extract was centrifuged at 13000xg for 10 minutes at 4 °C to pellet the debris, and protein concentration was determined with a protein assay kit from Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

For DNA pull-down, 250 µg of nuclear extract underwent pre-clearing using 30 µl of neutravidin agarose beads (Pierce, Rockford, IL, USA) and incubated for 2 hours at 4 °C on a rocker-type shaker. Pre-cleared nuclear extracts were next incubated on the shaker for 16 hours at 4 °C in 500 µl of buffer C containing poly dAdT non-specific oligonucleotides (4 ng/µl) and specific double-stranded biotinylated probes (4 ng/µl). For competition, 1X (4 ng/µl) or 3X (12 ng/µl) specific double-stranded non-biotinylated probes were added to the mix. The probes used are listed in Table 8. For double-stranded biotinylated probes, each anti-sense oligonucleotide was biotinylated at its 5' end to allow interaction with neutravidin. The DNA/protein complexes were captured using 50 µl of neutravidin agarose beads for 1.5 hours at 4°C on a rocker-type shaker. After incubation, beads were washed 4 times with buffer C and resuspended in 3X Laemmli loading buffer. Proteins were resolved by SDS-PAGE gel, transferred to a PVDF membrane and immunodetected with a specific antibody.

Electromobility shift assay (EMSA). Nuclear extracts (5 µg of proteins) were incubated for 30 min on ice in 20 µl of a solution containing 20 mM HEPES (pH 7.5), 40 mM KCl, 5 % glycerol, 5 mM spermidine, and 100 ng of poly(dA-dT) in the presence of

radiolabeled probe (14 ng/100.000 cpm). For supershift analysis, the nuclear extracts were pre-incubated 30 min on ice then incubated in presence of 4 µg of E2F antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and incubated on ice for 1 h. The sequences of the oligonucleotide probes were: E2F-like (wild-type) 5'-CTGTGCCTCACTGGCGGCAGTCCTGCTCAA-3'; and E2F-like mutant (OA) site, 5'-CTGTGCCTCACTGGTGGCAGTCCTGCTCAA-3'. Samples were then separated on 7 % native polyacrylamide gels (acrylamide:bis 29:1 in 0.5 x Tris-borate EDTA). Gels were run at 180 V for 3 hours with a recirculation pump for the buffer and a cooling tank.

Chromatin immunoprecipitation. Primary chondrocytes or C28/I2 cell line were cultured in 10 cm plates. Cells were fixed by adding concentrated formaldehyde solution directly in cell medium at a final concentration of 1 %. Plates were incubated at room temperature for 15 minutes. Crosslink reaction was stopped by adding 1 M glycine solution for a final concentration of 125 mM and by incubating at room temperature for 5 minutes. Crosslinked cells were washed twice with 5 ml of cold PBS and cells were collected by scraping in 500 µl of cold PBS. To isolate nuclei from these cells, cell pellet was spun for 5 minutes at 4 °C at 500xg and pellet was resuspended in 1 ml of cold NCP I buffer (10 mM Hepes pH 6.5, 10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA and 0.25 % Triton X-100 (v/v)). Homogenate was spun for 5 minutes at 4 °C at 500xg and pellet was resuspended in 1 ml of cold NCP II buffer (10 mM Hepes pH 6.5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA and 0.5 mM EGTA). To get nuclei, the homogenate was spun for 5 minutes at 4 °C at 500xg and this nucleus pellet was resuspended in 800 µl of cold RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % NP-40 (v/v), 0.5 % (w/v) deoxycholate, 0.1 % (w/v) SDS and 1X Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail). Nuclei lysate was sonicated on ice for seven 10-second pulses with an output of 10 using Sonifier S-150D from Branson (Danbury, CT, USA). Lysate was spun for 10 minutes at 4 °C at 17000xg and supernatant was transferred to a new tube. Total protein quantification was performed on this supernatant using a protein assay kit from Bio-Rad (Hercules, CA USA).

Prior to immunoprecipitation, 1 mg of crosslink protein extract was pre-cleared using 30 μ l of protein A or G streptavidin agarose beads and 6 μ g of salmon sperm DNA, in a total volume of 800 μ l with 4-hours incubation at 4 °C on a rocker-type shaker. Following the pre-clearing, 5 μ g of a specific antibody was added to the protein extract and samples were incubated for 16 hours at 4 °C on a rocker-type shaker. Protein/DNA complexes were then pulled down for 1 hour at 4 °C using 50 μ l of protein A or G streptavidin agarose beads. To remove non-specific interactions with beads, complexes were washed twice with 500 μ l of RIPA buffer, four times with 500 μ l of lithium chloride buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM LiCl, 1 % NP-40 (v/v), 1 % deoxycholate (w/v)), twice with 500 μ l of RIPA buffer and once with 500 μ l of 100 mM Tris solution (pH 8). Protein/DNA complexes were next eluted from beads by heating to 65 °C in 150 μ l of a 1 % SDS solution. 200 mM of NaCl was added to the supernatant and the extract was incubated at 65 °C for 5 hours to allow reverse formaldehyde crosslinks. 100 μ g of total nuclear extract used for the immunoprecipitation was also set aside in order to reverse formaldehyde crosslinks. Sample volume was next increased to 300 μ l with a 100 mM Tris solution (pH 8.0). DNA was purified by phenol/chloroform extraction and precipitated using 2.5 volumes of concentrated ethanol for 16 hours at -20 °C. Chromatin from input and CHIP samples were resuspended in 100 μ l and 50 μ l of a 10 mM Tris solution (pH 8.0) respectively. To analyse immunoprecipitated chromatin fragments, real-time PCR was performed using primers listed in supplemental Table 7 as describe in the real-time PCR analysis section.

Immunoblot. Leammli buffer (58.3 mM Tris-HCl pH 6.8, 1.71 % SDS, 0.83 % β -mercaptoethanol, 0.002 % bromophenol blue, 5 % glycerol) was added to 10 or 50 μ g of protein extract and loaded on a 7.5 or 10 % acryl amide SDS-PAGE gel. Proteins were allowed to separation and next transfer on a PVDF membrane (Milipore). PVDF membrane was immunoblotted with a specific antibodies solution (1:500 dilution factor in PBS/Tween/3 % BSA) for 16 hours. PVDF membrane was next immunoblotted with horseradich peroxidase conjugates anti-mouse, anti-rabbit or anti-goat solution (1:10000 diluted in PBS/Tween/5 % milk) for 1 hour. Proteins were detected using Western

Lightning ECL substrate (Perkin Elmer) and by exposing PVDF membrane 10 to 60 seconds on a Fuji X-ray films.

Préface au chapitre 3

Le XLH est un syndrome qui se caractérise par un retard de croissance, une ostéomalacie, une hypophosphatémie secondaire due à une perte anormale de phosphate dans les urines et une concentration inappropriée, malgré l'hypophosphatémie, de 1-25-(OH)₂D₃ circulant. La cause de cette pathologie est la mutation de la peptidase PHEX, qui résulte en son inactivation. L'expression de *PHEX* corrèle avec la minéralisation de la matrice extracellulaire osseuse *in vivo* et *in vitro*. Plusieurs groupes se sont intéressés à la régulation transcriptionnelle de *PHEX*. Au moment où ce projet a été entrepris, trois mécanismes avaient déjà été découverts. Le premier implique le facteur de transcription RUNX2 et résulte en l'activation de la transcription. Le second correspond à la répression du gène, laquelle est induite par la 1-25-(OH)₂D₃. Enfin, le troisième, découvert par le groupe du docteur Guy Boileau, correspond à la répression du gène sous l'effet de la PTH et la PTHrP. L'article présenté dans ce chapitre fait ainsi suite à cette dernière découverte. L'objectif du projet est de mettre en lumière le mécanisme transcriptionnel responsable de la répression de *PHEX* par la PTHrP(1-34). Il est à noter qu'au moment où a été entreprise cette étude, un groupe a identifié le répresseur transcriptionnel E4BP4 comme cible directe de la PTH dans les ostéoblastes. Cette découverte s'est avérée fort intéressante pour notre étude puisque deux éléments de réponses pour E4BP4 sont présents dans une région critique du promoteur de *PHEX* pour sa répression par la PTHrP(1-34).

Ce chapitre est présenté sous forme de manuscrit. Le 22 février 2011, ce manuscrit a été révisé par quatre réviseurs du périodique *Journal of Cellular Physiology*. L'éditeur de ce journal nous a accordé un délai de six mois afin de répondre aux modifications demandées par les réviseurs et de soumettre ce manuscrit une seconde fois. Ainsi, nous prévoyons soumettre une seconde fois ce manuscrit modifié à *Journal of Cellular Physiology* en mai 2011. Ce projet s'est déroulé de mai 2004 à mai 2007 dans le laboratoire du docteur Guy Boileau et de mai 2007 à décembre 2010 dans le laboratoire du docteur Alain Moreau. Ma contribution à cet article est majeure. J'ai

réalisé la plupart des expériences de ce projet à l'exception des essais avec la CIAP (Véronique Bériault) et l'immunoprécipitation d'E4BP4 pour évaluer son état de phosphorylation (Maryam Taheri). Aussi, Mathieu St-Louis a aidé pour le clonage du promoteur de *PHEX* et est celui qui a initié le projet. Enfin, les docteurs Guy Boileau et Alain Moreau sont tous deux superviseurs principaux du projet.

Chapitre 3



**La PTHrP(1-34) induit la répression du gène *PHEX*
dans les ostéoblastes via la répresseur transcriptionnel
E4BP4**

3.1 Article 2

PTHRP(1-34)-MEDIATED REPRESSION OF THE PHEX GENE IN OSTEOBLASTIC CELLS INVOLVES THE TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR E4BP4

Martin PELLICELLI^{1,2} , Maryam TAHERI², Mathieu ST-LOUIS¹, Véronique BÉRIAULT¹, Luc DESGROSEILLERS¹, Guy BOILEAU¹ and Alain MOREAU^{1,2,3,*}

¹Department of Biochemistry; Faculty of Medicine; Université de Montréal; Montréal, Québec, Canada. ²Sainte-Justine University Hospital Research Center; Université de Montréal; Montréal, Québec, Canada. ³Department of Stomatology; Faculty of Dentistry; Université de Montréal; Montréal, Québec, Canada.

*Corresponding address: Alain Moreau, PhD, Sainte-Justine University Hospital Research Center, Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases (room 4734), 3175 Côte-Sainte Catherine Road, Montréal, Quebec, H3T 1C5. Phone: 514-345-4931 ext. 3476. Fax: 514-345-4801. Email: 


Running head title: Repression of PHEX gene by E4BP4

Keywords:

- **PHEX**
- **PTHrP**
- **E4BP4**
- **Osteoblast**
- **Bone**

Total number of figures: 6

Total number of tables: 1

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MT-13052 to G.B. and L.D.)

3.1.1 ABSTRACT

PHosphate-regulating gene with homology to Endopeptidase on the X chromosome (PHEX) has been identified as the gene mutated in X-linked hypophosphatemia (XLH) syndrome, the most prevalent form of rickets in humans. The predominant expression of *PHEX* in bones and teeth, and the defective mineralization of these tissues in XLH patients indicate that PHEX is an important regulator of mineralization. Parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) are known to regulate the expression of numerous genes in osteoblastic cells through activation of the protein kinase A pathway, including repression of *PHEX*. PTH also activates the transcriptional repressor E4BP4 through the same pathway, suggesting that PTH or PTHrP-mediated repression of *PHEX* expression could involve E4BP4. To evaluate this possibility, we treated UMR-106 osteoblastic cells with PTHrP(1-34), and used RT-PCR and immunoblotting to analyze *PHEX* and *E4BP4* expression. *E4BP4* mRNA and protein levels were rapidly increased in cells treated with PTHrP(1-34), with a concomitant decrease in *PHEX* expression. This downregulation of *PHEX* could be reproduced by overexpression of E4BP4. Moreover, PTHrP(1-34)-mediated *PHEX* repression is blocked when cells were transfected with a siRNA targeting *E4BP4* mRNA. Finally, DNA pull-down and luciferase assays showed that two E4BP4 response elements located in the PHEX promoter are functional. These results underline the important role of E4BP4 in osteoblastic cells and further define the repression mechanism of PHEX gene by PTHrP(1-34).

3.1.2 INTRODUCTION

PHEX (PHosphate-regulating gene with homology to Endopeptidase on the X chromosome) has been identified as the gene mutated in X-linked hypophosphatemia (XLH) syndrome, a dominant disorder of phosphate homeostasis, and the most prevalent form of inherited rickets in humans (Francis et al., 1995). XLH is characterized by growth retardation, defective bone mineralization, hypophosphatemia secondary to renal phosphate wasting, and an inappropriately normal serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25-(OH)₂D₃) (Tenenhouse and Econs, 2001). Much of our actual understanding of the pathophysiology of XLH has been obtained from studies of the *Hyp* mouse, which presents a large deletion in the 3' region of the *Phex* gene (Beck et al., 1997) and phenotypic features similar to those of XLH patients, including rickets and osteomalacia (Tenenhouse, 1999). Consistent with the mineralized tissue phenotype observed in XLH patients and *Hyp* animals, several studies using different approaches such as *in situ* hybridization, Northern blotting, RT-PCR, RNase protection assay and immunohistochemistry have shown that *Phex* mRNA and protein are expressed predominantly in bones and teeth, specifically in osteoblasts, osteocytes and odontoblast (Du et al., 1996; Guo and Quarles, 1997; Ruchon et al., 1998; Ruchon et al., 2000; Thompson et al., 2002). PHEX protein is a type II integral membrane glycoprotein that exhibits significant similarity to members of the M13 family of zinc metallopeptidase (Turner and Tanzawa, 1997) and has been shown to have peptidase activity *in vitro* (Addison et al., 2008; Boileau et al., 2001). The peptidase activity of the protein and its predominant localization in bone and teeth cells suggest that the enzyme regulates mineralization by controlling the function of bioactive peptides. However, PHEX physiological substrate(s) is (are) still unknown but recent data strongly suggest that it is involved in the molecular mechanisms controlling FGF23 expression (Brownstein et al., 2010; Liu et al., 2003; Liu et al., 2006; Nakatani et al., 2009; Yamazaki et al., 2002). It has been observed by *in situ* hybridization that *Phex* expression correlates with the initiation of bone mineralization at day E13.5 in mouse embryos (Ruchon et al., 1998). Similarly, *Phex* mRNA and protein levels increase during mineralization by cultured osteoblasts (Ecarot and Desbarats, 1999). These results suggest that *PHEX* expression is

modulated at the transcriptional level during cell differentiation. However the molecular mechanisms that control *PHEX* expression in cells of osteoblastic lineage, are still largely unknown. Hormones known to regulate bone metabolism have been shown to influence *PHEX* expression. For example, *Phex* is up-regulated by glucocorticoid in UMR-106 cells and in primary cultures from mouse calvaria embryos (Hines et al., 2002). This activation of *Phex* transcription involves binding of Runx2 to its promoter (Hines et al., 2002). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and growth hormone (GH) can also up-regulate *Phex* expression *in vivo* (Zoidis et al., 2000). In contrast, 1,25-(OH)₂D₃ represses *Phex* expression in primary osteoblasts derived from calvaria and in UMR-106 cells by stimulating the binding of a yet to be characterized repressor to a polyadenine element present on its promoter (Ecarot and Desbarats, 1999; Hines et al., 2004).

Parathyroid hormone (PTH) and parathyroid hormone-related protein (PTHrP) have profound catabolic effects on bones (Inoue and Matsumoto, 2000; Karaplis, 2001). By binding to the common PTH/PTHrP receptor-1 on bone cells, these peptides cause an intracellular accumulation of the second messenger cAMP, and activate PKA, thus controlling gene expression (Blind et al., 1993; Fujimori et al., 1992). We have previously reported the repression of *Phex* by PTHrP(1-34) in UMR-106 cells and primary osteoblasts derived from rat calvaria, and showed that this repression involved activation of the PTH/PTHrP receptor-1/cAMP/PKA pathway (Vargas et al., 2003). Similar results were obtained by Alos and Ecarot with PTH(1-34) (Alos and Ecarot, 2005).

PTH-induced intracellular accumulation of cAMP in osteoblastic cells has been shown to promote expression of the transcriptional repressor E4BP4 (Ozkurt et al., 2004; Ozkurt and Tetradis, 2003). E4BP4 is a member of the basic leucine zipper (b-ZIP) protein family, first characterized for its binding to the ATF site of the adenovirus E4 promoter (Cowell et al., 1992). E4BP4 can repress gene expression in various cell types and in many physiological conditions. For example, E4BP4 regulates clock genes expression in pineal gland cells (Doi et al., 2004) and represses Von Willebrand factor (VWF) transcription in non-endothelial cells (Hough et al., 2005). In primary mouse osteoblast cells, E4BP4 represses the expression of synthetic reporter genes containing E4BP4 response elements (EBPREs) (Ozkurt and Tetradis, 2003). More recently,

PTHrP-induced expression of E4BP4 in human pre-osteoblastic cells was shown to correlate with the repression of *Runx2* and *Osterix* gene expression, two transcriptional regulators essential for osteoblast differentiation and maturation, suggesting that osteoblastic cells use E4BP4 to regulate the expression of genes involved in the mineralization process (Silvestris et al., 2008).

In the present report, we have established that PTHrP(1-34)-mediated repression of *PHEX* expression involves binding of E4BP4 to the *PHEX* promoter. Using UMR-106 cells as an osteoblastic cell model, we show that PTHrP(1-34) increases expression of E4BP4 at both mRNA and protein levels resulting in down-regulation of *PHEX*. A decrease in *PHEX* expression is also observed in UMR-106 cells overexpressing E4BP4. Our data suggest that repression of the *PHEX* gene by E4BP4 requires binding on two E4BP4 response elements. This study defines a functional role for E4BP4 in osteoblastic cells.

3.1.3 MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies

All reagents were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA), except for human PTHrP(1-34) purchased from Bachem (Torrance, CA, USA). Oligonucleotides were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), except for oligonucleotides used in DNA pull-down experiments that were obtained from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). Anti-E4BP4 antibody (sc-9550) was purchased from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA), anti-Lamin A/C antibody was purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) and anti-phosphoserine antibody was purchased from Sigma.

Vector Constructions

To overexpress E4BP4 in UMR-106 cells, we obtained a *E4bp4* cDNA from total RNA extracted from MC3T3-E1 cells (CRL-2593, ATCC, Manassas, VA, USA) treated with PTHrP(1-34) at a concentration of 10^{-7} M for 4 hours, essentially as described by Ozkurt and Tetradis (Ozkurt and Tetradis, 2003). *E4bp4* cDNA was cloned using XhoI and BamHI sites in pLPC vector (a kind gift from Dr. G. Ferbeyre, Université de Montréal, Canada), downstream from the cytomegalovirus promoter (Serrano et al., 1997).

Human *PHEX* promoter was amplified from genomic DNA from HEK 293 cells (CRL-1573, ATCC). PCR sense oligonucleotides 5'-TCCTGTGGTACCTCTAAAG-3', 5'-AGGCTGGTACCGAACTCCTGGC-3' and 5'-GAATGGTACCCTCAGTAGGA-3' were used with the anti-sense oligonucleotide 5'-TAGGTGGCCTCGAGTCACCGGA-3' to obtain the -1050/+110 bp, -500/+110 bp and -352/+110 bp *PHEX* promoter fragments, respectively. All promoter fragments were sequenced and cloned using KpnI and XhoI restriction sites in pGL4 basic vector (Promega Corporation, Madison, WI, USA), upstream of the luc2 firefly reporter gene.

Culture, infections, siRNA transfection, PTHrP(1-34) and TPA treatment of UMR-106 cells

Stock cultures of UMR-106 cells (CRL-1661, ATCC) were maintained as described previously (Vargas et al., 2003). Stable cell pools were obtained using the retroviral-mediated gene transfer method as described previously (Serrano et al., 1997) and with 3 days of selection in puromycin (2.5 µg/ml). Thereafter, stable UMR-106 cells were always kept in puromycin.

PTHrP(1-34) and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) were prepared as described previously (Vargas et al., 2003). Treatments of UMR-106 cells with PTHrP(1-34) or TPA were done at a final concentration of 10^{-7} M and 10^{-8} M respectively. Incubations were for the time periods indicated in the text.

For *E4BP4* knockdown using siRNA, 1×10^6 cells were plated in 6 cm plates sixteen hours before transfection. Each plate was transfected using 300 pmol of pre-validated Stealth RNAiTM siRNA duplex and 15 µl of RNAi/Max Lipofectamine, both from Invitrogen, following the manufacturer's instructions. E4BP4-237 siRNA recognized CCUUACCGCACAAGCUCCGGAUUA sequence and E4BP4-239 siRNA recognized UCAGGACUACCAGACAUCCAAGGCU sequence. At 48 hours post transfection, cells were treated as mentioned in text and total RNA or nuclear proteins extracts were performed.

Nuclear extract and DNA pull-down

Nuclear extracts were obtained as described previously (Vargas et al., 2003). Briefly, five 10 cm dishes of confluent UMR-106 cells either treated for 4 hours with PTHrP(1-34) or overexpressing E4BP4 were washed three times and scraped in cold PBS. Cells were spun and resuspended in 1 ml of hypotonic buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, and 1X Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche, Indianapolis, IN, USA)). Cells were allowed to swell on ice for 1 hour and then homogenized by passing 20 times through an 18-gauge needle and 20 times through a 21 1/2-gauge needle. Homogenates were centrifuged at 600xg for 20 minutes at 4 °C to pellet the crude nuclear fraction. This fraction was resuspended in buffer A containing 0.1 % TritonX-100, layered over 30 % sucrose (w/v in buffer A), and

centrifuged at 5000xg for 30 minutes at 4 °C. The pellet containing the nuclear fraction was resuspended in buffer B (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 0.1 % Triton X-100 and 1X Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail) and sonicated on ice for 3 pulses of 15 seconds each. The nuclear extract was centrifuged at 13000xg for 10 minutes at 4 °C to pellet debris, and protein concentration was determined by Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

For DNA pull-down, 250 µg of nuclear extract were incubated on a rotating shaker for 3 hours at 4 °C in 350 µl of buffer B containing BSA (0.05 µg/ml), poly G/C non-specific oligonucleotide (4 ng/ml) or specific double stranded oligonucleotides (4 ng/ml) corresponding to the sequence of either of the two PHEX promoter E4BP4-response elements (EBPREs) or a mutated form of EBPRE2 named EBPRE2m. The sense and anti-sense oligonucleotides for the first EBPRE (EBPRE1) are 5'-AAGTGGACAGTTTATGTAAACACAAAAACA-3', and 5'-(biot)TGTTTTTGTGTTTACATAAACTGTCCACTT-3', respectively. The sense and anti-sense oligonucleotides for the second EBPRE (EBPRE2) are 5'-TTGCAACAGAATTTACATGATTAATTGAGAT-3', and 5'-(biot)ATCTCAATTAATCATGTAATTCTGTTGCAA-3', respectively. The sense and anti-sense oligonucleotides for EBPRE2m are 5'-TTGCAACAGAACAGCATGATTAATTGAGAT-3', and 5'-(biot)ATCTCAATTAATCATGCTGTTCTGTTGCAA-3', respectively (mutations appear in italics). The nucleotide sequence recognized by E4BP4 is underlined and each anti-sense oligonucleotide is biotinylated at its 5' to allow interaction of the double-stranded nucleotides with neutravidin. The DNA/proteins complexes were captured using 50 µl of neutravidin agarose beads (Pierce, Rockford, IL, USA) for 1.5 hours at 4 °C on a rotating shaker. After incubation, beads were washed 3 times with buffer B and one time with water. Beads/DNA/proteins complexes were resuspended in 3X Laemmli loading buffer and proteins were resolved by SDS-PAGE on a 7.5 % gel, transferred to a PVDF membrane and immunodetected with anti-E4BP4 antibodies.

CIAP treatment

Fifty μg of nuclear extract from UMR-106 treated 4 hours with 10^{-7} M PTHrP(1-34) was incubated 1 hour at 37 °C with 10 units of calf intestine alkaline phosphatase (CIAP) (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA). As a negative control, CIAP was heat inactivated for 15 minutes at 85 °C before adding the nuclear extract. After CIAP treatment, 6X Laemmli loading buffer was then added and proteins were resolved by SDS-PAGE on a 7.5 % gel, transferred to a PVDF membrane and E4BP4 was immunodetected with anti-E4BP4 antibodies.

Immunoprecipitation

UMR-106 overexpressing E4BP4 cells were treated 4 hours with 10^{-7} M PTHrP(1-34) and lysed in immunoprecipitation buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 2.5 mM Sodium Pyrophosphate, 1 mM β -glycerolphosphate and 1x protease inhibitor cocktail from Roche). Protein extracts were centrifuged at 13000xg for 10 minutes at 4 °C to pellet debris, and protein concentration was determined by Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Pre-clearing was performed 1 hour at 4 °C using 1 mg of cell extract proteins and 30 μl of streptavidin protein A beads (GE Healthcare). Following pre-clearing, IP was performed 16 hours at 4 °C using anti-phospho-serine antibodies (final dilution 1:200). Immunocomplex was captured using 50 μl of streptavidin protein A beads, wash 4 times with IP buffer and 3X Laemmli loading buffer was added. Proteins were resolved by SDS-PAGE on a 7.5 % gel, transferred to a PVDF membrane and immunodetected with anti-E4BP4 antibodies.

RNA extraction and qPCR

Total RNA was isolated using Trizol Reagent from Invitrogen according to the manufacturer's instructions. Prior to real time PCR, cDNA synthesis was performed on 1 μg of total RNA using Tetro cDNA synthesis kit from Bioline (London, England) according to the manufacturer's instructions. cDNA was then diluted 1:25 in water and real-time PCR was performed.

Real-time PCR was performed in a 96-well plate format using the Mx3000P from Stratagene (Santa Clara, CA, USA) and the SsoFast Evagreen detection kit from Bio-

Rad (Hercules, CA, USA). Each reaction was performed using 7.5 μ l of Evagreen master mix, 3.75 μ l of 2 mM concentrated primer pair and 3.75 μ l of diluted cDNA (final dilution 1:100) for a final volume of 15 μ l. *ACTB* gene was used to normalize target genes level. All primers used for gene amplification are listed in table 1.

Luciferase assay

Luciferase assays were performed in UMR-106 cells. Sixteen hours before transfection, 1.15×10^5 cells were seeded in 12-well plates. In each well 250 ng of pGL4 vector containing *PHEX* promoter fragments was co-transfected with 100 ng of β -gal reporter vector (used as a control to normalize *firefly* luciferase signal). When *PHEX* repression by *E4bp4* was studied, 100 ng of pLPC-E4BP4 vector or an equivalent empty vector was used. To transfect these DNAs into cells, 5 μ l of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) per well was used according to the manufacturer's instructions. When necessary, 24 hours post-transfection, cells were treated with PTHrP(1-34) for 24 hours. In all cases, 48 hours post-transfection, cells were washed twice with PBS and lysed in 200 μ l of lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA).

Luciferase assays were performed using 30 μ l of cell lysis and 30 μ l of Luciferin solution (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(-)-Luciferin (Roche, Indianapolis, IN, USA), pH 7.7). *Firefly* counts were obtained using the Wallac VICTOR² from Perkin Elmer. β -gal assays were performed using 30 μ l of cell lysis and 30 μ l of fresh β -gal assay buffer (10.1 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , 12 mM KCl, 137 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 50 mM 2-mercaptoethanol, 1 % 2-nitrophenyl β -D-galactopyranoside, pH 7.4) and incubated 5-10 minutes at room temperature. β -gal counts were obtained by measuring at 405 nm absorbance using DTX 880 Multimode Detector Microplate Reader from Beckman Coulter (Brea, CA, USA). *Firefly* luciferase counts were normalized using the β -gal values. Each experiment was performed in triplicate.

Statistical analyses

Data generally represent the mean \pm SEM values from two independent experiments. t test was used to determine statistical significance between individual means. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

3.1.4 RESULTS

PTHrP(1-34) increases E4BP4 protein expression and represses *PHEX* gene in UMR-106 cells

Treatment of UMR-106 cells with 10^{-7} M PTHrP(1-34) for 24 hours results in down-regulation of the *PHEX* gene (Vargas et al., 2003). To characterize cis-elements of the *PHEX* promoter involved in this regulation, we first analyzed the promoter's sequence with MatInspector software from Genomatix software to identify putative regulatory cis-acting elements (Cartharius et al., 2005). This analysis allowed the identification of several consensus sequences for known response elements (some are shown in Fig. 1A). Among them, we noticed two elements for the transcriptional activator ATF4 at positions -310/-303 bp and -281/-274 bp of the proximal *PHEX* promoter and one response element for the transcriptional activator RUNX2 at position -225/-219 bp. Interestingly, we also identified two elements for the transcriptional repressor E4BP4, a known transcriptional repressor previously shown to be active in osteoblast cells on synthetic promoters following PTH and PTHrP treatment (Ozkurt and Tetradis, 2003). These elements, named EBP1 and EBP2, are located at position -383/-374 bp and +73/+82 bp relative to the transcriptional initiation site, respectively. EBP2 is found on the complementary strand, in *PHEX* gene first exon.

To investigate whether E4BP4 is implicated in PTHrP(1-34)-mediated *PHEX* gene repression, we first determined by qPCR the amounts of *E4BP4* mRNA in UMR-106 cells during a time course treatment with 10^{-7} M PTHrP(1-34), a dose able to repress *PHEX* expression by 50% (Fig. 1B, second graph). Results showed a 5 fold increase of *E4BP4* mRNA level after 1 and 2 hours of treatment (Fig. 1B, first graph). Immunoblotting of E4BP4 in nuclear extracts from UMR-106 treated under the same conditions revealed an increased expression of E4BP4 at the protein level by 3 fold after 4 hours (Fig. 1C). This E4BP4 increase is rapid and transient. Starting shortly after *E4BP4* mRNA and protein reached the maximum, *PHEX* mRNA decreased significantly by 50% (Fig. 1B, second graph). As control, no variation of *NEP* mRNA was observed under the same PTHrP(1-34) treatment (Fig. 1B, third graph). These results showed that

E4BP4 is induced in UMR-106 cells by a PTHrP(1-34) treatment able to decrease the amount of *PHEX* mRNA.

E4BP4 overexpression decreases *PHEX* mRNA level

To determine whether E4BP4 has a direct role in regulating *PHEX* expression, we generated, by infection, stably overexpressing E4BP4 UMR-106 cells. Overexpression of E4BP4 was monitored by immunoblotting of nuclear extracts from the infected UMR-106 cells. The amount of E4BP4 was increased in E4BP4 infected cells when compared with endogenous E4BP4 in control stable cells (Fig. 2A). We next determined by qPCR the level of *PHEX* mRNA in the control and in the E4BP4-expressing stable cells. Overexpression of E4BP4 decreased *PHEX* mRNA by 90% (Fig. 2B, white column E4BP4 vs white column vector) which is slightly more than the 70% repression observed for treatment of control cells by PTHrP(1-34) (Fig. 2B, white column vector vs black column vector). Moreover, when UMR-106 cells overexpressing E4BP4 were treated with PTHrP(1-34), the levels of *PHEX* mRNA did not dropped further suggesting that both E4BP4 overexpression and PTHrP(1-34) treatment act in the same pathway to repress *PHEX* expression (Fig. 2B, white column E4BP4 vs black column E4BP4).

It was previously showed that 10^{-8} M TPA treatment for 24 hours increases *PHEX* mRNA levels in UMR-106 cells (Vargas et al., 2003). This *PHEX* gene activation by TPA can be compromised by a PTHrP(1-34) treatment (Fig. 2C and Vargas et al., 2003). To assess if E4BP4 itself can compromise *PHEX* activation, we next treated the control infected UMR-106 cells or cells overexpressing E4BP4 with TPA and analyzed *PHEX* mRNA levels by qPCR. The amount of *PHEX* mRNA was increased 5 fold following TPA treatment of control cells (Fig. 2B, gray column vector vs white column vector). However, when cells overexpressing E4BP4 were exposed to TPA, no increase of *PHEX* mRNA was observed (Fig. 2B, gray column E4BP4 vs white column E4BP4). Taken together, our results demonstrate that E4BP4 can repress *PHEX* gene expression.

***E4BP4* expression is essential for *PHEX* repression by PTHrP(1-34)**

To confirm the role of E4BP4 in *PHEX* repression following PTHrP(1-34) treatment we performed *E4BP4* knock down using two different siRNAs (named siE4BP4-237 and siE4BP4-239). To validate these siRNAs we first transfected UMR-106 cells, treated these cells 4 hours with 10^{-7} M PTHrP(1-34) and monitored E4BP4 protein levels by immunoblotting of nuclear extracts. Both siRNA targeting *E4BP4* mRNA blunted protein increases following PTHrP(1-34) treatment when compared with UMR-106 cells transfected with a control siRNA (siCTRL) (Fig. 3A). Similar results were obtained by monitoring *E4bp4* mRNA levels by qPCR (Fig. 3B). To evaluate the impact of E4BP4 knock down on *Phex* repression by PTHrP(1-34), we next performed qPCR analysis of mRNA extracts from siRNAs transfected UMR-106 cells treated with 10^{-7} M PTHrP(1-34) during 24 hours. The results show that E4BP4 knock down using either siE4BP4 increases the basal *PHEX* mRNA expression by up to 4 fold when compared to the siCTRL transfected cells (Fig. 3C, white columns). Finally, E4BP4 knock down was sufficient to blunt PTHrP(1-34)-mediated *PHEX* gene repression (Fig. 3C, black columns). A small *PHEX* repression was seen following PTHrP(1-34) treatment when using siE4BP4-237 transfected cells, but this repression is not statistically significant. These results confirmed that PTHrP(1-34)-mediated *PHEX* repression needs E4BP4 protein to be achieved.

***E4BP4* interacts with both response elements present in *PHEX* gene promoter**

To investigate whether E4BP4 binds to *PHEX* promoter, double stranded biotinylated oligonucleotides corresponding to the sequences of response elements 1 (EBPRE1) and 2 (EBPRE2) (sequences are provided in Materials and Methods) were incubated with nuclear extracts from UMR-106 cells overexpressing E4BP4 (Fig. 4A). Analysis by immunoblotting with E4BP4-specific antibodies of the proteins associated with the EBPREs shows that both elements can bind E4BP4. In addition, mutation of the second element (EBPRE2m) (sequence presented in Material and Methods) reduced the binding of E4BP4 (Fig. 4A). As negative control, the DNA pull-down was performed with a non-specific DNA biotinylated probe. E4BP4 did not bind to this probe.

To determine whether the interaction between E4BP4 and the EBPRES is specific, we performed the DNA pull-down in competition with a non-biotinylated double-stranded oligonucleotides. The results show a progressive decrease of E4BP4/EBPRES interaction when we added non-biotinylated oligonucleotides (Fig. 4B). These results show that E4BP4 can specifically interact with both response elements for E4BP4 present in PHEX promoter.

E4BP4 use both EBPRES on *PITX1* promoter to repress its expression

To investigate whether interactions between E4BP4 and both response elements are essential for PHEX gene repression, we next evaluated the potential of E4BP4 to repress a luciferase reporter gene driven by a PHEX gene promoter containing intact or mutated EBPRES. First, we expressed different constructs in which the luciferase gene is under the control of the -1050/+110 bp, -500/+110 bp or -352/+110 bp region of the PHEX promoter in UMR-106 cells. The results show up to 30% repression of the luciferase reporter activity when cells were treated with PTHrP(1-34) (Fig. 5A, compare white and black columns). Repression was also achieved by overexpressing E4BP4. Data show that E4BP4 can repress promoter activity by more than 35%, concordant with results presented in figure 2 showing that E4BP4 overexpression is more efficient than PTHrP(1-34) treatment to repress *PHEX* expression (Fig. 5A, compare white and grey columns). Interestingly, the ability of PTHrP(1-34) and E4BP4 to repress -352/+110 *PHEX* promoter fragment, a construct lacking the first EBPRES, is comparable to the larger promoter fragments, suggesting that presence of only one EBPRES is sufficient to support PTHrP-mediated *PHEX* expression.

To validate this hypothesis, we next mutated both EBPRES in the -1050/+110 promoter construct and monitored the ability of PTHrP(1-34) to repress mutated *PHEX* promoter. Results show that PTHrP-mediated PHEX repression was abolished when both EBPRES were mutated (Fig. 5B). Interestingly, EBPRES mutations do not change basal promoter activity, suggesting that these elements were only used by transcriptional repressors and not by transcriptional activators. Taken together, these results and DNA pull-down results suggest that both EBPRES in PHEX gene can functionally bind the repressor E4BP4.

PTHrP(1-34) increases phosphorylation of E4BP4 in UMR-106 cells

Previous studies have shown that serine residue phosphorylation affects E4BP4 activity and stability (Chen et al., 1995; Doi et al., 2004). To determine whether E4BP4 is phosphorylated in UMR-106 cells and whether PTHrP(1-34) treatment influences E4BP4 phosphorylation state, nuclear extracts from cells stimulated or not with PTHrP(1-34) were treated with calf intestine alkaline phosphatase (CIAP) and analyzed by immunoblotting using anti-E4BP4 antibody (Fig. 6A). In both cases, treatment with CIAP decreased the apparent molecular weight (MW) of E4BP4, suggesting that the protein is phosphorylated in UMR-106 cells. Heat inactivation of CIAP before incubation abrogated this MW shift. Examination of the immunoblot from cells treated or not with PTHrP(1-34) reveals the presence of at least two forms of E4BP4 with MW larger than CIAP-treated E4BP4 (Fig. 6A, compare lanes 1 and 2 or lanes 4 and 5), suggesting that in UMR-106 cells most E4BP4 is phosphorylated. Interestingly, the proportion of the most phosphorylated form appears to be greater in the PTHrP(1-34)-treated extract than in the extract from untreated cells (compare lanes 1 and 4, Fig. 6A). To confirm these observations, UMR-106 overexpressing E4BP4 were treated with vehicle or PTHrP(1-34) and nuclear extracts were prepared. In these conditions, immunoblotting of nuclear extracts showed no significant effect of PTHrP(1-34) treatment on the amounts of E4BP4 protein detected due to overexpression of the protein from the viral vector (Fig. 6B). However, when nuclear extracts were first immunoprecipitated with an anti-phosphoserine antibody and then the immunoprecipitated proteins analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with an anti-E4BP4 antibody, we observed an increased phosphorylation state of E4BP4 protein (Fig. 6B). This result confirms that PTHrP(1-34) does not only activate E4BP4 transcription but also increases its phosphorylation state and potentially modify its activity.

3.1.5 DISCUSSION

The defective mineralization of bones and teeth observed in XLH patients and *Hyp* animals clearly indicates that PHEX is an important regulator of the mineralization process. Therefore, the way *PHEX* expression is controlled should profoundly influence bone mineralization. In support of this hypothesis, it has been shown that vitamin D3, glucocorticoids, IGF and GH, factors known to regulate bone mineralization, also regulate *PHEX* expression (Ecarot and Desbarats, 1999; Hines et al., 2002; Hines et al., 2004; Zoidis et al., 2000). In previous studies (Alos and Ecarot, 2005; Vargas et al., 2003), us and others have demonstrated that PHEX expression is down-regulated in presence of PTHrP(1-34) or PTH(1-34), two peptides affecting bone metabolism by directly modulating osteoblast activity (Inoue and Matsumoto, 2000; Karaplis, 2001). This repression of *PHEX* was mediated by increased cAMP levels and activation of protein kinase A (PKA). To gain more insight into PTHrP(1-34) regulation of *PHEX* expression, we examined the possibility that the repressor E4BP4 could be involved in this process. The increased expression of E4BP4 in osteoblasts upon activation of the cAMP-PKA pathway and the presence of two E4BP4-binding elements in human PHEX proximal promoter constitute the rational for this hypothesis (Ozkurt et al., 2004; Ozkurt and Tetradis, 2003). Our data suggest that, indeed, E4BP4 represses *PHEX* expression. In support of this conclusion, we have observed an inverse correlation between expression of *E4bp4* and *Phex* mRNA abundance in UMR-106 osteoblastic cells treated with PTHrP(1-34). We have shown that both mRNA and protein levels of *E4bp4* were rapidly increased in UMR-106 cells after treatment with a concentration of PTHrP(1-34) that also down-regulated *Phex* expression. *Phex* mRNA levels started decreasing shortly after E4BP4 protein reached its peak. The rapid increase in *E4bp4* mRNA levels observed upon treatment of UMR-106 cells with PTHrP(1-34) is consistent with previous reports showing increased *E4BP4* mRNA levels in calvaria of mice injected with PTH (Ozkurt et al., 2004), and in primary mouse osteoblasts or MC3T3 osteoblastic cells treated with PTH (Ozkurt and Tetradis, 2003). In further support of our conclusion, we have observed that repression of *Phex* expression by PTHrP(1-34) is significantly

abrogated by transfecting the cells with two different siRNA that strongly decrease E4BP4 protein levels.

Consistent with a role of E4BP4 in the regulation of *PHEX* expression, we have shown that overexpression of E4BP4 decreases expression of *Phex* in UMR-106 cells. Moreover, we observe that *PHEX* repression could be further stimulated by treatment of the cells with PTHrP(1-34). This observation may argue against a role of E4BP4 in *PHEX* down-regulation by PTHrP(1-34). However, immunoblotting of cell extracts with E4BP4 antibodies showed an increase in the phosphorylation state of E4BP4 upon treatment of the UMR-106 cells with PTHrP(1-34). Conflicting data are reported concerning the control of E4BP4 repression activity by phosphorylation. In chick pineal gland and LMH cells, phosphorylation of E4BP4 serine residue 182 (S182) correlates with increased proteasome degradation and decreased transcriptional repression activity (Doi et al., 2004). In contrast, *in vitro* experiments using mammalian systems indicated that phosphorylation of the protein results in greater DNA binding affinity (Chen et al., 1995), and that binding of E4BP4 to the elements closely paralleled its inhibition activity (Ozkurt and Tetradis, 2003). Since we have observed that treatment of UMR-106 cells with PTHrP(1-34) increases the phosphorylation state of E4BP4, it is conceivable that the low repression levels of *Phex* expression in UMR-106 cells overexpressing E4BP4 is due to the low phosphorylation state of the repressor. Treatment of the cells with PTHrP(1-34) would reduce *PHEX* expression by stimulating both E4BP4 gene expression and protein phosphorylation. This model support results observed in figure 2B where stronger *PHEX* gene repression was reached when cells overexpressing E4BP4 were treated with PTHrP(1-34)

Inhibition of TPA-induced up-regulation of *Phex* expression by overexpression of E4bp4 is also consistent with a model in which this repressor mediates PTHrP(1-34) effects. Ligand binding to the PTH/PTHrP receptor 1 is known to activate both the cAMP-PKA and PKC pathways (Blind et al., 1993; Fujimori et al., 1992; Gagnon et al., 1993; Jouishomme et al., 1992). In the case of the *Phex*, we have shown previously (Vargas et al., 2003) that activation of the PKC pathway with TPA in UMR-106 cells up-regulates *Phex* expression. However, this response to TPA could be blunted, in a dose-dependent manner, by co-treatment of the cells with forskolin, an activator of adenylate cyclase.

Our present observation that overexpression of E4BP4 also significantly decreases TPA-mediated up-regulation of PHEX expression strongly suggests that E4BP4 is a mediator of PTHrP(1-34) effects.

Our results indicate that binding of E4BP4 to *PHEX* gene promoter is essential for its repression activity. In DNA pull-down assays, the repressor bound both EBPRES elements identified in *PHEX* proximal promoter, although it appeared to bind with more affinity to the EBPRES2 element located in the first exon of the *PHEX* gene. Deletion of the EBPRES1, by using -352/+110 *PHEX* promoter fragment construct, does not significantly affect the ability of PTHrP(1-34) to mediate *PHEX* repression. However, mutation of both EBPRES, that reduced E4BP4 binding in DNA pull-down assays, significantly reduced the repression activity mediated by PTHrP(1-34) in the luciferase gene reporter experiments. Together, these results suggest that E4BP4, essentially by using the second EBPRES, is an important mediator of PTHrP activity in osteoblastic cells.

The molecular mechanism by which E4BP4 represses *PHEX* gene expression is still not fully elucidated. E4BP4 is a b-ZIP nuclear factor (Cowell and Hurst, 1994; Cowell et al., 1992). These factors that also include the AP-1, CREB/ATF, C/EBP and PAR transcription factors, have been shown to bind to closely related 10 nucleotide DNA sequences composed of two half-sites (Cowell and Hurst, 1994). Binding to DNA requires homodimerization or, in some cases, heterodimerization of these factors. The first EBPRES in *PHEX* promoter (5'-T-T-T-A-T-G-T-A-A-A-3') closely resembles the consensus sequence for E4BP4 binding (5'-G/A-T-G/T-A-C/T-G-T-A-A-T/C-3') diverging only in the first and last nucleotide. However, in the second EBPRES (5'-A-T-C-A-T-G-T-A-A-T-3', on the complementary strand in figure 1A), the 3' half-site is also an imperfect CREB/ATF and C/EBP half-site (5'-G-T-C-A-T-3' and 5'-G-C-A-A-T-3', respectively). E4BP4 and CREB have been shown to heterodimerize (Acharya et al., 2006). It is possible that CREB cooperates with E4BP4 to down-regulate *PHEX* expression. In chondrocytes, PTHrP has been shown to down-regulate *Runx2*, through a mechanism that involves transactivation of CREB by PKA (Li et al., 2004). *Runx2* is a transcription activator also present in osteoblasts and important for the expression of osteoblasts-specific genes: *Runx2* haploinsufficiency results in cleidocranial dysplasia, a

human genetic disorder affecting the skeleton (Mundlos et al., 1997). The observation that *Runx2* is down-regulated by PTHrP (Li et al., 2004; van der Horst et al., 2005) is important since a Runx2 binding site is present in the *PHEX* gene promoter (Fig. 1B) and since Runx2 has been shown to mediate glucocorticoid-induced *PHEX* expression (Hines et al., 2002). One can speculate that PTHrP(1-34) represses *PHEX* gene expression by two mechanisms: 1) by inducing the expression of E4BP4 that acts as a repressor on the *PHEX* gene, and 2) by repressing expression of *Runx2*, an essential factor for osteoblastic gene expression (van der Horst et al., 2005). This could explain the lack of *Phex* expression recovery after E4bp4 protein levels have returned to base line levels in UMR-106 cells treated with 10^{-7} M PTHrP(1-34) (Fig. 2). Clearly, more studies are needed to fully understand *PHEX* gene regulation.

In conclusion, our data show that E4BP4 represses *PHEX* gene expression by and binds to two elements in *PHEX* promoter. It also suggests that phosphorylation of the repressor is important to obtain maximum repression activity.

3.1.6 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Benoît St-Jacques for its critical reading of this manuscript.

3.1.7 REFERENCES

- Acharya A, Rishi V, Moll J, Vinson C. 2006. Experimental identification of homodimerizing B-ZIP families in Homo sapiens. *Journal of structural biology* 155(2):130-139.
- Addison WN, Nakano Y, Loisel T, Crine P, McKee MD. 2008. MEPE-ASARM peptides control extracellular matrix mineralization by binding to hydroxyapatite: an inhibition regulated by PHEX cleavage of ASARM. *J Bone Miner Res* 23(10):1638-1649.
- Alos N, Ecarot B. 2005. Downregulation of osteoblast PheX expression by PTH. *Bone* 37(4):589-598.
- Beck L, Soumounou Y, Martel J, Krishnamurthy G, Gauthier C, Goodyer CG, Tenenhouse HS. 1997. Pex/PEX tissue distribution and evidence for a deletion in the 3' region of the Pex gene in X-linked hypophosphatemic mice. *The Journal of clinical investigation* 99(6):1200-1209.
- Blind E, Raue F, Knappe V, Schroth J, Ziegler R. 1993. Cyclic AMP formation in rat bone and kidney cells is stimulated equally by parathyroid hormone-related protein (PTHrP) 1-34 and PTH 1-34. *Experimental and clinical endocrinology* 101(3):150-155.
- Boileau G, Tenenhouse HS, Desgroseillers L, Crine P. 2001. Characterization of PHEX endopeptidase catalytic activity: identification of parathyroid-hormone-related peptide107-139 as a substrate and osteocalcin, PPI and phosphate as inhibitors. *The Biochemical journal* 355(Pt 3):707-713.
- Brownstein CA, Zhang J, Stillman A, Ellis B, Troiano N, Adams DJ, Gundberg CM, Lifton RP, Carpenter TO. 2010. Increased bone volume and correction of HYP mouse hypophosphatemia in the Klotho/HYP mouse. *Endocrinology* 151(2):492-501.
- Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T. 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21(13):2933-2942.
- Chen WJ, Lewis KS, Chandra G, Cogswell JP, Stinnett SW, Kadwell SH, Gray JG. 1995. Characterization of human E4BP4, a phosphorylated bZIP factor. *Biochimica et biophysica acta* 1264(3):388-396.

- Cowell IG, Hurst HC. 1994. Transcriptional repression by the human bZIP factor E4BP4: definition of a minimal repression domain. *Nucleic acids research* 22(1):59-65.
- Cowell IG, Skinner A, Hurst HC. 1992. Transcriptional repression by a novel member of the bZIP family of transcription factors. *Molecular and cellular biology* 12(7):3070-3077.
- Doi M, Okano T, Yujnovsky I, Sassone-Corsi P, Fukada Y. 2004. Negative control of circadian clock regulator E4BP4 by casein kinase Iepsilon-mediated phosphorylation. *Curr Biol* 14(11):975-980.
- Du L, Desbarats M, Viel J, Glorieux FH, Cawthorn C, Ecarot B. 1996. cDNA cloning of the murine Pex gene implicated in X-linked hypophosphatemia and evidence for expression in bone. *Genomics* 36(1):22-28.
- Ecarot B, Desbarats M. 1999. 1,25-(OH)2D3 down-regulates expression of Phex, a marker of the mature osteoblast. *Endocrinology* 140(3):1192-1199.
- Francis F, Henning S, Korn B, Reinhardt R, de Jong P, Poustka A, Lehrach H, Rowe PSN, Goulding JN, Summerfield T, Mountford R, Read AP, Popowska E, Pronicka E, Davies KE, O'Riordan JLH, Econs MJ, Nesbitt T, Drezner MK, Oudet C, Pannetier S, Hanauer A, Strom TM, Meindi A, Lorenz B, Cagnoli B, Mohnike KL, Murken J, Meitinger T. 1995. A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. The HYP Consortium. *Nature genetics* 11(2):130-136.
- Fujimori A, Cheng SL, Avioli LV, Civitelli R. 1992. Structure-function relationship of parathyroid hormone: activation of phospholipase-C, protein kinase-A and -C in osteosarcoma cells. *Endocrinology* 130(1):29-36.
- Gagnon L, Jouishomme H, Whitfield JF, Durkin JP, MacLean S, Neugebauer W, Willick G, Rixon RH, Chakravarthy B. 1993. Protein kinase C-activating domains of parathyroid hormone-related protein. *J Bone Miner Res* 8(4):497-503.
- Guo R, Quarles LD. 1997. Cloning and sequencing of human PEX from a bone cDNA library: evidence for its developmental stage-specific regulation in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 12(7):1009-1017.

- Hines ER, Collins JF, Jones MD, Serey SH, Ghishan FK. 2002. Glucocorticoid regulation of the murine PHEX gene. *Am J Physiol Renal Physiol* 283(2):F356-363.
- Hines ER, Kolek OI, Jones MD, Serey SH, Sirjani NB, Kiela PR, Jurutka PW, Haussler MR, Collins JF, Ghishan FK. 2004. 1,25-dihydroxyvitamin D3 down-regulation of PHEX gene expression is mediated by apparent repression of a 110 kDa transfactor that binds to a polyadenine element in the promoter. *The Journal of biological chemistry* 279(45):46406-46414.
- Hough C, Cuthbert CD, Notley C, Brown C, Hegadorn C, Berber E, Lillicrap D. 2005. Cell type-specific regulation of von Willebrand factor expression by the E4BP4 transcriptional repressor. *Blood* 105(4):1531-1539.
- Inoue D, Matsumoto T. 2000. Parathyroid hormone-related peptide and bone: pathological and physiological aspects. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 54 Suppl 1:32s-41s.
- Jouishomme H, Whitfield JF, Chakravarthy B, Durkin JP, Gagnon L, Isaacs RJ, MacLean S, Neugebauer W, Willick G, Rixon RH. 1992. The protein kinase-C activation domain of the parathyroid hormone. *Endocrinology* 130(1):53-60.
- Karaplis AC. 2001. PTHrP: novel roles in skeletal biology. *Current pharmaceutical design* 7(8):655-670.
- Li TF, Dong Y, Ionescu AM, Rosier RN, Zuscik MJ, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Drissi H. 2004. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) inhibits Runx2 expression through the PKA signaling pathway. *Experimental cell research* 299(1):128-136.
- Liu S, Guo R, Simpson LG, Xiao ZS, Burnham CE, Quarles LD. 2003. Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. *The Journal of biological chemistry* 278(39):37419-37426.
- Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW, Quarles LD. 2006. Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice. *American journal of physiology* 291(1):E38-49.
- Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR. 1997.

- Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89(5):773-779.
- Nakatani T, Ohnishi M, Razzaque MS. 2009. Inactivation of klotho function induces hyperphosphatemia even in presence of high serum fibroblast growth factor 23 levels in a genetically engineered hypophosphatemic (Hyp) mouse model. *Faseb J* 23(11):3702-3711.
- Ozkurt IC, Pirih FQ, Tetradis S. 2004. Parathyroid hormone induces E4bp4 messenger ribonucleic acid expression primarily through cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signaling in osteoblasts. *Endocrinology* 145(8):3696-3703.
- Ozkurt IC, Tetradis S. 2003. Parathyroid hormone-induced E4BP4/NFIL3 down-regulates transcription in osteoblasts. *The Journal of biological chemistry* 278(29):26803-26809.
- Ruchon AF, Marcinkiewicz M, Siegfried G, Tenenhouse HS, DesGroseillers L, Crine P, Boileau G. 1998. Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts. *J Histochem Cytochem* 46(4):459-468.
- Ruchon AF, Tenenhouse HS, Marcinkiewicz M, Siegfried G, Aubin JE, DesGroseillers L, Crine P, Boileau G. 2000. Developmental expression and tissue distribution of Phex protein: effect of the Hyp mutation and relationship to bone markers. *J Bone Miner Res* 15(8):1440-1450.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88(5):593-602.
- Silvestris F, Cafforio P, De Matteo M, Calvani N, Frassanito MA, Dammacco F. 2008. Negative regulation of the osteoblast function in multiple myeloma through the repressor gene E4BP4 activated by malignant plasma cells. *Clin Cancer Res* 14(19):6081-6091.
- Tenenhouse HS. 1999. X-linked hypophosphataemia: a homologous disorder in humans and mice. *Nephrol Dial Transplant* 14(2):333-341.

- Tenenhouse HS, Econs MJ. 2001. Mendelian hypophosphatemias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw Hill Book Co. p 5039-5067.
- Thompson DL, Sabbagh Y, Tenenhouse HS, Roche PC, Drezner MK, Salisbury JL, Grande JP, Poeschla EM, Kumar R. 2002. Ontogeny of Phex/PHEX protein expression in mouse embryo and subcellular localization in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 17(2):311-320.
- Turner AJ, Tanzawa K. 1997. Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *Faseb J* 11(5):355-364.
- van der Horst G, Farid-Sips H, Lowik CW, Karperien M. 2005. Multiple mechanisms are involved in inhibition of osteoblast differentiation by PTHrP and PTH in KS483 Cells. *J Bone Miner Res* 20(12):2233-2244.
- Vargas MA, St-Louis M, Desgroseillers L, Charli JL, Boileau G. 2003. Parathyroid hormone-related protein(1-34) regulates Phex expression in osteoblasts through the protein kinase A pathway. *Endocrinology* 144(11):4876-4885.
- Yamazaki Y, Okazaki R, Shibata M, Hasegawa Y, Satoh K, Tajima T, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Yamashita T, Fukumoto S. 2002. Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87(11):4957-4960.
- Zoidis E, Zapf J, Schmid C. 2000. Phex cDNA cloning from rat bone and studies on phex mRNA expression: tissue-specificity, age-dependency, and regulation by insulin-like growth factor (IGF) I in vivo. *Molecular and cellular endocrinology* 168(1-2):41-51.

3.1.8 FIGURE LEGENDS

Figure 1. PTHrP(1-34) causes an up-regulation of *E4BP4* and a down-regulation of *PHEX* mRNA in UMR-106 cells. (A) Sequence of human *PHEX* promoter between -500/+110 bp. Response elements were predicted by MatInspector software from Genomatix software suite. Asterisk indicates that the consensus sequence is present on the complementary strand and +1 indicates the predicted transcriptional initiation start site. (B) qPCR on *PHEX*, *E4BP4* and *NEP* mRNA extracted from UMR-106 cells treated with vehicle or PTHrP(1-34) 10^{-7} M for different times (1, 2, 4, 6, 16 and 24 hours). Data are presented as the percent of target mRNA levels compared to time 0. These experiments were performed three times. Error bars indicate standard deviation and asterisks a significant change of target mRNA level (paired t test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$). (C) Immunoblot of E4BP4 and Lamin A/C (used as loading control) proteins in nuclear extracts prepared from UMR-106 cells treated with PTHrP(1-34) 10^{-7} M during different times. Graph shows bands quantification. Data are presented as the percent of E4BP4 signal, normalized using Lamin A/C signal, when compare to time 0. This experiment is representative of a triplicate.

Figure 2. Overexpression of E4BP4 in UMR-106 cells represses *PHEX* gene. (A) Immunoblot of E4BP4 and Lamin A/C (used as loading control) proteins in nuclear extracts prepared from control UMR-106 cells (vector) or UMR-106 cells stably overexpressing E4BP4. (B) qPCR on *Phex* mRNA performed in control UMR-106 cells (vector) and cells overexpressing E4BP4 treated 24 hours with vehicle, PTHrP(1-34) (10^{-7} M) or TPA (10^{-8} M). Data show the means and standard deviations of three independent experiments. (C) qPCR performed on *Phex* mRNA extracted from UMR-106 cells treated 24 hours with vehicle or PTHrP(1-34) (10^{-7} M) and TPA (10^{-8} M) alone or together. Data show the means and standard deviation of three independent experiments. For B, asterisks indicate a significant change between vehicle treated UMR-106-vector cells and experimental

conditions (paired t test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$). For **C**, asterisks indicate a significant change between two experimental conditions (paired t test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$)

Figure 3. *E4bp4* knock down abrogate PTHrP(1-34)-mediated *Phex* repression. (A-C) UMR-106 cells transfected with control siRNA (siCTRL) or two different siRNAs targeting *E4bp4* mRNA (siE4BP4-237 and 239). For **A**, immunoblot of E4BP4 and Lamin A/C (used as loading control) proteins in nuclear extracts prepared from siRNA transfected UMR-106 treated 4 hours with 10^{-7} M PTHrP(1-34). For **B**, qPCR of *E4bp4* mRNA performed in siRNAs transfected UMR-106 cells treated 2 hours with 10^{-7} M PTHrP(1-34). Data show the means and standard deviations of three independent experiments. Asterisks represent a significant decrease between siCTRL and siE4BP4s transfected cells (paired t test: * $p < 0.001$). For **C**, qPCR on *PHEX* mRNA performed in siRNAs transfected UMR-106 cells treated 24 hours with 10^{-7} M PTHrP(1-34) (dark) or vehicle (white). Data show the means and standard deviations of three independent experiments. Asterisks represent a significant change between vehicle treated UMR-106 transfected with siCTRL and other experimental conditions (paired t test: * $p < 0.005$).

Figure 4. E4BP4 interacts with both E4BP4 response elements (EBPRE) on *PHEX* promoter. (A and B) Immunoblot of E4BP4 on DNA pull-down experiments performed with nuclear extracts from UMR-106 cells treated 4 hours with 10^{-7} M PTHrP(1-34). Biotinylated double stranded probes representing different wildtype or mutated EBPRE of *PHEX* promoter were used. A non-specific 30 bp biotinylated double stranded probe (nsProbe) was used as negative control. For **B**, DNA pull-down experiments were performed with increasing amounts of competing non-biotinylated anti-sense oligonucleotides specific for each response element.

Figure 5. EBPREs integrity is necessary for E4BP4-mediated *PHEX* repression. (A and B) Luciferase assays in UMR-106 cell transiently transfected with different *PHEX* promoter constructs. Cells were treated 24 hours with 10^{-7} M PTHrP(1-34) (dark), vehicle

(white) or co-transfected with plasmid expressing E4BP4 (grey). Data show the means and standard deviations of three independent experiments. Asterisks represent a significant decrease of luciferase activity compared to control transfected cells (paired t test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.005$).

Figure 6. E4BP4 is phosphorylated in osteoblasts. (A) Immunoblot of E4BP4 protein on total nuclear protein extracts from UMR-106 cells treated 4 hours with PTHrP(1-34). Extracts were incubated with or without CIAP or with heat-inactivated CIAP (iCIAP). (B) Immunoblot (IB) of E4BP4 and Lamin A/C (used as loading control) proteins on cell extracts or on anti-phosphoserine immunoprecipitation (IP) products obtained from UMR-106 overexpressing E4BP4 treated for 4 hours with vehicle or 10^{-7} M PTHrP(1-34).

3.1.9 FIGURES AND TABLE

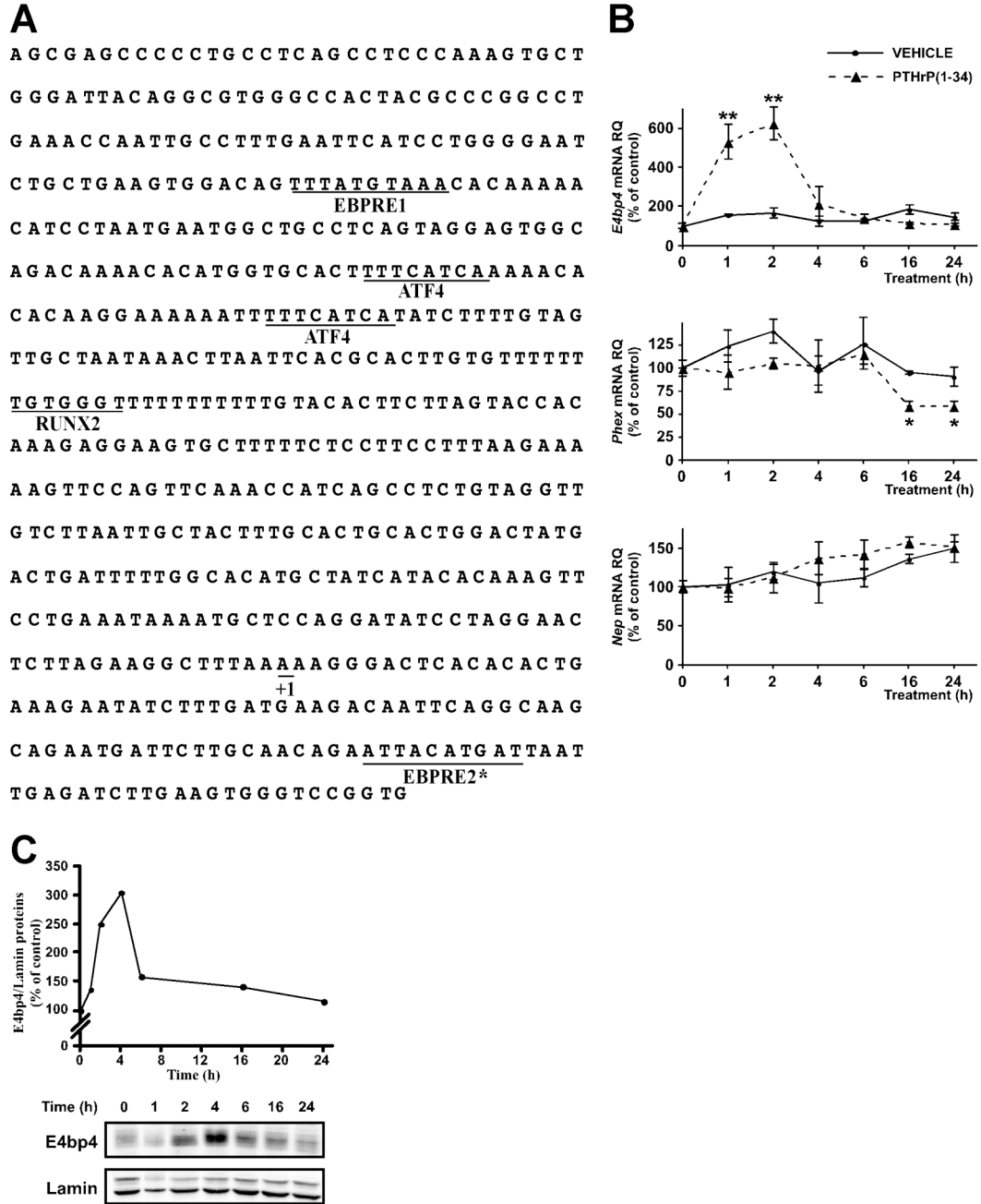


Figure 3.1 PTHrP(1-34) causes an up-regulation of *E4BP4* and a down-regulation of *PHEX* mRNA in UMR-106 cells

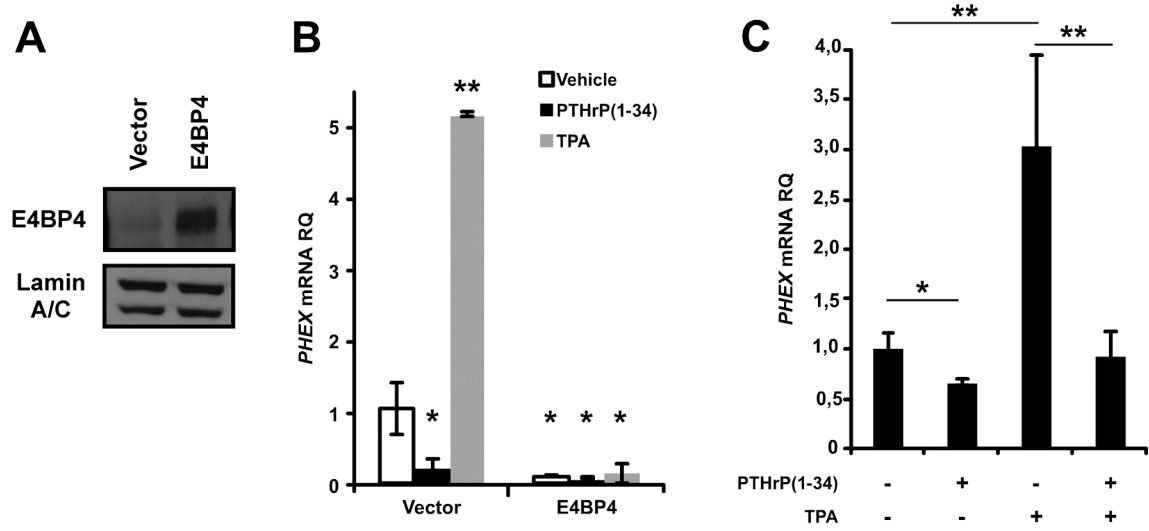


Figure 3.2 Overexpression of E4BP4 in UMR-106 cells represses *PHEX* gene

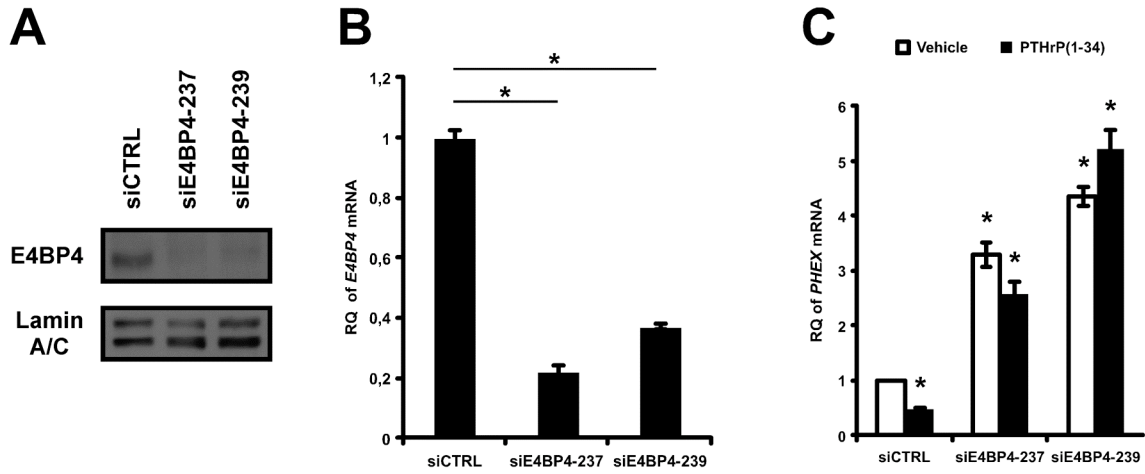


Figure 3.3 *E4bp4* knock down abrogate PTHrP(1-34)-mediated *Phex* repression

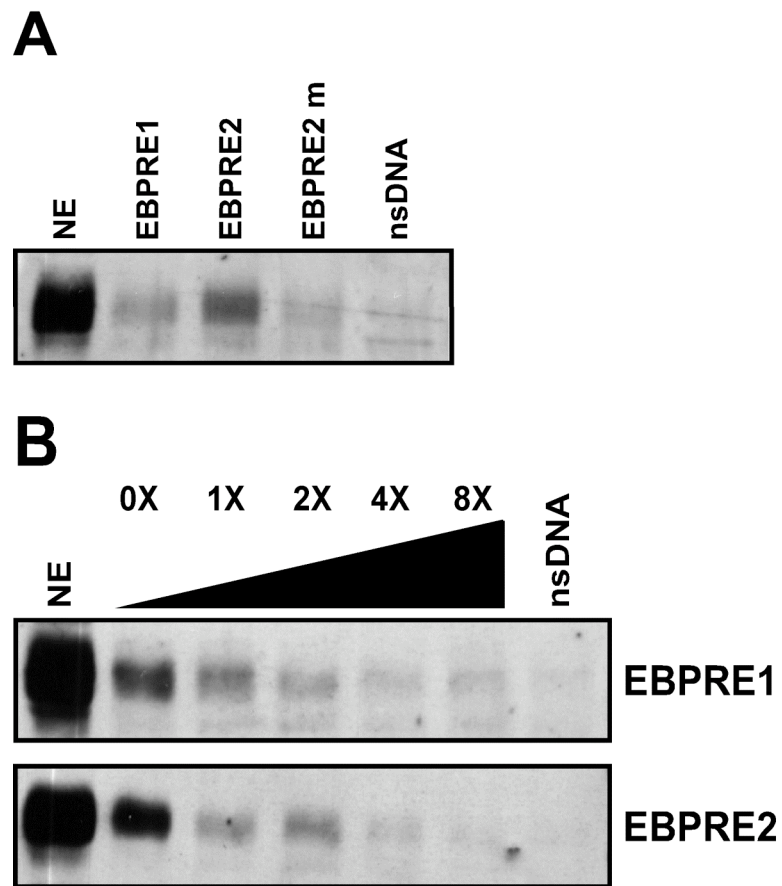


Figure 3.4 E4BP4 interacts with both E4BP4 response elements (EBPRE) on *PHEX* promoter

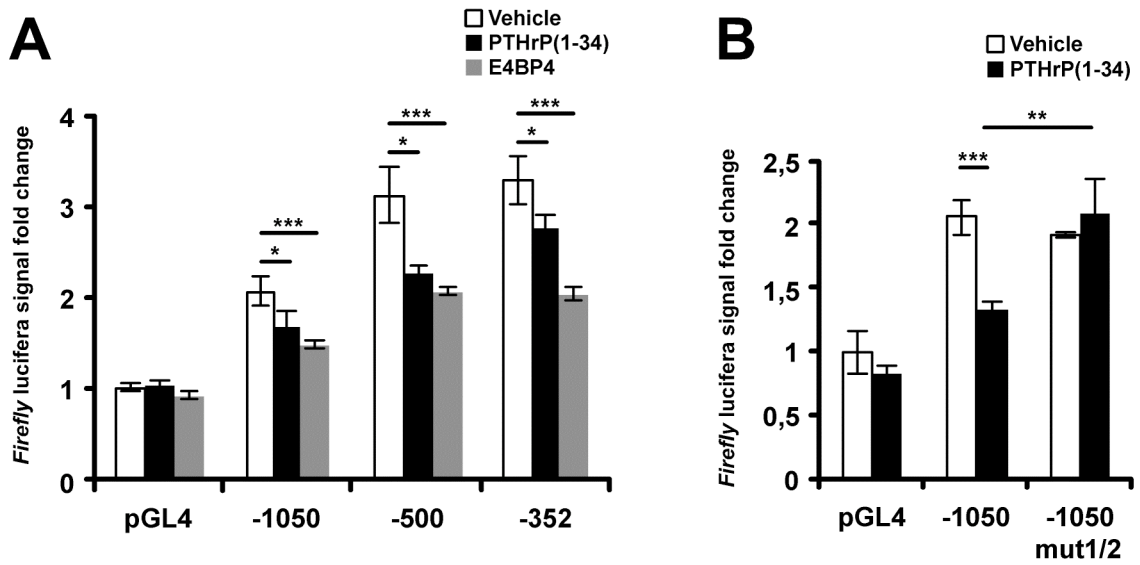


Figure 3.5 EBPREs integrity is necessary for E4BP4-mediated PHEX repression

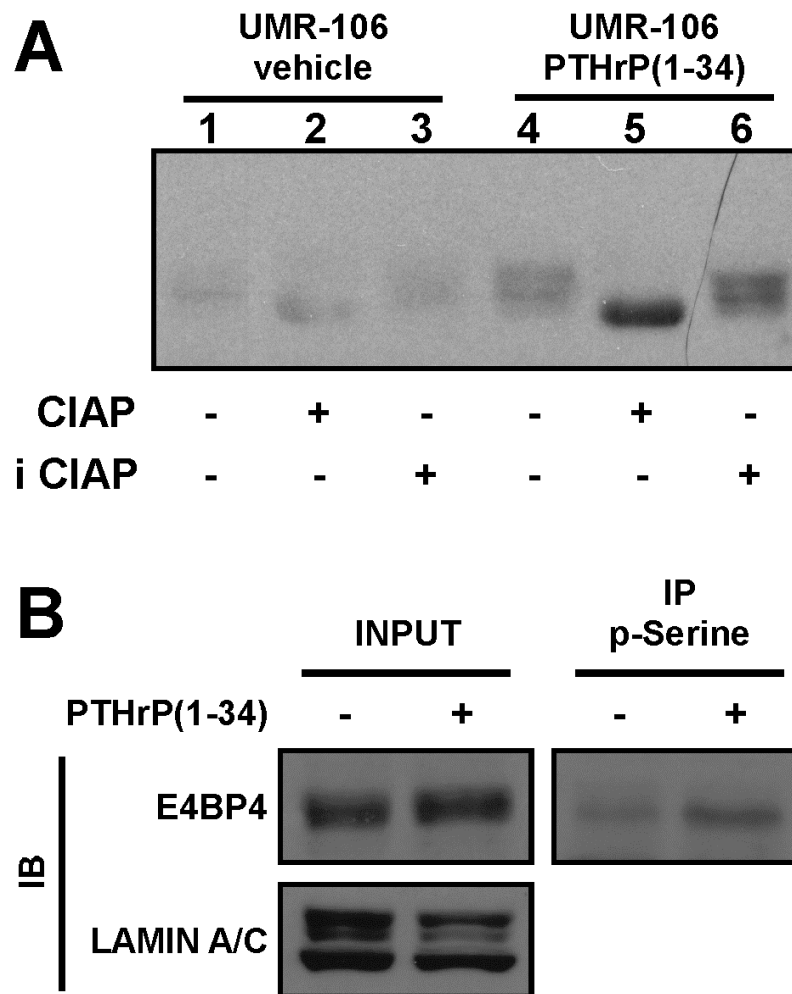


Figure 3.6 E4BP4 is phosphorylated in osteoblasts

Table 3.1 qPCR assay primers

Gene name	Primer direction	Primer sequence
<i>Actb</i>	Forward	5'-CTCTCTTCCAGCCTTCCTTCCTGG-3'
	Reverse	5'-CTAGGAGCCAGGGCAGTAATCTCC-3'
<i>Phex</i>	Forward	5'-CCCTCGATCTCTGAGTTACGGTGC-3'
	Reverse	5'-CTTCAGAGTCCACAGACCACCACG-3'
<i>E4bp4</i>	Forward	5'-GTGTCTGAGGTGTCCTCTGTGGAG-3'
	Reverse	5'-CTGGTAGATGGAGGCGGAATAGGC-3'
<i>Nep</i>	Forward	5'-GAGACCTCGTTGACTGGTGGACTC-3'
	Reverse	5'-GATGCTGTCCACCTGCTAGGTCC-3'

Chapitre 4

Discussion et Conclusion

4.1 Présentation de la discussion

Le développement normal des os et leur homéostasie sont de complexes processus qui requièrent la participation, parfaitement orchestrée, de trois types cellulaires: les chondrocytes, les ostéoblastes et les ostéoclastes. Ainsi, autant lors du développement embryonnaire qu'à l'âge adulte, la prolifération, la différenciation et l'activité de ces cellules nécessitent une régulation fine dans l'espace et dans le temps. Notre compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation de ces différentes étapes a grandement progressée durant les dernières années. Ces nouvelles connaissances nous permettent maintenant de poser des diagnostics de manière plus précoce lorsque nous sommes devant certaines pathologies osseuses. De plus, elles offrent de nouvelles possibilités de traitement. Malgré tout, il reste beaucoup à faire afin de bien comprendre toutes les subtilités de la biologie de l'os.

L'objectif général de cette thèse est de caractériser de nouveaux mécanismes transcriptionnels impliqués dans le développement et l'homéostasie des os. Plus spécifiquement, elle s'intéresse à la régulation de deux gènes, la peptidase *PHEX* et le facteur de transcription *PITX1*, respectivement impliqués dans l'activité des ostéoblastes et dans le développement des structures cartilagineuses et osseuses. Ainsi, à titre de perspective, les résultats présentés dans cette thèse permettent d'imaginer de nouvelles façons de traiter des pathologies comme l'ostéoporose, les hypophosphatémies et l'ostéoarthrite.

Cette discussion est essentiellement divisée en deux sections. La première partie discute des perspectives soulevées par la nouvelle implication de la protéine Prohibitin (*PHB1*) dans la répression transcriptionnelle du facteur de transcription *PITX1* et dans le développement de l'OA. Cette découverte rallie un grand nombre d'études portant sur les anomalies mitochondriales, le stress oxydatif et la prolifération cellulaire dans le développement de cette pathologie. La seconde partie porte sur la nouvelle fonction du facteur de transcription *E4BP4* en tant que répresseur du gène *PHEX* dans les ostéoblastes. Cette étude permet d'établir un parallèle entre le rythme circadien, la PTH et la

minéralisation des os. Aussi, cette section discute du rôle potentiel que ce mécanisme pourrait exercer dans le contrôle des niveaux de phosphate sanguin. Suite à ces deux sections, on retrouve une conclusion générale dans laquelle sont mentionnées quelques idées permettant d'unifier les concepts décrits dans les deux études de cette thèse.

4.2 Mécanismes de répression de *PITX1* par la PHB1 dans les chondrocytes articulaires de patients OA

4.2.1 Identification de la PHB1

Une étude antérieure à celle présentée dans le premier article de cette thèse a montré une perte d'expression du facteur de transcription *PITX1* dans les chondrocytes articulaires de patients OA ^[287]. Puisque, chez les sujets sains, les niveaux d'expression de ce gène sont maintenus élevés, le projet présenté dans le premier article de cette thèse a pour objectif de caractériser les mécanismes transcriptionnels impliqués dans le maintien de son expression chez les sujets sains et de sa répression chez les patients OA. Dans le but d'identifier de potentielles mutations dans des éléments de réponses du promoteur de *PITX1* et de caractériser les mécanismes conduisant à la répression de *PITX1* dans les chondrocytes de patients OA, nous avons eu recours, comme première stratégie, au séquençage des 10000 premiers nucléotides du promoteur de *PITX1* humain. Ainsi, l'analyse du promoteur de *PITX1* d'une petite cohorte de patients OA a révélé la présence d'un SNP, absent chez les sujets sains, dans un élément de réponse pour les facteurs de transcription E2Fs constitué des nucléotides -3753/-3748 pb par rapport au site d'initiation de la transcription. Toutefois, une seconde analyse, utilisant une plus large cohorte de sujets sains et de patients OA n'a pas permis de confirmer ce premier résultat. Malgré tout, des expériences de capture par l'ADN (*DNA pull-down*), dans lesquelles une sonde d'ADN correspondant à cet élément de réponse muté a été utilisée, combinées à la spectrométrie de masse en tandem ont été réalisées afin d'identifier des protéines interagissant avec cet élément de réponse. Ces expériences ont permis de découvrir que la protéine PHB1 interagit avec cet élément de

réponse. Finalement, des analyses par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont permis de valider que PHB1 est fortement recruté au promoteur de *PITX1* dans les chondrocytes de patients OA. L'ensemble de ces résultats, présentés dans le premier article de cette thèse, montre que PHB1 agit comme un répresseur transcriptionnel de *PITX1*, qu'elle s'accumule dans le noyau des chondrocytes OA et que sa suppression, par siRNA, dans les chondrocytes OA, permet de restaurer l'expression de *PITX1*.

4.2.1.1 Description de PHB1

PHB1 est une protéine hautement conservée, exprimée chez la plupart des cellules eucaryotes. Trois domaines importants caractérisent cette protéine: un domaine SPFH (*Stomatin/Prohibitin/Flotillin/HflK*, composé des acides aminés 26 à 187) responsable de l'attachement aux lipides membranaires, un domaine "coiled-coil" (composé des acides aminés 185 à 214) responsable d'interaction protéine/protéine et un domaine présentant un signal d'export nucléaire riche en leucine (NES; *nuclear export signal*; composé des acides aminés 243 à 272) responsable de l'exportation nucléaire active de PHB1 ^[310, 311]. Chacun de ces domaines confère à PHB1 un caractère multifonctionnel. À l'instar de ces fonctions, le patron d'expression cellulaire est lui aussi très large. Ainsi, on retrouve PHB1 dans divers compartiment cellulaires tels la membrane cytoplasmique, la mitochondrie et le noyau ^[312].

La fonction la plus importante de PHB1, parce que nécessaire à la survie cellulaire, est celle qu'elle exerce dans les mitochondries. À l'intérieur de cet organelle, on la retrouve, à la membrane interne, en complexe avec la protéine Prohibitin 2 (PHB2), une protéine hautement semblable à PHB1. Dans cet organelle, plusieurs rôles lui sont attribuables dont la stabilisation de la membrane mitochondriale, la stabilisation de l'ADN mitochondriale, la formation et le maintien des "cristae", le maintien du réseau mitochondrial et la protection contre les dommages causés par le stress oxydatif qui sera abordé en détail plus loin dans cette discussion ^[312-319]. En ce qui a trait à son association avec la membrane cytoplasmique, PHB1 agit comme modulateur dans certaines voies de signalisation. Par exemple, elle s'avère nécessaire, par son interaction avec RAS et RAF, pour l'activation de

la cascade RAF/MEK/ERK par la protéine RAS ^[320]. Aussi, PHB1 s'associe au récepteur de l'insuline, association qui favorise l'activation de la voie PI3K/AKT ^[321, 322]. Enfin, la troisième fonction de PHB1 est sa capacité à agir comme régulateur transcriptionnel. Ainsi, par son association avec divers facteurs de transcription et autres facteurs nucléaires tels ER α , RNF2, p53, pRB et E2F1, PHB1 est en mesure d'agir comme co-activateur ou co-répresseur transcriptionnel ^[311, 323-327]. Sa fonction de co-répresseur étant la mieux caractérisée, il est maintenant connu que PHB1 aide au recrutement de protéines associées à la répression transcriptionnelle et au remodelage de la chromatine telles que HDAC1, NCOR1 et BRG1/BRM ^[324, 326, 328, 329]. La capacité de PHB1 d'agir comme un co-activateur transcriptionnel, lorsque couplée à p53, et comme un co-répresseur transcriptionnel, lorsque couplée à E2F1, permet maintenant de la considérer comme un gène suppresseur de tumeur ^[330-333]. Cette dernière caractéristique de PHB1 sera discutée en détail plus loin puisque les résultats présentés dans ce premier article s'apparentent à ceux provenant d'autres études traitant de la sénescence chondrocytaire dans la pathogenèse de l'OA.

4.2.2 Les mécanismes moléculaires de répression transcriptionnelle de *PITX1* par la PHB1

Les expériences de gène rapporteur utilisant différents fragments du promoteur de *PITX1* suggèrent l'implication de deux mécanismes d'action par lesquels PHB1 réprime l'expression de *PITX1*. Le premier mécanisme, essentiel à la forte répression de *PITX1* par PHB1, est dépendant de la région distale -3895/-3034 pb du promoteur de *PITX1*, tandis que le second, responsable d'une légère répression, dépend de la région proximale -374/-84 pb du promoteur.

En ce qui concerne les mécanismes de répression qui dépendent de la région promotrice -3895/-3034 pb, les résultats des expériences ChIP dirigées contre PHB1 indiquent que cette protéine est recrutée à la région -3746/-3643 pb du promoteur de *PITX1*. Combinés aux expériences de gène rapporteur, qui montrent un effet maximal sur la répression de *PITX1* lorsque la forme la plus longue de son promoteur est utilisée, ces

résultats suggèrent que la présence physique de PHB1 à cet endroit du promoteur est essentielle pour induire une forte répression de *PITX1*. Toutefois, contrairement aux données présentées dans diverses études, à savoir que le recrutement de PHB1 au promoteur d'un gène cible activé par E2F1 se fait via son interaction avec cet activateur transcriptionnel, il semble que nos résultats indiquent un mécanisme d'action différent^[311, 323, 334]. En effet, les expériences de gène rapporteur indiquent que seule la région proximale -214/+61 pb peut être stimulée par E2F1 et que la partie distale -3895/-3034 pb du promoteur de *PITX1* ne participe pas à cette activation. Ce résultat suggère donc qu'E2F1 ne lie pas cette région promotrice distale. Puisque PHB1 ne peut, par lui-même, interagir directement avec l'ADN, l'implication d'un partenaire inconnu demeure une hypothèse plausible. Enfin, une fois recruté au promoteur de *PITX1*, PHB1, aidé de ce partenaire inconnu, recrutera des cofacteurs, tels BRG1/BRM, RNF2, HP1 γ , NCoR et HDAC1 (Figure 2.7). Ainsi formé, ce complexe répresseur aura pour effet de réprimer l'expression de *PITX1*.

4.2.2.1 Recrutement de PHB1 au promoteur de *PITX1*

La sonde utilisée dans l'expérience de capture par l'ADN qui a mené à l'identification de PHB1 nous permet d'émettre quelques hypothèses quant à la nature de la protéine pouvant servir d'intermédiaire entre PHB1 et le promoteur de *PITX1*. Comme il a été mentionné plus tôt, la sonde utilisée présente un élément de réponse aux facteurs de transcription E2Fs et, donc, une séquence nucléotidique riche en G/C.

Tel que mentionné plus tôt, les expériences de gène rapporteur réalisées dans le premier article suggèrent qu'E2F1, et probablement E2F3, n'utilise que la région proximale du promoteur de *PITX1* afin de le réguler. De plus, aucune interaction entre l'élément de réponse de type E2F -3753/-3748 pb et d'autres facteurs E2Fs (E2F4, E2F5 et E2F6) n'a pu être détectée par des expériences de retard sur gel (EMSA). Il est toutefois important de préciser que dans ces expériences d'EMSA, aucun contrôle positif n'a été effectué. Ainsi, il n'est pas impossible que ce résultat soit erroné et que ces autres formes d'E2Fs puissent

permettre le recrutement de PHB1 au promoteur de *PITX1*. À ce jour, il n'a pas été encore démontré que PHB1 peut interagir avec un autre membre de la famille des facteurs E2Fs. Néanmoins, il est vraisemblable qu'une telle interaction puisse avoir lieu puisque la nature du domaine de dimérisation avec PHB1, la *marked box*, constitué des acides aminés 284 à 357, est bien conservée chez certains autres membres de la famille E2F, tel E2F4, E2F5 et E2F6 ^[323, 335]. Ainsi, pour considérer cette hypothèse, il serait d'abord nécessaire de vérifier si une telle interaction entre PHB1 et les membres E2F4, E2F5 ou E2F6 est possible. De plus, il serait important de valider les résultats obtenus par EMSA avec une autre technique comme le ChIP.

Les E2Fs ne sont pas les seuls facteurs de transcription à pouvoir interagir avec ce type d'élément de réponse. Par exemple, on retrouve un groupe de protéines nommées KLF/SP, présentant des doigts de zinc de type C₂H₂, constituées des protéines membre de la famille des Krüppel-like factors (KLF) et de la famille des facteurs de transcription SP (*Specificity protein*) ^[336-338]. Ainsi, ces protéines, grâce à leurs doigts de zinc, interagissent directement avec des éléments de réponses riche en G/C ^[336-338]. Bref, les possibilités demeurent multiples en ce qui a trait à la protéine agissant comme un pont entre le promoteur de *PITX1* et PHB1. La répétition des expériences de capture par l'ADN combinée à la caractérisation des protéines interagissant avec cette région promotrice par spectrométrie de masse permettrait de découvrir ce partenaire de PHB1.

Nos résultats indiquent que les niveaux d'E2F1 recruté à la région proximale du promoteur de *PITX1* ne varient pas entre les patients OA et les sujets contrôles (Figure 2.3E). Cette absence de changement soulève une question : est-ce que la présence d'E2F1 à la région proximale du promoteur de *PITX1* aide à sa répression par PHB1? Il est vraisemblable de penser que oui. Ainsi, E2F1, par sa capacité d'intéragir avec PHB1, pourrait permettre le rapprochement du complexe répresseur au site d'initiation de la transcription (Figure 2.7). Afin d'évaluer cette possibilité, il serait intéressant, par une approche de gène rapporteur, de supprimer les éléments de réponse pour E2F1 du promoteur de *PITX1* et d'évaluer la capacité de PHB1 de réprimer un tel promoteur. Cette

expérience pourrait toutefois présenter un problème, c'est-à-dire qu'elle pourrait engendrer une perte d'activité basale du promoteur de *PITX1*. Cependant, ce problème pourrait être corrigé par l'introduction d'un promoteur fort, de type SV40 (Virus Simien 40), en aval de celui de *PITX1*.

La découverte du partenaire qui permet le recrutement de PHB1 au promoteur de *PITX1* est très importante pour comprendre et contrer les conséquences qui découlent de cette accumulation nucléaire. Dans l'étude présentée au Chapitre 2, nous avons démontré, par une expérience de siRNA dirigé contre PHB1, que la diminution de l'expression de cette protéine a un effet positif sur l'expression de *PITX1* dans les chondrocytes OA (Figure 2.6E). Cette approche, bien qu'efficace *in vitro*, peu s'avérer difficilement applicable *in vivo*. De plus, elle risquerait d'induire des conséquences néfastes dans un organisme étant donné le rôle central joué par PHB1 dans le maintien de l'intégrité des mitochondries [312-319]. Ainsi, la découverte du partenaire de PHB1 permettrait d'avoir une cible dont l'inhibition aurait peut-être un plus faible impact sur les fonctions vitales de la cellule.

Enfin, une autre observation intéressante, lorsque l'on considère le complexe formé par PHB1 et son potentiel partenaire, est la spécificité que ce complexe semble offrir quant au choix du gène cible. En effet, dans les expériences de siRNA dirigé contre PHB1, on observe que la diminution d'expression de *PHB1* permet l'augmentation de deux cibles des E2Fs, soit la *Cyclin A2* (CCNA2) et la *Cyclin E1* (CCNE1), mais pas celle des deux autres, *Breast Cancer 1* (BRCA1) et *Damage-specific DNA Binding Protein 2* (DDB2) (Figure 2.6E). Ainsi, ces résultats suggèrent que PHB1 ne participe pas à la répression de toutes les cibles des E2Fs qui sont réprimées dans les chondrocytes de patients OA.

4.2.2.2 Effet dépendant de la région proximale du promoteur de *PITX1* pour sa répression par PHB1

Tel que mentionné plus tôt, les expériences de gène rapporteur suggèrent qu'une part de la répression de *PITX1* par PHB1 semble dépendre de la région proximale -214/+61 pb

du promoteur. Cette découverte n'est pas étonnante puisque E2F1 utilise directement cette même région pour activer l'expression de *PITX1* et que plusieurs études ont montré que PHB1 agit de diverse manière pour inhiber ce facteur de transcription ^[311, 323, 327, 334]. Ainsi, cet effet de PHB1 pourrait être dépendant de la protéine pRB, un suppresseur de tumeur capable d'inhiber E2F1 en le séquestrant, puisque PHB1 est capable d'interagir et d'activer directement toutes les isoformes de pRB ^[324, 339]. Toutefois, encore ici, des expériences complémentaires seraient nécessaires pour valider un tel modèle. Ainsi, il serait pertinent de répéter ces études de gène rapporteur dans une lignée cellulaire où pRB est absente, telle les SAOS-2. Dans un tel type cellulaire, la répression de *PITX1* par PHB1 devrait être atténuée car elle ne dépendrait que du mécanisme dépendant du recrutement de PHB1 à la région promotrice -3746/-3643 pb. Supportant cette hypothèse, il a été démontré que l'expression de *PITX1* est plus grande dans les lignées cellulaires dans lesquelles pRB est inactif ^[340].

4.2.3 Le contrôle potentiel de l'activité de PHB1 par les oestrogènes

Au cours des dernières années, quelques groupes se sont intéressés aux mécanismes contrôlant l'activité transcriptionnelle de PHB1. Leurs recherches les ont conduit à s'intéresser à l'impact que pourraient avoir les œstrogènes sur PHB1. Ceux-ci s'avère être un choix intéressant puisqu'il est bien connu que PHB2 agit comme un inhibiteur des récepteurs aux œstrogènes ^[315, 341]. Plus précisément, en présence d'œstrogènes, PHB2 interagit avec ER α et est importée au noyau. Ainsi, les résultats de deux études suggèrent que la fonction transcriptionnelle de PHB1 pourrait être inhibée par les œstrogènes. En effet, l'exposition de cellules à la tamoxifène, un inhibiteur des récepteurs aux oestrogènes, permet l'activation d'une cible transcriptionnelle de p53, le gène *HIC-1*, par le recrutement de PHB1 à ses promoteurs ^[342]. Aussi, la co-surexpression de PHB2 et de PHB1 inhibe la capacité qu'à cette dernière d'agir comme un répresseur transcriptionnel d'un promoteur induit par E2F1 ^[343]. Ensemble, ces résultats suggèrent que les œstrogènes, via une translocation nucléaire de PHB2, pourraient inhiber la fonction de régulateur

transcriptionnel de PHB1. Un tel mécanisme d'action s'avère intéressant en ce qui concerne l'OA. En effet, il a été démontré que le risque de développer des lésions articulaires est plus grand chez les hommes que chez les femmes avant l'âge de 50 ans ^[344, 345]. Toutefois, cette situation est inversée chez les femmes ménopausées, état physiologique associée à une diminution des niveaux d'oestrogènes, où le risque de développer l'OA est plus grand chez les femmes que chez les hommes ^[344, 345]. Ce renversement de situation suggère donc que les oestrogènes protègent le cartilage articulaire. Ainsi, l'un de ces mécanismes de protection pourrait être l'inhibition de l'activité répressive de PHB1 et, donc, le maintien de l'expression de PITX1. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'évaluer l'expression de *Pitx1* chez les souris ayant subi une ovariectomie et développant des lésions articulaires typiques de l'OA ^[346].

Le lien entre les oestrogènes et la fonction de régulateur transcriptionnel de PHB1 amène à se questionner quant à l'approche expérimentale choisie. En effet, dans l'étude présentée au Chapitre 2, nous avons utilisé des chimères des protéines E2F1, E2F2 et E2F3 afin d'étudier l'effet de ce facteur de transcription sur l'expression de *PITX1*. Plus précisément, ces chimères consistent en la fusion du facteur de transcription E2Fs et d'une sous-unité du récepteur aux oestrogènes. Cette fusion permet la migration nucléaire et l'activation de la protéine E2F chimérique lorsque les cellules sont exposées à la tamoxifène (Figure 2.2A-D). Ainsi, il est pertinent de se demander si cette exposition à la tamoxifène induit à elle seule un changement dans l'expression de *PITX1*. La réponse à cette question est non, puisque, par une approche de gène rapporteur, une expérience contrôle a été réalisée. Ainsi, nous avons exposé des cellules à la tamoxifène sans qu'aucune protéine E2Fs chimériques ne soit surexprimée. Par cette expérience nous n'avons observé aucun changement dans les niveaux d'expression de la luciférase (Figure 2.2D).

4.2.4 L'accumulation nucléaire de la PHB1 dans les chondrocytes des patients OA

La répression de *PITX1*, dans les chondrocytes OA, par PHB1, ne semble pas impliquer un changement de son expression et, ce, autant au niveau du messager ou de la protéine (Figure 2.4F et G). Pour cette raison, la localisation cellulaire de PHB1 a été évaluée. Les résultats montrent qu'une accumulation nucléaire, spécifique aux chondrocytes de patients OA, semble être la cause de la répression de *PITX1* chez cette cohorte (Figure 2.4, Figure Supplémentaire 2.3 et Tableau Supplémentaire 2.1). Bien que les techniques utilisées dans cette étude ne permettent pas de quantifier avec exactitude cette accumulation, les évaluations semi-quantitatives des différents résultats, dont ceux d'immunofluorescence, suggèrent une accumulation de l'ordre de trois à cinq fois plus pour la plupart des chondrocytes de patients OA (Figure 2.4E). Il est toutefois important de mentionner que le niveau d'accumulation nucléaire de PHB1 mesuré peut être variable d'un patient à l'autre. Dans certain cas, il s'avère même difficile de mesurer une différence entre les chondrocytes contrôles et ceux provenant de patients OA (voire exemple du patients OA282 dans la Figure Supplémentaire 2.3). Ainsi, bien que ce problème n'est peut-être que l'illustration de l'hétérogénéité de la maladie, il s'avère nécessaire de développer une méthode plus rigoureuse afin de quantifier les niveaux de PHB1 dans les chondrocytes de patients OA. Une amélioration de l'évaluation de l'accumulation nucléaire de PHB1 pourrait être utilisée pour un diagnostic précoce et permettrait une meilleure classification des patients OA.

4.2.4.1 Les conséquences hypothétiques de la déplétion cytoplasmique de PHB1

Dans les chondrocytes de patients OA, nous observons une forte accumulation nucléaire de PHB1 lorsque comparée aux chondrocytes de sujets sains (Figure 2.4 et Figure Supplémentaire 2.3). Cette accumulation nucléaire n'est pas associée à un changement de l'expression totale de PHB1 (Figure 2.4F et G). Ce résultat suggère donc qu'il y ait une déplétion cytoplasmique de PHB1 chez les patients OA. Cette déplétion pourrait elle aussi

contribuer au dysfonctionnement des chondrocytes dans la pathogenèse de l'OA. Par exemple, il se pourrait que la déplétion de PHB1 nuise au bon fonctionnement de certaines voies de signalisation. En effet, tel que mentionné auparavant, PHB1 participe à l'activation de voies de signalisation, notamment celle induite par IGF1^[321, 322]. IGF1 est un facteur de croissance important dans la chondrogenèse. En effet, il a été démontré que l'activation de cette voie de signalisation entraîne une augmentation de la prolifération/différenciation des chondrocytes, de la synthèse de protéoglycans par ces chondrocytes et de la réparation du cartilage articulaire endommagé^[347-351]. De plus, des études ont montré que la signalisation induite par IGF-1 est compromise dans les chondrocytes OA^[352-354]. Ainsi, il est possible de croire qu'une accumulation nucléaire de PHB1, sans changement au niveau de son expression, conduise à un dysfonctionnement de la voie de signalisation IGF1. Aussi, il serait intéressant d'évaluer l'effet engendré d'une surexpression de PHB1 dans les chondrocytes OA sur cette voie de signalisation.

4.2.4.2 Les mécanismes régulant l'importation et l'exportation nucléaire de PHB1

Peu de données sont disponibles concernant les mécanismes d'entrée et de sortie de PHB1 au noyau, rendant difficile l'explication de cette accumulation nucléaire de PHB1 dans les chondrocytes de patients OA. Ainsi, le seul mécanisme caractérisé à ce jour concerne l'exportation nucléaire de PHB1. Ce mécanisme implique le recrutement de PHB1 par la protéine XPO1 (*Exportin 1*, aussi nommé CRM1), via son NES riche en leucine^[355-360]. C'est ce mécanisme qui est mis en cause lors de l'induction de l'exportation nucléaire de PHB1 par un stress génotoxique provoqué par une exposition à la camptothecin^[360]. Toutefois, il est important de spécifier que ce mécanisme ne semble être actif que dans les cellules transformées^[360]. Inversement, les seuls moyens connus d'induire une accumulation de PHB1 dans le noyau cellulaire est d'inhiber la fonction de XPO1 par la leptomycin B ou d'induire un léger stress cellulaire tel un choc thermique^[359-361]. Enfin, l'étude présentée dans cette thèse montre pour la première fois une association entre la mauvaise localisation cellulaire de PHB1 et le développement d'une pathologie.

Les informations sur la translocation de PHB1 entre le noyau et le cytoplasme conduisent à poser certaines questions. Cette accumulation de PHB1 dans les chondrocytes OA est-elle la conséquence d'une activation de son importation, d'une inhibition de son exportation ou d'une combinaison de ces deux mécanismes? Selon les données disponibles, quant aux mécanismes contrôlant le trafic des protéines entre le cytoplasme et le noyau, il est possible de formuler quelques hypothèses (Figure 4.1).

4.2.4.3 Les mécanismes hypothétiques qui permettent d'expliquer l'accumulation nucléaire de PHB1 dans les chondrocytes de patients OA

Une analyse *in silico* de la protéine PHB1 n'a pas permis l'identification d'un signal de localisation nucléaire (NLS), ce qui suggère que son importation au noyau ne dépend pas de mécanismes d'importation actifs. De plus, puisque la masse de PHB1 est faible, c'est-à-dire autour de 30 kDa, elle serait capable de diffuser passivement du cytoplasme vers le noyau, car ce phénomène est possible chez les protéines dont la taille est inférieure à environ 50 kDa ^[362, 363]. Toutefois, cette capacité d'entrée passive de PHB1 n'exclue pas totalement une possible importation active via son interaction avec un autre partenaire possédant un NLS. Afin de s'assurer qu'un tel mécanisme est en cause ou non dans les chondrocytes de patients OA, il suffirait de bloquer l'importation nucléaire des protéines par un agent comme la lectine, présente dans le germe de blé, et d'évaluer la localisation de PHB1 dans ces cellules ^[364].

Comme mentionné auparavant, une autre possibilité pouvant mener à l'accumulation anormale de PHB1 dans les chondrocytes de patients OA est l'inhibition de son exportation vers le cytoplasme (Figure 4.1). Cette hypothèse est davantage favorisée puisque, tel que mentionné plus tôt, PHB1 affiche un NES fonctionnel utilisé par XPO1 lors de l'activation de son exportation par un stress génotoxique ^[360]. Cette caractéristique de PHB1 suggère donc que les mécanismes actifs d'exportation nucléaire sont nécessaires ou, du moins, capables d'induire la translocation de PHB1 vers le cytoplasme.

Deux types de mécanismes sont possibles pour la régulation de la translocation de protéines présentant un NES riche en leucine vers le noyau. Le premier mécanisme est la régulation de l'activité de l'exportine XPO1. La fonction de cette protéine est dépendante de l'activité de la protéine RAN (*Ras-related nuclear protein*), une petite protéine GTPase^[357]. Cette protéine, aussi essentielle dans l'importation nucléaire des protéines présentant un NLS, voit elle aussi son activité régulée^[365, 366]. Ainsi, la GEF (*Guanine exchange factor*) RCC1 (*Regulator of chromosome condensation 1*) favorise son activation en favorisant l'échange du GDP pour le GTP^[367]. Aussi, une troisième protéine, la RANBP3, s'avère elle aussi nécessaire à la fonction de XPO1 en agissant à deux niveaux: (1) en rapprochant RCC1 et RAN, permettant l'activation de cette dernière ainsi (2) qu'en facilitant l'interaction entre XPO1 et la portion NES de la protéine à exporter^[356, 357, 368-370]. Globalement, ces deux effets favorisent la formation du complexe permettant l'exportation de la protéine présentant un NES. Ainsi, afin d'évaluer si un problème avec le système d'exportation est en cause dans les chondrocytes de la population de patients OA utilisée dans cette étude, il serait pertinent d'y évaluer l'expression et l'intégrité de XPO1 et de RANBP3. La diminution de l'expression ou une mutation inactivant l'un de ces deux gènes pourrait expliquer l'accumulation nucléaire de PHB1 (Figure 4.1). Peu de choses sont connues de RANBP3. Toutefois, pour ce qui est de XPO1, il a maintes fois été observé une hausse de son expression dans certains cancers, suggérant que son expression peut varier dans certaines pathologies^[371-373].

La seconde étape cruciale pour la régulation de l'exportation des protéines du noyau se situe au niveau même de la protéine présentant un NES. Ainsi, il a été démontré que certaines modifications post-traductionnelles, telles la phosphorylation^[374-379], l'ubiquitination^[380, 381] ou la sumoylation^[381-383], peuvent favoriser ou inhiber la translocation vers le cytoplasme de protéines présentant un NES. Contrairement au mécanisme décrit dans le paragraphe précédent, celui-ci n'affecte qu'une protéine cible et non pas l'ensemble de la machinerie d'exportation nucléaire. L'hypothèse qu'un tel mécanisme pourrait avoir lieu pour PHB1 est supportée par la présence de plusieurs sites de

phosphorylation dans le domaine NES de PHB1, telles la Thr 258, la Tyr 249, la Ser 252, la Ser 254 et la Ser 256 (Figure 4.1) ^[384-387]. Parmi ces sites, seule la Thr 258 possède un substrat connu, la kinase AKT (*V-AKT Murine Thymoma viral oncogene homolog 1*) ^[386] tandis que les autres ont tous été identifiés par spectrométrie de masse suite à un criblage recherchant des protéines phosphorylées et n'ont donc pas encore été validés ^[384, 385, 387]. La présence de ces résidus pouvant être phosphorylés dans le NES suggère que des mécanismes impliquant différentes kinases et/ou phosphatases pourraient contrôler l'exportation nucléaire de PHB1. Ainsi, la découverte d'une forme de PHB1 phosphorylée accrue dans le noyau des chondrocytes de patients OA serait un indicateur qu'un tel mécanisme pourrait être en cause.

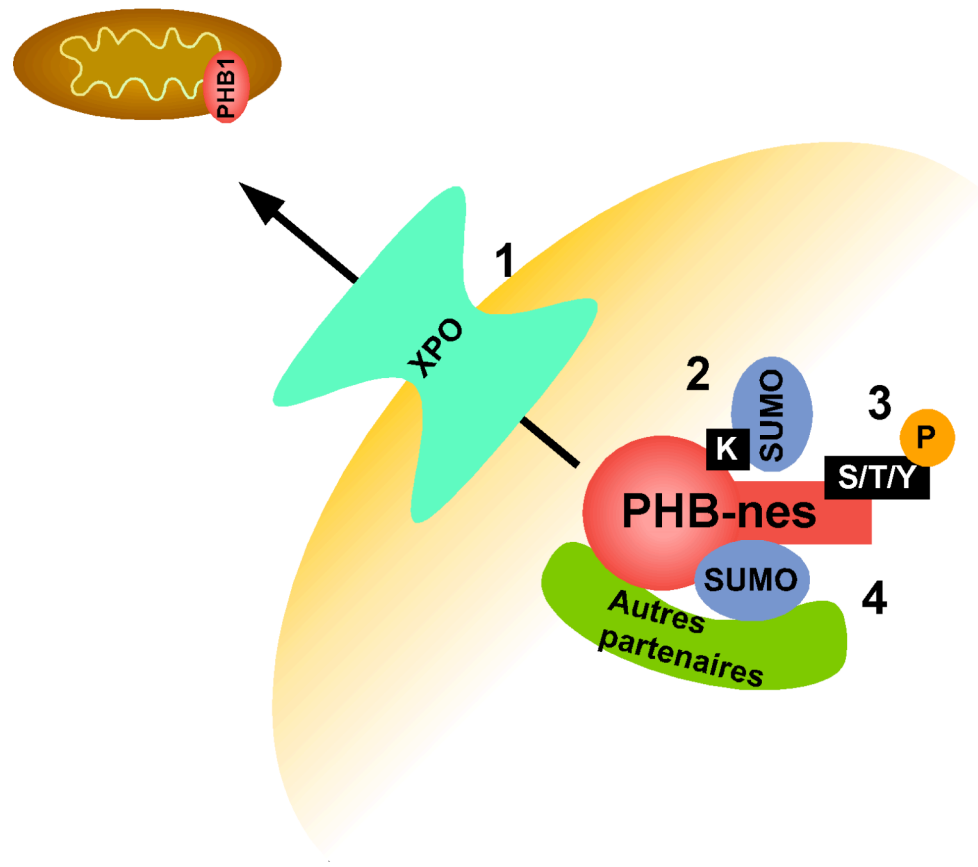


Figure 4.1 Schéma résumant les mécanismes hypothétiques contrôlant l'exportation nucléaire de PHB1.

Quatre mécanismes hypothétiques contrôlant l'exportation nucléaire de PHB1 peuvent être soulevés. (1) La diminution de l'expression ou une mutation inactivatrice de l'exportine XPO1 ou de l'un de ses partenaires tels que RANBP3 conduirait à l'accumulation nucléaire de PHB1. (2-3) La présence de modifications post-traductionnelles de PHB1 telle la sumoylation (2) ou une phosphorylation (3), notamment au niveau de son NES, pourraient masquer le signal d'export de PHB1, interférer avec sa reconnaissance par XPO1 et inhiber son exportation nucléaire. (4) L'interaction entre PHB1 et une protéine SUMO pourrait créer un complexe protéiques ne pouvant pas être reconnu par la machinerie d'exportation et conduirait à l'accumulation nucléaire de PHB1. K, Lysine ; S, Sérine ; T, Thréonine ; Y, Tyrosine ; P, Phosphate.

Aussi tel qu'il a été mentionné précédemment, la sumoylation (un processus impliquant la conjugaison, de manière covalente, d'une protéine SUMO sur un résidu lysine d'une protéine cible) d'une protéine présentant un NES et/ou son interaction avec une protéine SUMO peut engendrer son accumulation dans le noyau ^[382, 383]. La sumoylation de PHB1 n'a encore jamais été réellement étudiée. Les seules données disponibles sur ce sujet se résument en l'identification de PHB1, par deux études indépendantes, comme étant une protéine associée à SUMO1, 2 et 4 ^[388, 389]. Toutefois, il est important de mentionner que ces études concluent en une association entre une protéine SUMO et PHB1, ce qui indique une interaction SUMO/PHB1 ou la conjugaison de la protéine SUMO directement sur PHB1. Ainsi, la recherche d'une forme sumoylée de PHB1, spécifique aux chondrocytes dérivés de sujets sains ou de patients OA, indiquerait qu'un tel mécanisme pourrait être en cause dans l'accumulation nucléaire de PHB1. L'idée que la sumoylation, ou qu'une interaction avec une protéine SUMO, favorise l'accumulation de PHB1 au noyau et, donc, sa fonction de répresseur, est également supportée par l'importance de cette modification post-traductionnelle sur la répression transcriptionnelle de gènes (Figure 4.1) ^[390, 391].

Il a été mentionné, au début de la section 4.2.4 que notre approche expérimentale ne permet pas une quantification précise de l'accumulation nucléaire de PHB1. Toutefois, une évaluation semi-quantitative permet de voir que cette accumulation varie d'un patient à l'autre. En effet, que ce soit par l'évaluation des immunobuvardages (Figure 2.4C), des immunofluorescences (Figure 2.4D et Figure supplémentaire 2.3) ou des ChIPs dirigées contre PHB1 (Figure 2.6A), on observe toujours une certaine variabilité entre les patients OA. Ainsi, les mécanismes contrôlant l'importation et l'exportation de PHB1 au noyau ont tous le potentiel d'engendrer une variation du degré d'accumulation nucléaire de PHB1 chez les patients OA. Aussi, une variation génétique entre les niveaux d'activité d'un mécanisme ou d'un autre pourrait conduire à cette variation observée dans notre cohorte. Toutefois, il est important de préciser qu'une très forte majorité de patients OA présentent

un certain degré d'accumulation nucléaire tandis que cette accumulation est absente chez tous les sujets sains.

À la lumière de ces résultats, il est impossible de dire si cette accumulation nucléaire de PHB1 est spécifique aux chondrocytes articulaires ou si elle peut également survenir dans d'autres types cellulaires chez les patients souffrant d'OA. Toutefois, si cette accumulation nucléaire est de nature génétique, c'est-à-dire qu'elle n'est pas un événement secondaire induit suite à un stress cellulaire, par exemple, il est plausible de penser que PHB1 pourrait également être détectée dans le noyau de d'autres types cellulaires. Parmi ces autres cellules, il serait intéressant d'évaluer la présence nucléaire de PHB1 dans les ostéoblastes. En effet, outre la dégradation du cartilage articulaire, on observe, dans les cas d'OA, une sclérose de l'os sous-chondral. Du point de vue cellulaire, cette sclérose est accompagnée par un changement métabolique des ostéoblastes situés dans cette structure [392-394]. Ainsi, puisque *PITX1* participe à la minéralisation du tissu osseux, la répression de son expression par l'accumulation nucléaire de PHB1 pourrait expliquer, du moins en partie, le changement métabolique des ostéoblastes de patients OA. Afin de considérer cette hypothèse, une évaluation de la présence nucléaire de PHB1 et de l'expression de *PITX1* serait nécessaire dans ces cellules.

Enfin, le développement d'un modèle murin dans lequel l'expression d'une forme de PHB1 s'accumulant au noyau (PHB1-NLS) des chondrocyte articulaires fournirait un bon moyen de valider l'importance de cette protéine dans le développement de l'OA. Un tel modèle pourrait combiner différentes approches dont l'accumulation nucléaire de PHB1 versus une déficience en œstrogène (via une ovariectomie) ou versus le vieillissement, dont l'implication sera décrite dans la section 4.2.6.

4.2.5 L'activation de l'expression de *PITX1* par les facteurs de transcription E2Fs

Outre la découverte d'un mécanisme de répression de *PITX1* par PHB1, les résultats présentés dans cette thèse permettent aussi de confirmer les résultats obtenus par deux groupes indépendant ayant découvert, par des expériences de micropuces d'ADN, une activation de l'expression de *PITX1* par E2F1 [290, 395]. De plus, les expériences de knockdown de *Transcription Factor E2F Dimerization Partner 1* (TFDP1), un partenaire nécessaire pour l'activité des facteurs de transcription E2Fs, par ARN d'interférence (siRNA), suggèrent que cette activation de *PITX1* par E2F1 est essentielle à son expression basale (Figure 2.3B et D). Aussi, en plus d'E2F1, nous observons que d'autres membres de cette famille agissant comme activateurs transcriptionnels sont capables de stimuler l'expression de *PITX1*. En effet, par les expériences de gène rapporteur, nous avons découvert qu'E2F2 et E2F3 entraînent l'augmentation de l'expression de *PITX1* (Figure 2.2C). Ce résultat n'est pas surprenant, puisque les facteurs de transcription E2Fs possèdent une activité redondante [198, 396]. Toutefois, à l'exception de E2F3 et la sonde -180 bp, les expériences de capture par l'ADN n'ont pas permis d'observer une forte liaison entre ces facteurs de transcription (E2F2 et E2F3) et le promoteur de *PITX1* (Figure 2.2F). Ce résultat peu s'expliquer par les hauts niveaux d'expression d'E2F1 et les faibles niveaux d'expression d'E2F2 et E2F3 dans les chondrocytes C28/I2. Cette découverte montrant une stimulation de l'activité transcriptionnelle de *PITX1* par les E2Fs est intéressante puisqu'elle permet d'expliquer le défaut de croissance des os longs des souris *E2f1^{-/-}E2f3a^{-/-}* [198]. En effet, ces animaux présentent une plaque de croissance dysplasique caractérisée par une augmentation du nombre de chondrocytes hypertrophiques et la diminution de la quantité de chondrocytes prolifératifs [198]. Il est également intéressant de constater que lors de la naissance, ces animaux ne présentent pas de phénotype apparent. Ainsi, il semble que les E2Fs ne soient pas requis pour le développement des structures cartilagineuses durant l'embryogenèse. Cette observation suggère que le contrôle transcriptionnel de *PITX1* par E2F1 ne soit vrai qu'à l'âge adulte, ce qui pourrait expliquer que les anomalies osseuses

sont moins sévères chez les souris *E2f1^{-/-}E2f3a^{-/-}* que chez les souris *Pitx1^{-/-}* [198, 283]. Enfin, il serait intéressant d'évaluer l'expression de *Pitx1* dans les chondrocytes des animaux *E2f1^{-/-}E2f3a^{-/-}* durant l'embryogenèse.

4.2.6 La sénescence cellulaire et la pathogenèse de l'ostéoarthrite

4.2.6.1 Caractéristiques de la sénescence cellulaire

Comme il a été mentionné plus tôt dans cette discussion, *PHB1* est considéré comme un gène suppresseur de tumeur [330-333]. Par conséquent, sa surexpression, dans des cellules normales comme dans des cellules transformées, induit un arrêt de prolifération cellulaire permanent en G₁, ce qui correspond à la sénescence cellulaire [334]. Outre cet arrêt de prolifération permanent, la sénescence cellulaire est aussi associée à une augmentation de l'activité de la β-galactosidase lysosomale (SA-β-gal pour *Senescence-Associated β-Galactosidase*), l'accumulation d'hétérochromatine (SAHF pour *senescence-associated heterochromatic foci*), l'accumulation de corps *Promyelocytic Leukemia* (PML) dans le noyau et à la sécrétion anormalement élevée d'enzymes catalytiques ainsi que de cytokines pro-inflammatoires [397, 398]. De plus, il est important de mentionner que la sénescence, chez l'humain, requiert l'intégrité de deux voies de signalisation: l'une menant à l'activation de p53 et l'autre, à l'activation de pRB et, donc, à l'inhibition des facteurs E2F1, E2F2 et E2F3 [397, 398]. Deux conditions particulières sont connues pour déclencher un état de sénescence chez une cellule: un trop grand nombre de cycles de divisions cellulaires (sénescence répllicative) et un stress externe [397, 398]. Dans le cas de la sénescence répllicative, elle est induite une fois que les cellules ont atteint un certain nombre de divisions cellulaires, nommé la limite de Hayflick [399]. L'atteinte de cette limite est associée à un raccourcissement des télomères et, par conséquent, au dysfonctionnement de ceux-ci [397, 398]. Pour ce qui est de la sénescence associée à un stress, ce sont souvent des stress conduisant à l'apparition de dommages à l'ADN qui sont mis en cause comme, par exemple, les stress oncogéniques et les stress oxydatifs [397, 398].

4.2.6.2 La sénescence cellulaire dans le cartilage articulaire de patients OA

Dans le cartilage articulaire vieillissant, plusieurs groupes ont observé que les chondrocytes s'y trouvant affichaient des caractéristiques associées aux cellules sénescents. Parmi ces caractéristiques, on note le raccourcissement des télomères des chondrocytes, la diminution de leur réponse aux facteurs de croissance, une production anormalement élevée de MMPs et l'augmentation de la SA- β -gal^[400-404]. De plus, il a également été observé que les chondrocytes présents dans la partie lésée du cartilage articulaire OA présentent davantage certaines de ces caractéristiques comparativement aux chondrocytes d'une région non endommagée^[405]. Malgré le grand nombre d'études s'étant intéressées à la sénescence des chondrocytes articulaires dans le cartilage de patients OA, les mécanismes menant à cet état demeurent largement inconnus. Une des hypothèses permettant d'expliquer l'augmentation du nombre de chondrocytes sénescents dans le cartilage âgé et dans celui de patients OA est le stress oxydatif^[404, 406-408]. Cette hypothèse est basée sur les découvertes montrant une augmentation du stress oxydatif dans le cartilage articulaire de sujets âgés et une corrélation entre la présence du stress oxydatif chez les chondrocytes articulaires et leur état de sénescence^[406, 408].

4.2.6.3 PHB1 et la sénescence cellulaire dans les chondrocytes articulaires de patients OA

La présence anormalement élevée de PHB1 dans le noyau des chondrocytes OA présentée dans cette thèse permet d'établir un parallèle intéressant avec l'implication potentielle du stress oxydatif dans le développement de l'OA. Tout d'abord, il a été montré que PHB1 protège les cellules contre certains effets néfastes induits par le stress oxydatif^[316, 409, 410]. Ainsi, son absence conduit à une détérioration cellulaire et tissulaire due, notamment, à une élévation des dommages causés par le stress oxydatif^[410]. De plus, il a été montré, dans les cardiomyocytes et les cellules de l'épithélium de l'intestin, qu'un accroissement de l'expression de PHB1 dans les mitochondries est nécessaire pour contrer les effets néfastes du stress oxydatif^[316, 409]. Ensemble, ces résultats suggèrent que la présence de PHB1 à la

mitochondrie est nécessaire pour protéger la cellule des dommages causés par un stress oxydatif. Tel que mentionné auparavant, dans les chondrocytes de patients OA, on observe une augmentation de la présence de PHB1 dans le noyau sans changement des niveaux totaux de cette protéine. Ce résultat porte à croire qu'il y a une déplétion de PHB1 au niveau des mitochondries des chondrocytes de patients OA, les rendant ainsi plus susceptibles au stress oxydatif. Ainsi, les résultats présentés dans ce premier article suggèrent que PHB1 peut promouvoir la sénescence cellulaire de deux manières chez les chondrocytes OA: en offrant une protection moindre contre le stress oxydatif et en inhibant la fonction de E2F1. Afin de valider l'hypothèse voulant que PHB1 soit déplié des mitochondries, il serait nécessaire d'évaluer, par fractionnement cellulaire et immunobuvardage de type western contre PHB1, les niveaux de PHB1 dans les mitochondries de chondrocytes de patients OA. Également, l'évaluation de l'état des chondrocytes OA avant et après déplétion, par siRNA dirigé contre PHB1, serait nécessaire afin d'établir un rôle pour PHB1 dans la mise en place d'un phénotype de sénescence. Pour ce faire, il serait pertinent de mesurer l'expression de marqueurs de sénescence dont p16, p21, différentes cytokines et protéases ou les niveaux de phosphorylation de certaines protéines dont l'histone H2AX et la protéine pRB.

Enfin, il est important de rester prudent quant à la possibilité de concevoir un traitement pharmacologique ayant PHB1 comme cible. En effet, puisque son rôle mitochondrial est essentiel à la survie cellulaire, il s'avèrerait plus avisé de promouvoir sa translocation du noyau vers les mitochondries et non pas simplement d'inhiber ses fonctions générales. Ainsi, une telle stratégie corrigerait la répression anormale de *PITX1* et permettrait une protection accrue des chondrocytes contre le stress oxydatif.

4.2.7 D'autres mécanismes hypothétiques contrôlant l'expression de *PITX1* dans les chondrocytes

Dans ce premier manuscrit, nous suggérons un modèle dans lequel une accumulation nucléaire de PHB1 et, par conséquent, son recrutement à la région distale du promoteur de

PITX1, conduit à la répression de ce gène dans les chondrocytes de patients OA (Figure 2.7). Toutefois, bien que notre approche expérimentale ne nous permette pas de quantifier de manière précise l'importance de l'accumulation nucléaire de PHB1, il semble que la corrélation entre cette donnée et l'amplitude de la répression de *PITX1* ne soit pas toujours parfaite. Aussi, d'autres facteurs de transcription pourraient intervenir dans la régulation transcriptionnelle de *PITX1*. Quelques autres éléments de réponse ayant tous le potentiel de recruter des activateurs ou des répresseurs sont présentés à la figure 2.1C. Ainsi, cette section portera sur deux mécanismes potentiels pouvant intervenir dans la régulation transcriptionnelle de *PITX1*. De plus, il est important de préciser que ces éléments de réponses pourraient également servir à la stimulation de l'expression de *PITX1* dans d'autres types cellulaires tels les ostéoblastes.

4.2.7.1 La régulation de la transcription de *PITX1* par les HIFs

Des données récentes, obtenues dans le laboratoire du Dr. Alain Moreau, indiquent que les facteurs de transcription HIF1 α et HIF2 α répriment la transcription de *PITX1* dans les ostéoblastes. Les HIFs sont une famille de facteurs de transcription activés lorsque les cellules se trouvent en condition d'hypoxie ^[411, 412]. Cette répression de *PITX1* implique le recrutement des HIFs à un élément de réponse nommé HRE (Élément de Réponse induit par une Hypoxie, *Hypoxia Response Element*) situé à environ -1000 pb et présentant la séquence 5'-TACGTGCA-3'. Cette capacité des HIFs à réprimer l'expression de *PITX1* est intéressante puisque cette famille de facteurs de transcription joue un rôle important dans l'homéostasie du cartilage articulaire. En effet, puisque le cartilage articulaire est non-vascularisé, les facteurs de transcription HIFs et leurs cibles transcriptionnelles sont essentielles à la survie des chondrocytes et participent à la synthèse de la MEC et stimulent l'expression de *SOX9* ^[413-415]. Ainsi, le fait que les HIFs sont capables de réprimer l'expression de *PITX1* pourrait expliquer les variations d'expression que nous percevons entre les patients OA.

Généralement, les HIFs sont considérés comme des activateurs de la transcription. Toutefois, de nouvelles données laissent croire qu'ils pourraient également agir comme répresseurs transcriptionnels dans certains contextes. En effet, bien que ce concept soit contesté, il semble que, suite à une sumoylation, l'activité et la stabilité de HIF1 α et HIF2 α soient réduites ^[416-418]. Ainsi, une augmentation globale de la sumoylation dans les chondrocytes OA pourraient conduire à une répression de *PITX1* par les HIFs. Cette idée qu'une augmentation de la sumoylation soit en jeu rejoint celle décrite plus tôt pour expliquer l'augmentation de l'accumulation nucléaire de PHB1 dans les chondrocytes OA. Enfin, il serait intéressant d'évaluer la capacité des HIFs de réprimer l'expression de *PITX1* dans les chondrocytes OA. Ceci pourrait être fait grâce à une analyse par CHIP afin de mesurer la présence du HRE présent dans le promoteur de *PITX1*.

4.2.7.2 La régulation transcriptionnelle de *PITX1* par SP1/EGR1

L'évaluation de la séquence nucléotidique de la région proximale du promoteur de *PITX1* révèle une large région riche en GC (Figure 2.1C et 2.2E). Une analyse *in silico* de cette région a permis de déterminer des éléments de réponse potentiels pour les facteurs de transcription SP1 et EGR1. Il est intéressant de constater que ce chevauchement d'éléments de réponse SP1/EGR1 est également retrouvé dans le promoteur de *COL2A1* ^[305]. Ainsi, dans les chondrocytes, SP1 et EGR1 sont respectivement impliqués dans l'activation et la répression de l'expression de *COL2A1*. Plus précisément, il semble que SP1 permet une expression basale de *COL2A1* et qu'en présence de cytokines pro-inflammatoires, telle l'interleukine-1bêta (IL-1 β), EGR1 est recruté à son élément de réponse, entraînant le déplacement de SP1 et la diminution de l'expression de *COL2A1* ^[305]. Puisque le promoteur de *PITX1* présente le même type d'éléments de réponse et que son patron d'expression s'apparente, du moins en partie, à celui de *COL2A1*, il ne serait pas surprenant qu'une régulation par SP1/EGR1 soit possible. Aussi, il serait intéressant de vérifier, à l'aide d'une expérience de gène rapporteur, si SP1 et EGR1 peuvent respectivement stimuler et réprimer l'expression de *PITX1*.

4.2.8 Conclusion sur la répression de *PITX1* par PHB1 dans les chondrocytes articulaires de patients OA

Les résultats présentés dans le premier article de cette thèse permettent d'établir deux nouveaux mécanismes de régulation transcriptionnelle de *PITX1* dans les chondrocytes articulaires. Ainsi, il semble que, dans un contexte normal, l'expression basale de *PITX1* est assurée par le recrutement de facteurs de transcription E2Fs à son promoteur. Ce mécanisme concorde avec les résultats de deux autres études ayant découvert, à l'aide de micropuces à ADN, que ces facteurs de transcription sont capables de stimuler l'expression de *PITX1* [290, 395]. Le second mécanisme caractérisé dans cette étude montre que dans un contexte d'OA, PHB1 est recrutée au promoteur de *PITX1* et réprime son expression. Dans ce cas, le mécanisme par lequel PHB1 réprime l'expression de *PITX1* ne semble pas être typique à ceux décrits auparavant puisque PHB1 ne semble pas utiliser le facteur de transcription E2F1 pour interagir avec le promoteur de *PITX1*.

Les résultats de cette étude montrent également que la protéine PHB1 s'accumule de manière anormale dans les noyaux des chondrocytes de patients OA. Aussi, *PHB1* est responsable de la répression transcriptionnelle de *PITX1*, puisque la déplétion de ce gène, dans les chondrocytes de patients OA, conduit à une augmentation de l'expression de *PITX1*. De plus, outre l'effet sur l'expression de *PITX1*, PHB1 semble également participer à la répression transcriptionnelle d'autres cibles des E2Fs telles *CCNA2* et *CCNE1*, deux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent que l'accumulation nucléaire de PHB1, dans les chondrocytes de patients OA, favorise un arrêt de leur prolifération, ou leur sénescence. Cette idée rejoint celles émises dans un bon nombre d'études qui rendent compte de la présence de chondrocytes sénescents et propose une nouvelle explication moléculaire sur les mécanismes menant à cet état.

Enfin, le développement d'une thérapie pharmacologique permettant de stimuler l'exportation nucléaire de PHB1 serait intéressante. Une telle thérapie permettrait de lever la répression de gènes cibles des E2Fs, tels *PITX1*, *CCNA2* et *CCNE1* et d'offrir une

protection cellulaire contre le stress oxydatif par l'augmentation de la présence de PHB1 aux mitochondries. Globalement, ces effets favoriseraient la prolifération des chondrocytes et la réparation du cartilage articulaire.

Pour finir, parmi toutes les expériences suggérées dans cette section, deux s'avèrent prioritaires. Premièrement, il est essentiel de découvrir le partenaire de PHB1 qui lui permet d'être recruté au promoteur de gènes cibles. Une telle découverte permettrait de mieux comprendre les conséquences de la répression par PHB1 dans les chondrocytes de patients OA. Deuxièmement, il est essentiel de comprendre le mécanisme par lequel PHB1 s'accumule au noyau des chondrocytes de patients OA. La découverte de ce mécanisme offrirait une cible pour un éventuel traitement pharmacologique ayant pour but de contrer les conséquences de l'accumulation nucléaire de PHB1.

4.3 Mécanisme de répression de *PHEX* par E4BP4

4.3.1 Le facteur de transcription E4BP4

E4BP4 (aussi nommé NFIL3) est un répresseur transcriptionnel à domaine bZIP appartenant à la sous-famille des protéines CREB ^[419]. Tout d'abord étudié parce qu'il est capable d'interagir avec un élément de réponse ATF dans le promoteur de l'adénovirus E4, ce répresseur transcriptionnel est maintenant connu comme étant un important facteur dans l'établissement et le maintien du rythme circadien, dont l'intérêt sera abordé plus loin ^[419-423]. Afin de réprimer l'expression de ses gènes cibles, E4BP4, comme tous les autres bZIPs, doit directement interagir avec un élément de réponse présent dans le promoteur de ceux-ci ^[46, 47]. Dans le cas d'E4BP4, la séquence consensus qu'il reconnaît est 5'-(G/A)T(G/T)A(C/T)GTAA(T/C)-3', avec une forte préférence pour la séquence 5'-TTATGTAA-3' ^[419]. Deux éléments de réponses situés dans la région proximale du promoteur humain de *PHEX* présentent une séquence s'apparentant à ce consensus. Ces éléments, nommés EBP1 (constitué des nucléotides -383/-374, par rapport au site d'initiation de la transcription, et présentant la séquence 5'-TTTATGTAAA-3') et EBP2

(constitué des nucléotides +73/+82, par rapport au site d'initiation de la transcription, et présentant la séquence 5'-ATCATGTAAT-3' sur le brin complémentaire) sont tous deux capables de recruter E4BP4 et sont nécessaires pour la répression de *PHEX* par la PTHrP(1-34). Aussi, il est intéressant de constater que la suppression de l'expression de E4BP4, par l'utilisation d'un siRNA, conduit à l'augmentation de l'expression basale de *PHEX* (Figure 3.3C). Ce résultat suggère qu'E4BP4 ne participe pas seulement à la répression de *PHEX* suite à une stimulation par la PTHrP(1-34), mais qu'il participe également au maintien de l'expression de *PHEX* à de bas niveaux en absence de stimulation.

4.3.2 Le mécanisme moléculaire de répression de *PHEX* par E4BP4

4.3.2.1 Mécanisme connu impliquant DR1/DRAP1

À ce jour, les mécanismes par lesquels E4BP4 réprime la transcription ont peu été étudiés. Ce que nous savons de ces mécanismes se résume à sa capacité d'interagir directement avec la protéine DR1 (Downregulator of Transcription 1) via un domaine composé des acides aminés 299 à 363 situé dans la région C-terminale d'E4BP4 ^[424]. DR1, en association avec son co-répresseur DRAP1, interagit avec la TBP et empêche ainsi la formation du complexe de pré-initiation de la transcription ^[424-428]. Les résultats présentés dans cette thèse ne permettent pas de dire que ce mécanisme est nécessaire pour la répression de *PHEX* puisque nous n'avons jamais vérifié si DR1 et DRAP1 sont présents au promoteur suite à un traitement à la PTHrP(1-34). Une analyse par CHIP dirigée contre les protéines DR1 ou DRAP1 permettrait d'en apprendre plus sur le mécanisme moléculaire utilisé par E4BP4 pour réprimer la transcription de *PHEX*.

4.3.2.1.1 Un mécanisme spécifique aux ostéoblastes matures ?

Il est intéressant de mentionner que ce mécanisme transcriptionnel (E4BP4/DR1) semble plus actif, du moins dans le cerveau, dans les populations cellulaires ayant atteint un état avancé de différenciation ^[427]. Puisque la répression imputée à E4BP4 dans cette

thèse concerne *PHEX*, un gène exprimé seulement dans les ostéoblastes matures et, donc, pleinement différenciés, il est possible de croire que ce soit également vrai pour le tissu osseux [256, 258]. Aussi, afin de supporter cette hypothèse, il est pertinent de mentionner que l'expression de PTH1R augmente, *in vitro*, avec l'avancement de l'état de différenciation des ostéoblastes [429, 430]. Dans le même ordre d'idée, il a été observé que l'exposition d'ostéoblastes à la PTHrP(1-34) induit la production de plus grandes quantités d'AMPc dans les cellules ayant atteint un état avancé de différenciation par rapport à des ostéoblastes situés au début du processus de différenciation [431]. Encore ici, cette idée qu'E4BP4 participe à un mécanisme spécifique aux ostéoblastes matures ne demeure qu'une hypothèse et nécessite d'être vérifiée. Des résultats préliminaires, non présentés dans cette thèse, n'ont pas permis d'observer un changement d'expression d'E4BP4 au cours de la différenciation de cellules MC3T3, une lignée d'ostéoblastes dérivés de calvarias. Toutefois, il est important de spécifier qu'il s'agissait d'ostéoblastes ne subissant aucune autre stimulation que celle nécessaire à induire l'apparition de nodules de minéralisation, c'est-à-dire du β -glycerophosphate et de l'acide ascorbique. Ainsi, afin de s'assurer qu'E4BP4 est préférentiellement activé dans les ostéoblastes matures, il serait nécessaire de refaire cette expérience de différenciation *in vitro* en incluant un traitement à la PTH ou la PTHrP. Une telle découverte permettrait de définir la voie de signalisation PTHrP(PTH)/G α s/PKA/E4BP4 comme une voie spécifique aux ostéoblastes matures.

4.3.2.2 Mécanisme hypothétique impliquant RUNX2

Lors d'un traitement à la PTHrP(1-34), nous observons une rapide induction de l'expression de *E4BP4*, suivie d'une répression de *PHEX* (Figure 3.1B). Toutefois, tandis que les niveaux protéiques d'E4BP4 reviennent à des valeurs tout près de la normale huit heures après le début du traitement, la répression de *PHEX* est fortement maintenue durant 24 heures (Figure 3.1 B et C). Afin d'expliquer le maintien de cette répression, nous suggérons une possible implication du facteur de transcription RUNX2. En effet, il a été démontré qu'un traitement à la PTHrP(1-34) bloque l'expression de RUNX2 dans les ostéoblastes en différenciation [431]. Cette inhibition résulte en une diminution de

l'expression de l'ALP et de la minéralisation de la MEC par les ostéoblastes. Aussi, puisque la surexpression de *RUNX2* semble suffisante pour contrer cet effet ^[431], il serait pertinent d'évaluer l'effet de cette surexpression lorsque *PHEX* est inhibé par la PTHrP(1-34). Or, advenant que le maintien de la répression de *PHEX* par la PTHrP(1-34) soit due à une répression de *RUNX2*, la surexpression de ce facteur de transcription devrait renverser cette situation. Ainsi, on devrait observer une augmentation de l'expression de *PHEX* rapidement après un retour de l'expression de *E4BP4* à des niveaux basals.

4.3.2.3 Mécanisme hypothétique impliquant CREB

Les premiers travaux réalisés, ayant pour but de caractériser le rôle d'E4BP4, ont démontré que cette protéine forme un homodimère afin d'interagir avec l'ADN. Toutefois, à l'instar de d'autres bZIP, il a été plus tard montré que ce répresseur est aussi capable d'hétérodimériser avec CREB. Cette caractéristique d'E4BP4 est intéressante puisque l'implication de CREB dans la réponse cellulaire à la PTH ou à la PTHrP a été observée à plusieurs occasions ^[432-435]. Toutefois, l'ensemble de ces études présentent des résultats contradictoires, illustrant bien la complexité de l'effet de la PTH et de la PTHrP sur le tissu osseux. Ainsi, on observe, que la stimulation de CREB par la PTH entraîne la diminution de l'expression de *RUNX2* par les chondrocytes et l'augmentation de l'expression de *RANKL* par les ostéoblastes, résultats concordant l'effet catabolique de la PTH et la PTHrP sur le tissu osseux ^[435, 436]. À l'inverse, d'autres ont observé une augmentation de l'expression de *c-FOS*, un bZIP favorisant la prolifération des ostéoblastes ^[55, 56], suite à l'activation de CREB par la PTH, résultat en accord avec sa fonction anabolique ^[432]. Ainsi, puisque ces deux types d'action (catabolique et anabolique) semblent co-exister et qu'elle requiert l'activation de voies de signalisation communes, il demeure possible, dans le cas qui nous intéresse dans cette thèse, qu'une stimulation d'E4BP4 et de CREB par la PTHrP entraîne leur dimérisation et leur recrutement au promoteur de *PHEX*. Cette hypothèse est aussi supportée par la séquence nucléotidique présentée par les éléments de réponses EBPREs, notamment celle de l'EBPRE2, présent dans le promoteur de *PHEX*. Ainsi, la moitié 5' de l'EBPRE2 (5'-ATCAT-3' en considérant le brin complémentaire) présente une séquence

légèrement atypique d'un EBPRES classique (5'-(G/A)T(G/T)A(C/T)-3') et qui pourrait aussi s'apparenter à un demi-site CREB/ATF (5'-GTCAT-3'). Cependant, les résultats présentés ici ne permettent pas de valider cette hypothèse. Une confirmation de cette interaction entre E4BP4 et CREB dans notre système ainsi qu'une vérification du recrutement de CREB au promoteur de *PHEX*, par ChIP, suite à l'exposition à la PTHrP(1-34), s'avèreraient nécessaires pour vérifier cette idée.

4.3.3 E4BP4 et le rythme circadien

Comme il a été mentionné auparavant, E4BP4 est un acteur important pour l'établissement et le maintien du rythme circadien. Ce système, qui prend naissance dans le noyau suprachiasmatique (NSC) de la partie antérieure de l'hypothalamus, permet l'établissement d'un cycle temporel dans l'organisme ^[437-440]. De manière plus concrète, ce cycle temporel peut être décrit comme un cycle interne qui transpose, à l'intérieur de l'organisme, celui du jour et de la nuit. Du point de vue moléculaire, le fonctionnement du rythme circadien est assuré par l'oscillation de l'expression de gènes *Clocks* ^[437-440]. Une fois que cette expression rythmée est bien établie dans le NSC, l'oscillation est transmise aux organes périphériques, notamment par l'entremise du système nerveux périphérique ou de signaux endocriniens ^[437-440]. Ainsi, E4BP4 intervient dans la régulation du cycle circadien par son action répressive sur la transcription de certains gènes *Clocks*, tels *PER1*, *PER2*, *PER3*, *NR1D1*, *NR1D2*, *RORA* et *RORB* ^[423, 441, 442].

Outre cette fonction de répresseur de gène *Clocks*, les résultats présentés dans cette thèse et ceux obtenus par deux autres groupes montrent que cette protéine exerce aussi une fonction dans les ostéoblastes. En effet, dans ces cellules la PTH et la PTHrP, via l'augmentation des niveaux d'AMPc, induit l'expression de *E4BP4* ^[443-445]. Une fois induit, le répresseur diminue l'expression de *PHEX* et de *COX-2* par son interaction avec des éléments de réponses présents dans leur promoteur. Par la suite, cette répression de *COX-2* conduit à la suppression de l'expression des facteurs de transcription RUNX2 et

OSX^[445]. Ainsi, l'ensemble de ces effets suggèrent qu'E4BP4 est capable de diminuer la différenciation et l'activité des ostéoblastes.

4.3.3.1 Le rythme circadien et le contrôle de la masse osseuse

Cette nouvelle fonction d'E4BP4 sur le métabolisme et la différenciation des ostéoblastes permet de tracer un parallèle intéressant avec son rôle dans la régulation du cycle circadien. En effet, au cours des dernières années, plusieurs évidences s'accumulent suggérant que le rythme circadien intervient dans la régulation de la minéralisation via son action sur les ostéoblastes et les ostéoclastes^[446-451]. Parmi les études supportant cette hypothèse, on retrouve celle réalisée par l'équipe du docteur Karsenty montrant que les souris *Per1*^{-/-};*Per2*^{-/-} et *Cry1*^{-/-};*Cry2*^{-/-}, dont les gènes délétés correspondent à des gènes *Clocks* nécessaire à l'établissement de l'oscillation dans le NSC et en périphérie, ont une masse osseuse supérieure aux animaux sauvages^[451-453]. Cet effet semble être la conséquence d'une augmentation de la prolifération et de la différenciation des ostéoblastes, montrant donc que ces gènes *Clocks* ont pour fonction d'inhiber ce processus lorsque exprimés^[451]. De plus, puisque ces souris knock-out ne sont plus sensibles à la perte de la masse osseuse induite par l'axe leptine/NSC/Système nerveux sympathique (SNS), ces résultats suggèrent un contrôle systémique du volume osseux par le NSC par la régulation des gènes *Clocks*^[451]. Cette idée d'un contrôle de la masse osseuse par le NSC est supportée par une autre étude montrant que les niveaux circulants en leptine sont régulés par le NSC^[454].

Aussi, d'autres hormones agissant sur le tissu osseux peuvent être régulées par le NSC. C'est le cas de la PTH qui voit son expression oscillée sur un cycle de 24 heures^[455]. Ces fluctuations, combinées au fait que cette hormone est capable de stimuler l'expression de *Per1* dans les ostéoblastes et les chondrocytes, suggèrent que le NSC pourrait aussi contrôler la masse osseuse par l'entremise de la PTH^[456, 457]. Les résultats présentés dans cette thèse et retrouvés dans d'autres études appuient également un tel modèle. En effet, puisque la PTHrP et la PTH induisent l'expression d'un régulateur du cycle circadien,

E4BP4, et que cette induction conduit à la répression de gènes essentiels à la minéralisation de la matrice extracellulaire osseuse, soit *OSX*, *RUNX2* et *PHEX*, on pourrait croire que ces deux hormones coopèrent avec la l'axe leptine/NSC/SNS pour inhiber la minéralisation. Toutefois, la particularité du rôle de la PTH sur le tissu osseux ne permet pas une conclusion aussi simple. En effet, puisque cette hormone induit autant un effet catabolique qu'anabolique sur ce tissu, on se doit de considérer une deuxième hypothèse. Cette hypothèse est basée sur la fonction d'E4BP4 en tant que régulateur du cycle circadien par sa capacité de réprimer l'expression de plusieurs gènes *Clocks*, dont notamment celle de *PER1* et *PER2* [423, 441, 442]. Cette fonction, quoique jamais démontrée dans les ostéoblastes, permettrait donc à E4BP4 de réprimer l'expression de protéines responsables d'inhiber la prolifération et la différenciation des ostéoblastes. L'idée qu'E4BP4 soit impliquée dans l'établissement et le maintien du rythme circadien dans les ostéoblastes est supportée par un grand nombre d'études démontrant qu'un défaut dans l'expression rythmique de la PTH est associé à la diminution de la masse osseuse chez les femmes ménopausées [455, 458-462]. De plus, cette action rythmique de la PTH n'est pas sans rappeler l'impact positif, sur la densité osseuse, engendré par l'administration de PTH recombinant de manière intermittente [75-77]. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer l'effet de l'expression rythmique d'E4BP4 seul sur la densité osseuse. Pour ce faire, le développement d'une souris transgénique surexprimant E4BP4, sous le contrôle d'un promoteur inductible à la doxycycline, pourrait s'avérer utile pour évaluer le rôle spécifique d'E4BP4 dans le gain de la masse osseuse lorsque les ostéoblastes sont exposés de manière intermittente à la PTH.

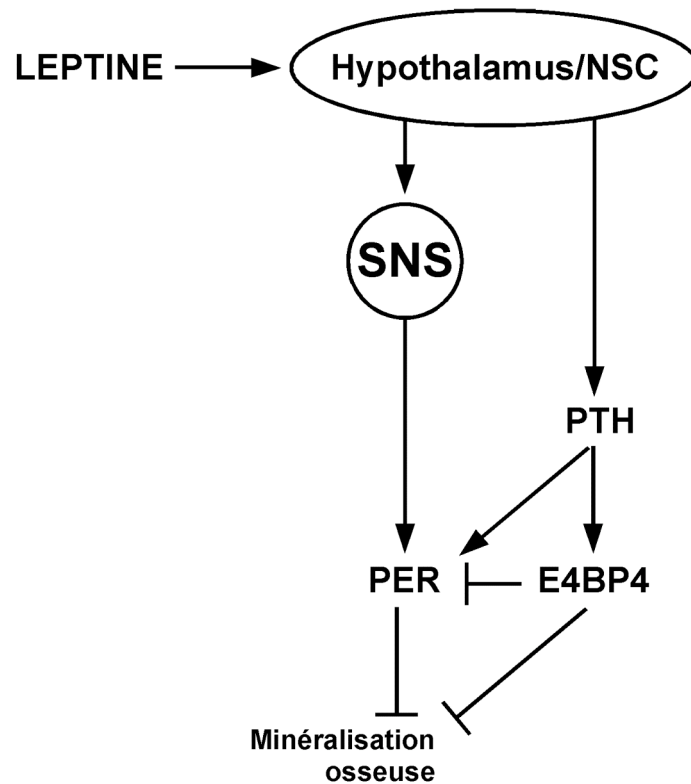


Figure 4.2 Schéma résumant l'action hypothétique de E4BP4 sur la minéralisation des os.

Le système nerveux sympathique (SNS), sous l'influence d'un axe Leptine/Hypothalamus-noyau suprachiasmatique (NSC) inhibe la minéralisation par la stimulation de PER1/2 ^[451]. E4BP4 est une protéine participant à l'établissement des rythmes circadiens par son action inhibitrice sur les gènes *Clocks* dont font parti PER1/2 ^[423, 441, 442]. Aussi, ce répresseur transcriptionnel réprime l'expression de différents gènes essentiels à la différenciation et l'activées des ostéoblastes tels que *RUNX2*, *OSX* et *PHEX*. Deux hypothèses peuvent être formulées suite à ces différents rôles. La première stipule qu'E4BP4 peut augmenter la masse osseuse par sa capacité à établir et maintenir un rythme circadien dans les cellules, notamment en réprimant l'expression de *PER1* et *PER2*. La deuxième stipule qu'E4BP4, en agissant directement sur des gènes importants à l'activité des ostéoblastes, diminue la masse osseuse.

Notre compréhension de cette nouvelle voie de régulation passe par une compréhension de l'impact physiologique de la répression de *PHEX* par l'axe PTHrP (ou PTH)/E4BP4. Puisque les modèles cellulaires *in vitro* ne nous permettent pas de comprendre la complexité de l'action de la PTH et de la PTHrP sur l'homéostasie des os, le développement d'un modèle animal knock-out pour *E4bp4* serait utile pour considérer l'une ou l'autre des hypothèses mentionnées auparavant. Deux types de résultats, basés sur ces deux hypothèses, seraient envisageables. Selon la première hypothèse, la souris *E4bp4*^{-/-} verrait sa masse osseuse diminuée due à un défaut de l'oscillation circadienne des ostéoblastes et à l'expression constante de gènes tels *Per1* et *Per2*. Selon la seconde hypothèse, la souris *E4bp4*^{-/-} verrait sa masse osseuse augmentée due au maintien de l'expression de *Runx2*, d'*Osx* et de *Phex* (Figure 4.2). De plus, il ne serait pas étonnant de noter un effet beaucoup plus grand dans l'os cortical que trabéculaire puisque, chez les souris *Pth1r*^{-/-}, on observe un épaississement de cette structure osseuse [394].

4.3.4 E4BP4 et le contrôle des niveaux de phosphate sanguin

Du point de vue de la régulation des niveaux de phosphate sanguin, l'impact de cette répression de *PHEX* par la voie PTHrP/E4BP4 s'avère également intéressant. En effet, comme il a été mentionné auparavant, *PHEX*, par un mécanisme dépendant de l'augmentation de l'expression de *FGF23*, est un acteur important du contrôle de la réabsorption du phosphate excrété par les reins (Figure 1.7) [250-252]. Ainsi, l'inactivation ou l'absence de *PHEX* chez les patients souffrant du XLH ou chez la souris *Hyp* conduit à la diminution de l'expression des co-transporteurs sodium/phosphate *NaPi2a* et *NaPi2c* [463, 464]. Outre *FGF23*, la PTH contrôle elle aussi la réabsorption du phosphate par les reins (Figure 1.7) [73, 465]. Pour ce faire, elle utilise le même mécanisme, soit la diminution de l'expression de *NaPi2a/c* [466-469]. La répression de *PHEX* par la PTH et la PTHrP présentée dans cette thèse et observée dans le passé suggère que la PTH pourrait accroître les niveaux d'expression de *FGF23* en supprimant l'expression de *PHEX*. Cet effet indirect pourrait s'ajouter à celui récemment découvert montrant qu'une injection de la PTH chez les rats

permet l'augmentation de l'expression du FGF23 par les calvarias^[470]. Aussi, en support à cette hypothèse, il a été observé que, dans le syndrome de McCune-Albright et la chondrodysplasie métaphysaire de Jansen, respectivement causés par une mutation activatrice du gène *GNAS* et *PTH1R*, il y a une augmentation de FGF23 circulant associée à une hypophosphatémie^[471, 472]. Il serait donc intéressant d'évaluer l'importance de la répression de *PHEX* par l'axe PTH/E4BP4 dans le développement de l'hypophosphatémie retrouvée dans ces deux maladies. Ainsi, dans la perspective qu'une répression de *PHEX* dans ces deux maladies est responsable, du moins en partie, de l'augmentation des niveaux de FGF23 circulant et donc de l'hypophosphatémie, une inhibition de cette voie de signalisation s'avérerait pertinente pour un traitement d'un tel symptôme.

4.3.5 ATF4, un potentiel activateur transcriptionnel de *PHEX*

Enfin, l'analyse *in silico* du promoteur de *PHEX* a révélé la présence de deux éléments de réponse potentiels pour le facteur de transcription ATF4. Ces deux éléments de réponse, situés sur le brin complémentaire, sont localisés aux nucléotides -310/-303 et -281/-274 (par rapport au site d'initiation de la transcription) et présentent la séquence complémentaire 5'-TGATGAAA-3'. Cette séquence est similaire au consensus pour les facteur ATFs, soit 5'-TGACGT(C/A)(G/A)-3'^[47, 473]. La présence de ces deux éléments de réponse suggère qu'ATF4 est potentiellement capable d'activer l'expression de *PHEX*. Cette idée est intéressante puisqu'en 3' de ces éléments (en position -225/-219) on retrouve un site de liaison pour RUNX2, un partenaire connu d'ATF4 et un activateur transcriptionnel de *PHEX*^[61, 66, 263]. Aussi, les observations réalisées chez les souris adultes *Rsk2^{-y}*, dont la fonction kinase est essentielle à l'activité d'Atf4, tel que mentionné plus tôt, supportent également l'idée qu'ATF4 puisse être un activateur transcriptionnel de *PHEX*^[61, 62]. En effet, chez ces animaux, il est impossible de détecter l'expression de la peptidase *Phex* dans les ostéoblastes, tandis que l'expression d'autres marqueurs tardifs de leur différenciation, telles l'OCN et l'OPN, semble maintenue^[62]. De plus, le défaut de minéralisation de l'os cortical engendré par cette mutation s'apparente à celui retrouvé chez les souris *Hyp*^[474]. Ensemble,

ces deux observations suggèrent qu'ATF4, *in vivo*, active l'expression de *PHEX* pour promouvoir la fonction des ostéoblastes. Malgré tout, cette régulation reste hypothétique et une étude mécanistique n'en demeure pas moins nécessaire pour s'assurer de sa véracité. Ainsi, une première analyse par CHIP, afin de vérifier l'occupation des éléments de réponses pour ATF4, couplée à la délétion de ces mêmes éléments dans le rapporteur luciférase, nous permettraient d'en apprendre beaucoup sur le rôle potentiel d'ATF4 dans la régulation transcriptionnelle de *PHEX*.

4.3.6 Conclusion sur la répression de *PHEX* par E4BP4

Les résultats présentés dans ce deuxième article permettent de caractériser la voie de signalisation utilisée par la PTH et la PTHrP afin de réprimer l'expression de *PHEX*. Ce nouveau rôle d'E4BP4 suggère également un nouveau mécanisme par lequel le cycle circadien pourrait contrôler la minéralisation des os via la PTH. Ainsi, E4BP4 pourrait s'avérer un facteur clé dans l'établissement du rythme circadien dans le tissu osseux. De plus, la rythmicité du cycle circadien et de la sécrétion de la PTH par les glandes parathyroïdiennes n'est pas sans rappeler l'effet bénéfique, sur la masse osseuse, qu'engendre l'administration intermittente de la PTH chez les femmes ménopausées souffrant d'ostéoporose. Ainsi, l'activation de ce nouveau mécanisme transcriptionnel pourrait s'avérer une belle alternative à l'utilisation de la PTH afin d'induire un gain de la densité osseuse chez les patients souffrant d'ostéoporose. Bref, cette nouvelle fonction d'E4BP4 en tant que régulateur transcriptionnel de *PHEX* pourrait permettre le développement de thérapies plus spécifiques pour le traitement de pathologie telle l'ostéoporose.

Enfin, même si la fonction de *PHEX* n'est pas entièrement comprise, le caractère dominant du syndrome XLH suggère que son expression doit être parfaitement contrôlée afin que la minéralisation du tissu osseux et que les niveaux de phosphate sanguin soient optimaux. Ainsi, la découverte de ce nouveau mécanisme permet maintenant d'explorer l'implication de *PHEX* dans de nouvelles pathologies. Par exemple, dans les pathologies

ayant pour conséquence l'augmentation de l'activité des protéines $G\alpha_s$, tels le syndrome de McCune-Albright et la chondrodysplasie métaphysaire de Jansen, une faible diminution de l'expression de *PHEX*, due à l'expression constante d'E4BP4, pourrait être responsable de l'établissement de l'hypophosphatémie.

Pour conclure, un grand nombre d'expériences ont été proposées dans cette section de la discussion. Aussi, afin de poursuivre ce projet, il serait essentiel de produire une souris *E4bp4^{-/-}*. Un tel animal permettrait de déterminer l'importance de la répression de *PHEX* par E4BP4 sur l'homéostasie du tissu osseux et de l'importance de ce facteur de transcription dans la voie de signalisation PTHrP(PTH)/ $G\alpha_s$ /PKA.

4.4 *PITXI* et *PHEX*, deux gènes respectivement impliqués dans la minéralisation des os et l'ostéoarthrite ?

Les deux projets de recherche décrits dans cette thèse touchent, à première vue, deux volets de la biologie osseuse distincts. En effet, tandis que le premier porte sur la régulation d'un facteur de transcription dont la perte d'expression semble avoir des conséquences néfastes sur l'homéostasie du cartilage articulaire, le second porte plutôt sur la régulation d'une peptidase jouant un rôle clé dans la minéralisation des os et le contrôle des niveaux sanguins de phosphate. Toutefois, lorsque l'on s'y attarde, on retrouve certaines indications qui suggèrent un rôle potentiel de *PITXI* dans l'ostéoblastogenèse et, par conséquent, dans la minéralisation des os. Il est également possible d'émettre certaines hypothèses attribuant un rôle potentiel de *PHEX* dans la chondrogenèse, et peut-être même dans la pathogenèse de l'OA.

Comme il l'a été mentionné dans la section 1.6.1.4, *PHEX* est fortement exprimé dans les chondrocytes hypertrophiques. Puisque les souris *Hyp* et les patients souffrant de XLH présentent un rachitisme, il est vraisemblable de penser que *PHEX* exerce une fonction dans ces chondrocytes. De plus, étant donné le rôle de *PHEX* dans les ostéoblastes, cette peptidase pourrait contribuer à la minéralisation de la MEC par les

chondrocytes hypertrophiques. Dans l'OA, on observe une augmentation de la calcification du cartilage articulaire. Aussi, si PHEX participerait à une telle fonction, une inhibition de l'expression de cette peptidase chez les patients souffrant d'OA pourrait diminuer cette calcification. Pour ce faire, une stimulation de l'expression d'E4BP4 par la PTH ou une inhibition de l'expression de RUNX2 par une approche de RNAi pourrait être utilisée.

Dans la section 1.6.2, il a été mentionné que les souris *Pitx1*^{+/-} âgées présentaient, en plus de l'amincissement du cartilage articulaire, une augmentation du volume de l'os sous-chondral. Puisque nous croyons que l'accumulation nucléaire de PHB1 et, par conséquent, la répression de *PITX1*, est de nature génétique et non pas secondaire à un événement telle l'inflammation, il est possible de penser que l'expression de *PITX1* est également réduite dans les ostéoblastes de patients OA. Peu de données permettent de définir une fonction précise à *PITX1* dans les ostéoblastes. Toutefois, à la lumière des observations faites chez les souris déficientes en *Pitx1* et des résultats obtenus dans différentes études portant sur les E2Fs et pRB, il est possible de croire que *PITX1* favorise la prolifération des ostéoblastes. Ainsi, une diminution de l'expression de *PITX1* dans ces cellules pourrait favoriser une sortie des ostéoblastes du cycle cellulaire, leur maturation et, par conséquent, l'augmentation de la minéralisation de la MEC par les ostéoblastes.

4.4.1 Conclusion générale

Pour conclure, cette thèse a pour but d'identifier de nouveaux mécanismes transcriptionnels impliqués dans le développement et l'homéostasie des os. Ainsi, nous avons découvert que PHB1 et E2F1 sont respectivement capables de réprimer et d'activer l'expression de *PITX1*, un facteur de transcription jouant un rôle clé dans la chondrogenèse. De plus, nous avons aussi découvert que le répresseur transcriptionnel E4BP4 réprime l'expression de *PHEX*, une peptidase essentielle au maintien de niveaux standards de phosphate circulant et à la minéralisation des os, lors d'une exposition des ostéoblastes à la PTHrP. Ensemble, ces nouveaux mécanismes transcriptionnels permettent une meilleure connaissance des événements régulant le développement et l'homéostasie des os. Aussi, ces

nouveaux mécanismes offrent de nouvelles cibles pour le traitement de maladies telles que l'OA, l'ostéoporose et les hypophosphatémies.

Bibliographie

1. Quarles LD. Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J Clin Invest.* 2008 Dec;118(12):3820-8.
2. Blair HC, Zaidi M, Huang CL, Sun L. The developmental basis of skeletal cell differentiation and the molecular basis of major skeletal defects. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2008 Nov;83(4):401-15.
3. Karsenty G. Transcriptional control of skeletogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:183-96.
4. Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:629-48.
5. Mariani FV, Martin GR. Deciphering skeletal patterning: clues from the limb. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):319-25.
6. Canalis E. Growth factor control of bone mass. *J Cell Biochem.* 2009 Nov 1;108(4):769-77.
7. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell.* 2002 Apr;2(4):389-406.
8. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):332-6.
9. Zuscik MJ, Hilton MJ, Zhang X, Chen D, O'Keefe RJ. Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *J Clin Invest.* 2008 Feb;118(2):429-38.
10. Archer CW, Douthwaite GP, Francis-West P. Development of synovial joints. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2003 May;69(2):144-55.
11. Pacifici M, Koyama E, Iwamoto M. Mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation: recent advances, but many lingering mysteries. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2005 Sep;75(3):237-48.
12. Pacifici M, Koyama E, Shibukawa Y, Wu C, Tamamura Y, Enomoto-Iwamoto M, et al. Cellular and molecular mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Apr;1068:74-86.
13. Craig FM, Bentley G, Archer CW. The spatial and temporal pattern of collagens I and II and keratan sulphate in the developing chick metatarsophalangeal joint. *Development.* 1987 Mar;99(3):383-91.
14. Pacifici M, Koyama E, Iwamoto M, Gentili C. Development of articular cartilage: what do we know about it and how may it occur? *Connect Tissue Res.* 2000;41(3):175-84.
15. Niedermaier M, Schwabe GC, Fees S, Helmrich A, Brieske N, Seemann P, et al. An inversion involving the mouse *Shh* locus results in brachydactyly through dysregulation of *Shh* expression. *J Clin Invest.* 2005 Apr;115(4):900-9.
16. Pitsillides AA, Ashhurst DE. A critical evaluation of specific aspects of joint development. *Dev Dyn.* 2008 Sep;237(9):2284-94.
17. Karsenty G. The complexities of skeletal biology. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):316-8.

18. Lefebvre V, Smits P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005 Sep;75(3):200-12.
19. Drissi H, Zuscik M, Rosier R, O'Keefe R. Transcriptional regulation of chondrocyte maturation: potential involvement of transcription factors in OA pathogenesis. *Mol Aspects Med*. 2005 Jun;26(3):169-79.
20. Aigner T, Soder S, Gebhard PM, McAlinden A, Haag J. Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis--structure, chaos and senescence. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007 Jul;3(7):391-9.
21. Thomas JT, Lin K, Nandedkar M, Camargo M, Cervenka J, Luyten FP. A human chondrodysplasia due to a mutation in a TGF-beta superfamily member. *Nat Genet*. 1996 Mar;12(3):315-7.
22. Iwamoto M, Tamamura Y, Koyama E, Komori T, Takeshita N, Williams JA, et al. Transcription factor ERG and joint and articular cartilage formation during mouse limb and spine skeletogenesis. *Dev Biol*. 2007 May 1;305(1):40-51.
23. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(3):224.
24. Schumacher BL, Block JA, Schmid TM, Aydelotte MB, Kuettner KE. A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Arch Biochem Biophys*. 1994 May 15;311(1):144-52.
25. Jay GD, Britt DE, Cha CJ. Lubricin is a product of megakaryocyte stimulating factor gene expression by human synovial fibroblasts. *J Rheumatol*. 2000 Mar;27(3):594-600.
26. Rhee DK, Marcelino J, Baker M, Gong Y, Smits P, Lefebvre V, et al. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J Clin Invest*. 2005 Mar;115(3):622-31.
27. Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys*. 2008 May 15;473(2):98-105.
28. Coffman JA. Runx transcription factors and the developmental balance between cell proliferation and differentiation. *Cell Biol Int*. 2003;27(4):315-24.
29. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997 May 30;89(5):747-54.
30. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 1997 May 30;89(5):755-64.
31. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. 1997 May 30;89(5):765-71.
32. Ducy P. *Cbfa1*: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn*. 2000 Dec;219(4):461-71.
33. Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, et al. A *Cbfa1*-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev*. 1999 Apr 15;13(8):1025-36.

34. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, et al. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell*. 1997 May 30;89(5):773-9.
35. Yoshida CA, Furuichi T, Fujita T, Fukuyama R, Kanatani N, Kobayashi S, et al. Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development. *Nat Genet*. 2002 Dec;32(4):633-8.
36. Ueta C, Iwamoto M, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Enomoto-Iwamoto M, et al. Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *J Cell Biol*. 2001 Apr 2;153(1):87-100.
37. Zhou G, Zheng Q, Engin F, Munivez E, Chen Y, Sebald E, et al. Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Dec 12;103(50):19004-9.
38. Zhang M, Xie R, Hou W, Wang B, Shen R, Wang X, et al. PTHrP prevents chondrocyte premature hypertrophy by inducing cyclin-D1-dependent Runx2 and Runx3 phosphorylation, ubiquitylation and proteasomal degradation. *J Cell Sci*. 2009 May 1;122(Pt 9):1382-9.
39. Bialek P, Kern B, Yang X, Schrock M, Sosic D, Hong N, et al. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev Cell*. 2004 Mar;6(3):423-35.
40. Howard TD, Paznekas WA, Green ED, Chiang LC, Ma N, Ortiz de Luna RI, et al. Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet*. 1997 Jan;15(1):36-41.
41. El Ghouzzi V, Le Merrer M, Perrin-Schmitt F, Lajeunie E, Benit P, Renier D, et al. Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet*. 1997 Jan;15(1):42-6.
42. El Ghouzzi V, Lajeunie E, Le Merrer M, Cormier-Daire V, Renier D, Munnich A, et al. Mutations within or upstream of the basic helix-loop-helix domain of the TWIST gene are specific to Saethre-Chotzen syndrome. *Eur J Hum Genet*. 1999 Jan;7(1):27-33.
43. El Ghouzzi V, Legeai-Mallet L, Aresta S, Benoist C, Munnich A, de Gunzburg J, et al. Saethre-Chotzen mutations cause TWIST protein degradation or impaired nuclear location. *Hum Mol Genet*. 2000 Mar 22;9(5):813-9.
44. Nishio Y, Dong Y, Paris M, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H. Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene*. 2006 May 10;372:62-70.
45. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002 Jan 11;108(1):17-29.
46. Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*. 2002 May;4(5):E131-6.
47. Ameri K, Harris AL. Activating transcription factor 4. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(1):14-21.
48. Deutsch PJ, Hoeffler JP, Jameson JL, Lin JC, Habener JF. Structural determinants for transcriptional activation by cAMP-responsive DNA elements. *J Biol Chem*. 1988 Dec 5;263(34):18466-72.

49. Wang ZQ, Liang J, Schellander K, Wagner EF, Grigoriadis AE. c-fos-induced osteosarcoma formation in transgenic mice: cooperativity with c-jun and the role of endogenous c-fos. *Cancer Res.* 1995 Dec 15;55(24):6244-51.
50. Jochum W, Passegue E, Wagner EF. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene.* 2001 Apr 30;20(19):2401-12.
51. Hess J, Hartenstein B, Teurich S, Schmidt D, Schorpp-Kistner M, Angel P. Defective endochondral ossification in mice with strongly compromised expression of JunB. *J Cell Sci.* 2003 Nov 15;116(Pt 22):4587-96.
52. Kenner L, Hoebertz A, Beil T, Keon N, Karreth F, Eferl R, et al. Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects. *J Cell Biol.* 2004 Feb 16;164(4):613-23.
53. Narayanan K, Srinivas R, Peterson MC, Ramachandran A, Hao J, Thimmapaya B, et al. Transcriptional regulation of dentin matrix protein 1 by JunB and p300 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2004 Oct 22;279(43):44294-302.
54. Akhouayri O, St-Arnaud R. Differential mechanisms of transcriptional regulation of the mouse osteocalcin gene by Jun family members. *Calcif Tissue Int.* 2007 Feb;80(2):123-31.
55. Machwate M, Jullienne A, Moukhtar M, Lomri A, Marie PJ. c-fos protooncogene is involved in the mitogenic effect of transforming growth factor-beta in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol.* 1995 Feb;9(2):187-98.
56. Grigoriadis AE, Schellander K, Wang ZQ, Wagner EF. Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J Cell Biol.* 1993 Aug;122(3):685-701.
57. Jochum W, David JP, Elliott C, Wutz A, Plenk H, Jr., Matsuo K, et al. Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nat Med.* 2000 Sep;6(9):980-4.
58. Sabatakos G, Sims NA, Chen J, Aoki K, Kelz MB, Amling M, et al. Overexpression of DeltaFosB transcription factor(s) increases bone formation and inhibits adipogenesis. *Nat Med.* 2000 Sep;6(9):985-90.
59. Kveiborg M, Sabatakos G, Chiusaroli R, Wu M, Philbrick WM, Horne WC, et al. DeltaFosB induces osteosclerosis and decreases adipogenesis by two independent cell-autonomous mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2004 Apr;24(7):2820-30.
60. Sabatakos G, Rowe GC, Kveiborg M, Wu M, Neff L, Chiusaroli R, et al. Doubly truncated FosB isoform (Delta2DeltaFosB) induces osteosclerosis in transgenic mice and modulates expression and phosphorylation of Smads in osteoblasts independent of intrinsic AP-1 activity. *J Bone Miner Res.* 2008 May;23(5):584-95.
61. Yang X, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T, et al. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell.* 2004 Apr 30;117(3):387-98.
62. David JP, Mehic D, Bakiri L, Schilling AF, Mandic V, Priemel M, et al. Essential role of RSK2 in c-Fos-dependent osteosarcoma development. *J Clin Invest.* 2005 Mar;115(3):664-72.
63. Dobрева G, Chahrour M, Dautzenberg M, Chirivella L, Kanzler B, Farinas I, et al. SATB2 is a multifunctional determinant of craniofacial patterning and osteoblast differentiation. *Cell.* 2006 Jun 2;125(5):971-86.

64. Chevray PM, Nathans D. Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jul 1;89(13):5789-93.
65. Hai T, Curran T. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 May 1;88(9):3720-4.
66. Xiao G, Jiang D, Ge C, Zhao Z, Lai Y, Boules H, et al. Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and Runx2/Cbfa1 stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression. *J Biol Chem*. 2005 Sep 2;280(35):30689-96.
67. Chandhoke TK, Huang YF, Liu F, Gronowicz GA, Adams DJ, Harrison JR, et al. Osteopenia in transgenic mice with osteoblast-targeted expression of the inducible cAMP early repressor. *Bone*. 2008 Jul;43(1):101-9.
68. Yu VW, Ambartsoumian G, Verlinden L, Moir JM, Prud'homme J, Gauthier C, et al. FIAT represses ATF4-mediated transcription to regulate bone mass in transgenic mice. *J Cell Biol*. 2005 May 23;169(4):591-601.
69. Abou-Samra AB, Juppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, et al. Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Apr 1;89(7):2732-6.
70. Segre GV, Abou-Samra AB, Juppner H, Schipani E, Force T, Urena P, et al. Characterization of cloned PTH/PTHrP receptors. *J Endocrinol Invest*. 1992;15(9 Suppl 6):11-7.
71. Juppner H, Abou-Samra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, et al. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science*. 1991 Nov 15;254(5034):1024-6.
72. Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, Zeng Q, Miles RR, et al. Catabolic effects of continuous human PTH (1-38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology*. 2001 Sep;142(9):4047-54.
73. Bergwitz C, Juppner H. Regulation of phosphate homeostasis by PTH, vitamin D, and FGF23. *Annu Rev Med*. 2010;61:91-104.
74. Friedman PA, Gesek FA. Calcium transport in renal epithelial cells. *Am J Physiol*. 1993 Feb;264(2 Pt 2):F181-98.
75. Reeve J, Meunier PJ, Parsons JA, Bernat M, Bijvoet OL, Courpron P, et al. Anabolic effect of human parathyroid hormone fragment on trabecular bone in involutional osteoporosis: a multicentre trial. *Br Med J*. 1980 Jun 7;280(6228):1340-4.
76. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*. 2001 May 10;344(19):1434-41.
77. Hodsman AB, Bauer DC, Dempster DW, Dian L, Hanley DA, Harris ST, et al. Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr Rev*. 2005 Aug;26(5):688-703.

78. Ishizuya T, Yokose S, Hori M, Noda T, Suda T, Yoshiki S, et al. Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. *J Clin Invest*. 1997 Jun 15;99(12):2961-70.
79. Rickard DJ, Wang FL, Rodriguez-Rojas AM, Wu Z, Trice WJ, Hoffman SJ, et al. Intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) as well as a non-peptide small molecule agonist of the PTH1 receptor inhibits adipocyte differentiation in human bone marrow stromal cells. *Bone*. 2006 Dec;39(6):1361-72.
80. Kulkarni NH, Wei T, Kumar A, Dow ER, Stewart TR, Shou J, et al. Changes in osteoblast, chondrocyte, and adipocyte lineages mediate the bone anabolic actions of PTH and small molecule GSK-3 inhibitor. *J Cell Biochem*. 2007 Dec 15;102(6):1504-18.
81. Miyakoshi N, Kasukawa Y, Linkhart TA, Baylink DJ, Mohan S. Evidence that anabolic effects of PTH on bone require IGF-I in growing mice. *Endocrinology*. 2001 Oct;142(10):4349-56.
82. Bikle DD, Sakata T, Leary C, Elalieh H, Ginzinger D, Rosen CJ, et al. Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone. *J Bone Miner Res*. 2002 Sep;17(9):1570-8.
83. Krishnan V, Moore TL, Ma YL, Helvering LM, Frolik CA, Valasek KM, et al. Parathyroid hormone bone anabolic action requires Cbfa1/Runx2-dependent signaling. *Mol Endocrinol*. 2003 Mar;17(3):423-35.
84. Hurley MM, Okada Y, Xiao L, Tanaka Y, Ito M, Okimoto N, et al. Impaired bone anabolic response to parathyroid hormone in Fgf2^{-/-} and Fgf2^{+/-} mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Mar 24;341(4):989-94.
85. Wang BL, Dai CL, Quan JX, Zhu ZF, Zheng F, Zhang HX, et al. Parathyroid hormone regulates osterix and Runx2 mRNA expression predominantly through protein kinase A signaling in osteoblast-like cells. *J Endocrinol Invest*. 2006 Feb;29(2):101-8.
86. Wang Y, Nishida S, Boudignon BM, Burghardt A, Elalieh HZ, Hamilton MM, et al. IGF-I receptor is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *J Bone Miner Res*. 2007 Sep;22(9):1329-37.
87. Kousteni S, Bilezikian JP. The cell biology of parathyroid hormone in osteoblasts. *Curr Osteoporos Rep*. 2008 Jun;6(2):72-6.
88. Sabbieti MG, Agas D, Xiao L, Marchetti L, Coffin JD, Doetschman T, et al. Endogenous FGF-2 is critically important in PTH anabolic effects on bone. *J Cell Physiol*. 2009 Apr;219(1):143-51.
89. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest*. 1999 Aug;104(4):439-46.
90. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab*. 2006 Aug;4(2):111-21.
91. Allan EH, Hausler KD, Wei T, Gooi JH, Quinn JM, Crimeen-Irwin B, et al. EphrinB2 regulation by PTH and PTHrP revealed by molecular profiling in differentiating osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2008 Aug;23(8):1170-81.
92. Ebert R, Schutze N, Adamski J, Jakob F. Vitamin D signaling is modulated on multiple levels in health and disease. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 Mar 27;248(1-2):149-59.

93. St-Arnaud R. The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Arch Biochem Biophys.* 2008 May 15;473(2):225-30.
94. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Jul;289(1):F8-28.
95. Panda DK, Miao D, Tremblay ML, Sirois J, Farookhi R, Hendy GN, et al. Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1alpha -hydroxylase enzyme: evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jun 19;98(13):7498-503.
96. Norman AW, Okamura WH, Bishop JE, Henry HL. Update on biological actions of 1alpha,25(OH)₂-vitamin D₃ (rapid effects) and 24R,25(OH)₂-vitamin D₃. *Mol Cell Endocrinol.* 2002 Nov 29;197(1-2):1-13.
97. Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology.* 2006 Dec;147(12):5542-8.
98. Chun RF, Adams JS, Hewison M. Back to the future: a new look at 'old' vitamin D. *J Endocrinol.* 2008 Aug;198(2):261-9.
99. Li YC, Pirro AE, Amling M, Dellling G, Baron R, Bronson R, et al. Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Sep 2;94(18):9831-5.
100. Katai K, Miyamoto K, Kishida S, Segawa H, Nii T, Tanaka H, et al. Regulation of intestinal Na⁺-dependent phosphate co-transporters by a low-phosphate diet and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem J.* 1999 Nov 1;343 Pt 3:705-12.
101. Capuano P, Radanovic T, Wagner CA, Bacic D, Kato S, Uchiyama Y, et al. Intestinal and renal adaptation to a low-Pi diet of type II NaPi cotransporters in vitamin D receptor- and 1alphaOHase-deficient mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005 Feb;288(2):C429-34.
102. Terpening CM, Haussler CA, Jurutka PW, Galligan MA, Komm BS, Haussler MR. The vitamin D-responsive element in the rat bone Gla protein gene is an imperfect direct repeat that cooperates with other cis-elements in 1,25-dihydroxyvitamin D₃- mediated transcriptional activation. *Mol Endocrinol.* 1991 Mar;5(3):373-85.
103. Owen TA, Aronow MS, Barone LM, Bettencourt B, Stein GS, Lian JB. Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell phenotype: dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures. *Endocrinology.* 1991 Mar;128(3):1496-504.
104. Noda M, Vogel RL, Craig AM, Prah J, DeLuca HF, Denhardt DT. Identification of a DNA sequence responsible for binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (SPP-1 or osteopontin) gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Dec;87(24):9995-9.
105. Pavlin D, Bedalov A, Kronenberg MS, Kream BE, Rowe DW, Smith CL, et al. Analysis of regulatory regions in the COL1A1 gene responsible for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated transcriptional repression in osteoblastic cells. *J Cell Biochem.* 1994 Dec;56(4):490-501.
106. Blagosklonny MV. p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect. *FASEB J.* 2000 Oct;14(13):1901-7.

107. Liu S, Guo R, Quarles LD. Cloning and characterization of the proximal murine Phex promoter. *Endocrinology*. 2001 Sep;142(9):3987-95.
108. Drissi H, Pouliot A, Koolloos C, Stein JL, Lian JB, Stein GS, et al. 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ suppresses the bone-related Runx2/Cbfa1 gene promoter. *Exp Cell Res*. 2002 Apr 1;274(2):323-33.
109. Tanaka H, Seino Y. Direct action of 1,25-dihydroxyvitamin D on bone: VDRKO bone shows excessive bone formation in normal mineral condition. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 May;89-90(1-5):343-5.
110. Hines ER, Kolek OI, Jones MD, Serey SH, Sirjani NB, Kiela PR, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ down-regulation of PHEX gene expression is mediated by apparent repression of a 110 kDa transfactor that binds to a polyadenine element in the promoter. *J Biol Chem*. 2004 Nov 5;279(45):46406-14.
111. Sooy K, Sabbagh Y, Demay MB. Osteoblasts lacking the vitamin D receptor display enhanced osteogenic potential in vitro. *J Cell Biochem*. 2005 Jan 1;94(1):81-7.
112. Fretz JA, Zella LA, Kim S, Shevde NK, Pike JW. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces expression of the Wnt signaling co-regulator LRP5 via regulatory elements located significantly downstream of the gene's transcriptional start site. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007 Mar;103(3-5):440-5.
113. Shi YC, Worton L, Esteban L, Baldock P, Fong C, Eisman JA, et al. Effects of continuous activation of vitamin D and Wnt response pathways on osteoblastic proliferation and differentiation. *Bone*. 2007 Jul;41(1):87-96.
114. Christakos S, Dhawan P, Benn B, Porta A, Hediger M, Oh GT, et al. Vitamin D: molecular mechanism of action. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Nov;1116:340-8.
115. Yamamoto R, Minamizaki T, Yoshiko Y, Yoshioka H, Tanne K, Aubin JE, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ acts predominately in mature osteoblasts under conditions of high extracellular phosphate to increase fibroblast growth factor 23 production in vitro. *J Endocrinol*. 2010 Sep;206(3):279-86.
116. Baldock PA, Thomas GP, Hodge JM, Baker SU, Dressel U, O'Loughlin PD, et al. Vitamin D action and regulation of bone remodeling: suppression of osteoclastogenesis by the mature osteoblast. *J Bone Miner Res*. 2006 Oct;21(10):1618-26.
117. Li TF, O'Keefe RJ, Chen D. TGF-beta signaling in chondrocytes. *Front Biosci*. 2005 Jan 1;10:681-8.
118. Wan M, Cao X. BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Mar 18;328(3):651-7.
119. Onyekwelu I, Goldring MB, Hidaka C. Chondrogenesis, joint formation, and articular cartilage regeneration. *J Cell Biochem*. 2009 Jun 1;107(3):383-92.
120. Mertin S, McDowall SG, Harley VR. The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins. *Nucleic Acids Res*. 1999 Mar 1;27(5):1359-64.
121. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem*. 2006 Jan 1;97(1):33-44.
122. Kawakami Y, Rodriguez-Leon J, Izpisua Belmonte JC. The role of TGFbetas and Sox9 during limb chondrogenesis. *Curr Opin Cell Biol*. 2006 Dec;18(6):723-9.
123. Akiyama H. Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9. *Mod Rheumatol*. 2008;18(3):213-9.

124. Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, et al. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet.* 1995 Jan;9(1):15-20.
125. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet.* 1999 May;22(1):85-9.
126. Akiyama H, Kim JE, Nakashima K, Balmes G, Iwai N, Deng JM, et al. Osteochondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Oct 11;102(41):14665-70.
127. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B. 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 Dev.* 2002 Nov 1;16(21):2813-28.
128. Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, et al. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet.* 1997 Jun;16(2):174-8.
129. Zhou G, Lefebvre V, Zhang Z, Eberspaecher H, de Crombrughe B. Three high mobility group-like sequences within a 48-base pair enhancer of the Col2a1 gene are required for cartilage-specific expression in vivo. *J Biol Chem.* 1998 Jun 12;273(24):14989-97.
130. Bridgewater LC, Lefebvre V, de Crombrughe B. Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer. *J Biol Chem.* 1998 Jun 12;273(24):14998-5006.
131. Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, et al. SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem.* 2000 Apr 14;275(15):10738-44.
132. Liu Y, Li H, Tanaka K, Tsumaki N, Yamada Y. Identification of an enhancer sequence within the first intron required for cartilage-specific transcription of the alpha2(XI) collagen gene. *J Biol Chem.* 2000 Apr 28;275(17):12712-8.
133. Tsuda M, Takahashi S, Takahashi Y, Asahara H. Transcriptional co-activators CREB-binding protein and p300 regulate chondrocyte-specific gene expression via association with Sox9. *J Biol Chem.* 2003 Jul 18;278(29):27224-9.
134. Yamashita S, Andoh M, Ueno-Kudoh H, Sato T, Miyaki S, Asahara H. Sox9 directly promotes Bapx1 gene expression to repress Runx2 in chondrocytes. *Exp Cell Res.* 2009 Aug 1;315(13):2231-40.
135. Cheng A, Genever PG. SOX9 determines RUNX2 transactivity by directing intracellular degradation. *J Bone Miner Res.* 2010 Dec;25(12):2404-13.
136. Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* 1998 Oct 1;17(19):5718-33.
137. Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell.* 2001 Aug;1(2):277-90.
138. Han Y, Lefebvre V. L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Mol Cell Biol.* 2008 Aug;28(16):4999-5013.

139. Dy P, Smits P, Silvester A, Penzo-Mendez A, Dumitriu B, Han Y, et al. Synovial joint morphogenesis requires the chondrogenic action of Sox5 and Sox6 in growth plate and articular cartilage. *Dev Biol.* 2010 May 15;341(2):346-59.
140. Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Nov;2(11):827-37.
141. Dhordain P, Dewitte F, Desbiens X, Stehelin D, Duterque-Coquillaud M. Mesodermal expression of the chicken *erg* gene associated with precartilaginous condensation and cartilage differentiation. *Mech Dev.* 1995 Mar;50(1):17-28.
142. Vega RB, Matsuda K, Oh J, Barbosa AC, Yang X, Meadows E, et al. Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell.* 2004 Nov 12;119(4):555-66.
143. Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S. Regulation of chondrocyte differentiation by *Cbfa1*. *Mech Dev.* 1999 Feb;80(2):159-70.
144. Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, et al. Maturation disturbance of chondrocytes in *Cbfa1*-deficient mice. *Dev Dyn.* 1999 Apr;214(4):279-90.
145. Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, et al. *Runx2* and *Runx3* are essential for chondrocyte maturation, and *Runx2* regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev.* 2004 Apr 15;18(8):952-63.
146. Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, Ducy P, Karsenty G. Continuous expression of *Cbfa1* in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues *Cbfa1*-deficient mice. *Genes Dev.* 2001 Feb 15;15(4):467-81.
147. Kuboki T, Kanyama M, Nakanishi T, Akiyama K, Nawachi K, Yatani H, et al. *Cbfa1/Runx2* gene expression in articular chondrocytes of the mice temporomandibular and knee joints in vivo. *Arch Oral Biol.* 2003 Jul;48(7):519-25.
148. Wang X, Manner PA, Horner A, Shum L, Tuan RS, Nuckolls GH. Regulation of MMP-13 expression by *RUNX2* and *FGF2* in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004 Dec;12(12):963-73.
149. Koelling S, Kruegel J, Irmer M, Path JR, Sadowski B, Miro X, et al. Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis. *Cell Stem Cell.* 2009 Apr 3;4(4):324-35.
150. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003 Jun 13;113(6):685-700.
151. Schmierer B, Hill CS. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Dec;8(12):970-82.
152. zur Nieden NI, Kempka G, Rancourt DE, Ahr HJ. Induction of chondro-, osteo- and adipogenesis in embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2: effect of cofactors on differentiating lineages. *BMC Dev Biol.* 2005;5:1.
153. Zehentner BK, Dony C, Burtscher H. The transcription factor *Sox9* is involved in BMP-2 signaling. *J Bone Miner Res.* 1999 Oct;14(10):1734-41.
154. Pan Q, Yu Y, Chen Q, Li C, Wu H, Wan Y, et al. *Sox9*, a key transcription factor of bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenesis, is activated through BMP pathway and a CCAAT box in the proximal promoter. *J Cell Physiol.* 2008 Oct;217(1):228-41.

155. Pan Q, Wu Y, Lin T, Yao H, Yang Z, Gao G, et al. Bone morphogenetic protein-2 induces chromatin remodeling and modification at the proximal promoter of Sox9 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Feb 6;379(2):356-61.
156. Furumatsu T, Tsuda M, Yoshida K, Taniguchi N, Ito T, Hashimoto M, et al. Sox9 and p300 cooperatively regulate chromatin-mediated transcription. *J Biol Chem*. 2005 Oct 21;280(42):35203-8.
157. Kawakami Y, Tsuda M, Takahashi S, Taniguchi N, Esteban CR, Zemmyo M, et al. Transcriptional coactivator PGC-1alpha regulates chondrogenesis via association with Sox9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 15;102(7):2414-9.
158. Zhao L, Li G, Zhou GQ. SOX9 directly binds CREB as a novel synergism with the PKA pathway in BMP-2-induced osteochondrogenic differentiation. *J Bone Miner Res*. 2009 May;24(5):826-36.
159. Barna M, Niswander L. Visualization of cartilage formation: insight into cellular properties of skeletal progenitors and chondrodysplasia syndromes. *Dev Cell*. 2007 Jun;12(6):931-41.
160. Yoon BS, Ovchinnikov DA, Yoshii I, Mishina Y, Behringer RR, Lyons KM. *Bmpr1a* and *Bmpr1b* have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Apr 5;102(14):5062-7.
161. Drissi MH, Li X, Sheu TJ, Zuscik MJ, Schwarz EM, Puzas JE, et al. Runx2/Cbfa1 stimulation by retinoic acid is potentiated by BMP2 signaling through interaction with Smad1 on the collagen X promoter in chondrocytes. *J Cell Biochem*. 2003 Dec 15;90(6):1287-98.
162. Yoon BS, Pogue R, Ovchinnikov DA, Yoshii I, Mishina Y, Behringer RR, et al. BMPs regulate multiple aspects of growth-plate chondrogenesis through opposing actions on FGF pathways. *Development*. 2006 Dec;133(23):4667-78.
163. Kobayashi T, Lyons KM, McMahon AP, Kronenberg HM. BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 13;102(50):18023-7.
164. De Luca F, Barnes KM, Uyeda JA, De-Levi S, Abad V, Palese T, et al. Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology*. 2001 Jan;142(1):430-6.
165. Retting KN, Song B, Yoon BS, Lyons KM. BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation. *Development*. 2009 Apr;136(7):1093-104.
166. Yi SE, Daluiski A, Pederson R, Rosen V, Lyons KM. The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb. *Development*. 2000 Feb;127(3):621-30.
167. Nishitoh H, Ichijo H, Kimura M, Matsumoto T, Makishima F, Yamaguchi A, et al. Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5. *J Biol Chem*. 1996 Aug 30;271(35):21345-52.
168. Merino R, Macias D, Ganan Y, Economides AN, Wang X, Wu Q, et al. Expression and function of Gdf-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud. *Dev Biol*. 1999 Feb 1;206(1):33-45.

169. Francis-West PH, Abdelfattah A, Chen P, Allen C, Parish J, Ladher R, et al. Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development*. 1999 Mar;126(6):1305-15.
170. Storm EE, Kingsley DM. GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev Biol*. 1999 May 1;209(1):11-27.
171. Settle SH, Jr., Rountree RB, Sinha A, Thacker A, Higgins K, Kingsley DM. Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse *Gdf6* and *Gdf5* genes. *Dev Biol*. 2003 Feb 1;254(1):116-30.
172. Appel B, Baumer J, Eyrich D, Sarhan H, Toso S, Englert C, et al. Synergistic effects of growth and differentiation factor-5 (GDF-5) and insulin on expanded chondrocytes in a 3-D environment. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 Nov;17(11):1503-12.
173. Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi D, Kubo T, Takatori Y, Saito S, et al. A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet*. 2007 Apr;39(4):529-33.
174. Chapman K, Takahashi A, Meulenbelt I, Watson C, Rodriguez-Lopez J, Egli R, et al. A meta-analysis of European and Asian cohorts reveals a global role of a functional SNP in the 5' UTR of GDF5 with osteoarthritis susceptibility. *Hum Mol Genet*. 2008 May 15;17(10):1497-504.
175. Valdes AM, Spector TD, Doherty S, Wheeler M, Hart DJ, Doherty M. Association of the DVWA and GDF5 polymorphisms with osteoarthritis in UK populations. *Ann Rheum Dis*. 2009 Dec;68(12):1916-20.
176. Evangelou E, Chapman K, Meulenbelt I, Karassa FB, Loughlin J, Carr A, et al. Large-scale analysis of association between GDF5 and FRZB variants and osteoarthritis of the hip, knee, and hand. *Arthritis Rheum*. 2009 Jun;60(6):1710-21.
177. Valdes AM, Evangelou E, Kerkhof HJ, Tamm A, Doherty SA, Kisand K, et al. The GDF5 rs143383 polymorphism is associated with osteoarthritis of the knee with genome-wide statistical significance. *Ann Rheum Dis*. 2010 Sep 24.
178. Leonard CM, Fuld HM, Frenz DA, Downie SA, Massague J, Newman SA. Role of transforming growth factor-beta in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenous TGF-beta and evidence for endogenous TGF-beta-like activity. *Dev Biol*. 1991 May;145(1):99-109.
179. Seo HS, Serra R. Deletion of *Tgfb2* in *Prx1-cre* expressing mesenchyme results in defects in development of the long bones and joints. *Dev Biol*. 2007 Oct 15;310(2):304-16.
180. Matsunobu T, Torigoe K, Ishikawa M, de Vega S, Kulkarni AB, Iwamoto Y, et al. Critical roles of the TGF-beta type I receptor ALK5 in perichondrial formation and function, cartilage integrity, and osteoblast differentiation during growth plate development. *Dev Biol*. 2009 Aug 15;332(2):325-38.
181. Serra R, Johnson M, Filvaroff EH, LaBorde J, Sheehan DM, Derynck R, et al. Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J Cell Biol*. 1997 Oct 20;139(2):541-52.

182. Yang X, Chen L, Xu X, Li C, Huang C, Deng CX. TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J Cell Biol.* 2001 Apr 2;153(1):35-46.
183. Valdes AM, Spector TD, Tamm A, Kisand K, Doherty SA, Dennison EM, et al. Genetic variation in the SMAD3 gene is associated with hip and knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2010 Aug;62(8):2347-52.
184. Yao JY, Wang Y, An J, Mao CM, Hou N, Lv YX, et al. Mutation analysis of the Smad3 gene in human osteoarthritis. *Eur J Hum Genet.* 2003 Sep;11(9):714-7.
185. Schluter KD. PTH and PTHrP: Similar Structures but Different Functions. *News Physiol Sci.* 1999 Dec;14:243-9.
186. Datta NS, Abou-Samra AB. PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cell Signal.* 2009 Aug;21(8):1245-54.
187. Kato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev.* 1993 Mar;7(3):331-42.
188. Beier F, Ali Z, Mok D, Taylor AC, Leask T, Albanese C, et al. TGFbeta and PTHrP control chondrocyte proliferation by activating cyclin D1 expression. *Mol Biol Cell.* 2001 Dec;12(12):3852-63.
189. MacLean HE, Guo J, Knight MC, Zhang P, Cobrinik D, Kronenberg HM. The cyclin-dependent kinase inhibitor p57(Kip2) mediates proliferative actions of PTHrP in chondrocytes. *J Clin Invest.* 2004 May;113(9):1334-43.
190. Huang W, Zhou X, Lefebvre V, de Crombrugge B. Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Mol Cell Biol.* 2000 Jun;20(11):4149-58.
191. Huang W, Chung UI, Kronenberg HM, de Crombrugge B. The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 2;98(1):160-5.
192. Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, Bronson RT, Tybulewicz VL, Kronenberg HM, et al. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev.* 1994 Feb 1;8(3):277-89.
193. Amizuka N, Henderson JE, Hoshi K, Warshawsky H, Ozawa H, Goltzman D, et al. Programmed cell death of chondrocytes and aberrant chondrogenesis in mice homozygous for parathyroid hormone-related peptide gene deletion. *Endocrinology.* 1996 Nov;137(11):5055-67.
194. Chung UI, Lanske B, Lee K, Li E, Kronenberg H. The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 27;95(22):13030-5.
195. Miao D, He B, Karaplis AC, Goltzman D. Parathyroid hormone is essential for normal fetal bone formation. *J Clin Invest.* 2002 May;109(9):1173-82.
196. Zhang P, Liegeois NJ, Wong C, Finegold M, Hou H, Thompson JC, et al. Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature.* 1997 May 8;387(6629):151-8.

197. Scheijen B, Bronk M, van der Meer T, Bernards R. Constitutive E2F1 overexpression delays endochondral bone formation by inhibiting chondrocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 2003 May;23(10):3656-68.
198. Tsai SY, Opavsky R, Sharma N, Wu L, Naidu S, Nolan E, et al. Mouse development with a single E2F activator. *Nature*. 2008 Aug 28;454(7208):1137-41.
199. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science*. 1996 Aug 2;273(5275):613-22.
200. Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, et al. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science*. 1996 Aug 2;273(5275):663-6.
201. Kobayashi T, Chung UI, Schipani E, Starbuck M, Karsenty G, Katagiri T, et al. PTHrP and Indian hedgehog control differentiation of growth plate chondrocytes at multiple steps. *Development*. 2002 Jun;129(12):2977-86.
202. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev*. 1999 Aug 15;13(16):2072-86.
203. Karp SJ, Schipani E, St-Jacques B, Hunzelman J, Kronenberg H, McMahon AP. Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways. *Development*. 2000 Feb;127(3):543-8.
204. Long F, Zhang XM, Karp S, Yang Y, McMahon AP. Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development*. 2001 Dec;128(24):5099-108.
205. Mak KK, Kronenberg HM, Chuang PT, Mackem S, Yang Y. Indian hedgehog signals independently of PTHrP to promote chondrocyte hypertrophy. *Development*. 2008 Jun;135(11):1947-56.
206. Burton DW, Foster M, Johnson KA, Hiramoto M, Deftos LJ, Terkeltaub R. Chondrocyte calcium-sensing receptor expression is up-regulated in early guinea pig knee osteoarthritis and modulates PTHrP, MMP-13, and TIMP-3 expression. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005 May;13(5):395-404.
207. Chen X, Macica CM, Dreyer BE, Hammond VE, Hens JR, Philbrick WM, et al. Initial characterization of PTH-related protein gene-driven lacZ expression in the mouse. *J Bone Miner Res*. 2006 Jan;21(1):113-23.
208. Semevolos SA, Nixon AJ, Fortier LA, Strassheim ML, Haupt J. Age-related expression of molecular regulators of hypertrophy and maturation in articular cartilage. *J Orthop Res*. 2006 Aug;24(8):1773-81.
209. Broadus AE, Macica C, Chen X. The PTHrP functional domain is at the gates of endochondral bones. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Nov;1116:65-81.
210. Chen X, Macica CM, Nasiri A, Broadus AE. Regulation of articular chondrocyte proliferation and differentiation by indian hedgehog and parathyroid hormone-related protein in mice. *Arthritis Rheum*. 2008 Dec;58(12):3788-97.

211. Jiang J, Leong NL, Mung JC, Hidaka C, Lu HH. Interaction between zonal populations of articular chondrocytes suppresses chondrocyte mineralization and this process is mediated by PTHrP. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008 Jan;16(1):70-82.
212. Amizuka N, Warshawsky H, Henderson JE, Goltzman D, Karaplis AC. Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. *J Cell Biol*. 1994 Sep;126(6):1611-23.
213. Amizuka N, Karaplis AC, Henderson JE, Warshawsky H, Lipman ML, Matsuki Y, et al. Haploinsufficiency of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) results in abnormal postnatal bone development. *Dev Biol*. 1996 Apr 10;175(1):166-76.
214. Lin AC, Seeto BL, Bartoszko JM, Khoury MA, Whetstone H, Ho L, et al. Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis. *Nat Med*. 2009 Dec;15(12):1421-5.
215. Francis F, Henning S, Korn B, Reinhardt R, de Jong P, Poustka A, et al. A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. The HYP Consortium. *Nat Genet*. 1995 Oct;11(2):130-6.
216. Barker PE, Shipp MA, D'Adamio L, Masteller EL, Reinherz EL. The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3 (q21-q27). *J Immunol*. 1989 Jan 1;142(1):283-7.
217. Letarte M, Vera S, Tran R, Addis JB, Onizuka RJ, Quackenbush EJ, et al. Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med*. 1988 Oct 1;168(4):1247-53.
218. Lorenzo MN, Khan RY, Wang Y, Tai SC, Chan GC, Cheung AH, et al. Human endothelin converting enzyme-2 (ECE2): characterization of mRNA species and chromosomal localization. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Nov 11;1522(1):46-52.
219. Schmidt M, Kroger B, Jacob E, Seulberger H, Subkowski T, Otter R, et al. Molecular characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ECE-1). *FEBS Lett*. 1994 Dec 19;356(2-3):238-43.
220. Marsh WL. Molecular biology of blood groups: cloning the Kell gene. *Transfusion*. 1992 Feb;32(2):98-101.
221. Lee S, Zambas ED, Marsh WL, Redman CM. Molecular cloning and primary structure of Kell blood group protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jul 15;88(14):6353-7.
222. Valdenaire O, Richards JG, Faull RL, Schweizer A. XCE, a new member of the endothelin-converting enzyme and neutral endopeptidase family, is preferentially expressed in the CNS. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999 Feb 5;64(2):211-21.
223. Bonvouloir N, Lemieux N, Crine P, Boileau G, DesGroseillers L. Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal localization of MMEL2, a gene coding for a novel human member of the neutral endopeptidase-24.11 family. *DNA Cell Biol*. 2001 Aug;20(8):493-8.
224. Turner AJ, Tanzawa K. Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J*. 1997 Apr;11(5):355-64.
225. Pierrot-Deseilligny E, Bussel B. Evidence for recurrent inhibition by motoneurons in human subjects. *Brain Res*. 1975 Apr 25;88(1):105-8.

226. Tenenhouse HS, Econs MJ. Mendelian hypophosphatemias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw Hill Book Co; 2001. p. 5039-67.
227. Strom TM, Francis F, Lorenz B, Boddrich A, Econs MJ, Lehrach H, et al. Pex gene deletions in Gy and Hyp mice provide mouse models for X-linked hypophosphatemia. *Hum Mol Genet*. 1997 Feb;6(2):165-71.
228. Carpinelli MR, Wicks IP, Sims NA, O'Donnell K, Hanzinikolas K, Burt R, et al. An ethyl-nitrosourea-induced point mutation in pexh causes exon skipping, x-linked hypophosphatemia, and rickets. *Am J Pathol*. 2002 Nov;161(5):1925-33.
229. Lorenz-Depiereux B, Guido VE, Johnson KR, Zheng QY, Gagnon LH, Bauschatz JD, et al. New intragenic deletions in the Pexh gene clarify X-linked hypophosphatemia-related abnormalities in mice. *Mamm Genome*. 2004 Mar;15(3):151-61.
230. Xiong X, Qi X, Ge X, Gu P, Zhao J, Zhao Q, et al. A novel Pexh mutation with defective glycosylation causes hypophosphatemia and rickets in mice. *J Biomed Sci*. 2008 Jan;15(1):47-59.
231. Beck L, Soumounou Y, Martel J, Krishnamurthy G, Gauthier C, Goodyer CG, et al. Pex/PEX tissue distribution and evidence for a deletion in the 3' region of the Pex gene in X-linked hypophosphatemic mice. *J Clin Invest*. 1997 Mar 15;99(6):1200-9.
232. Argiro L, Desbarats M, Glorieux FH, Ecarot B. Mepe, the gene encoding a tumor-secreted protein in oncogenic hypophosphatemic osteomalacia, is expressed in bone. *Genomics*. 2001 Jun 15;74(3):342-51.
233. Berndt T, Craig TA, Bowe AE, Vassiliadis J, Reczek D, Finnegan R, et al. Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent. *J Clin Invest*. 2003 Sep;112(5):785-94.
234. Carpenter TO, Ellis BK, Insogna KL, Philbrick WM, Sterpka J, Shimkets R. Fibroblast growth factor 7: an inhibitor of phosphate transport derived from oncogenic osteomalacia-causing tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Feb;90(2):1012-20.
235. Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW, Quarles LD. Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 Jul;291(1):E38-49.
236. Addison WN, Nakano Y, Loisel T, Crine P, McKee MD. MEPE-ASARM peptides control extracellular matrix mineralization by binding to hydroxyapatite: an inhibition regulated by PHEX cleavage of ASARM. *J Bone Miner Res*. 2008 Oct;23(10):1638-49.
237. Rowe PS, Kumagai Y, Gutierrez G, Garrett IR, Blacher R, Rosen D, et al. MEPE has the properties of an osteoblastic phosphatonin and minihibin. *Bone*. 2004 Feb;34(2):303-19.
238. Bresler D, Bruder J, Mohnike K, Fraser WD, Rowe PS. Serum MEPE-ASARM-peptides are elevated in X-linked rickets (HYP): implications for phosphaturia and rickets. *J Endocrinol*. 2004 Dec;183(3):R1-9.
239. Rowe PS, Matsumoto N, Jo OD, Shih RN, Oconnor J, Roudier MP, et al. Correction of the mineralization defect in hyp mice treated with protease inhibitors CA074 and pepstatin. *Bone*. 2006 Oct;39(4):773-86.
240. Addison WN, Masica DL, Gray JJ, McKee MD. Phosphorylation-dependent inhibition of mineralization by osteopontin ASARM peptides is regulated by PHEX cleavage. *J Bone Miner Res*. 2010 Apr;25(4):695-705.

241. Zhang B, Sun Y, Chen L, Guan C, Guo L, Qin C. Expression and distribution of SIBLING proteins in the predentin/dentin and mandible of hyp mice. *Oral Dis*. 2010 Jul;16(5):453-64.
242. Liu S, Brown TA, Zhou J, Xiao ZS, Awad H, Guilak F, et al. Role of matrix extracellular phosphoglycoprotein in the pathogenesis of X-linked hypophosphatemia. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Jun;16(6):1645-53.
243. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem*. 2006 Mar 10;281(10):6120-3.
244. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*. 2006 Dec 7;444(7120):770-4.
245. Shimada T, Urakawa I, Yamazaki Y, Hasegawa H, Hino R, Yoneya T, et al. FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Feb 6;314(2):409-14.
246. Larsson T, Marsell R, Schipani E, Ohlsson C, Ljunggren O, Tenenhouse HS, et al. Transgenic mice expressing fibroblast growth factor 23 under the control of the alpha1(I) collagen promoter exhibit growth retardation, osteomalacia, and disturbed phosphate homeostasis. *Endocrinology*. 2004 Jul;145(7):3087-94.
247. Gattineni J, Bates C, Twombly K, Dwarakanath V, Robinson ML, Goetz R, et al. FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009 Aug;297(2):F282-91.
248. Yamazaki Y, Okazaki R, Shibata M, Hasegawa Y, Satoh K, Tajima T, et al. Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Nov;87(11):4957-60.
249. Jonsson KB, Zahradnik R, Larsson T, White KE, Sugimoto T, Imanishi Y, et al. Fibroblast growth factor 23 in oncogenic osteomalacia and X-linked hypophosphatemia. *N Engl J Med*. 2003 Apr 24;348(17):1656-63.
250. Sitara D, Razzaque MS, Hesse M, Yoganathan S, Taguchi T, Erben RG, et al. Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in PheX-deficient mice. *Matrix Biol*. 2004 Nov;23(7):421-32.
251. Nakatani T, Ohnishi M, Razzaque MS. Inactivation of klotho function induces hyperphosphatemia even in presence of high serum fibroblast growth factor 23 levels in a genetically engineered hypophosphatemic (Hyp) mouse model. *FASEB J*. 2009 Nov;23(11):3702-11.
252. Brownstein CA, Zhang J, Stillman A, Ellis B, Troiano N, Adams DJ, et al. Increased bone volume and correction of HYP mouse hypophosphatemia in the Klotho/HYP mouse. *Endocrinology*. 2010 Feb;151(2):492-501.

253. Koralnik IJ, Gessain A, Klotman ME, Lo Monaco A, Berneman ZN, Franchini G. Protein isoforms encoded by the pX region of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Sep 15;89(18):8813-7.
254. Bowe AE, Finnegan R, Jan de Beur SM, Cho J, Levine MA, Kumar R, et al. FGF-23 inhibits renal tubular phosphate transport and is a PHEX substrate. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jun 22;284(4):977-81.
255. Liu S, Guo R, Simpson LG, Xiao ZS, Burnham CE, Quarles LD. Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. *J Biol Chem*. 2003 Sep 26;278(39):37419-26.
256. Ruchon AF, Marcinkiewicz M, Siegfried G, Tenenhouse HS, DesGroseillers L, Crine P, et al. Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts. *J Histochem Cytochem*. 1998 Apr;46(4):459-68.
257. Ruchon AF, Tenenhouse HS, Marcinkiewicz M, Siegfried G, Aubin JE, DesGroseillers L, et al. Developmental expression and tissue distribution of Phex protein: effect of the Hyp mutation and relationship to bone markers. *J Bone Miner Res*. 2000 Aug;15(8):1440-50.
258. Ecarot B, Desbarats M. 1,25-(OH)₂D₃ down-regulates expression of Phex, a marker of the mature osteoblast. *Endocrinology*. 1999 Mar;140(3):1192-9.
259. Grieff M, Mumm S, Waeltz P, Mazzarella R, Whyte MP, Thakker RV, et al. Expression and cloning of the human X-linked hypophosphatemia gene cDNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Feb 24;231(3):635-9.
260. Blydt-Hansen TD, Tenenhouse HS, Goodyer P. PHEX expression in parathyroid gland and parathyroid hormone dysregulation in X-linked hypophosphatemia. *Pediatr Nephrol*. 1999 Sep;13(7):607-11.
261. Shalhoub V, Conlon D, Tassinari M, Quinn C, Partridge N, Stein GS, et al. Glucocorticoids promote development of the osteoblast phenotype by selectively modulating expression of cell growth and differentiation associated genes. *J Cell Biochem*. 1992 Dec;50(4):425-40.
262. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest*. 1998 Jul 15;102(2):274-82.
263. Hines ER, Collins JF, Jones MD, Serey SH, Ghishan FK. Glucocorticoid regulation of the murine PHEX gene. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002 Aug;283(2):F356-63.
264. Zoidis E, Zapf J, Schmid C. Phex cDNA cloning from rat bone and studies on phex mRNA expression: tissue-specificity, age-dependency, and regulation by insulin-like growth factor (IGF) I in vivo. *Mol Cell Endocrinol*. 2000 Oct 25;168(1-2):41-51.
265. Zoidis E, Gosteli-Peter M, Ghirlanda-Keller C, Meinel L, Zapf J, Schmid C. IGF-I and GH stimulate Phex mRNA expression in lungs and bones and 1,25-dihydroxyvitamin D(3) production in hypophysectomized rats. *Eur J Endocrinol*. 2002 Jan;146(1):97-105.
266. Olney RC. Regulation of bone mass by growth hormone. *Med Pediatr Oncol*. 2003 Sep;41(3):228-34.

267. Miao D, Bai X, Panda DK, Karaplis AC, Goltzman D, McKee MD. Cartilage abnormalities are associated with abnormal Phex expression and with altered matrix protein and MMP-9 localization in Hyp mice. *Bone*. 2004 Apr;34(4):638-47.
268. Appleton CT, Pitelka V, Henry J, Beier F. Global analyses of gene expression in early experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2007 Jun;56(6):1854-68.
269. Horvat-Gordon M, Praul CA, Ramachandran R, Bartell PA, Leach RM, Jr. Use of microarray analysis to study gene expression in the avian epiphyseal growth plate. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*. 2010 Mar;5(1):12-23.
270. Liu S, Guo R, Tu Q, Quarles LD. Overexpression of Phex in osteoblasts fails to rescue the Hyp mouse phenotype. *J Biol Chem*. 2002 Feb 1;277(5):3686-97.
271. Bai X, Miao D, Panda D, Grady S, McKee MD, Goltzman D, et al. Partial rescue of the Hyp phenotype by osteoblast-targeted PHEX (phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome) expression. *Mol Endocrinol*. 2002 Dec;16(12):2913-25.
272. Boskey A, Frank A, Fujimoto Y, Spevak L, Verdelis K, Ellis B, et al. The PHEX transgene corrects mineralization defects in 9-month-old hypophosphatemic mice. *Calcif Tissue Int*. 2009 Feb;84(2):126-37.
273. Erben RG, Mayer D, Weber K, Jonsson K, Juppner H, Lanske B. Overexpression of human PHEX under the human beta-actin promoter does not fully rescue the Hyp mouse phenotype. *J Bone Miner Res*. 2005 Jul;20(7):1149-60.
274. Sabbagh Y, Carpenter TO, Demay MB. Hypophosphatemia leads to rickets by impairing caspase-mediated apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jul 5;102(27):9637-42.
275. Kraus WL. Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2008 Jun;20(3):294-302.
276. Majewski PM, Thurston RD, Ramalingam R, Kiela PR, Ghishan FK. Cooperative role of NF- κ B and poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in the TNF-induced inhibition of PHEX expression in osteoblasts. *J Biol Chem*. 2010 Nov 5;285(45):34828-38.
277. Vargas MA, St-Louis M, Desgroseillers L, Charli JL, Boileau G. Parathyroid hormone-related protein(1-34) regulates Phex expression in osteoblasts through the protein kinase A pathway. *Endocrinology*. 2003 Nov;144(11):4876-85.
278. Alos N, Ecarot B. Downregulation of osteoblast Phex expression by PTH. *Bone*. 2005 Oct;37(4):589-98.
279. Eicher EM, Southard JL, Scriver CR, Glorieux FH. Hypophosphatemia: mouse model for human familial hypophosphatemic (vitamin D-resistant) rickets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976 Dec;73(12):4667-71.
280. Gage PJ, Suh H, Camper SA. The bicoid-related Pitx gene family in development. *Mamm Genome*. 1999 Feb;10(2):197-200.
281. Szeto DP, Ryan AK, O'Connell SM, Rosenfeld MG. P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jul 23;93(15):7706-10.
282. Szeto DP, Rodriguez-Esteban C, Ryan AK, O'Connell SM, Liu F, Kioussi C, et al. Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev*. 1999 Feb 15;13(4):484-94.

283. Lanctot C, Moreau A, Chamberland M, Tremblay ML, Drouin J. Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development*. 1999 May;126(9):1805-10.
284. Marcil A, Dumontier E, Chamberland M, Camper SA, Drouin J. Pitx1 and Pitx2 are required for development of hindlimb buds. *Development*. 2003 Jan;130(1):45-55.
285. Mitsiadis TA, Drouin J. Deletion of the Pitx1 genomic locus affects mandibular tooth morphogenesis and expression of the Barx1 and Tbx1 genes. *Dev Biol*. 2008 Jan 15;313(2):887-96.
286. DeLaurier A, Schweitzer R, Logan M. Pitx1 determines the morphology of muscle, tendon, and bones of the hindlimb. *Dev Biol*. 2006 Nov 1;299(1):22-34.
287. Picard C, Azeddine B, Moldovan F, Martel-Pelletier J, Moreau A. New emerging role of pitx1 transcription factor in osteoarthritis pathogenesis. *Clin Orthop Relat Res*. 2007 Sep;462:59-66.
288. Kolfschoten IG, van Leeuwen B, Berns K, Mullenders J, Beijersbergen RL, Bernards R, et al. A genetic screen identifies PITX1 as a suppressor of RAS activity and tumorigenicity. *Cell*. 2005 Jun 17;121(6):849-58.
289. Liu DX, Lobie PE. Transcriptional activation of p53 by Pitx1. *Cell Death Differ*. 2007 Nov;14(11):1893-907.
290. Muller H, Bracken AP, Vernell R, Moroni MC, Christians F, Grassilli E, et al. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev*. 2001 Feb 1;15(3):267-85.
291. Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctot C, Therrien M, Gauthier Y, Drouin J. Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes Dev*. 1996 May 15;10(10):1284-95.
292. Quirk CC, Lozada KL, Keri RA, Nilson JH. A single Pitx1 binding site is essential for activity of the LHbeta promoter in transgenic mice. *Mol Endocrinol*. 2001 May;15(5):734-46.
293. Baird-Titus JM, Clark-Baldwin K, Dave V, Caperelli CA, Ma J, Rance M. The solution structure of the native K50 Bicoid homeodomain bound to the consensus TAATCC DNA-binding site. *J Mol Biol*. 2006 Mar 10;356(5):1137-51.
294. Fortin J, Bernard DJ. SMAD3 and EGR1 physically and functionally interact in promoter-specific fashion. *Cell Signal*. 2010 Jun;22(6):936-43.
295. Lamba P, Khivansara V, D'Alessio AC, Santos MM, Bernard DJ. Paired-like homeodomain transcription factors 1 and 2 regulate follicle-stimulating hormone beta-subunit transcription through a conserved cis-element. *Endocrinology*. 2008 Jun;149(6):3095-108.
296. Coss D, Thackray VG, Deng CX, Mellon PL. Activin regulates luteinizing hormone beta-subunit gene expression through Smad-binding and homeobox elements. *Mol Endocrinol*. 2005 Oct;19(10):2610-23.
297. Island ML, Mesplede T, Darracq N, Bandu MT, Christeff N, Djian P, et al. Repression by homeoprotein pitx1 of virus-induced interferon promoters is mediated by physical interaction and trans repression of IRF3 and IRF7. *Mol Cell Biol*. 2002 Oct;22(20):7120-33.

298. Jeong KH, Chin WW, Kaiser UB. Essential role of the homeodomain for pituitary homeobox 1 activation of mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression through interactions with c-Jun and DNA. *Mol Cell Biol.* 2004 Jul;24(14):6127-39.
299. Tremblay JJ, Marcil A, Gauthier Y, Drouin J. Ptx1 regulates SF-1 activity by an interaction that mimics the role of the ligand-binding domain. *EMBO J.* 1999 Jun 15;18(12):3431-41.
300. Jeyabalan J, Nesbit MA, Galvanovskis J, Callaghan R, Rorsman P, Thakker RV. SEDLIN forms homodimers: characterisation of SEDLIN mutations and their interactions with transcription factors MBP1, PITX1 and SF1. *PLoS One.* 2010;5(5):e10646.
301. Tremblay JJ, Drouin J. Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone beta gene transcription. *Mol Cell Biol.* 1999 Apr;19(4):2567-76.
302. Wang FL, Connor JR, Dodds RA, James IE, Kumar S, Zou C, et al. Differential expression of egr-1 in osteoarthritic compared to normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2000 May;8(3):161-9.
303. Cho CH, Nuttall ME. Emerging techniques for the discovery and validation of therapeutic targets for skeletal diseases. *Expert Opin Ther Targets.* 2002 Dec;6(6):679-89.
304. Figliola R, Busanello A, Vaccarello G, Maione R. Regulation of p57(KIP2) during muscle differentiation: role of Egr1, Sp1 and DNA hypomethylation. *J Mol Biol.* 2008 Jul 4;380(2):265-77.
305. Tan L, Peng H, Osaki M, Choy BK, Auron PE, Sandell LJ, et al. Egr-1 mediates transcriptional repression of COL2A1 promoter activity by interleukin-1beta. *J Biol Chem.* 2003 May 16;278(20):17688-700.
306. Rockel JS, Bernier SM, Leask A. Egr-1 inhibits the expression of extracellular matrix genes in chondrocytes by TNFalpha-induced MEK/ERK signalling. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(1):R8.
307. St Amand TR, Zhang Y, Semina EV, Zhao X, Hu Y, Nguyen L, et al. Antagonistic signals between BMP4 and FGF8 define the expression of Pitx1 and Pitx2 in mouse tooth-forming anlage. *Dev Biol.* 2000 Jan 15;217(2):323-32.
308. Dixit M, Anseau E, Tassin A, Winokur S, Shi R, Qian H, et al. DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Nov 13;104(46):18157-62.
309. Gurnett CA, Alaei F, Kruse LM, Desruisseau DM, Hecht JT, Wise CA, et al. Asymmetric lower-limb malformations in individuals with homeobox PITX1 gene mutation. *Am J Hum Genet.* 2008 Nov;83(5):616-22.
310. Morrow IC, Parton RG. Flotillins and the PHB domain protein family: rafts, worms and anaesthetics. *Traffic.* 2005 Sep;6(9):725-40.
311. Joshi B, Ko D, Ordonez-Ercan D, Chellappan SP. A putative coiled-coil domain of prohibitin is sufficient to repress E2F1-mediated transcription and induce apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Dec 12;312(2):459-66.
312. Mishra S, Murphy LC, Murphy LJ. The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J Cell Mol Med.* 2006 Apr-Jun;10(2):353-63.

313. Nijtmans LG, de Jong L, Artal Sanz M, Coates PJ, Berden JA, Back JW, et al. Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO J.* 2000 Jun 1;19(11):2444-51.
314. Bogenhagen DF, Wang Y, Shen EL, Kobayashi R. Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. *Mol Cell Proteomics.* 2003 Nov;2(11):1205-16.
315. Kasashima K, Ohta E, Kagawa Y, Endo H. Mitochondrial functions and estrogen receptor-dependent nuclear translocation of pleiotropic human prohibitin 2. *J Biol Chem.* 2006 Nov 24;281(47):36401-10.
316. Theiss AL, Idell RD, Srinivasan S, Klapproth JM, Jones DP, Merlin D, et al. Prohibitin protects against oxidative stress in intestinal epithelial cells. *FASEB J.* 2007 Jan;21(1):197-206.
317. Merkwirth C, Dargazanli S, Tatsuta T, Geimer S, Lower B, Wunderlich FT, et al. Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes Dev.* 2008 Feb 15;22(4):476-88.
318. Osman C, Merkwirth C, Langer T. Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *J Cell Sci.* 2009 Nov 1;122(Pt 21):3823-30.
319. Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Prohibitin and mitochondrial biology. *Trends Endocrinol Metab.* 2009 Oct;20(8):394-401.
320. Rajalingam K, Wunder C, Brinkmann V, Churin Y, Hekman M, Sievers C, et al. Prohibitin is required for Ras-induced Raf-MEK-ERK activation and epithelial cell migration. *Nat Cell Biol.* 2005 Aug;7(8):837-43.
321. Ande SR, Mishra S. Prohibitin interacts with phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) and modulates insulin signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Dec 18;390(3):1023-8.
322. Ande SR, Gu Y, Nyomba BL, Mishra S. Insulin induced phosphorylation of prohibitin at tyrosine 114 recruits Shp1. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Aug;1793(8):1372-8.
323. Wang S, Nath N, Fusaro G, Chellappan S. Rb and prohibitin target distinct regions of E2F1 for repression and respond to different upstream signals. *Mol Cell Biol.* 1999 Nov;19(11):7447-60.
324. Wang S, Fusaro G, Padmanabhan J, Chellappan SP. Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression. *Oncogene.* 2002 Dec 5;21(55):8388-96.
325. Fusaro G, Dasgupta P, Rastogi S, Joshi B, Chellappan S. Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling. *J Biol Chem.* 2003 Nov 28;278(48):47853-61.
326. Wang S, Zhang B, Faller DV. BRG1/BRM and prohibitin are required for growth suppression by estrogen antagonists. *EMBO J.* 2004 Jun 2;23(11):2293-303.
327. Choi D, Lee SJ, Hong S, Kim IH, Kang S. Prohibitin interacts with RNF2 and regulates E2F1 function via dual pathways. *Oncogene.* 2008 Mar 13;27(12):1716-25.
328. Wang S, Zhang B, Faller DV. Prohibitin requires Brg-1 and Brm for the repression of E2F and cell growth. *EMBO J.* 2002 Jun 17;21(12):3019-28.

329. Zhang B, Chambers KJ, Faller DV, Wang S. Reprogramming of the SWI/SNF complex for co-activation or co-repression in prohibitin-mediated estrogen receptor regulation. *Oncogene*. 2007 Nov 1;26(50):7153-7.
330. Dell'Orco RT, McClung JK, Jupe ER, Liu XT. Prohibitin and the senescent phenotype. *Exp Gerontol*. 1996 Jan-Apr;31(1-2):245-52.
331. Liu XT, Stewart CA, King RL, Danner DA, Dell'Orco RT, McClung JK. Prohibitin expression during cellular senescence of human diploid fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 May 30;201(1):409-14.
332. Guo W, Xu H, Chen J, Yang Y, Jin JW, Fu R, et al. Prohibitin suppresses renal interstitial fibroblasts proliferation and phenotypic change induced by transforming growth factor-beta1. *Mol Cell Biochem*. 2007 Jan;295(1-2):167-77.
333. Nuell MJ, Stewart DA, Walker L, Friedman V, Wood CM, Owens GA, et al. Prohibitin, an evolutionarily conserved intracellular protein that blocks DNA synthesis in normal fibroblasts and HeLa cells. *Mol Cell Biol*. 1991 Mar;11(3):1372-81.
334. Rastogi S, Joshi B, Dasgupta P, Morris M, Wright K, Chellappan S. Prohibitin facilitates cellular senescence by recruiting specific corepressors to inhibit E2F target genes. *Mol Cell Biol*. 2006 Jun;26(11):4161-71.
335. Cartwright P, Muller H, Wagener C, Holm K, Helin K. E2F-6: a novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F-dependent transcription. *Oncogene*. 1998 Aug 6;17(5):611-23.
336. Pearson R, Fleetwood J, Eaton S, Crossley M, Bao S. Kruppel-like transcription factors: a functional family. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(10):1996-2001.
337. Kaczynski J, Cook T, Urrutia R. Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol*. 2003;4(2):206.
338. Suske G. The Sp-family of transcription factors. *Gene*. 1999 Oct 1;238(2):291-300.
339. Wang S, Nath N, Adlam M, Chellappan S. Prohibitin, a potential tumor suppressor, interacts with RB and regulates E2F function. *Oncogene*. 1999 Jun 10;18(23):3501-10.
340. Yamaguchi T, Miki Y, Yoshida K. The c-Abl tyrosine kinase stabilizes Pitx1 in the apoptotic response to DNA damage. *Apoptosis*. 2010 Aug;15(8):927-35.
341. Montano MM, Ekena K, Delage-Mourroux R, Chang W, Martini P, Katzenellenbogen BS. An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 8;96(12):6947-52.
342. Zhang B, Faller DV, Wang S. HIC1 regulates tumor cell responses to endocrine therapies. *Mol Endocrinol*. 2009 Dec;23(12):2075-85.
343. He B, Feng Q, Mukherjee A, Lonard DM, DeMayo FJ, Katzenellenbogen BS, et al. A repressive role for prohibitin in estrogen signaling. *Mol Endocrinol*. 2008 Feb;22(2):344-60.
344. Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum*. 1998 Aug;41(8):1343-55.
345. Garstang SV, Stitik TP. Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *Am J Phys Med Rehabil*. 2006 Nov;85(11 Suppl):S2-11; quiz S2-4.

346. Sniekers YH, Weinans H, Bierma-Zeinstra SM, van Leeuwen JP, van Osch GJ. Animal models for osteoarthritis: the effect of ovariectomy and estrogen treatment - a systematic approach. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008 May;16(5):533-41.
347. Fortier LA, Mohammed HO, Lust G, Nixon AJ. Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br*. 2002 Mar;84(2):276-88.
348. Phornphutkul C, Wu KY, Gruppuso PA. The role of insulin in chondrogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 Apr 25;249(1-2):107-15.
349. Longobardi L, O'Rear L, Aakula S, Johnstone B, Shimer K, Chytil A, et al. Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. *J Bone Miner Res*. 2006 Apr;21(4):626-36.
350. Jenniskens YM, Koevoet W, de Bart AC, Weinans H, Jahr H, Verhaar JA, et al. Biochemical and functional modulation of the cartilage collagen network by IGF1, TGFbeta2 and FGF2. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006 Nov;14(11):1136-46.
351. Ekenstedt KJ, Sonntag WE, Loeser RF, Lindgren BR, Carlson CS. Effects of chronic growth hormone and insulin-like growth factor 1 deficiency on osteoarthritis severity in rat knee joints. *Arthritis Rheum*. 2006 Dec;54(12):3850-8.
352. Dore S, Pelletier JP, DiBattista JA, Tardif G, Brazeau P, Martel-Pelletier J. Human osteoarthritic chondrocytes possess an increased number of insulin-like growth factor 1 binding sites but are unresponsive to its stimulation. Possible role of IGF-1-binding proteins. *Arthritis Rheum*. 1994 Feb;37(2):253-63.
353. Loeser RF, Shanker G, Carlson CS, Gardin JF, Shelton BJ, Sonntag WE. Reduction in the chondrocyte response to insulin-like growth factor 1 in aging and osteoarthritis: studies in a non-human primate model of naturally occurring disease. *Arthritis Rheum*. 2000 Sep;43(9):2110-20.
354. Loeser RF, Carlson CS, Del Carlo M, Cole A. Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1beta and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1. *Arthritis Rheum*. 2002 Sep;46(9):2349-57.
355. Ossareh-Nazari B, Bachelier F, Dargemont C. Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science*. 1997 Oct 3;278(5335):141-4.
356. Stade K, Ford CS, Guthrie C, Weis K. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell*. 1997 Sep 19;90(6):1041-50.
357. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*. 1997 Sep 19;90(6):1051-60.
358. Fukuda M, Asano S, Nakamura T, Adachi M, Yoshida M, Yanagida M, et al. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature*. 1997 Nov 20;390(6657):308-11.
359. Tsuchiya A, Tashiro E, Yoshida M, Imoto M. Involvement of nuclear accumulation of heat shock protein 27 in leptomycin B-induced apoptosis in HeLa cells. *J Antibiot (Tokyo)*. 2005 Dec;58(12):810-6.
360. Rastogi S, Joshi B, Fusaro G, Chellappan S. Camptothecin induces nuclear export of prohibitin preferentially in transformed cells through a CRM-1-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2006 Feb 3;281(5):2951-9.

361. Thompson WE, Asselin E, Branch A, Stiles JK, Sutovsky P, Lai L, et al. Regulation of prohibitin expression during follicular development and atresia in the mammalian ovary. *Biol Reprod.* 2004 Jul;71(1):282-90.
362. Keminer O, Peters R. Permeability of single nuclear pores. *Biophys J.* 1999 Jul;77(1):217-28.
363. Macara IG. Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001 Dec;65(4):570-94, table of contents.
364. Finlay DR, Newmeyer DD, Price TM, Forbes DJ. Inhibition of in vitro nuclear transport by a lectin that binds to nuclear pores. *J Cell Biol.* 1987 Feb;104(2):189-200.
365. Melchior F, Paschal B, Evans J, Gerace L. Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J Cell Biol.* 1993 Dec;123(6 Pt 2):1649-59.
366. Moore MS, Blobel G. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature.* 1993 Oct 14;365(6447):661-3.
367. Ren M, Drivas G, D'Eustachio P, Rush MG. Ran/TC4: a small nuclear GTP-binding protein that regulates DNA synthesis. *J Cell Biol.* 1993 Jan;120(2):313-23.
368. Nemergut ME, Lindsay ME, Brownawell AM, Macara IG. Ran-binding protein 3 links Crm1 to the Ran guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem.* 2002 May 17;277(20):17385-8.
369. Englmeier L, Fornerod M, Bischoff FR, Petosa C, Mattaj IW, Kutay U. RanBP3 influences interactions between CRM1 and its nuclear protein export substrates. *EMBO Rep.* 2001 Oct;2(10):926-32.
370. Lindsay ME, Holaska JM, Welch K, Paschal BM, Macara IG. Ran-binding protein 3 is a cofactor for Crm1-mediated nuclear protein export. *J Cell Biol.* 2001 Jun 25;153(7):1391-402.
371. Yao Y, Dong Y, Lin F, Zhao H, Shen Z, Chen P, et al. The expression of CRM1 is associated with prognosis in human osteosarcoma. *Oncol Rep.* 2009 Jan;21(1):229-35.
372. van der Watt PJ, Maske CP, Hendricks DT, Parker MI, Denny L, Govender D, et al. The Karyopherin proteins, Crm1 and Karyopherin beta1, are overexpressed in cervical cancer and are critical for cancer cell survival and proliferation. *Int J Cancer.* 2009 Apr 15;124(8):1829-40.
373. Huang WY, Yue L, Qiu WS, Wang LW, Zhou XH, Sun YJ. Prognostic value of CRM1 in pancreas cancer. *Clin Invest Med.* 2009;32(6):E315.
374. Dai F, Duan X, Liang YY, Lin X, Feng XH. Coupling of dephosphorylation and nuclear export of Smads in TGF-beta signaling. *Methods Mol Biol.* 2010;647:125-37.
375. von Knethen A, Tzieply N, Jennewein C, Brune B. Casein-kinase-II-dependent phosphorylation of PPARgamma provokes CRM1-mediated shuttling of PPARgamma from the nucleus to the cytosol. *J Cell Sci.* 2010 Jan 15;123(Pt 2):192-201.
376. Sasaki T, Kojima H, Kishimoto R, Ikeda A, Kunimoto H, Nakajima K. Spatiotemporal regulation of c-Fos by ERK5 and the E3 ubiquitin ligase UBR1, and its biological role. *Mol Cell.* 2006 Oct 6;24(1):63-75.
377. Benzeno S, Lu F, Guo M, Barbash O, Zhang F, Herman JG, et al. Identification of mutations that disrupt phosphorylation-dependent nuclear export of cyclin D1. *Oncogene.* 2006 Oct 12;25(47):6291-303.

378. Wesierska-Gadek J, Wojciechowski J, Schmid G. Phosphorylation regulates the interaction and complex formation between wt p53 protein and PARP-1. *J Cell Biochem.* 2003 Aug 15;89(6):1260-84.
379. Mowen K, David M. Regulation of STAT1 nuclear export by Jak1. *Mol Cell Biol.* 2000 Oct;20(19):7273-81.
380. Nie L, Sasaki M, Maki CG. Regulation of p53 nuclear export through sequential changes in conformation and ubiquitination. *J Biol Chem.* 2007 May 11;282(19):14616-25.
381. Carter S, Bischof O, Dejean A, Vousden KH. C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53. *Nat Cell Biol.* 2007 Apr;9(4):428-35.
382. Du JX, Bialkowska AB, McConnell BB, Yang VW. SUMOylation regulates nuclear localization of Kruppel-like factor 5. *J Biol Chem.* 2008 Nov 14;283(46):31991-2002.
383. Chen A, Wang PY, Yang YC, Huang YH, Yeh JJ, Chou YH, et al. SUMO regulates the cytoplasmic nuclear transport of its target protein Daxx. *J Cell Biochem.* 2006 Jul 1;98(4):895-911.
384. Ravetch JV, Lanier LL. Immune inhibitory receptors. *Science.* 2000 Oct 6;290(5489):84-9.
385. Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, et al. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell.* 2006 Nov 3;127(3):635-48.
386. Han EK, McGonigal T, Butler C, Giranda VL, Luo Y. Characterization of Akt overexpression in MiaPaCa-2 cells: prohibitin is an Akt substrate both in vitro and in cells. *Anticancer Res.* 2008 Mar-Apr;28(2A):957-63.
387. Wang B, Malik R, Nigg EA, Korner R. Evaluation of the low-specificity protease elastase for large-scale phosphoproteome analysis. *Anal Chem.* 2008 Dec 15;80(24):9526-33.
388. Manza LL, Codreanu SG, Stamer SL, Smith DL, Wells KS, Roberts RL, et al. Global shifts in protein sumoylation in response to electrophile and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 2004 Dec;17(12):1706-15.
389. Guo D, Han J, Adam BL, Colburn NH, Wang MH, Dong Z, et al. Proteomic analysis of SUMO4 substrates in HEK293 cells under serum starvation-induced stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Dec 2;337(4):1308-18.
390. Liu B, Shuai K. Regulation of the sumoylation system in gene expression. *Curr Opin Cell Biol.* 2008 Jun;20(3):288-93.
391. Garcia-Dominguez M, Reyes JC. SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jun-Aug;1789(6-8):451-9.
392. Lajeunesse D, Reboul P. Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. *Curr Opin Rheumatol.* 2003 Sep;15(5):628-33.
393. Karsdal MA, Leeming DJ, Dam EB, Henriksen K, Alexandersen P, Pastoureau P, et al. Should subchondral bone turnover be targeted when treating osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage.* 2008 Jun;16(6):638-46.

394. Lanske B, Amling M, Neff L, Guiducci J, Baron R, Kronenberg HM. Ablation of the PTHrP gene or the PTH/PTHrP receptor gene leads to distinct abnormalities in bone development. *J Clin Invest*. 1999 Aug;104(4):399-407.
395. Young AP, Nagarajan R, Longmore GD. Mechanisms of transcriptional regulation by Rb-E2F segregate by biological pathway. *Oncogene*. 2003 Oct 16;22(46):7209-17.
396. Maehara K, Yamakoshi K, Ohtani N, Kubo Y, Takahashi A, Arase S, et al. Reduction of total E2F/DP activity induces senescence-like cell cycle arrest in cancer cells lacking functional pRB and p53. *J Cell Biol*. 2005 Feb 14;168(4):553-60.
397. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 2005 Feb 25;120(4):513-22.
398. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Sep;8(9):729-40.
399. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961 Dec;25:585-621.
400. Guerne PA, Blanco F, Kaelin A, Desgeorges A, Lotz M. Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development. *Arthritis Rheum*. 1995 Jul;38(7):960-8.
401. Forsyth CB, Cole A, Murphy G, Bienias JL, Im HJ, Loeser RF, Jr. Increased matrix metalloproteinase-13 production with aging by human articular chondrocytes in response to catabolic stimuli. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005 Sep;60(9):1118-24.
402. Parsch D, Brummendorf TH, Richter W, Fellenberg J. Replicative aging of human articular chondrocytes during ex vivo expansion. *Arthritis Rheum*. 2002 Nov;46(11):2911-6.
403. Martin JA, Buckwalter JA. Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001 Apr;56(4):B172-9.
404. Loeser RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 Aug;17(8):971-9.
405. Price JS, Waters JG, Darrah C, Pennington C, Edwards DR, Donell ST, et al. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell*. 2002 Oct;1(1):57-65.
406. Pfeuty A, Gueride M. Peroxide accumulation without major mitochondrial alteration in replicative senescence. *FEBS Lett*. 2000 Feb 18;468(1):43-7.
407. Carlo MD, Jr., Loeser RF. Increased oxidative stress with aging reduces chondrocyte survival: correlation with intracellular glutathione levels. *Arthritis Rheum*. 2003 Dec;48(12):3419-30.
408. Jallali N, Ridha H, Thrasivoulou C, Underwood C, Butler PE, Cowen T. Vulnerability to ROS-induced cell death in ageing articular cartilage: the role of antioxidant enzyme activity. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005 Jul;13(7):614-22.
409. Liu X, Ren Z, Zhan R, Wang X, Zhang Z, Leng X, et al. Prohibitin protects against oxidative stress-induced cell injury in cultured neonatal cardiomyocyte. *Cell Stress Chaperones*. 2009 May;14(3):311-9.
410. Ko KS, Tomasi ML, Iglesias-Ara A, French BA, French SW, Ramani K, et al. Liver-specific deletion of prohibitin 1 results in spontaneous liver injury, fibrosis, and hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*. 2010 Dec;52(6):2096-108.

411. Saito T, Kawaguchi H. HIF-2alpha as a possible therapeutic target of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Dec;18(12):1552-6.
412. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*. 2010 Oct 22;40(2):294-309.
413. Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, Kobayashi T, Knight M, Johnson RS. Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev*. 2001 Nov 1;15(21):2865-76.
414. Pfander D, Cramer T, Schipani E, Johnson RS. HIF-1alpha controls extracellular matrix synthesis by epiphyseal chondrocytes. *J Cell Sci*. 2003 May 1;116(Pt 9):1819-26.
415. Amarilio R, Viukov SV, Sharir A, Eshkar-Oren I, Johnson RS, Zelzer E. HIF1alpha regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. *Development*. 2007 Nov;134(21):3917-28.
416. van Hagen M, Overmeer RM, Abolvardi SS, Vertegaal AC. RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2alpha. *Nucleic Acids Res*. 2010 Apr;38(6):1922-31.
417. Berta MA, Mazure N, Hattab M, Pouyssegur J, Brahimi-Horn MC. SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Aug 31;360(3):646-52.
418. Cheng J, Kang X, Zhang S, Yeh ET. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell*. 2007 Nov 2;131(3):584-95.
419. Cowell IG, Skinner A, Hurst HC. Transcriptional repression by a novel member of the bZIP family of transcription factors. *Mol Cell Biol*. 1992 Jul;12(7):3070-7.
420. Blau J, Young MW. Cycling vrille expression is required for a functional Drosophila clock. *Cell*. 1999 Dec 10;99(6):661-71.
421. Glossop NR, Houl JH, Zheng H, Ng FS, Dudek SM, Hardin PE. VRILLE feeds back to control circadian transcription of Clock in the Drosophila circadian oscillator. *Neuron*. 2003 Jan 23;37(2):249-61.
422. Cyran SA, Buchsbaum AM, Reddy KL, Lin MC, Glossop NR, Hardin PE, et al. vrille, Pdp1, and dClock form a second feedback loop in the Drosophila circadian clock. *Cell*. 2003 Feb 7;112(3):329-41.
423. Doi M, Okano T, Yujnovsky I, Sassone-Corsi P, Fukada Y. Negative control of circadian clock regulator E4BP4 by casein kinase Iepsilon-mediated phosphorylation. *Curr Biol*. 2004 Jun 8;14(11):975-80.
424. Cowell IG, Hurst HC. Protein-protein interaction between the transcriptional repressor E4BP4 and the TBP-binding protein Dr1. *Nucleic Acids Res*. 1996 Sep 15;24(18):3607-13.
425. Inostroza JA, Mermelstein FH, Ha I, Lane WS, Reinberg D. Dr1, a TATA-binding protein-associated phosphoprotein and inhibitor of class II gene transcription. *Cell*. 1992 Aug 7;70(3):477-89.
426. Kim TK, Zhao Y, Ge H, Bernstein R, Roeder RG. TATA-binding protein residues implicated in a functional interplay between negative cofactor NC2 (Dr1) and general factors TFIIA and TFIIB. *J Biol Chem*. 1995 May 5;270(18):10976-81.

427. Mermelstein F, Yeung K, Cao J, Inostroza JA, Erdjument-Bromage H, Egelson K, et al. Requirement of a corepressor for Dr1-mediated repression of transcription. *Genes Dev.* 1996 Apr 15;10(8):1033-48.
428. Yeung K, Kim S, Reinberg D. Functional dissection of a human Dr1-DRAP1 repressor complex. *Mol Cell Biol.* 1997 Jan;17(1):36-45.
429. McCauley LK, Koh AJ, Beecher CA, Cui Y, Rosol TJ, Franceschi RT. PTH/PTHrP receptor is temporally regulated during osteoblast differentiation and is associated with collagen synthesis. *J Cell Biochem.* 1996 Jun 15;61(4):638-47.
430. McCauley LK, Koh AJ, Beecher CA, Cui Y, Decker JD, Franceschi RT. Effects of differentiation and transforming growth factor beta 1 on PTH/PTHrP receptor mRNA levels in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res.* 1995 Aug;10(8):1243-55.
431. van der Horst G, Farih-Sips H, Lowik CW, Karperien M. Multiple mechanisms are involved in inhibition of osteoblast differentiation by PTHrP and PTH in KS483 Cells. *J Bone Miner Res.* 2005 Dec;20(12):2233-44.
432. Pearman AT, Chou WY, Bergman KD, Pulumati MR, Partridge NC. Parathyroid hormone induces c-fos promoter activity in osteoblastic cells through phosphorylated cAMP response element (CRE)-binding protein binding to the major CRE. *J Biol Chem.* 1996 Oct 11;271(41):25715-21.
433. Tyson DR, Swarthout JT, Partridge NC. Increased osteoblastic c-fos expression by parathyroid hormone requires protein kinase A phosphorylation of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein at serine 133. *Endocrinology.* 1999 Mar;140(3):1255-61.
434. Swarthout JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene.* 2002 Jan 9;282(1-2):1-17.
435. Li TF, Dong Y, Ionescu AM, Rosier RN, Zuscik MJ, Schwarz EM, et al. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) inhibits Runx2 expression through the PKA signaling pathway. *Exp Cell Res.* 2004 Sep 10;299(1):128-36.
436. Mak KK, Bi Y, Wan C, Chuang PT, Clemens T, Young M, et al. Hedgehog signaling in mature osteoblasts regulates bone formation and resorption by controlling PTHrP and RANKL expression. *Dev Cell.* 2008 May;14(5):674-88.
437. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature.* 2002 Aug 29;418(6901):935-41.
438. Schibler U, Sassone-Corsi P. A web of circadian pacemakers. *Cell.* 2002 Dec 27;111(7):919-22.
439. Feder ME. Physiology and global climate change. *Annu Rev Physiol.* 2010 Mar 17;72:123-5.
440. Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol.* 2010 Mar 17;72:517-49.
441. Doi M, Nakajima Y, Okano T, Fukada Y. Light-induced phase-delay of the chicken pineal circadian clock is associated with the induction of cE4bp4, a potential transcriptional repressor of cPer2 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jul 3;98(14):8089-94.

442. Ueda HR, Hayashi S, Chen W, Sano M, Machida M, Shigeyoshi Y, et al. System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat Genet.* 2005 Feb;37(2):187-92.
443. Ozkurt IC, Tetradis S. Parathyroid hormone-induced E4BP4/NFIL3 down-regulates transcription in osteoblasts. *J Biol Chem.* 2003 Jul 18;278(29):26803-9.
444. Ozkurt IC, Pirih FQ, Tetradis S. Parathyroid hormone induces E4bp4 messenger ribonucleic acid expression primarily through cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signaling in osteoblasts. *Endocrinology.* 2004 Aug;145(8):3696-703.
445. Silvestris F, Cafforio P, De Matteo M, Calvani N, Frassanito MA, Dammacco F. Negative regulation of the osteoblast function in multiple myeloma through the repressor gene E4BP4 activated by malignant plasma cells. *Clin Cancer Res.* 2008 Oct 1;14(19):6081-91.
446. Simmons DJ, Nichols G, Jr. Diurnal periodicity in the metabolic activity of bone tissue. *Am J Physiol.* 1966 Feb;210(2):411-8.
447. Schlemmer A, Hassager C, Jensen SB, Christiansen C. Marked diurnal variation in urinary excretion of pyridinium cross-links in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992 Mar;74(3):476-80.
448. Srivastava AK, Bhattacharyya S, Li X, Mohan S, Baylink DJ. Circadian and longitudinal variation of serum C-telopeptide, osteocalcin, and skeletal alkaline phosphatase in C3H/HeJ mice. *Bone.* 2001 Oct;29(4):361-7.
449. Ladlow JF, Hoffmann WE, Breur GJ, Richardson DC, Allen MJ. Biological variability in serum and urinary indices of bone formation and resorption in dogs. *Calcif Tissue Int.* 2002 Mar;70(3):186-93.
450. Patel MS, Eleftheriou F. The new field of neuroskeletal biology. *Calcif Tissue Int.* 2007 May;80(5):337-47.
451. Fu L, Patel MS, Bradley A, Wagner EF, Karsenty G. The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation. *Cell.* 2005 Sep 9;122(5):803-15.
452. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell.* 2000 Jan 21;100(2):197-207.
453. Takeda S, Eleftheriou F, Lévassieur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell.* 2002 Nov 1;111(3):305-17.
454. Kalsbeek A, Fliers E, Romijn JA, La Fleur SE, Wortel J, Bakker O, et al. The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. *Endocrinology.* 2001 Jun;142(6):2677-85.
455. Schmitt CP, Homme M, Schaefer F. Structural organization and biological relevance of oscillatory parathyroid hormone secretion. *Pediatr Nephrol.* 2005 Mar;20(3):346-51.
456. Hanyu R, Hayata T, Nagao M, Saita Y, Hemmi H, Notomi T, et al. Per-1 is a specific clock gene regulated by parathyroid hormone (PTH) signaling in osteoblasts and is functional for the transcriptional events induced by PTH. *J Cell Biochem.* 2010 Nov 22.

457. Hinoi E, Ueshima T, Hojo H, Iemata M, Takarada T, Yoneda Y. Up-regulation of per mRNA expression by parathyroid hormone through a protein kinase A-CREB-dependent mechanism in chondrocytes. *J Biol Chem*. 2006 Aug 18;281(33):23632-42.
458. Eastell R, Calvo MS, Burritt MF, Offord KP, Russell RG, Riggs BL. Abnormalities in circadian patterns of bone resorption and renal calcium conservation in type I osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992 Mar;74(3):487-94.
459. Ledger GA, Burritt MF, Kao PC, O'Fallon WM, Riggs BL, Khosla S. Role of parathyroid hormone in mediating nocturnal and age-related increases in bone resorption. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Nov;80(11):3304-10.
460. Fraser WD, Logue FC, Christie JP, Gallacher SJ, Cameron D, O'Reilly DS, et al. Alteration of the circadian rhythm of intact parathyroid hormone and serum phosphate in women with established postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int*. 1998;8(2):121-6.
461. Joseph F, Chan BY, Durham BH, Ahmad AM, Vinjamuri S, Gallagher JA, et al. The circadian rhythm of osteoprotegerin and its association with parathyroid hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Aug;92(8):3230-8.
462. White HD, Ahmad AM, Durham BH, Peter R, Prabhakar VK, Corlett P, et al. PTH circadian rhythm and PTH target-organ sensitivity is altered in patients with adult growth hormone deficiency with low BMD. *J Bone Miner Res*. 2007 Nov;22(11):1798-807.
463. Tenenhouse HS, Werner A, Biber J, Ma S, Martel J, Roy S, et al. Renal Na(+)-phosphate cotransport in murine X-linked hypophosphatemic rickets. Molecular characterization. *J Clin Invest*. 1994 Feb;93(2):671-6.
464. Tenenhouse HS, Martel J, Gauthier C, Segawa H, Miyamoto K. Differential effects of Npt2a gene ablation and X-linked Hyp mutation on renal expression of Npt2c. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Dec;285(6):F1271-8.
465. Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H. Proximal tubular handling of phosphate: A molecular perspective. *Kidney Int*. 2006 Nov;70(9):1548-59.
466. Lotscher M, Kaissling B, Biber J, Murer H, Levi M. Role of microtubules in the rapid regulation of renal phosphate transport in response to acute alterations in dietary phosphate content. *J Clin Invest*. 1997 Mar 15;99(6):1302-12.
467. Pfister MF, Lederer E, Forgo J, Ziegler U, Lotscher M, Quabius ES, et al. Parathyroid hormone-dependent degradation of type II Na⁺/Pi cotransporters. *J Biol Chem*. 1997 Aug 8;272(32):20125-30.
468. Keusch I, Traebert M, Lotscher M, Kaissling B, Murer H, Biber J. Parathyroid hormone and dietary phosphate provoke a lysosomal routing of the proximal tubular Na/Pi-cotransporter type II. *Kidney Int*. 1998 Oct;54(4):1224-32.
469. Segawa H, Yamanaka S, Ito M, Kuwahata M, Shono M, Yamamoto T, et al. Internalization of renal type IIc Na-Pi cotransporter in response to a high-phosphate diet. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Mar;288(3):F587-96.
470. Lavi-Moshayoff V, Wasserman G, Meir T, Silver J, Naveh-Many T. PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Oct;299(4):F882-9.

471. Riminucci M, Collins MT, Fedarko NS, Cherman N, Corsi A, White KE, et al. FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting. *J Clin Invest*. 2003 Sep;112(5):683-92.
472. Brown WW, Juppner H, Langman CB, Price H, Farrow EG, White KE, et al. Hypophosphatemia with elevations in serum fibroblast growth factor 23 in a child with Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Jan;94(1):17-20.
473. Lin YS, Green MR. Interaction of a common cellular transcription factor, ATF, with regulatory elements in both E1a- and cyclic AMP-inducible promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 May;85(10):3396-400.
474. Miao D, Bai X, Panda D, McKee M, Karaplis A, Goltzman D. Osteomalacia in hyp mice is associated with abnormal phex expression and with altered bone matrix protein expression and deposition. *Endocrinology*. 2001 Feb;142(2):926-39.