

Université de Montréal

**Rôle du facteur de transcription PITX1 dans la pathogenèse de
l'arthrose**

par

Cynthia Picard

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

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

Juin, 2012

© Cynthia Picard, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Rôle du facteur de transcription PITX1 dans la pathogenèse de l'arthrose

Présentée par :
Cynthia Picard

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Nikolaus Heveker, président-rapporteur
Alain Moreau, directeur de recherche
Florina Moldovan, co-directrice
Daniel Lajeunesse, membre du jury
Giovanni Di Battista, examinateur externe
Nathalie Arbour, représentante du doyen de la FES

Résumé

L'arthrose ou ostéoarthrite (OA) est la plus commune des maladies chroniques associées au vieillissement. La multiplicité des loci et des polymorphismes associés à l'OA suggère l'implication de nombreuses voies de signalisation. La plupart des voies empruntées partagent des points en commun avec le processus d'ossification endochondrale. Dans l'arthrose, la réinitiation de ce processus pourrait être responsable de la dégradation du cartilage et de la présence d'ostéophytes. Un des gènes ayant fait surface autant dans l'OA que dans le développement musculosquelettique est *PITX1*. Contrairement à ce que son nom l'indique, *PITX1* n'est pas seulement exprimé dans la glande pituitaire mais également dans l'os, le cartilage, les muscles et les fibroblastes. *Pitx1* joue un rôle clé dans l'identité des membres inférieurs et son inactivation complète chez la souris mène à un phénotype ressemblant aux membres supérieurs. Moins sévère, son inactivation partielle provoque des symptômes apparentés à l'arthrose précoce chez la souris vieillissante. Chez l'humain, une perte d'expression de *PITX1* est observée dans le cartilage OA de concert avec une augmentation des protéines *EXTL3*, *REG1* et *PARP1*. Ces dernières pourraient favoriser la phase initiale de régénération associée à l'arthrose. Pour induire la prolifération des chondrocytes, de bas niveaux de *PITX1* sont nécessaires. À l'inverse, de hauts niveaux de *PITX1* pourraient prévenir la prolifération et être responsables du statut différencié des chondrocytes articulaires normaux. L'étude des mécanismes de régulation du gène *PITX1* a mené à l'identification d'un co-répresseur, nommé prohibitine (*PHB1*), lié sur une région promotrice distale. *PHB1* est normalement retrouvé au niveau des mitochondries mais son accumulation nucléaire semble corrélérer avec la perte de *PITX1* et l'initiation de l'OA. Cette découverte pourrait avoir un impact sur le diagnostic et d'éventuels traitements visant à prévenir l'apparition de l'arthrose.

Mots-clés: Arthrose, *PITX1*, facteur de transcription hypophysaire à homéodomaine, cartilage, ossification endochondrale, *PHB1*, prohibitine.

Abstract

Osteoarthritis (OA) is one of the most common age-related chronic disorders. The multiplicity of loci identified in OA linkage studies and the large number of associated SNPs suggests that many molecular pathways are involved in OA pathogenesis. Most of these pathways share common features with the process of endochondral ossification, normally occurring during embryogenesis. Cartilage degradation and the presence of osteophytes, hallmarks of OA, could be attributable to the reinitiation of this process. One gene that has surfaced both in OA and in musculoskeletal development is *PITX1*. Contrary to its original moniker, PITX1 is expressed in many tissues beyond the pituitary gland, including bone, cartilage, muscle and fibroblast cells. *Pitx1* is considered as a master regulator of hindlimb identity and its complete inactivation in mice leads to a forelimb-like phenotype. Less severe, its partial inactivation results in early OA symptoms in aging mice. In humans, loss of PITX1 expression is observed in OA cartilage concomitantly with the upregulation of EXTL3, REG1 and PARP1. The association between these proteins and tissue regeneration is consistent with the biosynthesis phase initially taking place in OA cartilage. The dose-dependent relationship between PITX1 and cell proliferation supports the view that low PITX1 expression levels are necessary for chondrocytes to proliferate. Conversely, high levels of PITX1 would prevent proliferation and be required to maintain a differentiated state in normal articular chondrocytes. The regulation of *PITX1* gene is of particular interest since it could help to better understand its role in osteoarthritis pathogenesis and in the process of endochondral ossification. Search for mechanisms responsible for the downregulation of *PITX1* in OA led to the identification of prohibitin (PHB1) bound to its distal promoter region. PHB1 is a mitochondrial marker but its presence in chondrocytes nuclei seems to correlate with the initiation stage of OA. This discovery could impact diagnosis as well as possible treatments for osteoarthritis.

Keywords: Osteoarthritis, PITX1, pituitary homeobox transcription factor, cartilage, endochondral ossification, PHB1, prohibitin.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xviii
Chapitre 1 - Introduction	1
L'arthrose.....	2
1.1 Définition.....	2
1.2 Diagnostic.....	4
1.3 Traitements.....	5
1.3.1 Médicaments analgésiques et anti-inflammatoires.....	5
1.3.2 Produits naturels.....	5
1.3.3 Chirurgie.....	6
1.4 Principaux aspects de la recherche sur l'arthrose.....	7
1.4.1 Le cartilage articulaire.....	8
1.4.2 Évaluation de la sévérité de l'arthrose à partir de coupes de cartilage.....	10
1.4.3 Changements moléculaires.....	12
1.4.4 Gènes de susceptibilité.....	13
1.4.5 Voies de signalisation.....	17
1.4.6 Facteurs de transcription.....	18
1.5 Comparaison entre la progression de l'arthrose et le processus d'ossification endochondrale.....	22
1.5.1 Développement des os longs.....	22
1.5.2 Marqueurs de la maturation des chondrocytes.....	24
1.5.3 Comparaison avec la progression de l'arthrose.....	26

1.6 Ostéophytes et exostoses.....	30
1.6.1 Similitudes entre les ostéophytes et les exostoses.....	30
1.6.2 Mécanismes impliqués dans le développement des ostéophytes et des exostoses	30
1.7 Protéines d'intérêt.....	33
1.7.1 Hedgehog.....	33
1.7.2 EXTL3.....	33
1.7.3 REG.....	34
1.7.4 PARP.....	34
1.8 Objectifs de la thèse.....	35
Préface au chapitre 2.....	36
Chapitre 2 - PITX1.....	37
PITX1: au-delà de la glande pituitaire.....	38
2.1 Title page.....	38
2.2 Abstract.....	39
2.3 Review.....	40
2.3.1 Introduction.....	40
2.3.2 Pitx1 and hindlimb identity.....	41
2.3.4 Phenotype of <i>Pitx1</i> knockout mice.....	42
2.3.5 Pitx1 and evolution: lessons from the fish.....	43
2.3.6 Regulation of <i>Pitx1</i>	44
2.3.7 Overexpression of <i>PITX1</i> can lead to apoptosis.....	44
2.3.8 PITX1 interacting partners and downstream targets.....	45
2.3.9 PITX1 and human disease.....	48
2.3.9.1 Hormonal disorders.....	48
2.3.9.2 Cancer.....	49
2.3.9.3 Musculoskeletal disease.....	51
2.4 Conclusions.....	56

2.5 Acknowledgments.....	57
2.6 References.....	58
2.7 Table.....	69
2.8 Figure legends.....	71
2.9 Figures.....	72
Préface au chapitre 3.....	74
Chapitre 3 - Article #1	76
Nouveau rôle du facteur de transcription PITX1 dans la pathogenèse de l'arthrose.....	77
3.1 Title page.....	77
3.2 Abstract.....	78
3.3 Introduction.....	79
3.4 Material and methods.....	81
3.5 Results.....	85
3.6 Discussion.....	87
3.7 Acknowledgments.....	90
3.8 References.....	91
3.9 Figure legends.....	93
3.10 Figures.....	95
Préface au chapitre 4.....	99
Chapitre 4 - Article #2	101
Nouveaux marqueurs biologiques de l'arthrose modulés par le facteur de transcription PITX1.....	102
4.1 Title page.....	102
4.2 Abstract.....	104
4.3 Introduction.....	105
4.4 Material and methods.....	107
4.5 Results.....	112

4.6 Discussion	115
4.7 Acknowledgments.....	120
4.8 References	121
4.9 Figure legends	125
4.10 Figures.....	128
Chapitre 5 - Discussion	133
5.1 Expression de PITX1 durant l'ossification endochondrale et la progression de l'arthrose	134
5.2 Conséquences de la perte d'expression de <i>PITX1</i>	137
5.2.1 Les souris <i>Pitx1</i> <i>-/-</i>	137
5.2.2. Les souris <i>Pitx1</i> <i>+/-</i>	137
5.2.3 Défauts génétiques associés à <i>PITX1</i> chez des patients atteints de maladies musculosquelettiques	139
5.3 Gènes cibles potentiellement régulés par PITX1	140
5.3.1 Membres de la famille Hedgehog	140
5.3.1.1 IHH.....	140
5.3.1.2 SHH.....	140
5.3.2 PARP1, REG1 et EXTL3.....	141
5.4 Rôles potentiels de PARP1, REG1 et EXTL3 dans la pathogenèse de l'arthrose....	143
5.4.1 Membres de la famille PARP.....	143
5.4.2 Membres de la famille REG.....	143
5.4.3 Membres de la famille EXT	144
5.5 Régulation de <i>PITX1</i>	145
5.5.1 Analyses de polymorphismes sur la région promotrice du gène <i>PITX1</i> humain	145
5.5.2 Mesure de l'activité de différentes régions du promoteur de <i>PITX1</i>	145
5.5.3 Contribution des facteurs de transcriton E2F.....	146

5.5.4 Identification de la prohibitine (PHB1) comme élément régulateur du gène <i>PITXI</i>	146
5.5.5 Validation de résultats à l'aide du modèle murin STR/ort	147
5.6 Synthèse générale.....	148
Chapitre 6 - Conclusions	150
6.1 Revue des hypothèses initiales.....	151
6.1.1 Expression de <i>PITXI</i>	151
6.1.2 Régulation de <i>PITXI</i>	152
6.1.3 Rôle de <i>PITXI</i>	153
6.2 Perspectives.....	155
Bibliographie.....	159
Annexe I.....	175
Annexe II.....	184

Liste des tableaux

Chapitre 1 - Introduction

Tableau I. Stades radiologiques d'arthrose selon Kellgren et Lawrence.....	4
Tableau II. Score histologique de Mankin.	10
Tableau III. Liste de gènes associés à la susceptibilité à l'arthrose.....	14

Chapitre 2 - PITX1

Table I. List of genes regulated by PITX1 acting alone or with cofactors.	69
--	----

Annexe II

Supplementary Table S-I. <i>PITX1</i> SNP analyses.	229
Supplementary Table S-II. Prohibitin peptides identified by mass spectrometry.....	230
Supplementary Table S-III. List of primers used in real-time RT-PCR to detect mRNA and ChIP-identified genomic DNA.	231
Supplementary Table S-IV. List of primers used for vector construction.	232

Liste des figures

Chapitre 1 - Introduction

Figure 1. Développement progressif de l'arthrose chez les souris STR/ort.	3
Figure 2. Représentation des différentes zones sur une coupe de cartilage humain.	9
Figure 3. Évaluation des dommages arthrosiques cartilagineux selon Mankin.	11
Figure 4. Voies de signalisation potentielles impliquant des facteurs associés à la pathologie de l'arthrose.	17
Figure 5. Développement d'un os long par ossification endochondrale.	23
Figure 6. Marqueurs associés à chacune des étapes de la maturation des chondrocytes.	25
Figure 7. Représentation d'un pannus sur coupe de cartilage arthrosique.	27
Figure 8. Développement progressif d'un ostéophyte.	29
Figure 9. Schéma représentant l'extrémité d'un os long ainsi que sa plaque de croissance et la localisation privilégiée d'un ostéophyte ou d'une exostose.	32

Chapitre 2 - PITX1

Figure 1. Homeodomain protein sequence of the three human PITX family members.	72
Figure 2. Hypothetical model depicting different roles attributed to PITX1 according to its expression levels.	72
Figure 3. Model of gene regulation in polydactyly.	73

Chapitre 3 - Article #1

Figure 1. Pitx1 protein is localized in the articular joint-forming region and in articular chondrocytes in developing mice hind limb long bones.	95
Figure 2. Radiographs of different strains of 24-months old Pitx1 +/- mice.	95
Figure 3. Pitx1 +/- mice show histological changes of osteoarthritis at 7-months of age. ...	96
Figure 4. Reverse transcription-polymerase chain reaction shows loss of Pitx1 gene expression in osteoarthritis samples.	97

Figure 5. Cartilage specimens immunostained with anti-Pitx1 antibody show loss of Pitx1 expression in osteoarthritis samples.....	98
---	----

Chapitre 4 - Article #2

Figure 1. Aging Pitx1 heterozygous mice show fibrocartilagenous outgrowths and exhibit OA-like phenotype.....	128
Figure 2. <i>In vivo</i> loss of <i>Pitx1</i> expression is associated with up-regulation of <i>Extl3</i> , <i>Reg1</i> and <i>Parp1</i>	129
Figure 3. Expression analysis of <i>PITX1</i> , <i>EXTL3</i> , <i>REG1</i> and <i>PARP1</i> in cultured human articular chondrocytes from controls and patients suffering from osteoarthritis.	129
Figure 4. Immunohistochemical analysis of EXTL3, REG1 and PARP1 proteins shows significant up-regulation in articular cartilage of patients with osteoarthritis (OA)..	130
Figure 5. Down-regulation of <i>PITX1</i> in human chondrocytes leads to increased expression of <i>EXTL3</i> , <i>REG1</i> , <i>PARP1</i> , and known osteoarthritis biomarkers.	131
Figure 6. <i>PITX1</i> over-expression has a variable effect on <i>EXTL3</i> , <i>REG1</i> , and <i>PARP1</i> , depending on cellular context.	132

Chapitre 5 - Discussion

Figure 1. Figure hypothétique démontrant le parallèle entre le développement normal et la progression de l'arthrose.....	135
--	-----

Chapitre 6 - Conclusions

Figure 1. Cibles de E2F1 associées au processus d'ossification endochondrale.....	152
Figure 2. Rôle de PITX1 dans le cartilage articulaire sain et arthrosique.....	154

Annexe I

Figure 1. La glucosamine inhibe l'activation de NF- κ B par TNF- α dans les cellules C28/I2 surexprimant EXTL3.	175
--	-----

Figure 2. Expression du gène <i>NFATC2</i> dans des chondrocytes provenant de sujets sains et de patients OA.....	177
Figure 3. Gene expression levels of <i>PITX1</i> , <i>E2F1</i> , <i>E2F2</i> and <i>E2F3</i> in articular chondrocytes from patients classified according to the Kellgren-Lawrence (KL) score.	178
Figure 4. Comparison of Photoshop fluorescence measurement technique and safranin-O staining.....	179
Figure 5. Comparaison des niveaux d'expression de <i>PITX1</i> à partir d'ARN extrait directement de tissu cartilagineux ou de chondrocytes mis en culture.	180
Figure 6. Effets de la surexpression de <i>PITX1</i> sur l'activité de différentes régions promotrices du gène <i>Ihh</i>	181
Figure 7. Expression du gène <i>IHH</i> dans des chondrocytes articulaires de patients classifiés selon le score de Kellgren-Lawrence.	182
Figure 8. Analyse <i>in silico</i> des sites <i>PITX1</i> sur les régions promotrices des gènes <i>Extl3</i> , <i>Reg1</i> et <i>Parp1</i> d'origine murine et humaine.....	183

Annexe II

Figure 1. Study of basal <i>PITX1</i> expression in human primary chondrocytes and in C28/I2 cell line.....	214
Figure 2. E2F1 binds to <i>PITX1</i> promoter and acts as a positive regulator.....	215
Figure 3. PHB1 accumulates in the nucleus of OA chondrocytes.....	216
Figure 4. PHB1 represses <i>PITX1</i> gene in C28/I2 chondrocyte cell line.	217
Figure 5. PHB1 is required to maintain repression of <i>PITX1</i> gene.....	218
Figure 6. <i>PITX1</i> and PHB1 levels in STR/ort mice.....	219
Figure 7. Schematic model showing PHB1 nuclear accumulation in OA chondrocytes...	220
Supplementary Figure S1. EMSA with nuclear extract from OA chondrocytes and different E2F antibodies.....	226
Supplementary Figure S2. Immunofluorescence against PHB1 and TOM20 in articular chondrocytes.	227

Supplementary Figure S3. Real time RT-PCR performed against E2F target genes in
articular chondrocytes 228

Liste des abréviations

<i>ACAN</i>	aggrecan
<i>ADAMTS5</i>	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5
ADN	acide désoxyribonucléique
AINS	anti-inflammatoires non stéroïdiens
<i>ANKH</i>	ankylosis, progressive homolog
AR	androgen receptor
ARNm	acide ribonucléique messenger
<i>ASPN</i>	asporin
β -cat	beta-catenin (produit du gène <i>CTNNB1</i>)
BMD	bone mineral density / densité minérale osseuse
BMP	bone morphogenetic protein
BMPR	bone morphogenetic protein receptor
<i>CALM1</i>	calmodulin 1
<i>CATSPER3</i>	cation channel, sperm associated 3
cho	chondrodysplasia
<i>CILP</i>	cartilage intermediate layer protein
cmd	cartilage matrix deficiency
COL	collagen
<i>COMP</i>	cartilage oligomeric matrix protein
COX-2	cyclooxygenase 2 (produit du gène <i>PTGS2</i>)
<i>CTNNB1</i>	catenin (cadherin-associated protein), beta 1
<i>CYTL1</i>	cytokine-like 1
DKK	dickkopf
<i>E2F1</i>	E2F transcription factor 1
<i>EGR1</i>	early growth response 1
ER α	estrogen receptor alpha (produit du gène <i>ESR1</i>)
ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2

<i>ESR1</i>	estrogen receptor 1
<i>EXTL3</i>	exostoses (multiple)-like 3
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FRSQ	Fonds de la recherche en santé du Québec
FRZ	frizzled (aussi FZ et FZD)
<i>FRZB</i>	frizzled-related protein
<i>GDF5</i>	growth differentiation factor 5
GLI	glioma-associated oncogene
GR	glucocorticoid receptor (produit du gène <i>NR3C1</i>)
HH	hedgehog
HIF	hypoxia inducible factor
HME	hereditary multiple exostoses
HPA	hypothalamus-pituitary-adrenal / hypothalamo-hypophysio-surrénalien
HS	heparan sulfate / sulfate d'héparane
<i>HSPG2</i>	heparan sulfate proteoglycan 2 (perlecan)
<i>IGF1</i>	insulin-like growth factor 1
<i>IGF1R</i>	insulin-like growth factor 1 receptor
<i>IHH</i>	indian hedgehog
IKK	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase
<i>IL1B</i>	interleukin 1 beta
IL1R	interleukin 1 receptor
IRSC	Instituts de recherche en santé du Canada
kb	kilobase
LEF	lymphoid enhancer-binding factor
<i>LEP</i>	leptin
<i>LRP5</i>	low density lipoprotein receptor-related protein 5
<i>MATN3</i>	matrilin 3
Mb	mégabase

MCDS	metaphyseal chondrodysplasia, Schmid type
<i>MMP13</i>	matrix metallopeptidase 13
<i>NFATC2</i>	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2
NF-κB	nuclear factor kappa-B
<i>NR3C1</i>	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1
OA	osteoarthritis / ostéoarthrite
OPG	osteoprotegerin (produit du gène <i>TNFRSF11B</i>)
<i>PARP1</i>	poly (ADP-ribose) polymerase 1
PCBD2	pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase 2
PCR	polymerase chain reaction / réaction en chaîne par polymérase
<i>PHB</i>	prohibitin
<i>PITX1</i>	paired-like homeodomain 1 (pituitary homeobox 1)
PTCH	patched
<i>PTGS2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
PTH-rP	parathyroid hormone-related protein
RA	rheumatoid arthritis / arthrite rhumatoïde
REG1	regenerating islet-derived 1
<i>RUNX2</i>	runt-related transcription factor 2
<i>SDC4</i>	syndecan 4
SED	spondyloepiphyseal dysplasia
SEDL	sedlin (produit du gène <i>TRAPPC2</i>)
siRNA	small interfering RNA / petits ARN interférents
SJS	Schwartz-Jampel syndrome
<i>SMAD3</i>	SMAD (mothers against decapentaplegic) family member 3
SMO	smoothened
SNP	single nucleotide polymorphism / polymorphisme nucléotidique simple
<i>SOX9</i>	SRY (sex determining region Y)-box 9
SP1	SP1 (specificity protein 1) transcription factor
<i>TERT</i>	telomerase reverse transcriptase

TGFβ	transforming growth factor beta
TGFβR	transforming growth factor beta receptor
TNF-α	tumor necrosis factor alpha
TNFR	tumor necrosis factor receptor
<i>TNFRSF11B</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
<i>TRAPPC2</i>	trafficking protein particle complex 2
<i>TXNDC15</i>	thioredoxin domain containing 15
<i>VDR</i>	vitamin D receptor
VEGF	vascular endothelial growth factor
WNT	wingless-type

*À mon conjoint Jean-François ainsi qu'à nos
trois merveilleux enfants, Noémie, Guillaume
et Ioan, pour leur amour et leur soutien*

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Alain Moreau, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et avoir cru en mon potentiel. Il a su me faire confiance et m'a souvent laissé carte blanche lors de la réalisation de mon projet de doctorat, ce que j'ai grandement apprécié. Il m'a donné l'opportunité de présenter mes travaux de recherche dans de nombreux congrès, ce qui m'a permis de faire des voyages très enrichissants, tant au niveau personnel que professionnel. J'aimerais souligner son incroyable optimisme, sa grande générosité, son sens de l'entraide, de l'écoute et de la compréhension ainsi que son sens de l'humour, même dans les moments les plus difficiles.

J'aimerais également remercier ma co-directrice, Dre Florina Moldovan, ainsi que Dre Christina Manacu, Irène Londono et Charlotte Zaouter, membres passés et actuels de son laboratoire, pour leurs expertises dans le domaine de l'histologie. Dans ce même domaine, j'aimerais souligner le travail très minutieux et organisé de Josée Dépôt, sans qui je n'aurais pu compléter toutes mes expériences à partir de coupes de cartilage. Il ne faut pas oublier non plus le travail du Dr DaShen Wang, toujours disponible pour la réception et la préparation du matériel biologique humain. L'accès aux échantillons de cartilage humain a été rendu possible grâce à la participation du Dr Patrick Lavigne, lequel j'aimerais grandement remercier pour m'avoir permis d'assister à une chirurgie de remplacement du genou et pour avoir évalué mon examen pré-doctoral. J'ai eu la chance aussi de travailler sur une des rares lignées de souris développant naturellement l'arthrose, les souris STR/ort, entretenues par Saadallah Bouhanik. J'aimerais souligner le sens de l'humour très développé et fort apprécié chez ce dernier.

Durant toutes ces années passées au laboratoire, j'ai côtoyé de nombreuses personnes, dont certaines avec lesquelles je me suis liée d'amitié. Je vais toujours garder un bon souvenir d'Isabelle Turgeon, Lakshmi Suvarnan, Roxanne Doucet, Anita Franco, Nancy Karam, Lauriane Bernard ainsi que Qing Yuan. Lors de mon arrivée au sein de

l'équipe, j'étais très avide de tout connaître sur la science et je remercie énormément le Dr Bouziane Azeddine pour avoir répondu si patiemment à mes nombreuses questions. J'ai également beaucoup appris aux côtés des Drs Benoît St-Jacques, Martin Pellicelli, Jean-François Lavoie et Kristen Fay Gorman.

J'aimerais aussi remercier tous les membres du laboratoire non mentionnés jusqu'à présent, pour leurs différentes expertises, leur soutien et leur grand respect envers moi. J'aimerais également remercier Mme Danielle Buch, éditrice/rédactrice médicale de l'unité de recherche clinique appliqué du CHU Sainte-Justine. Elle a revue et corrigé la majorité des articles dont j'étais l'auteur et grâce à elle j'ai su mieux comprendre l'art de bien rédiger un article scientifique dans la langue de Shakespeare.

Je suis très reconnaissante envers les organismes subventionnaires qui m'ont offert différentes bourses d'études. Merci à la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal pour une bourse accompagnant mon passage accéléré de la maîtrise au doctorat ainsi qu'une bourse de fin d'études doctorales. Merci aux organisateurs du programme MENTOR des IRSC pour une bourse initiale et un complément de bourse offerts sur une période de plus de trois ans. Merci au FRSQ pour m'avoir offert des bourses mensuelles durant trois années consécutives. Merci également aux organisateurs de différents congrès m'ayant remis à plusieurs reprises des prix pour récompenser la qualité de mes présentations orales.

Finalement, j'aimerais remercier les membres du jury pour avoir pris le temps de corriger ma thèse, fruit de nombreuses années de travail acharné. Merci à tous.

Chapitre 1 - Introduction

L'arthrose

1.1 Définition

L'arthrose est la forme la plus commune d'arthrite et représente la principale cause d'invalidité au Canada (selon les IRSC, www.irsc-cihr.gc.ca). Son impact sur la santé publique est énorme, touchant plus de 10% des Canadiens d'âge adulte. Les facteurs de risques associés comprennent l'âge, le sexe (surtout les femmes ménopausées), l'obésité, les blessures et l'hérédité. Les articulations affectées par l'arthrose, soit principalement les genoux, les hanches et celles des doigts, peuvent être endolories et avoir une amplitude de mouvement limitée. L'arthrose peut être généralisée, comme par exemple dans les cas de nodosités d'Heberden (1), ou localisée et de causes diverses. Elle peut être qualifiée de primaire, lorsqu'elle n'est pas reliée à une prédisposition évidente, ou de secondaire lorsqu'elle a une origine connue telle que développementale, mécanique, traumatique, métabolique, endocrinienne ou inflammatoire (2).

Plusieurs changements caractérisent les différents stades de la maladie, décrits ici à l'aide d'un modèle murin d'arthrose spontanée (Figure 1). Bien que l'inflammation ne soit pas la cause primaire de l'OA, elle peut mener à un épaissement de la membrane synoviale, phénomène souvent douloureux. Une perte de protéoglycanes, qui contribue à la fragilisation de la matrice cartilagineuse, est observable grâce à une réduction de la coloration rouge (safranine-O). L'érosion progressive du cartilage peut résulter en un dénuement complet de l'os sous-chondral accompagné d'attrition (aplatissement ou creux) (Figure 1D). Une activité de remodelage osseux entraîne une sclérose (densification de l'os sous-chondral) et l'apparition d'ostéophytes (Figure 1B), ceux-ci pouvant se former très tôt et apparaître même avant qu'une dégradation du cartilage ne soit visible (3). Les ostéophytes peuvent limiter la mobilité de l'articulation et être une source de douleur, souvent due à une compression d'un nerf. La présence d'ostéophytes est l'un des principaux critères servant à évaluer la sévérité de l'arthrose, tels que présentés dans le tableau I.

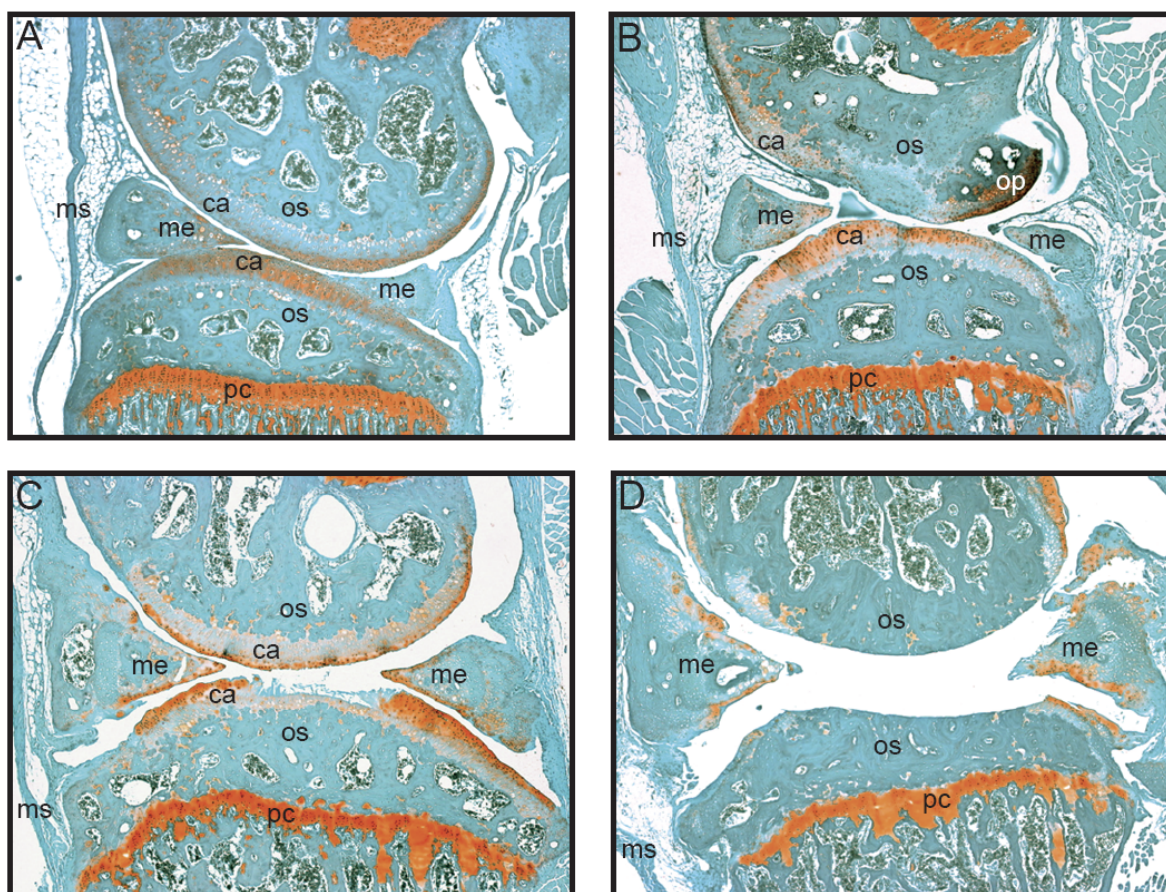


Figure 1. Développement progressif de l'arthrose chez les souris STR/ort.

Coupes histologiques colorées à la safranine-O (méthode, section 4.4) représentant des genoux de souris STR/ort âgées de **A)** 9 semaines, **B)** 16 semaines, **C)** 31 semaines et **D)** 40 semaines. La coloration rouge reflète la teneur en protéoglycanes alors que la coloration verte sert à visualiser la plupart des tissus. Toutes les photographies ont été prises avec un grossissement de 50 X et orientées de façon à retrouver les condyles fémoraux en haut et le plateau tibial en bas de chaque image. ca: cartilage, me: ménisque, ms: membrane synoviale, op: ostéophyte, os: os sous-chondral, pc: plaque de croissance. (Picard, 2012)

1.2 Diagnostic

La douleur aux articulations est le principal motif de la première consultation médicale. L'arthrose peut souvent être diagnostiquée grâce à l'historique du patient combiné à un examen physique. La pratique de certains métiers, comme la pose de tapis, peut augmenter les risques de développer l'OA (4). Certains sports, comme la course à pied ou le hockey, comportent également des risques plus élevés (2). Typiquement, une articulation affectée par l'arthrose présente une raideur et un crepitus (craquement) ainsi qu'une sensibilité à la pression et aux changements de températures. Le meilleur outil pour évaluer la sévérité de l'arthrose demeure la radiographie conventionnelle. Un stade variant de 0 à 4 est attribué selon l'échelle de Kellgren et Lawrence (Tableau I). Le pincement articulaire est défini comme étant une diminution de l'espace articulaire normal visible sur la radiographie (5).

Tableau I. Stades radiologiques d'arthrose selon Kellgren et Lawrence.

Stade	Description radiologique
0	Normale
1	Ostéophytes possibles
2	Petits ostéophytes avec faible pincement articulaire
3	Ostéophytes moyens avec pincement articulaire, sclérose et attrition possible
4	Gros ostéophytes, pincement articulaire sévère, importante sclérose et attrition

Tableau adapté de Sharma, 2007 (2)

1.3 Traitements

Pour le moment, il n'existe toujours pas de traitement curatif de l'arthrose. Seuls les symptômes peuvent être soulagés par les médicaments, les produits naturels, la physiothérapie ou une modification des habitudes de vie (exercices physiques, perte de poids, etc...). En cas d'échec de ces différentes approches, une opération chirurgicale doit être envisagée. Il est donc primordial de faire avancer la recherche face à l'arthrose, en espérant pouvoir éventuellement réparer les dommages de façon non invasive.

1.3.1 Médicaments analgésiques et anti-inflammatoires

L'acétaminophène est l'analgésique le plus souvent recommandé pour soulager les douleurs arthrosiques. Il peut être prescrit en combinaison avec des narcotiques comme la codéine ou le propoxyphène (2). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tels que l'ibuprofène, le kétoprofène et le naproxène peuvent aider à soulager la douleur et l'inflammation. Ils agissent principalement en inhibant la cyclo-oxygénase (COX)-2 par l'intermédiaire de la voie NF- κ B (nuclear factor kappa-B). Étant donné leurs effets indésirables potentiels, il est plus sécuritaire d'utiliser des anti-inflammatoires topiques (6). Dans les cas plus graves, les patients peuvent avoir recours à des injections de corticostéroïdes directement dans l'articulation atteinte (2). Un autre type d'injection, appelé viscosuppléance, consiste à lubrifier l'articulation par l'ajout d'acide hyaluronique. Cependant, il n'existe pas d'évidences démontrant que cette technique pourrait être supérieure à l'injection de corticostéroïdes ou la physiothérapie conventionnelle (7).

1.3.2 Produits naturels

Le composé actif du cayenne, la capsaïcine, est utilisé dans les crèmes et onguents pour soulager la douleur causée par l'arthrose. Son usage, ainsi que celui de la glucosamine et de la chondroïtine, a été recommandé par l'OARSI (Osteoarthritis Research International) (8). La glucosamine et la chondroïtine sont des composants essentiels du

cartilage, produits de façon naturelle par l'organisme. Une controverse persiste à savoir si la prise de ces deux produits est plus efficace conjointement plutôt qu'individuellement. La plus grande étude à ce jour sur le sujet conclue qu'une combinaison de glucosamine et de sulfate de chondroïtine procure un apaisement significatif de la douleur, mais ce, seulement chez les patients souffrant d'arthrose du genou avec une douleur de moyenne à sévère (9). Ces deux molécules ont pour propriété de prévenir l'activation de NF- κ B, un facteur nucléaire impliqué dans la réponse pro-inflammatoire (10, 11). Au laboratoire, nous avons démontré que la glucosamine pouvait inhiber la voie NF- κ B induite par TNF- α , en empêchant le couplage du récepteur de TNF- α avec EXTL3 (Figure 1, Annexe I).

1.3.3 Chirurgie

En dernier recours, plusieurs options chirurgicales s'offrent aux patients souffrant d'une forme avancée d'arthrose. L'arthroscopie est une intervention légère qui permet de retirer les débris d'os et de cartilage présents dans l'articulation (2). Elle est utile surtout chez les patients expérimentant une sensation de blocage due à une déchirure du cartilage. Un autre type d'intervention permet de corriger les excroissances et les déformations osseuses: l'ostéotomie. L'ostéotomie a pour but de rééquilibrer les pressions en diminuant celles-ci au niveau de la zone arthrosique pour les reporter sur une zone saine (12). Cette pratique n'affecte pas le pincement articulaire mais peut empêcher l'arthrose de progresser. Dans certains cas particuliers, une greffe ostéochondrale peut être envisagée. L'échantillon sain prélevé peut provenir soit du patient receveur (autogreffe) ou d'un donneur compatible (allogreffe) (13). Finalement, l'articulation atteinte peut être remplacée par une articulation artificielle, procédé appelé chirurgie de remplacement. Même si les risques associés peuvent être sérieux, cette technique est très efficace pour soulager la douleur et améliorer la qualité de vie des patients OA (2).

1.4 Principaux aspects de la recherche sur l'arthrose

De façon évidente, les traitements proposés en cas d'arthrose n'auraient pu exister sans l'apport de la recherche clinique. Différents matériaux sont activement à l'étude, autant pour les prothèses que pour les techniques d'implantation sous arthroscopie (14). Au sujet de l'inflammation et l'OA, plusieurs études ont démontré qu'elle pouvait être due à la sécrétion de prostaglandines, de leucotriènes, de protéases, de neuropeptides et de cytokines (15). D'ailleurs, certaines de ces molécules comme $TNF\alpha$ (tumor necrosis factor), LIF (leukemia inhibitory factor) et les interleukines 1β , 6, 11 et 18 se sont avérées de potentiels biomarqueurs de l'arthrose (16). L'identification de nouveaux biomarqueurs, sujet très en vogue, pourrait permettre un diagnostic plus précoce de l'OA, surtout chez les patients non symptomatiques.

En ce qui concerne la recherche fondamentale, les premiers investigateurs avaient tendance à étiqueter l'OA comme une maladie isolée du cartilage articulaire. Bien que la dégradation de ce dernier soit une caractéristique majeure, les modèles contemporains admettent que toute l'articulation synoviale est affectée par l'arthrose (17). La membrane synoviale, l'os sous-chondral, les ménisques ainsi que les muscles et ligaments péri articulaires ont tous fait l'objet de nombreuses publications concernant l'OA. Les cellules provenant de ces différents tissus possèdent toutes des capacités indépendantes permettant une réponse face aux lésions articulaires, qui mènera ultimement vers la dégradation du cartilage (18). Suite à une injure mécanique, plusieurs voies de signalisation peuvent être activées dont celles des WNT (wingless-type), des BMP (bone morphogenetic protein), de $FGF\beta$ (fibroblast growth factor) et de MMP13 (matrix metalloproteinase) (19, 20). Les changements moléculaires et histologiques observés dans l'OA occupent une place prépondérante dans la littérature et seront discutés dans les prochaines sections.

Pour alléger l'introduction, nous allons nous concentrer sur les aspects de l'arthrose permettant une meilleure compréhension des chapitres qui suivront.

1.4.1 Le cartilage articulaire

Le cartilage est un tissu conjonctif sans vascularisation et sans innervation, principalement nourri via le liquide synovial et l'os sous-chondral (2). Il est composé d'un seul type cellulaire, les chondrocytes, qui représentent environ 2% de son volume total. Les chondrocytes normaux se divisent très peu et sont responsables du lent renouvellement de la matrice extracellulaire. Cette matrice est composée principalement d'eau (65-80%), de collagène de type II (10-20%) et de protéoglycanes (10-20%). La disposition du dense réseau de fibres de collagène varie de la superficie à la profondeur (21). Dans la zone superficielle, les fibres de collagène sont orientées de façon parallèle à la surface et deviennent progressivement perpendiculaires à celle-ci dans les zones plus profondes. La forme et la disposition des chondrocytes sont grandement influencées par le réseau de collagène (Figure 2).

En vieillissant, le cartilage démontre une moins bonne résistance au stress mécanique due à une diminution du nombre de chondrocytes et de protéoglycanes (22). Bien que ces changements soient apparentés à l'arthrose, il importe de noter qu'elle n'est pas une conséquence inévitable du vieillissement (23). Plusieurs personnes âgées ne souffrent pas d'arthrose et il est possible d'induire celle-ci de façon expérimentale chez de jeunes animaux. De plus, certaines caractéristiques spécifiques à l'OA ne sont pas retrouvées au cours du vieillissement normal. Par exemple, le cartilage OA passe à travers une phase de biosynthèse avant de faire place à la phase de dégradation (18). Une prolifération cellulaire accrue ainsi que l'apparition de clones (amas de chondrocytes) sont alors typiquement observables (2). Durant cette phase considérée comme une tentative de réparation, la production de composants de la matrice extracellulaire est augmentée, quoique de façon plutôt anarchique. Plus tard, un déséquilibre des activités de synthèse favorisera une période de catabolisme caractérisée par la dégradation du cartilage. La mort cellulaire, ou apoptose, sera plus importante que lors du vieillissement normal et causera une calcification accélérée du cartilage articulaire.

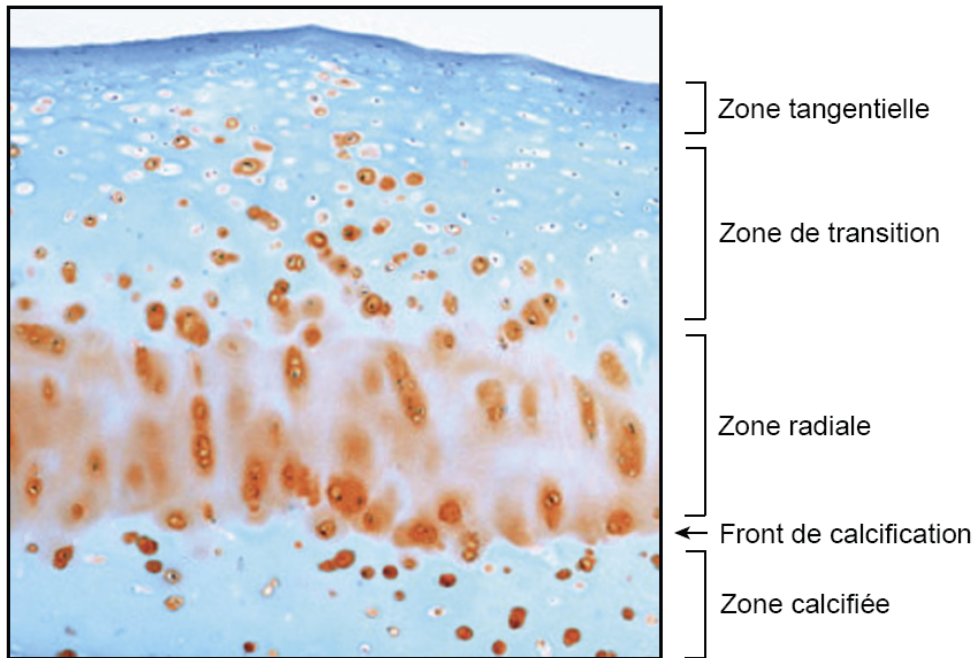


Figure 2. Représentation des différentes zones sur une coupe de cartilage humain.

Coupe de cartilage arthrosique colorée à la safranine-O permettant de mieux distinguer les différentes zones du cartilage. La zone superficielle, ou tangentielle, comprend de petites cellules aplaties et orientées de façon parallèle à la surface. Dans la zone moyenne, ou zone de transition, les cellules sont plus arrondies et de tailles moyennes. Les grosses cellules disposées en colonnes font parti de la zone profonde ou zone radiale. La zone calcifiée correspond à une région de mort cellulaire, d'où un nombre diminué de cellules et une teneur réduite en protéoglycanes. La coloration à la safranine-O permet de visualiser plus facilement la limite entre les zones non calcifiées et calcifiées, appelée front de calcification. Noter que chez un sujet sain, la coloration rouge s'étend beaucoup plus en hauteur vers la zone tangentielle. Photographie prise avec un grossissement de 100 X. (Picard, 2012)

1.4.2 Évaluation de la sévérité de l'arthrose à partir de coupes de cartilage

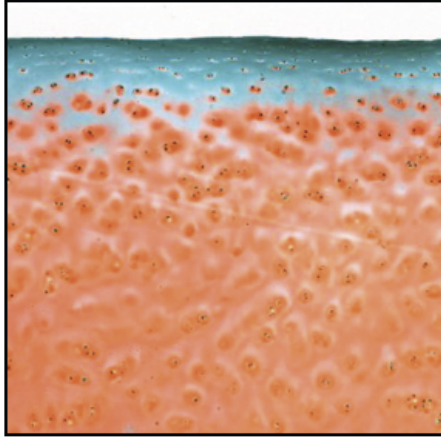
À partir d'un prélèvement de cartilage humain, par exemple suite à une intervention chirurgicale, une évaluation histologique de la sévérité de l'arthrose est possible. Noter qu'il est difficile de couper à travers la zone calcifiée (Figure 2) très dure, cette dernière étant par conséquent souvent exclue, laissant le front de calcification non identifiable. L'échantillon enrobé dans la paraffine et coupé à une épaisseur de 5 ou 6 μm est fixé sur une lame. C'est à partir d'une coloration à la safranine-O que sont établis les critères d'évaluation selon le score histologique de Mankin (Tableau II). Des exemples sont fournis à la figure 3.

Tableau II. Score histologique de Mankin.

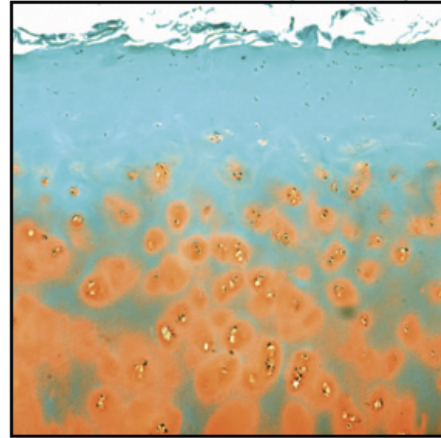
	Score		Score
I. Structure du cartilage		III. Coloration à la safranine-O	
a. Normale	0	a. Normale	0
b. Surface irrégulière	1	b. Décoloration faible	1
c. Pannus et surface irrégulière	2	c. Décoloration modérée	2
d. Fissures jusqu'à la zone de transition	3	d. Décoloration sévère	3
e. Fissures jusqu'à la zone radiale	4	e. Aucune coloration	4
f. Fissures jusqu'à la zone calcifiée	5		
g. Désorganisation complète	6		
II. Cellularité		IV. Front de calcification	
a. Normale	0	a. Intact	0
b. Hypercellularité diffuse	1	b. Traversé par des vaisseaux	
c. Clones	2	sanguins	1
d. Hypocellularité	3		

Tableau adapté de Mankin, 1971 (24)

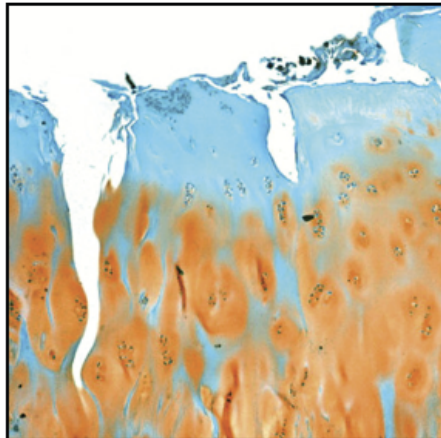
A) Structure normale (0)
Cellularité normale (0)
Coloration normale (0)



B) Surface irrégulière (1)
Clones (2)
Décoloration modérée (2)



C) Fissures jusqu'à la zone calcifiée (5)
Clones (2)
Décoloration modérée (2)



D) Désorganisation complète (6)
Hypocellularité (3)
Aucune coloration (4)

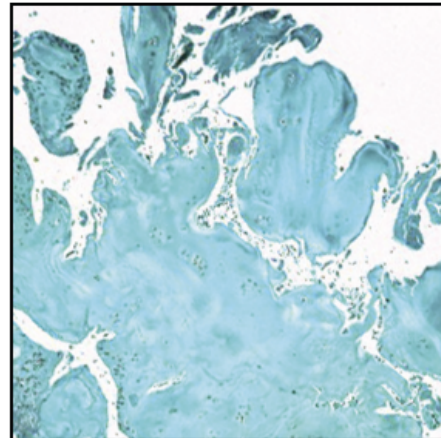


Figure 3. Évaluation des dommages arthrosiques cartilagineux selon Mankin.

Coupes de cartilage arthrosiques colorées à la safranine-O et évaluées selon le score histologique de Mankin. **A)** Score de 0, typique d'une section non affectée. **B)** Score de 5 et **C)** score de 9 représentant une arthrose avancée. **D)** Score de 13 avec arthrose sévère. Photographies prises avec un grossissement de 100 X. (Picard, 2012) Noter que nous pouvons apercevoir un exemple de pannus et d'hypercellularité à la figure 7.

1.4.3 Changements moléculaires

Lors de la progression de l'arthrose, il semble y avoir une conversion au niveau de la distribution du collagène (21). Bien que la production du collagène de type II semble augmenter dans les zones profondes du cartilage, elle diminue dans la zone superficielle au profit de l'expression du collagène de type I, habituellement associé au tissu osseux. Le collagène de type III, avec une localisation normalement péricellulaire, est retrouvé en plus grande quantité dans le cartilage OA, surtout dans les régions fibrocartilagineuses contenues dans les ostéophytes. Une distribution irrégulière de collagène de type X, absent du cartilage normal, caractérise l'hypertrophie cellulaire.

L'hypertrophie des chondrocytes est associée avec une activité de réparation du cartilage (21). Elle est accompagnée d'une augmentation tissulaire de la teneur en eau (oedème) ainsi que d'une activité métabolique accrue, mesurable par une plus grande production d'ARNm. Comme la quantité d'ADN semble être constante, ce phénomène ne peut être attribué à une augmentation de la quantité totale de cellules. Une hausse d'ARNm codant pour les différents types de collagène et pour des protéines telles que la ténascine C ou encore des protéoglycanes comme l'aggrécane, le biglycane et le lumicane, démontre un effort visant la régénération du cartilage.

Durant le développement normal, la biosynthèse du cartilage est régulée par différentes cytokines et facteurs de croissance tels que TGF β (transforming growth factor), IGF (insulin-like growth factor) et les BMP (18). Dans l'arthrose, plusieurs de ces facteurs sont réexprimés en combinaison avec des cytokines pro-inflammatoires. Ces dernières, incluant TNF α ainsi que les interleukines 1, 17 et 18, vont agir en augmentant la synthèse de MMP13, enzyme protéolytique responsable de la dégradation de la matrice extracellulaire. Le fragile équilibre entre les facteurs anaboliques et cataboliques est par conséquent perturbé, avec un résultat final en faveur de la destruction du cartilage.

1.4.4 Gènes de susceptibilité

Depuis plus de 70 ans, il est connu que l'arthrose présente une forte composante génétique (25). Cette influence génétique pourrait contribuer jusqu'à 65% des cas de certaines formes d'OA. Une approche thérapeutique ne pourrait être envisagée sans l'identification de gènes impliqués dans l'OA. Une liste élaborée mais non exhaustive des gènes de susceptibilité à l'arthrose est présentée dans le tableau III. Il est à noter que la plupart des études d'expression génique ont été réalisées à l'aide de tissus cartilagineux.

L'utilisation de modèles animaux permet de mieux comprendre le rôle biologique de chacun des gènes appartenant à cette liste. Chez un animal avec un seul gène inactivé, un phénotype normal peut être expliqué par une fonction redondante entre les différents membres d'une même famille. Cependant, une protéine mutée (ex. COMP et MATN3) peut résulter en un phénotype plus sévère que son inactivation complète, par exemple en séquestrant d'autres protéines aux fonctions biologiques plus importantes.

La plupart des gènes énumérés dans le tableau III jouent un rôle dans le développement musculosquelettique normal. Certains gènes (codant pour des facteurs de croissance et récepteurs) sont associés à la croissance alors que d'autres (codant pour des hormones, récepteurs et facteurs de transcription) sont plutôt reliés à la densité osseuse. De nombreux gènes (codant pour des composants de la matrice extracellulaire et facteurs reliés) sont impliqués dans le développement des membres et des structures craniofaciales.

En plus de participer à la pathogenèse de l'arthrose, quelques gènes mutés ont également été associés à d'autres pathologies telle que la dysplasie spondylo-épiphysaire (SED), la chondrodysplasie et le syndrome de Stickler (maladie du tissu conjonctif). Dans les cas d'arthrose primaire, le phénotype est souvent associé à un polymorphisme génétique (variations de la séquence nucléotidique dans une population) ou à un changement au niveau de l'expression d'un gène plutôt qu'à une mutation dans ce dernier.

Tableau III. Liste de gènes associés à la susceptibilité à l'arthrose.

Gène	État*	Phénotype humain	Modèle animal	Réf.
<i>ACAN</i> (<i>AGC1</i>)	Muté	SED, petite stature, OA précoce	Souris cmd : fente palatine, membres, queue et museau courts	(26, 27)
<i>ADAMTS5</i>	↑	OA du genou	Souris -/- : protégées contre l'OA	(28, 29)
<i>ANKH</i>	Muté	Chondrocalcinose, OA	Souris -/- : OA, dégradation du cartilage, ostéophytes, cristaux	(30, 31)
<i>AR</i>	Pol.	OA du genou	Souris -/- mâles : féminisation, retard de croissance, obésité	(32, 33)
<i>ASPN</i>	Pol.	OA du genou et de la hanche	Non investigué	(34)
<i>BMP2</i>	Pol. ↑	OA du genou	<i>Bmp2</i> +/- <i>Bmp6</i> -/- : ostéogenèse réduite, retard de croissance	(35, 36) (37)
<i>BMPRIA</i>	Muté	Polypose juvénile Non associé à l'OA	Souris -/- conditionnelles : fente palatine, dégradation du cartilage	(38, 39) (40, 41)
<i>CALMI</i>	Pol.	OA de la hanche	↑ chez pinsons à becs longs	(42, 43)
<i>CILP</i>	Pol.	OA du genou	<i>Cilp1</i> ↑ et <i>Cilp2</i> ↓ chez souris avec OA induite	(35, 44)
<i>COL2A1</i>	Muté	SED, syndrome de Stickler, chondrodysplasie, OA	Souris +/- : fente palatine, membres et museau courts	(45, 46) (47)
<i>COL9A1</i>	Pol.	Non associé à l'OA de la hanche	Souris +/- : OA du genou Souris -/- : chondrodysplasie	(48, 49)
<i>COL10A1</i>	↑	OA du genou et de la hanche	Souris mutantes : MCDS, membres courts disproportionnés	(50, 51)
<i>COL11A1</i>	Muté	Syndrome de Stickler, OA	Souris cho : fente palatine, OA, membres et museau courts	(52, 53)
<i>COMP</i>	Muté	Ostéocondrodysplasie, membres courts, OA	Souris -/- : phénotype normal	(54, 55)
<i>CTNNB1</i> (<i>β-cat</i>)	↑	OA du genou	Souris <i>Col2a1-β-cat</i> : OA, clones, cartilage fissuré, ostéophytes	(56)
<i>CYTL1</i>	↓	OA du genou	Souris -/- : susceptibilité à l'OA	(57)

Tableau III. (suite)

Gène	État*	Phénotype humain	Modèle animal	Réf.
<i>DKK1/2</i>	↑	OA du genou (↑ dans l'os)	Souris <i>Dkk1</i> -/- : malformations sévères de la tête et des membres	(58, 59) (60)
<i>EGR1</i>	↓	OA du genou et de la hanche	Souris -/- femelles : infertilité due à une déficience en LHβ	(61, 62)
<i>ESR1/2</i>	Pol.	OA du genou	<i>Esr1</i> -/- femelles : ostéoporose	(32, 63)
<i>FGF2/23</i>	↑	OA du genou	Souris <i>Fgf2</i> -/- : réduction de l'ossification	(64, 65)
<i>FGFR1</i>	↑	OA du genou	Souris mutantes : activation de RUNX2 et de l'ossification	(66, 67)
<i>FRZB</i>	Pol.	OA de la hanche	Souris -/- : susceptibilité à l'OA	(68, 69)
<i>GDF5</i>	Pol. ↓	OA de la hanche (↓ plus sévère dans l'arthrite rhumatoïde)	Souris -/- : membres courts et déformés	(70, 71) (72)
<i>HIF1A</i>	↑	OA du genou	Ostéoblastes -/- : os longs plus minces et moins vascularisés	(73, 74)
<i>HIF2A</i>	Pol. ↑	OA du genou (↑ durant stade initial et ↓ au stade final)	Souris +/- : protégées contre l'OA, membres courts	(75)
<i>HSPG2</i>	↑	OA du genou	Souris -/- : SJS, chondrodysplasie membres courts et déformés	(76, 77)
<i>IGF1</i>	Pol.	OA de genou, de la hanche, de la main et de la colonne	Souris -/- : retard de croissance et d'ossification, myopathie	(78, 79)
<i>IHH</i>	↑	OA du genou (exprimé près des lésions cartilagineuses)	Souris <i>Ptch1</i> +/- avec voie HH activée : prédisposition à l'OA	(80, 81)
<i>IL1B</i>	Pol.	OA de la hanche	↑ chez souris avec arthrite induite	(82, 83)
<i>LEP</i>	↑	OA du genou (↑ dans l'os)	Souris -/- : BMD élevée et obésité	(84, 85)
<i>LRP5</i>	Pol. ↑	OA du genou	Souris -/- : ostéoporose due à ↑ de sérotonine	(86, 87) (88)
<i>MATN3</i>	Muté	OA de la main	Souris -/- : phénotype normal	(89, 90)
<i>MMP13</i>	↑	OA du genou et de la hanche	Souris -/- : chondrodysplasie	(91, 92)
<i>NFATC2</i>	↓	OA du genou (Figure 2, Annexe I)	Souris -/- : OA, dégradation du cartilage, clones, ostéophytes	(93)

Tableau III. (suite)

Gène	État*	Phénotype humain	Modèle animal	Réf.
<i>NR3C1</i> (<i>GR</i>)	↓	OA du genou	Souris mutantes : dérégulation de l'axe HPA	(94, 95)
<i>OPG</i>	Pol.	OA du genou	Souris -/- : ostéoporose	(35, 96)
<i>PITX1</i>	↓	OA du genou	Souris +/- : OA, calcification du cartilage, sclérose osseuse Souris -/- : fente palatine, mandibule courte, membres inférieurs courts et inégaux	(97, 98)
<i>PTGS2</i> (<i>COX2</i>)	Pol.	OA du genou	Souris -/- : guérison des fractures retardée	(99, 100)
<i>PTHrP</i>	↑	OA de la hanche (↑ OA modérée et ↓ OA sévère)	↑ chez cobayes de Hartley (modèle d'OA spontanée)	(101, 102)
<i>RUNX2</i>	↑	OA du genou	Souris -/- : absence d'ossification	(64, 103)
<i>SDC4</i>	↑	OA du genou	↑ chez rats avec OA induite	(28)
<i>SMAD3</i>	Muté	OA du genou	Souris -/- : OA, dégradation du cartilage, clones, ostéophytes	(104, 105)
<i>SOX9</i>	↓	OA du genou	Souris -/- conditionnelles : absence d'os et de cartilage	(64, 106)
<i>TGFBI</i>	Pol.	Ostéophytose vertébrale	Souris -/- : squelette normal ↑ dans les ostéophytes murins	(107, 108) (109)
<i>TGFBR2</i>	↑	OA du genou (↑ dans les cellules souches mésenchymateuses)	Souris -/- conditionnelle : fente palatine, syndrome de DiGeorge Dominant négatif : OA, scoliose	(110, 111) (112)
<i>TNF</i>	Pol.	Arthrite rhumatoïde	Souris transgéniques <i>TNF</i> : perte de volume osseux	(113, 114)
<i>TRAPPC2</i>	Muté	SED, OA précoce	Non investigué	(115)
<i>VDR</i>	Pol.	OA du genou	Souris -/- : retard de croissance, rachitisme, infertilité	(116) (117)
<i>VEGF</i>	↑	OA du genou (stade avancé)	Inactivation chez la souris : retard de la croissance osseuse	(118, 119)

* ↑ : expression augmentée, ↓ : expression diminuée, Pol. : polymorphisme. (Picard, 2012)

1.4.5 Voies de signalisation

Un aspect majeur de la recherche fondamentale consiste à élucider si les différentes prédispositions génétiques à l'OA convergent vers une voie unique pouvant être ciblée par une intervention thérapeutique (120). Pour mieux comprendre les voies de signalisation impliquées dans la pathologie de l'OA, j'ai esquissé un classement des protéines codées par les gènes présentés dans le tableau III. La figure 4 regroupe la majorité de ces protéines, selon leurs interactions mutuelles et leurs fonctions.

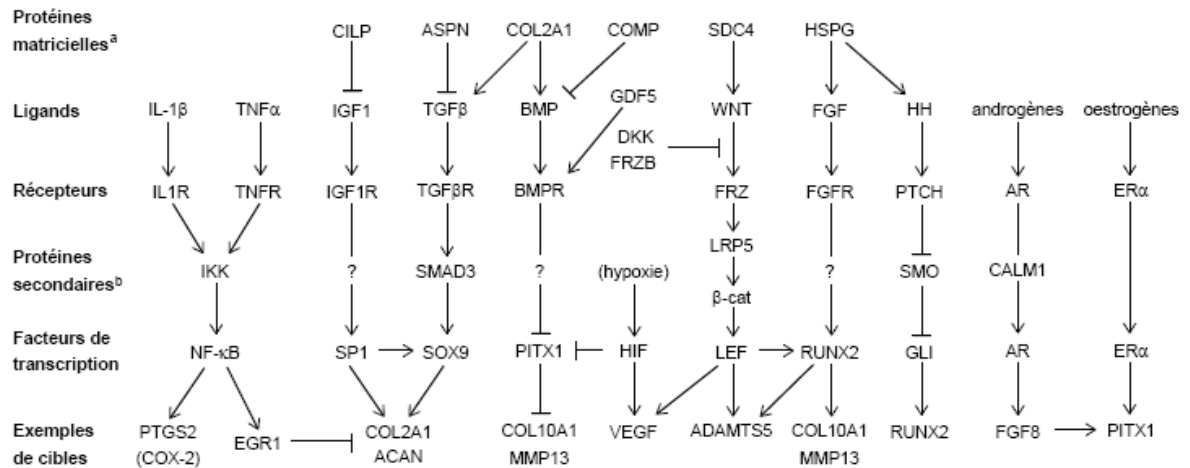


Figure 4. Voies de signalisation potentielles impliquant des facteurs associés à la pathologie de l'arthrose.

^aProtéines pouvant participer à la diffusion des molécules de signalisation ou interagir avec des inhibiteurs. ^bCo-récepteurs, seconds messagers ou enzymes responsables d'une modification post-traductionnelle. (Picard, 2012)

Les voies menant à l'activation de NF- κ B, soit celle de IL-1 β et de TNF α , sont responsables de l'aspect inflammatoire. Dans l'arthrite rhumatoïde, elles augmentent l'expression de RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand), stimulant la résorption osseuse (121). Dans l'OA, il n'y a pas de résorption osseuse mais bien au contraire, une augmentation de la densité osseuse. L'inflammation joue donc un rôle secondaire dans l'OA et elle peut être maîtrisée par l'administration d'inhibiteurs de COX-2 ou autres AINS.

La signalisation médiée par les facteurs de croissance IGF1 et TGF β stimule la biosynthèse de la matrice cartilagineuse (18). Durant le vieillissement normal, les niveaux de IGF1 circulant déclinent et pourraient donc influencer la susceptibilité à l'arthrose (122). Bien que le collagène de type II soit dégradé lors de la progression de l'OA, il semble que son expression soit augmentée durant les toutes premières étapes de la maladie (123). Une étude récente a démontré que lors de la différenciation des chondrocytes, les niveaux d'asporin (ASPN) étaient réduits (124). La répression de la voie TGF β pourrait ainsi être levée durant la phase qualifiée de régénérative.

Plusieurs facteurs favorisant l'ossification (voir Tableau III) ont un effet destructeur sur le cartilage. L'activation des voies menant à la surexpression de RUNX2, de COL10A1, de MMP13, d'ADAMTS5 ou de VEGF (Figure 4), participe à la progression de l'arthrose. Elle contribue à accélérer la maturation des chondrocytes, processus qui nécessite l'inhibition de la voie de TGF β (125). Il n'est donc pas étonnant que certaines études sur l'OA rapportent une activation de la voie de TGF β alors que d'autres rapportent le contraire. Lors des expérimentations, il est donc primordial de faire la différence entre les phases de régénération et de dégradation associées à l'arthrose.

1.4.6 Facteurs de transcription

Toutes les voies de signalisation présentées à la figure 4 sont médiées par des facteurs de transcription dont les rôles sont plus ou moins bien définis dans l'arthrose. Les

membres de la famille NF- κ B participent non seulement au processus d'inflammation et de dégradation du cartilage mais ils contribuent également à la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et la formation de pannus (126). Par conséquent, plusieurs études pharmacologiques se sont concentrées sur la modulation de cette voie, qui est naturellement bloquée par les protéines inhibitrices I κ B. Ces études ont démontré que les glucocorticoïdes et certains AINS pouvaient activer I κ B, prévenant ainsi la réponse inflammatoire.

Dans un contexte où NF- κ B est activé, celui-ci peut à son tour influencer la régulation d'autres facteurs de transcription comme EGR1 (127), SOX9 (128) ou HIF2 α (129). Bien que NF- κ B puisse lier le promoteur de *EGR1* et activer celui-ci (127), des études ont démontré une baisse générale des niveaux d'ARNm de *EGR1* dans les chondrocytes OA (61). Par contre, la présence de la protéine EGR1 a été détectée dans les régions comprenant des clones cellulaires. Il est intéressant de noter que EGR1 contribue à diminuer l'expression de *COL2A1* (collagène de type II) et de *ACAN* (AGC1 ou aggrecane), ces derniers étant normalement exprimés lors de la chondrogenèse et réprimés lors de l'hypertrophie cellulaire (130). Le facteur de transcription NF- κ B pourrait donc participer indirectement à l'hypertrophie des chondrocytes non seulement en augmentant l'expression de *EGR1* mais également en inhibant celle de *SOX9* (131).

SOX9, contrairement à EGR1, est connu pour augmenter l'expression de *COL2A1* ainsi que celle de *ACAN* (132). Il pourrait ainsi prévenir l'hypertrophie des chondrocytes lors de la phase de prolifération (106). Il a aussi été suggéré que SOX9 puisse empêcher l'apoptose des chondrocytes. D'autres études ont démontré que SOX9 était activé via SMAD3 et la voie de signalisation empruntée par TGF β (133). De façon intéressante, l'injection de papaïne, une enzyme protéolytique présente dans la papaye, a pour effet d'augmenter l'expression de TGF- β 1 et d'induire la formation d'ostéophytes (109). L'inhibition de cette voie, par l'utilisation d'une forme soluble du récepteur TGF- β -RII, prévient la formation d'ostéophytes mais réduit également la quantité de protéoglycanes et l'épaisseur du cartilage. L'effet sur *SOX9* n'a pas été examiné dans cette étude mais il serait

logique de penser qu'il soit impliqué, vu son rôle de chondroprotecteur. De plus, l'inactivation de RUNX2 et de la β -caténine par SOX9 contribue à empêcher la dégradation du cartilage (134, 135).

Le facteur de transcription RUNX2 joue un rôle crucial dans l'hypertrophie des chondrocytes et son expression, qui précède celle de *COL10A1* et de *MMP13*, est augmentée dans le cartilage OA (136). Tout comme la β -caténine (voie canonique des WNT), RUNX2 est un facteur essentiel pour la différenciation des ostéoblastes (137). Durant le processus d'ossification endochondrale, ces facteurs contribuent à la dégradation de la matrice cartilagineuse et à l'invasion des vaisseaux sanguins en augmentant l'expression de gènes tels que *ADAMTS5* (138) et *VEGF* (139). L'administration de la protéine recombinante PTH (hormone parathyroïdienne) résulte en une baisse de RUNX2 et a été proposée comme traitement pour réduire la dégradation du cartilage chez les patients OA (140).

Une autre voie de signalisation est connue, cette fois-ci, pour stimuler l'expression de *RUNX2*. La voie hedgehog, par l'entremise du facteur de transcription GLI, promouvoit la différenciation des ostéoblastes en régulant directement *RUNX2* (141). Chez la souris, le blocage pharmacologique de la voie hedgehog réduit la sévérité des symptômes arthrosiques. Les fonctions transcriptionnelles attribuées à RUNX2 pourraient aussi être augmentées par l'induction de la voie des WNT, indépendamment de la β -caténine (142). La voie non canonique des WNT pourrait aussi être impliquée dans la pathogenèse de l'arthrose en passant par le facteur de transcription NFAT1 (encodé par le gène *NFATC2*) (143). En effet, les souris *Nfat1* *-/-* démontrent une dégradation du cartilage accompagnée par la présence de clones et d'ostéophytes (93). Nos travaux, supportant ces résultats, ont démontré qu'il y avait une perte d'expression de *NFATC2* dans les chondrocytes OA (Figure 2, Annexe I). Il est à noter que la calcineurine, une phosphatase régulée par le calcium et pouvant activer NFAT1 (144), a été proposée comme cible pouvant aider au traitement de l'arthrose (145).

Un autre facteur de transcription mis en valeur dans les recherches sur l'arthrose est HIF2 α (hypoxia inducible factor 2 α). Une étude laborieuse concernant HIF2 α a démontré que son expression atteignait un maximum lors de la phase initiale de l'OA pour ensuite diminuer durant le stade final (75). De plus, la surexpression de HIF2 α entraîne une augmentation de l'activité des promoteurs de *COL10A1*, *MMP13* et *VEGF*. Les facteurs HIF sont reconnus pour être stabilisés en conditions hypoxiques. L'hypoxie peut également entraîner la perte de facteurs de transcription jouant un rôle clé dans l'homéostasie du cartilage, comme celle de PITX1 (146). Selon la base de donnée TRANSFAC (147), le site consensus ACGTGC, reconnu par les facteurs HIF, est retrouvé à la position -1125/-1120 du gène *PITX1*. Si *PITX1* était régulé directement par HIF2 α , il serait logique de croire que son expression puisse d'abord être diminuée puis augmentée durant le stade final de l'OA (tel qu'observé à la figure 3A, Annexe I).

En plus de son inhibition en condition hypoxique, *PITX1* est aussi inhibé par BMP4 (148), pouvant résulter en une augmentation de *COL10A1* et de *MMP13* (voir Article #2). À l'opposé, l'expression de *PITX1* est directement augmentée par les œstrogènes (149) et indirectement par les androgènes via FGF8 (150). Lors de la ménopause et de l'andropause, il ne serait donc pas surprenant qu'une baisse des niveaux de PITX1 puisse favoriser l'initiation de l'arthrose.

Les facteurs de transcription occupent une place centrale dans la pathologie de l'OA et PITX1 n'échappe pas à cette règle. Sa capacité de liaison avec EGR1 (151) et SMAD3 (152) lui ouvre d'autres possibilités toutes aussi intéressantes. Une revue de littérature extensive concernant PITX1 sera présentée au chapitre 2. Les prochaines sections traiteront de quelques concepts permettant de mieux saisir le rôle de PITX1 dans le cartilage.

1.5 Comparaison entre la progression de l'arthrose et le processus d'ossification endochondrale

Les voies de signalisation activées ou inhibées durant l'initiation et la progression de l'arthrose partagent plusieurs points en commun avec le processus d'ossification endochondrale. Cette section a donc pour but de faire le rapprochement entre les deux, grâce à de l'information pertinente relevée dans la littérature.

1.5.1 Développement des os longs

Les os longs sont formés par un processus d'ossification endochondrale (Figure 5), définissant le remplacement du cartilage par de l'os. En premier lieu, les cellules mésenchymateuses se regroupent et forment une ébauche aux contours plus ou moins définis. Ces cellules se différencient ensuite en chondrocytes (processus appelé chondrogenèse) qui produisent la matrice extracellulaire. Autour de l'ébauche cartilagineuse, il y a formation d'une mince couche appelée périchondre puis périoste, agissant comme réservoir de cellules souches (153). La croissance de l'ébauche cartilagineuse s'effectue en longueur par division cellulaire constante des chondrocytes. Les chondrocytes subissent plusieurs étapes de maturation en passant par l'hypertrophie et en terminant par l'apoptose, accompagnée de la calcification de la matrice. Les lacunes vides ainsi créées seront remplacées par des ostéoblastes provenant du périoste et acheminés grâce à des vaisseaux sanguins naissants. Au cours de leur croissance, les capillaires produisent un centre primaire d'ossification, faisant place au canal médullaire qui sera rempli par la suite de moelle rouge. Lorsque les vaisseaux sanguins pénètrent dans les épiphyses, des centres secondaires d'ossification se développent. Le cartilage qui persiste en surface des épiphyses deviendra le cartilage articulaire alors que le cartilage de conjugaison, situé entre l'épiphyse et la diaphyse, sera le siège de l'accroissement en longueur des os longs (154).

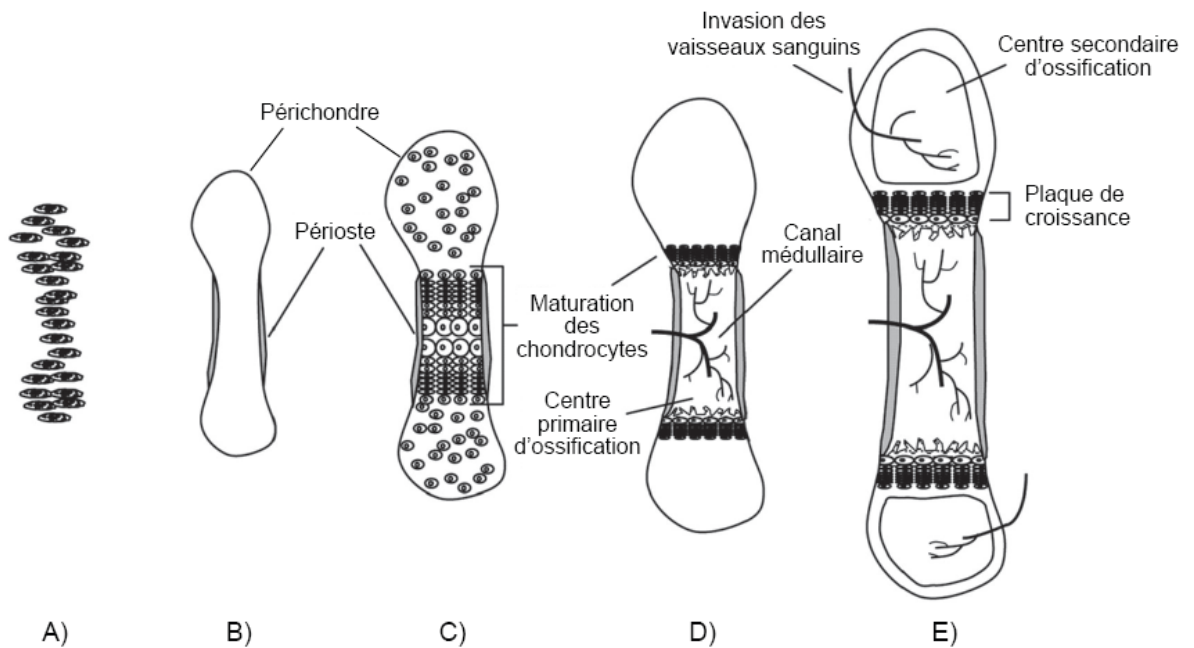


Figure 5. Développement d'un os long par ossification endochondrale.

Étapes du développement d'un os long représentant **A)** la condensation des cellules mésenchymateuses, **B)** la formation du manchon d'os périostique, **C)** la maturation des chondrocytes, **D)** la formation du centre primaire d'ossification et **E)** la formation des centres secondaires d'ossification. Schéma adapté de Boskey, 2010 (155).

1.5.2 Marqueurs de la maturation des chondrocytes

La chondrogenèse est un processus primordial qui permet de produire des chondrocytes autant durant l'embryogenèse que lors de la réparation tissulaire (156). Les cellules souches mésenchymateuses, qui expriment des molécules d'adhésion telles que la N-cadhérine, NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) et la ténascine-C (Figure 6), peuvent être différenciées en chondrocytes, même *in vitro*, via la signalisation de TGF β (157). Cette voie de signalisation, médiée par les facteurs de transcription SMAD2/3 et SOX9, contribue à l'expression du collagène de type II et de l'aggrécane (133). Cette étape précoce est également caractérisée par l'expression de PTHrP, molécule intermédiaire de la voie IHH/PTC1 (voir section 1.7.1).

Pour que le processus de maturation des chondrocytes puisse être poursuivi, la voie de TGF β doit être inhibée au profit de la voie des BMP, celle-ci mettant à contribution les facteurs SMAD1/5/8 (125). Les BMP favorisent l'expression de *NKX3.2* (158), *RUNX2* et *OSX* (159) ainsi que *FGFR3* (160). À son tour, le facteur de transcription RUNX2 pourra promouvoir l'expression de *IHH* (161), *COL10A1* (162), *VEGF* (163), puis finalement *MMP13* (164). RUNX2 joue également un rôle important dans la différenciation des ostéoblastes, aidé par ostérix (OSX) et la voie des WNT (137).

Dans le cartilage articulaire, l'arrêt de la maturation des chondrocytes doit être accompli pour que celui-ci puisse remplir ses fonctions de facilitation du mouvement (165). Les barrières qui contribuent à ce phénomène ne sont levées que dans des circonstances uniques, comme par exemple dans les cas d'arthrose. À ce moment, les chondrocytes vont commencer à proliférer et poursuivre leur maturation jusqu'à l'hypertrophie. Les voies de signalisation empruntées (section 1.4.5) témoignent en faveur de ces arguments.

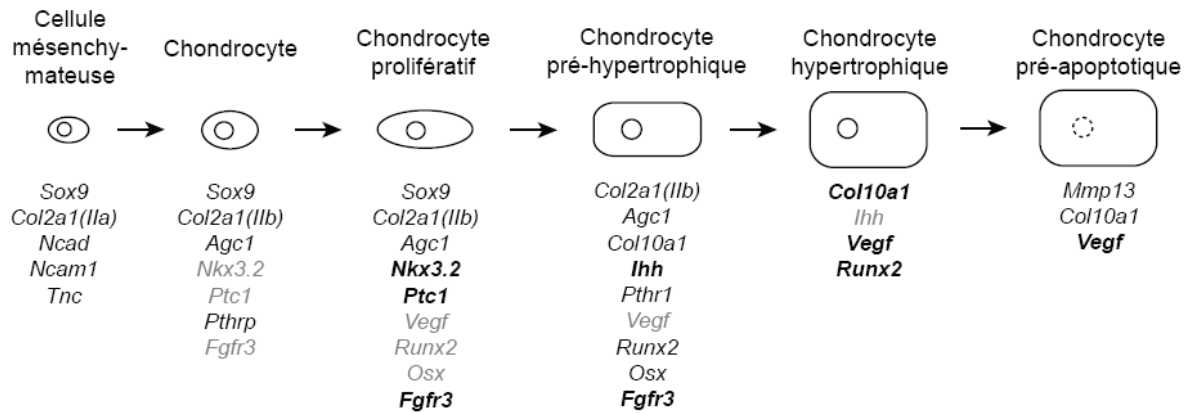


Figure 6. Marqueurs associés à chacune des étapes de la maturation des chondrocytes.

Représentation des différentes étapes de la maturation des chondrocytes en association avec la morphologie cellulaire et l'expression des gènes. Les gènes en gris et ceux en gras ont des niveaux d'expression respectivement plus bas et plus élevés que les autres gènes. Figure adaptée de Zuscik, 2008 (156).

1.5.3 Comparaison avec la progression de l'arthrose

En 1996, la microscopie électronique a permis de mieux caractériser les différents phénotypes associés aux chondrocytes présents dans le cartilage OA (166). Dans la zone superficielle, des cellules allongées possédant des filaments périnucléaires abondants représentaient un phénotype normal. Dans la zone moyenne étaient visibles des cellules aux contours irréguliers avec de nombreuses vacuoles cytoplasmiques, phénotype apparemment sécrétoire. Dans ces deux zones, des cellules plus arrondies et volumineuses avec filaments périnucléaires discontinus étaient regroupées en amas ou clones. Finalement, des cellules avec un noyau pycnotique et une membrane nucléaire dilatée, présageant la mort cellulaire, étaient retrouvées dans toutes les zones du cartilage OA. Ces informations diverses aident à déterminer l'état dans lequel le chondrocyte se trouve, soit un état quiescent, prolifératif, hypertrophique, ou apoptotique (représenté par différentes formes de cellules schématisées dans la figure 6). D'ailleurs, c'est dans cet ordre que correspondent les critères de cellularité du score histologique de Mankin (Tableau II), basés sur l'état chondrocytaire.

Dans le cartilage articulaire adulte sain, très peu de prolifération ou de mort cellulaire sont observées. Lorsque des chondrocytes sains sont isolés et mis en culture, une prolifération indique une perte de leur phénotype différencié, ou dédifférenciation, impliquant un changement visible de leurs formes générales et de leurs contours (167). Ces observations, combinées à celles du paragraphe précédent, portent à croire que la dédifférenciation des chondrocytes serait nécessaire aux activités de remodelage caractéristiques de l'arthrose. Dans le cartilage arthrosique, les chondrocytes situés dans la zone moyenne sont souvent entourés d'une matrice péricellulaire plus dense (168). La présence de protéines nouvellement sécrétées peut facilement y être observée par des techniques histologiques (Figure 4B, Annexe I, région péricellulaire). À l'occasion, il arrive qu'une activité de remodelage intense se présente sous forme de tissu fibreux ou pannus, retrouvé à la surface du cartilage (Figure 7).

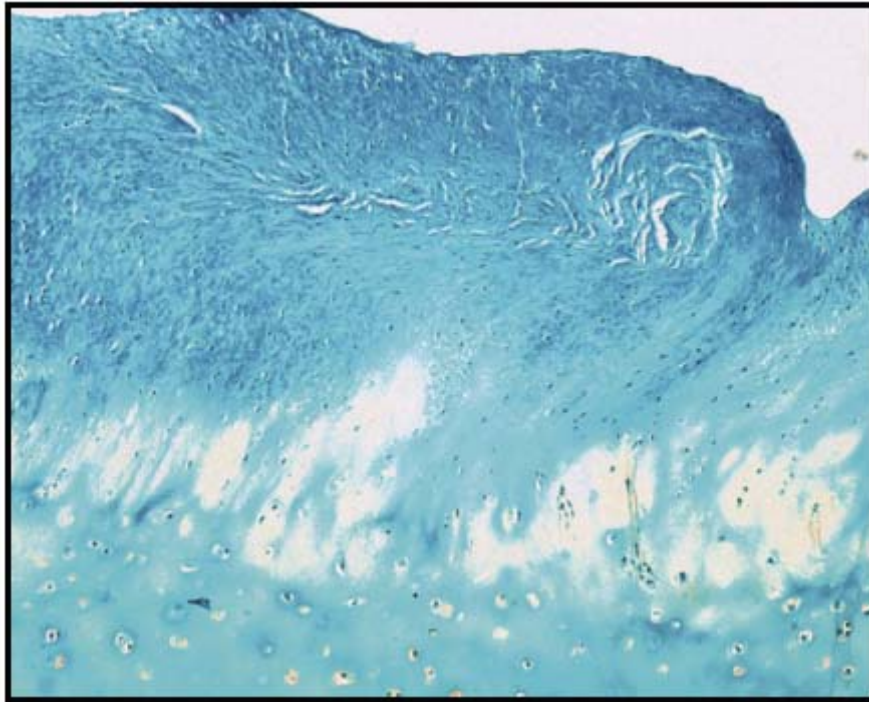


Figure 7. Représentation d'un pannus sur coupe de cartilage arthrosique.

Coupe de cartilage arthrosique colorée à la safranine-O et représentant une zone superficielle avec pannus. Une hypercellularité est observable grâce à la présence de très nombreux noyaux, identifiables par une coloration bleue foncée. Noter l'absence de coloration rouge dans cette région, caractéristique d'un tissu d'origine fibrocartilagineuse. Photographie prise avec un grossissement de 100X. Figure adaptée de Picard, 2012 (169).

Quant aux clones cellulaires, définis comme étant plusieurs chondrocytes retrouvés dans une même lacune, ils sont typiquement observables dans la plupart des cas d'arthrose (168). Leur formation est due à une prolifération accrue, menant à l'hypothèse que des cellules progénitrices puissent subsister dans le cartilage adulte (170). Ils sont souvent localisés dans la zone superficielle du cartilage, près des fissures. Les blessures et une charge mécanique excessive peuvent induire leur formation. Il a été démontré que ces chondrocytes pouvaient exprimer différents gènes tels que *SOX9*, *COL2A1*, *AGC1*, *RUNX2*, *COL10A1*, *MMP13* et certains marqueurs apoptotiques (168). Comparée à la figure 6, l'expression de ces gènes reflètent chacune des étapes de la maturation des chondrocytes, en passant par la prolifération, l'hypertrophie et l'apoptose.

Les chondrocytes articulaires OA semblent donc pouvoir traverser toutes les étapes de maturation, sans nécessairement être remplacés par la suite par des ostéoblastes. Cette dernière étape peut survenir seulement s'il y a disponibilité d'une source potentielle d'ostéoblastes, comme c'est le cas près du périoste. En effet, dans des conditions pathologiques comme l'arthrose, les cellules du périoste peuvent proliférer et donner naissance à des ostéophytes (Figure 8) (3). La réinitiation du programme d'ossification endochondrale fait indéniablement parti du processus de développement de ces ostéophytes. Dans des modèles expérimentaux arthrosiques, les premiers signes de la formation d'ostéophytes peuvent être aperçus après deux ou trois jours seulement. Le développement des ostéophytes est donc beaucoup plus rapide que le dommage causé au cartilage, celui-ci n'étant pas encore observable à l'intérieur d'une période aussi courte. Ces résultats appuient l'hypothèse voulant que le remodelage osseux précède l'érosion du cartilage lors de la progression de l'arthrose (discuté dans l'article #1).

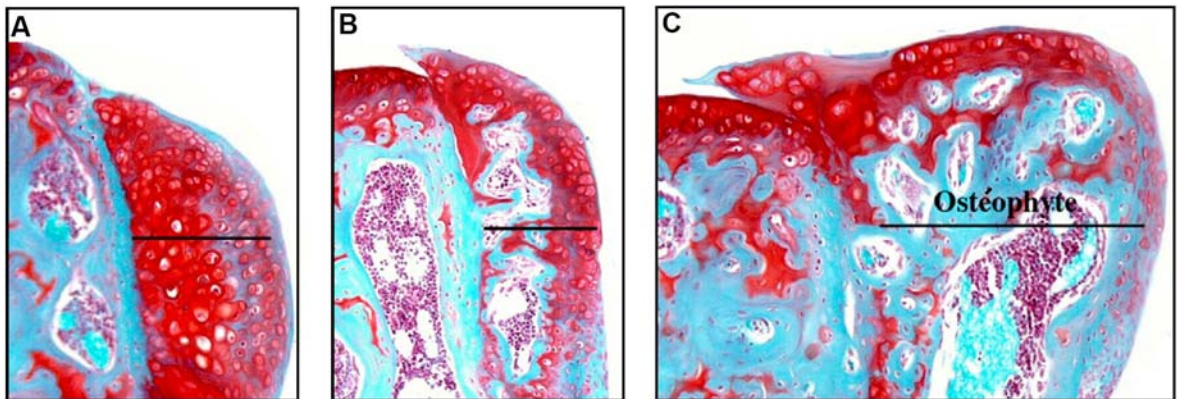


Figure 8. Développement progressif d'un ostéophyte.

Sur un tibia de souris, nous pouvons observer les différentes étapes de la formation d'un ostéophyte (trait noir) induit de façon expérimentale. **A)** La prolifération cellulaire est suivie par une maturation menant à l'hypertrophie des chondrocytes situés au centre de l'ostéophyte. **B)** Le processus d'ossification endochondrale mène à la formation d'une cavité médullaire. **C)** Un ostéophyte pleinement développé et intégré à l'os sous-chondral voit son cartilage de surface faire continuité avec le cartilage original. Figure adaptée de van der Kraan, 2007 (3).

1.6 Ostéophytes et exostoses

1.6.1 Similitudes entre les ostéophytes et les exostoses

Bien que les exostoses ne soient pas associées à l'arthrose et qu'il n'y ait pas d'ostéophytes identifiables dans la majorité des cas d'exostoses multiples, il existe bel et bien un lien entre ces derniers. Ils sont tous deux définis grossièrement de la même manière, soit comme étant des excroissances osseuses recouvertes d'une couche cartilagineuse.

Il semblerait que les cellules précurseurs du périoste, en enclenchant le programme de chondrogenèse, pourraient initier la formation autant des ostéophytes (3) que des exostoses (171). Dans les deux cas, la maturation des chondrocytes, accompagnée d'hypertrophie cellulaire et d'expression du collagène de type X, mènerait à l'apoptose puis à l'invasion des lacunes par des ostéoblastes, phénomène comparable à l'ossification endochondrale classique (3).

Il a été démontré que l'injection intra-articulaire répétée de TGF β dans les genoux de souris stimulait fortement la formation d'ostéophytes, localisés de façon semblable aux modèles arthrosiques expérimentaux (172) (Figure 9, jonction entre le cartilage et le périoste). Des expériences similaires rapportèrent que l'injection de BMP2 pouvait aussi induire la formation d'ostéophytes, ces derniers étant par contre retrouvés près des plaques de croissance (173), qui sont en fait le lieu privilégié pour la formation d'exostoses (Figure 9, jonction entre la plaque de croissance et le périoste).

1.6.2 Mécanismes impliqués dans le développement des ostéophytes et des exostoses

Les gènes *EXT*, codant pour des glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des chaînes d'héparane sulfate (HS), jouent un rôle important dans la formation d'exostoses

(174). À ce jour, cinq membres ont été identifiés chez l'humain: *EXT1*, *EXT2*, *EXTL1* (pour *EXT*-like), *EXTL2* et *EXTL3*. Plusieurs études ont démontré que des mutations au niveau des gènes *EXT1* et *EXT2* étaient responsables de la maladie exostosante héréditaire (HME) (175, 176). *EXT1* et *EXT2* semblent pouvoir catalyser l'étape de polymérisation des chaînes HS alors que les protéines *EXTL* possèdent différentes activités glycosyltransférases redondantes (177).

Il a été proposé que la protéine *EXTL3* pourrait aussi être impliquée dans l'étape de terminaison des chaînes (178) et cette hypothèse fut consolidée par un autre groupe qui démontra que la perte de *EXTL3* engendrait la synthèse de chaînes HS plus longues (177). Cette dernière étude rapportait également, à l'opposé, des chaînes HS plus courtes lorsque des siRNA dirigés contre *EXT1* ou *EXT2* étaient utilisés. Les auteurs conclurent que des chaînes HS écourtées pourraient affecter la signalisation de molécules dépendantes des chaînes HS et ainsi mener à la formation d'exostoses.

Chez la souris, il a été démontré qu'une diminution de l'activité de *EXT1* menait non seulement à une réduction du nombre de chaînes d'héparane sulfate mais également à une diffusion accentuée de la protéine IHH (179). Les auteurs suggérèrent qu'un haut degré de sulfatation est nécessaire pour restreindre la distribution de IHH. Autrement, une plus longue portée de IHH pourrait contribuer à étendre les zones de chondrocytes en prolifération et retarder l'hypertrophie, tel qu'observé dans leur modèle murin.

Que ce soit dans la maladie exostosante héréditaire ou dans l'arthrose, un manque de chaînes d'héparane sulfate pourrait conduire à l'activation de la signalisation IHH. Dans le premier cas, il a été proposé que l'inactivation de *EXT1* ou *EXT2* pourrait altérer la formation du manchon d'os périostique (Figure 5E, voir position du manchon d'os périostique par rapport à la plaque de croissance), laissant libre cours aux chondrocytes avoisinant d'engendrer le processus menant à la formation d'exostose (180).

Dans le cas de l'arthrose, ce processus ne pourrait avoir lieu à cet endroit, puisqu'il survient beaucoup plus tard chez l'adulte, bien après que les plaques de croissances aient

cessé leurs activités. Pour engendrer une ossification endochondrale complète, les chondrocytes hypertrophiés doivent être remplacés par des ostéoblastes, qui doivent provenir d'une source locale. Conséquemment, le meilleur endroit pour la formation d'un ostéophyte se trouve à la jonction du cartilage et du périoste (Figure 9), réservoir de cellules souches.

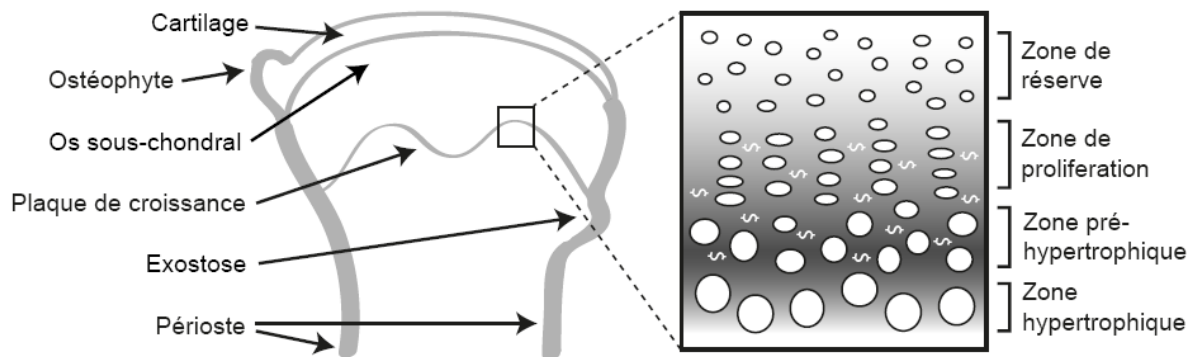


Figure 9. Schéma représentant l'extrémité d'un os long ainsi que sa plaque de croissance et la localisation privilégiée d'un ostéophyte ou d'une exostose.

Les os longs sont formés par un processus d'ossification endochondrale. Une ossification endochondrale ectopique peut mener à la formation d'ostéophytes ou d'exostoses. Les ostéophytes apparaissent à l'âge adulte et sont retrouvés à la jonction du cartilage et du périoste, à proximité de l'os sous-chondral. Les exostoses se forment plutôt durant l'enfance, à la jonction de la plaque de croissance et du périoste. Un exemple de plaque de croissance active est détaillée dans la section de droite. Les chondrocytes y sont représentés par des ovales de différentes formes et grosseurs, en lien avec leur localisation dans les zones de réserve, de prolifération, de pré-hypertrophie ou d'hypertrophie. Le gradient de concentration de IHH est représenté par un ombrage gris (gris pâle: faible concentration, gris foncé: forte concentration). La présence de EXT1 et EXT2 est nécessaire à la formation des chaînes d'héparane sulfate, représentées par le symbole \$. Les protéoglycanes à sulfate d'héparane assurent une diffusion normale de IHH, jusqu'à ses cellules cibles exprimant son récepteur PTCH1. (Picard, 2012)

1.7 Protéines d'intérêt

1.7.1 Hedgehog

Les membres de la famille Hedgehog sont des molécules de signalisation jouant un rôle important dans la régulation de la morphogenèse. Les homologues humains *Indian Hedgehog (IHH)*, *Sonic Hedgehog (SHH)*, et *Desert Hedgehog (DHH)*, partagent une très grande homologie de séquence avec le gène *Hedgehog* de la drosophile, responsable de l'établissement de la polarité segmentaire (181). Il a été démontré que IHH jouait un rôle essentiel durant l'ossification endochondrale (182). Bien que l'expression de IHH soit confinée aux chondrocytes post-mitotiques pré-hypertrophiques, la portée de sa signalisation s'étend jusqu'au périchondre, là où son récepteur Patched 1 (PTC1/PTCH1) peut être exprimé. La liaison de IHH à son récepteur mène à l'activation de Smoothed (SMO) qui déclenche ensuite une cascade de signalisation moléculaire (183). La sécrétion de PTHrP (parathyroid hormone-related protein), par les cellules du périchondre situées aux extrémités du moule cartilagineux, initie une boucle de rétroaction négative, empêchant l'hypertrophie des chondrocytes. La prolifération des chondrocytes est alors stimulée par PTHrP, tant que ceux-ci sont à sa portée. Lorsque la distance entre les chondrocytes et PTHrP devient trop grande, les chondrocytes s'hypertrophient et sécrètent IHH, fermant ainsi la boucle de régulation. IHH stimule également la différenciation ostéoblastique des cellules du périoste situées près de la zone pré-hypertrophique (Figure 5B-C, zone adjacente au périoste).

1.7.2 EXTL3

Tel que mentionné à la section 1.6.2, EXTL3 est impliquée dans l'étape de terminaison des chaînes HS, ces dernières pouvant affecter la signalisation de molécules comme IHH mais aussi FGF et BMP (184). Par un mécanisme encore inconnu, un traitement à l'héparinase est suffisant pour augmenter les niveaux d'expression de *EXTL3* (185). Outre ses fonctions enzymatiques, EXTL3 possède une région transmembranaire

pouvant potentiellement servir de récepteur pour les protéines REG (186). Récemment, une colocalisation entre les protéines REG1 et EXTL3 a été observée dans des neurones de rats (187). Cette étude a démontré que REG1 était responsable de la croissance des neurites et que cet effet était médié par EXTL3.

1.7.3 REG

Les membres de la famille REG, regroupés selon les sous-types I, II, III et IV, doivent leurs noms à leurs fonctions dans la régénération tissulaire. REG1, le prototype de la famille, a d'abord été identifié chez le rat grâce à l'isolation d'îlots pancréatiques en phase de régénération (188). Depuis, la sécrétion de REG1 a été associée à la régénération de divers autres organes tels que le foie (189), l'estomac (190) et l'intestin grêle (191). Il a été démontré que le facteur de transcription PARP contribuait à l'activation du gène *Reg* (192).

1.7.4 PARP

Les protéines PARP (poly-ADP-ribose polymerase) sont des enzymes responsables de l'addition de molécules d'adénosine diphosphate (ADP)-ribose (193). Les polymères d'ADP-ribose contribuent à augmenter la charge négative de leurs protéines cibles, pouvant ainsi modifier leurs fonctions. À ce jour, 17 isoformes de la protéine PARP ont été identifiées, avec des domaines structuraux et des fonctions différentes. PARP1, la plus abondante, est également celle qui a été la mieux caractérisée. Elle a déjà été étudiée dans le cadre de l'arthrose et ce, en lien avec son clivage suite à des signaux pro-apoptotiques (194, 195).

1.8 Objectifs de la thèse

L'objectif principal de cette thèse est d'approfondir les connaissances et de mieux comprendre les différentes fonctions associées à PITX1, plus particulièrement son rôle dans la pathogenèse de l'arthrose. Cet objectif sera accompli en décrivant le phénotype des souris déficientes en *Pitx1*, en mesurant les niveaux d'expression de PITX1 dans le cartilage OA comparé au cartilage sain, en identifiant des gènes modulés selon les niveaux d'expression de PITX1 puis en étudiant comment *PITX1* est lui-même régulé.

Les objectifs secondaires sont de mieux comprendre l'implication de PITX1 dans le développement des membres inférieurs, dans quelques maladies musculosquelettiques supplémentaires et durant le processus d'ossification endochondrale. Certaines de ces informations connexes aideront à clarifier les fonctions de PITX1 dans le cartilage articulaire. Une attention particulière sera portée sur les niveaux d'expression de *PITX1* en lien avec la prolifération et la différenciation cellulaire.

Préface au chapitre 2

L'article de revue qui suit fait office d'introduction sur le facteur de transcription PITX1. Il a été soumis en mai 2012 dans le journal *BBA - Reviews on Cancer* où il est présentement en révision. J'ai écrit cet article dans le but de faire ressortir les points communs soulevés dans la littérature et pouvant aider à mieux comprendre les différents rôles attribués à PITX1. Les articles sources couvrent une période allant de mai 1996 jusqu'à février 2012. Cet article a été une source d'inspiration qui m'a amenée à comparer le rôle de PITX1 dans l'ossification endochondrale avec la progression de l'arthrose, sujet abordé dans la discussion présentée au chapitre 5.

Dans cet article de revue, vous découvrirez que PITX1 n'est pas seulement exprimé dans la glande pituitaire, comme son nom l'indique, mais également dans l'os, le cartilage, les muscles et les fibroblastes. PITX1 joue un rôle crucial dans le développement musculosquelettique des membres inférieurs et il est impliqué dans de nombreuses maladies humaines. La surexpression de PITX1 peut induire l'apoptose et son rôle de suppresseur de tumeur est consolidé par sa capacité à activer *p53* et inhiber *TERT*. Par conséquent, de bas niveaux de *PITX1* ont été observés dans des cancers d'origines très variées et sa baisse d'expression semble également corrélée avec la dédifférenciation cellulaire. Ces informations précieuses nous aideront à mieux comprendre son rôle dans la pathologie de l'arthrose.

Chapitre 2 - PITX1

PITX1: au-delà de la glande pituitaire

2.1 Title page

PITX1: Beyond the Pituitary Gland

Cynthia Picard^{1,2} and Alain Moreau^{1,2,3}

¹Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases, Sainte-Justine University Hospital Research Center, Montreal, Quebec, Canada

²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

³Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Address correspondence to:

Prof. Alain Moreau

Director, Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases
Sainte-Justine University Hospital Research Center

2.2 Abstract

PITX1 is a homeobox transcription factor initially discovered in the pituitary gland. Contrary to its original moniker, PITX1, now known as paired-like homeodomain transcription factor, is expressed in many tissues beyond the pituitary gland, including bone, cartilage, muscle and fibroblast cells. Mouse and fish genomic studies reveal a distal cis-acting regulatory element responsible for *Pitx1* tissue-specific expression that has been highly conserved during evolution. This comprehensive review focuses on the regulation of *PITX1*, its numerous interacting partners and downstream targets, and its involvement in hindlimb musculoskeletal development and human disease. *PITX1* has been associated with hormonal hypothalamic-pituitary-adrenal axis disorders, Treacher Collins syndrome, cleft palate, clubfoot, and polydactyly, as well as with X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda, scoliosis, and certain forms of muscular dystrophy. Its role in osteoarthritis is currently being investigated. Furthermore, *PITX1* dysregulation in osteoarthritis could account for the re-initiation of the endochondral ossification program observed in osteophyte outgrowths. Indications are emerging of a role for *PITX1* in cancer development, including that of tumor suppressor and regulator of the dedifferentiation process. Indeed, extensive literature supports a dose-dependent relationship between PITX1 and cell proliferation and differentiation. Clearer identification of *PITX1* regulatory pathways and downstream targets will enable the design of more effective diagnosis and therapeutic interventions.

Key words: PITX1; pituitary homeobox transcription factor; paired-like homeodomain transcription factor; musculoskeletal disease; cancer

2.3 Review

2.3.1 Introduction

The first member of the *Pitx* gene family, now known as paired-like homeodomain transcription factor, was named pituitary homeobox 1 (*Pitx1* or *Ptx1*) for its potential involvement in the regulation of pituitary cell differentiation (1). The *Pitx1* gene was cloned in mice in 1996, with the initial publication revealing an encoded protein that could bind to a specific DNA sequence in the promoter region of the pro-opiomelanocortin (*Pomc*) gene. That same year, an independent team cloned and characterized another homeobox gene, *RIEG*, named for its involvement in Rieger syndrome, or Axenfeld-Rieger syndrome type 1 (2). Mutations in *RIEG*, later renamed *PITX2*, were associated with ocular anomalies, dental hypoplasia, and a protuberant umbilicus, along with occasional heart, pituitary and limb abnormalities. Thereafter, a number of papers were published regarding the role of *Pitx2* in left-right asymmetry (3-8). Screening of recombinant DNA libraries led to the identification of *Pitx3*, a gene strongly related to *Pitx1* and *Pitx2* (9). Mutations in *PITX3* have been identified in families with cataracts (10) and *PITX3* polymorphisms have been associated with Parkinson's disease (11-15) and, more recently, schizophrenia (16, 17).

Whereas *Pitx1* and *Pitx2* are co-expressed in the branchial arches, pituitary gland, teeth and hind limbs, *Pitx3* is expressed in the eyes, midbrain and tongue (18). According to the NCBI database (www.ncbi.nlm.nih.gov), the three human PITX proteins differ in only two positions of their 59-amino-acid homeodomain (Fig. 1). As the amino acids making specific contact with DNA are identical, all are capable of binding to the TAATCC consensus sequence. However, as PITX1, PITX2 and PITX3 do not share the same protein-protein interaction domain, it is likely that specific regulation is achieved through the use of different binding partners. It is noteworthy that the last two exons of *PITX1*, encoding the

homeodomain and the POU1F1 (or PIT1) interacting domain, are highly conserved in humans, chimpanzees, dogs, mice, rats, chickens and zebrafish, making animal models possible. Because human *PITX* genes do not share promoter sequence homology and are indeed located on different chromosomes (*PITX1*: 5q31; *PITX2*: 4q25 and *PITX3*: 10q25), they are probably independently regulated. During development, certain anatomical sites including the bladder, stomach, hindgut and pancreas were shown to preferentially express *Pitx1*, whereas the forelimbs, heart, umbilicus, kidney and bone marrow expressed *Pitx2* (18). Information on *PITX1* may therefore not be readily transferable to *PITX2* or *PITX3*.

In this review, we will examine some of the historical evidence of phenotypic expression of *PITX1* and then investigate regulation of the gene as well as interactions between the *PITX1* gene product and its downstream targets. We will present current findings with evidence, and then move on to explore the relationship between *PITX1* and human disease, including musculoskeletal diseases and emerging indications of a *PITX1* role in cancer development.

2.3.2 Pitx1 and hindlimb identity

In 1997, a team of researchers identified a novel homeobox gene whose spatiotemporal expression suggested a role in hindlimb development and identity (19, 20). This human protein was named backfoot (BFT) and its amino acid sequence was 96% identical to mouse *PITX1*; it was subsequently renamed *PITX1*. Subsequent studies in chickens confirmed the importance of *Pitx1* in the determination of hindlimb identity (21, 22). The expression pattern of *Pitx1* was similar to that of T-box 4 (*Tbx4*): both were expressed in hindlimbs but never in forelimbs and their expression was inducible by ectopic fibroblast growth factor (FGF) (21). Elegant experiments showed that forced expression of *Pitx1* in chick wings not only induced the expressions of *Tbx4*, homeobox C10 (*Hoxc10*) and homeobox C11 (*Hoxc11*), but also led to a leg-like appendage instead of a winged phenotype (22, 23). In 2001, serial analysis of gene expression in mice confirmed that

Pitx1, *Tbx4*, *Hoxc10* and *Hoxc11* along with *Hoxc9* were specifically expressed in developing hindlimbs as opposed to forelimbs (24). T-box 5 (*Tbx5*) was the only marker found to be specific to forelimbs, confirming previous work regarding limb identity (25). Interestingly, in a study on *Tbx5* conditional knock-out mice deprived of forelimbs, *Tbx4* could initiate and maintain limb outgrowth, but not *Pitx1* (26). The authors concluded that *Pitx1* was a candidate axial cue required for hindlimb-specific morphology. Further investigation showed that misexpression of *Pitx1* in mouse forelimbs resulted in the acquisition of hindlimb-like muscles, tendons and bone (27). The simultaneous loss of posterior digits corresponded to downregulation of the sonic hedgehog (*Shh*) and patched homolog (*Ptch1*) genes, both involved in limb anterior-posterior patterning. Although *Pitx1* may be considered a master regulator of hindlimb identity, recent work has confirmed the main downstream effector to be *Tbx4* (28), able to rescue most of the hindlimb defects observable in *Pitx1*^{-/-} mice.

2.3.4 Phenotype of *Pitx1* knockout mice

Pitx1-deficient mice were bred in the late 1990s and their phenotype described for the first time in 1999 (22, 29). Heterozygous mice were phenotypically normal at birth and fertile, unlike their homozygous counterparts, which would die shortly after birth: mandibular abnormalities, observable as early as embryonic day 14.5, caused feeding incapacity. Homozygous embryos suffered from severe micrognathia, cleft palate, bifurcated tongue and also scoliosis (scoliosis reported by A.M., unpublished data). The most striking phenotypic feature of homozygous mice was the hindlimbs. Both femurs were shortened, the right more so than the left. This left-right axial asymmetry could be explained by possible phenotypic rescue by the left-specific *Pitx2*. Knee joints deprived of *Pitx1* showed no distinct patella and fabella, acquiring instead an elbow-like appearance. Except for digits, changes in bone morphology reflected a transformation of hindlimb into forelimb-like structures, reflecting the chick experiments mentioned earlier. At embryonic day 17.5, *Pitx1*^{-/-} tibiae revealed greatly reduced articular cartilage but an expanded layer of

hypertrophied chondrocytes, surrounded by decreased mineralization, as if the cells had failed to undergo apoptosis-mediated mineralization. The altered endochondral ossification process resulting from the absence of *Pitx1* would explain the shorter hindlimbs. A more recent study regarding bone size in vertebrate limbs identified a highly conserved putative PITX1-binding site in the distal promoter region of *Tbx4* (30). When this region, named hindlimb enhancer A (HLEA), was deleted in mice, hindlimb bone size was decreased. Of note, an unrelated human genome-wide study has identified single-nucleotide polymorphisms (SNPs) significantly associated with adult height near both *PITX1* and *TBX4* genes (31).

2.3.5 Pitx1 and evolution: lessons from the fish

From an evolutionary perspective, studies on limb identity, morphology and length have proven extremely useful for determining gene function. In stickleback fish, pelvic spine deficiency in certain fresh water populations has been attributed to the absence of *Pitx1* expression (32). Fresh water sticklebacks further lack the robust bony armour characteristic of their marine cousins and exhibit variations in bony characteristics such as jaw shape (33). *Pitx1* was shown to be expressed not only in developing pelvic fin buds but also in the mouth and lower jaw of marine stickleback larvae (34). As in *Pitx1*^{-/-} mice, sticklebacks naturally lacking *Pitx1* expression showed reduction and asymmetry in their hindlimb equivalents. The use of the stickleback model led to the identification of a major locus controlling pelvic reduction (34). This chromosomal region contained not only *Pitx1* but other genes that in turn might influence *Pitx1* expression. Further to this finding, a recent study has uncovered a 501-bp cis-regulatory element responsible for *Pitx1* pelvic-specific expression (35). Deletions near this region were found in various pelvic-reduced stickleback populations; reintroduction of a functional 501-bp transgene was sufficient to produce enlarged pelvic girdles and spines. Located about 32 kb upstream of *Pitx1*, this noncoding region was shown to contain putative binding sites for homeobox proteins HOXC10 and HOXA9 as well as PBX1, a homeobox transcription factor involved in the

regulation of osteogenesis. Interestingly, in Fugu fish, a different mechanism was responsible for a similar phenotype: pelvic loss was associated with altered expression of homeobox protein HOXD9A, a marker for pelvic fin position, reflecting a bud-positioning defect rather than *Pitx1*-associated bud-initiation failure (36).

2.3.6 Regulation of *Pitx1*

Though regulation of *Pitx1* has been the subject of much speculation, only a few studies to date have demonstrated direct effects on the *Pitx1* gene promoter. *In vivo* experiments have shown that FGF signalling could induce *Pitx1* expression (21, 37, 38), but without identifying receptors or downstream effectors. Through developmental studies, secretory molecules have been uncovered that could affect *Pitx1* expression either positively or negatively, such as endothelin-1 (39) or bone morphogenetic protein 4 (BMP4) (38, 40), respectively. In several breast cancer cell lines, estrogen was shown to upregulate *PITX1* via direct binding of the estrogen nuclear receptor ESR1, to an enhancer region located 12 kb upstream of *PITX1* (41). Genistein, an isoflavone chemically related to estrogen, strongly upregulated *Pitx1* in mouse genitalia (42). In other mouse embryonic tissues, *Hoxa2* (43, 44) and *Hoxd12* (45) blocked *Pitx1* expression. *In vitro* experiments have revealed that homeobox proteins OTX1 and PITX2 each upregulated *Pitx1*, as well as PITX1 itself, a form of autoregulation with a positive feedback loop involving DNA-binding (46). Moreover, in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD), the double homeobox 4 transcription factor (DUX4) specifically binds to the *PITX1* promoter and acts as a transcriptional transactivator (47). Of note, *Pitx1* expression was shown to be sensitive to hypoxia (48), viral infection (49), retinoic acid (50) and DNA damage (51).

2.3.7 Overexpression of *PITX1* can lead to apoptosis

A study published in 2007 showed that forced expression of *PITX1* in MCF-7 breast cancer cell line led to apoptosis, establishing that PITX1 positively and directly regulated

the gene encoding tumor protein p53 (*TP53*) (52). Although p53 was known to be induced by hypoxia, DNA damage, and other stress-related signals, transcriptional regulation of *TP53* was hitherto unascertained. A PITX1 pro-apoptotic effect was also observable, albeit to a lesser extent, in the human osteosarcoma cell line MG-63, which lacks functional p53. *PITX1* overexpression demonstrably caused failure of sister chromatids to separate during anaphase and thus disrupted cell division.

Other p53-independent PITX1 apoptotic mechanisms have been demonstrated. In terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labelling (TUNEL) assays on p53-proficient as well as p53-deficient cells, the anti-cancer drug imatinib, a tyrosine kinase inhibitor, significantly dampened PITX1-mediated apoptosis. The enzyme c-Abl tyrosine kinase normally translocates into the nucleus in response to DNA damage and induces both post-transcriptional expression and phosphorylation of PITX1 (51). Moreover, doxorubicin and etoposide, two other anti-cancer agents, upregulated PITX1 expression at the protein level, though not at the mRNA level. In yet another recent study, transfection of *PITX1* cDNA into human SNU449 cells led to apoptosis and upregulation of the RAS protein activator-like 1 gene (*RASAL1*) (53), confirming earlier results that *RASAL1* was a downstream target of PITX1 (54).

2.3.8 PITX1 interacting partners and downstream targets

PITX1 has a wide range of transcriptional targets (Table 1) including genes for hormones (*Pomc*, *CGA*, *LHB*, *Fshb*, *Tshb*, *Gh1* and *PRL*), receptors (*Gnrhr*, *Sstr2*, *EDNRA* and *Mtnr1*), transcription factors (*Lhx3*, *Pou1f1*, *Hoxc10*, *Hoxc11*, *Tbx1*, *Tbx4* and *TP53*) and many others. Most of the time, PITX1 acts as a moderate activator of transcription but it can act in synergy with other cofactors to produce stronger activation (Table 1). PITX1 can also influence the expression levels of its own binding partners, such as LHX3 or POU1F1. Surprisingly, cofactors like the nuclear receptor NR5A1 (or SF-1) and the estrogen receptor ESR1 can be found in conjunction with PITX1 in both activator and

repressor complexes. Early growth response factor-1 (EGR1), known to act synergistically with PITX1 to enhance *LHB* transcription, can also reduce the effect of PITX1 on the melatonin receptor promoter (*Mtnr1*). Although not shown to be a direct partner of PITX1, the glucocorticoid receptor NR3C1 can bind to a PITX1 response element in the *Pomc* promoter region, resulting in transcriptional repression. Other studies have demonstrated that homeobox protein HESX1, a transactivation *Lhb* antagonist (55) and GATA transcription factors, positive *Lhb* regulators (56), compete with PITX1 for binding sites on the *Lhb* promoter. A few papers have suggested a secondary function for PITX1 as a cofactor capable of forming a complex that binds to DNA on a distinct response element. Even when the PITX1 binding site was mutated, PITX1 and NR5A1 could still synergize to activate *Lhb* (57). The authors demonstrated that PITX1 could bind directly to NR5A1 and modulate its activity by mimicking the role of a putative ligand. In a related study, PITX1 and EGR1 were shown to prevent the interaction of AR with the ligand-binding domain of NR5A1 that would otherwise lead to *Lhb* repression (58).

Numerous transcription factors need post-transcriptional modification to become activated. Whether this is the case for PITX1 remains largely elusive. As discussed earlier, PITX1 can be phosphorylated by the c-Abl tyrosine kinase (51). Using nuclear extracts from murine L β T2 cells, researchers showed that PITX1 was phosphorylated on three residues when bound to the promoter region of the Chinook salmon *Lhb* gene and mammalian two-hybrid assays demonstrated that PITX1 could form homodimers (59). However, no publication has ever mentioned how phosphorylation of PITX1 affected its capacity to bind to DNA or to other molecules. On the other hand, ubiquitination of NR5A1 facilitated its interaction with PITX1, while sumoylation had the opposite effect (60). Of note, PIN1, a peptidyl-prolyl cis/trans isomerase, was required for NR5A1 ubiquitination and could also directly bind to PITX1. In L β T2 cells, both NR5A1 and PITX1 were polyubiquitinated. PIN1 is known to alter the stability and localization of its interacting proteins, which raises the question of whether PITX1 might be found outside the nucleus. Many mechanisms are known to sequester transcription factors outside the nucleus. For

instance, the SEDLIN protein, encoded by the trafficking protein particle complex 2 (*TRAPPC2*) gene, can inhibit NR5A1 and PITX1-mediated transactivation of the *LHB* promoter by sequestering NR5A1 in the cytoplasm (61). Yet, in the COS-7 cell line, despite the interaction of SEDLIN with PITX1, their colocalization was observed in the nucleus only (62). In a totally different context, PITX1 was predominantly localized in the cytoplasm when HepG2 cells were transfected with a CMV-Flag-PITX1 construct (63). More experiments will be needed to determine whether this could be an artefact due to artificial tagging and to further investigate PITX1 subcellular localization.

In a systematic mapping of human protein-protein interactions using a high-throughput yeast two-hybrid system, PITX1 was shown to interact with novel partners such as the RHOX homeobox RHOXF2 (or PEPP-2), the RNA binding protein with multiple splicing RBPMS, and the dishevelled homolog DVL3 (64). According to the NCBI database, RHOXF2 localizes exclusively in the nucleus, RBPMS can be found in both nucleus and cytoplasm, while DVL3 is specific to peripheral cytoplasm. Although yeast two-hybrid assays can lead to false positives, these results may be of interest if PITX1 is indeed found outside the nucleus. RBPMS was shown to promote the nuclear accumulation of the SMAD proteins (65), some of which were identified in PITX1-containing complexes (Table 1). The binding of PITX1 to DVL3, associated with the known canonical Wnt pathway, would shed light on an entirely new role for PITX1 (66). Of note, many papers have been published regarding the Wnt/Dvl/beta-catenin and PITX2 pathway (67-69). Nevertheless, the interactions between PITX1 and DVL3 or RBPMS have still to be confirmed before further investigation is undertaken.

It is also crucial to keep in mind that every cellular environment is different. PITX1 may have a subset of partners in one species or cell type and not another. Some downstream targets of PITX1 were shown to be context-specific, as demonstrated by the following examples (Table 1). PITX1 was shown to exert a positive effect on the murine *Cga* promoter transfected into both human (HeLa) and monkey fibroblasts (CV-1 cell line),

but a negative effect on the porcine *CGA* promoter transfected into mouse gonadotroph cells (L β T2). In L929 and HeLa cells, mouse PITX1 was shown to repress the *Ifna4* gene, while in HepG2 cells, human PITX1 activated it. Importantly, the length of the transfected promoter can influence results as much as cell type and disease status.

2.3.9 PITX1 and human disease

In the preceding sections, we examined the developmental and apoptotic roles of *PITX1* as well as its regulation and interaction with target genes and other proteins. We will now explore how *PITX1* dysregulation can lead to human disease. *PITX1* has been associated with a variety of disorders related to misexpression, chromosomal positioning, or SNPs.

2.3.9.1 Hormonal disorders

PITX1 is responsible for the activation of most genes encoding human pituitary hormones. Not surprisingly, PITX1 protein has been detected in pituitary adenomas secreting GH, ACTH, PRL, FSH β , LH β , TSH β and α GSU (70, 71). Symptoms differ depending on the hormone produced. Patients with GH-producing tumors suffer from acromegaly, an enlargement of the hands, feet, nose, lips and ears, with brow and lower jaw protrusion (72). Individuals with ACTH-producing pituitary tumors present with Cushing disease, manifesting with symptoms such as rapid weight gain, thinning of the skin, hyperglycemia, hypertension, muscular atrophy, loss of bone mass, or mood swings with depression (73). In the case of excessive ACTH, the promoter region of the precursor *POMC* gene, containing a PITX1 response element, turned out to be unmethylated; *in vitro* methylation was sufficient to reduce POMC expression (74). Elevated ACTH levels would thus be due to a lack of DNA methylation rather than to *PITX1* upregulation. On the other hand, hyposecretion of POMC and ACTH was observed in a subgroup of individuals with autism (75). Although autism was associated with particular SNPs within the *PITX1* gene

(76), expression levels of *PITX1* have never been ascertained. Downregulation of *PITX1* has also been strongly linked to aggressive-invasive PRL tumors (77), despite the fact that *PITX1* was required for *PRL* expression. *PITX1* expression is downregulated in other types of tumors as well, as will be discussed in the following section.

2.3.9.2 Cancer

Given that overexpression of *PITX1* can lead to p53-dependent apoptosis (52), *PITX1* has been envisaged as a tumor suppressor. An earlier genetic screen had already confirmed *PITX1* as a suppressor of tumorigenicity, through activation of *RASAL1* which in turn downregulates the RAS pathway (54). Indeed, inhibition of *PITX1* in human primary cells induced proliferative signals mimicking oncogenic activation of the RAS pathway, whereas reintroduction of *PITX1* into human colorectal cancer cells inhibited cell proliferation and tumorigenicity. *PITX1* has significantly lower expression levels in colorectal cancers expressing wild-type *KRAS* than in those expressing mutant *KRAS* (78). The role of *PITX1* as a tumor suppressor was further supported by its ability to inhibit the expression of telomerase reverse transcriptase (*TERT*), an enzyme essential for maintaining telomere length and crucial for cell immortalization and cancer progression (79). A series of experiments confirmed *PITX1* as a gene candidate for a putative telomerase repressor located on human chromosome 5 (80); *TERT* promoter activity depended exclusively on *PITX1* consensus binding sites (79). Furthermore, *PITX1* could bind directly to the *TERT* promoter and inhibit telomerase activity in both humans and mice. *PITX1* dysfunction is likely involved in the development of a number of cancer types.

The cancer microarray database ONCOMINE (www.oncomine.org) is a web-based data-mining platform allowing the identification of patterns from published gene-expression and microarray analyses (81). Although not mentioned in the original publications (54), this tool has shown that *PITX1* was downregulated in prostate cancer (82) and bladder cell carcinoma (83).

PITX1 mRNA was decreased in Barrett's esophagus as compared to normal esophageal specimens, and further decreased in Barrett's-associated adenocarcinoma (84). According to this study, the process of epithelial cell dedifferentiation seen in Barrett's esophagus, both morphologically and genetically, may be attributable to *PITX1* dysregulation. *PITX1* is downregulated in human lung cancer (85), lingual squamous cell carcinoma (86), gastric cancer (79, 87), salivary gland adenoid cystic carcinoma (88) and liver cancer (53). Low levels of *PITX1* have also been associated with poorly differentiated tumors in the case of lung cancer (85), gastric cancer (87) and some dopamine-resistant PRL tumors (77).

Human embryonic stem cells (hESCs) have been very useful in clarifying the association of *PITX1* with cell differentiation. HESCs differentiated into dopaminergic neurons exhibited a 6.6-fold upregulation of *PITX1* as compared to undifferentiated hESCs (89). The use of cancer cell lines has further clarified the role of *PITX1* in cell differentiation, adhesion and invasion. *PITX1* was downregulated 3.4-fold in non-small cell lung cancer cell line D51 and 8.1-fold in small cell lung cancer cell line H526, as compared to normal bronchial epithelial cells (90). Small cell lung cancer is highly aggressive, with invasive potential and the ability to metastasize. Treatment of H526 cells with 5-bromodeoxyuridine, a differentiation inducing agent, led not only to the upregulation of *PITX1* but to a dramatic phenotypic change (91). Cells in suspension were converted to adherent cells with reduced colony-forming potential on soft agar and suppressed growth rate. Upregulation of *PITX1* could therefore contribute to reduce cancer malignancy, although it remains unclear if this represents a simple association or truly a causal element. Furthermore, in several lung cancer cell lines, *PITX1* mRNA and protein levels were downregulated, but the mechanism is unclear and did not involve promoter hypermethylation or histone acetylation of the *PITX1* promoter (85). Hypermethylation, however, was observed in salivary gland adenoid cystic carcinoma (92) and human hepatocellular carcinoma (53), in association with *PITX1* transcriptional repression.

Combining the results obtained from this review, we propose a model whereby *PITX1* expression levels could influence cell proliferation and differentiation (Fig. 2). Moderate *PITX1* levels would be associated with a normal proliferation rate; elevated levels, with cell growth arrest and apoptosis; and low levels, with cell dedifferentiation, in the extreme leading to exaggerated cell proliferation and cancer.

2.3.9.3 Musculoskeletal disease

Treacher Collins syndrome and 5q31 deletions. Treacher Collins syndrome was the first disease ever to be associated with *PITX1*, due to the close proximity of *PITX1* to an area on chromosome 5 involved in Treacher Collins-Franceschetti syndrome (93). Although characteristic craniofacial abnormalities may be imputed to loss of *PITX1* expression, no direct links were successfully established. Mutations in proximal regions of the gene responsible for Treacher Collins (*TCOF1*) were later discovered (94, 95). The search for aberrations in the human *PITX1* gene was spurred on when a patient presented with pituitary hypoplasia, os odontoideum, renal dysplasia and right leg anomalies, and clinical symptoms reminiscent of *Pitx1* knock-out mice (96). No mutations were found by direct genomic DNA sequencing. Note that the *PITX1* promoter region was not sequenced nor its expression levels measured. Deletions of the *PITX1*-containing 5q31 chromosomal region, however, were reported as early as 1980, even before *PITX1* was discovered (97). Despite the small number of individuals with deletions encompassing 5q31 reported since, some common features include short stature, developmental delay, intellectual disability, hypotonia, dislocated hips, clubfoot and scoliosis (98). Characteristic dysmorphic features also include a short neck, prominent forehead, downslanting palpebral fissures, orbital hypertelorism, a flat nasal bridge, cleft palate, micrognathia and ear abnormalities. Many genes other than *PITX1*, located in the 5q31 region, could account for these features. Those attributable to *PITX1* came to light when its contribution to clubfoot disease was first revealed.

Clubfoot. In 2008, a single missense mutation (E130K) in PITX1 was identified in all individuals affected with clubfoot in a five-generation family (99). In addition to this predominantly right-sided defect, some family members suffered from lower-limb malformations including patellar hypoplasia, oblique talus, tibial hemimelia, developmental hip dysplasia and preaxial polydactyly. Of note, the *PITX1* E130K mutation, located in the homeodomain, reduced the ability of PITX1 to transactivate a luciferase reporter, without affecting its nuclear localization, thus exerting a dominant negative effect on transcription. The authors of the study found no additional mutations in 100 clubfoot patients. Further investigation in other patients revealed clubfoot to be associated with recurrent chromosome 17q23.1q23.2 microduplications containing *TBX4*, a gene regulated by PITX1 (100). Affected individuals had short stature but no facial dysmorphisms, patellar hypoplasia or polydactyly. A role for the *PITX1-TBX4* pathway in the etiology of clubfoot has been further supported by recent findings. A chromosome 5q31 microdeletion was identified in three family members with isolated clubfoot but not in unaffected relatives (101). These patients did not present the other lower-limb malformations associated with the *PITX1* E130K mutation, possibly because the E130K mutant was able to sequester PITX1 interacting partners causing the more severe phenotype. Thus, in both humans and the mouse model, vascular, skeletal and muscular hypoplasia have been associated with clubfoot and *PITX1* haploinsufficiency.

Polydactyly. Mirror-image polydactyly is a very rare congenital anomaly characterized by duplication of digits with an anterior/posterior axis of symmetry (102). This malformation is often observed in combination with clubfoot and tibial hemimelia, as reported with the *PITX1* E130K mutation (99). Recently, analysis of DNA from three individuals affected with mirror-image polydactyly allowed for the identification of distinct *PITX1* deletions (102). A heterozygous 35-bp deletion in the PITX1 protein-protein interaction domain was identified in one patient. Contrary to the E130K mutation, this new mutation would prevent the binding of PITX1 to an essential cofactor. The other two individuals presented with much larger deletions on chromosome 5q31. Interestingly,

among the gene deletions listed in both cases, *EGR1* was the only gene coding for a known partner of PITX1. These results suggest that prevention of EGR1 binding was a necessary event leading to mirror-image polydactyly. This hypothesis, explained in further detail in Figure 3, is also supported by the absence of polydactyly in patients with 5q31 deletions excluding the *EGR1* gene, which is located downstream of the *PITX1* gene (101, 103). *PITX1* deletion alone is not sufficient to cause polydactyly, as this malformation was never observed in *Pitx1* knockout mice.

Facioscapulohumeral muscular dystrophy. Expression profiles of *Pitx1*^{-/-} mice hindlimb buds, as compared to *Pitx1*^{+/+}, showed downregulation of many genes involved in muscle development including the mu-crystallin (*Crym*) gene (101). CRYM, however, is upregulated in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) (104).

FSHD is one of the most common inherited forms of muscular dystrophy, an autosomal dominant disorder resulting from characteristic deletions of D4Z4 macrosatellite repeats on the 4q35 subtelomeric region of chromosome 4 (105). Affected individuals show progressive weakness and atrophy of the muscles of the face, upper arms, and abdominal muscles, resulting in an asymmetrical appearance and lordosis. Muscle biopsies from FSHD patients show a strong upregulation of *PITX1* when compared to samples from normal muscle or from individuals with other neuromuscular diseases (47, 106). In a related study, however, no clear upregulation of *PITX1* was observed between control and FSHD proliferating myoblasts in culture and only a trend when myoblasts differentiated into myotubes (107). Illustrative of how *PITX1* expression levels may be affected by proliferation and differentiation signals, these results exemplify that culture conditions do not always reflect the *in vivo* environment. Nonetheless, other results further support an activating role for PITX1. First, FSHD patients carry SNPs in the region distal to the last D4Z4 repeat, that maps to the *DUX4* gene and stabilizes the DUX4 transcript (105). In addition to inducing the *CRYM* gene (106), DUX4 has been shown to directly activate *PITX1* (47). Second, overexpression of *DUX4* in zebrafish and mouse muscle cells caused

myopathic effects through a p53-dependent proapoptotic mechanism, likely involving *PITX1* (108). Third, overexpression of *PITX1* can upregulate *TP53* expression in human myoblasts and cause reversible muscle atrophy in mice (106). Finally, the latter study also identified a putative PITX1-binding site on the promoter of the F-box protein 32 (*Fbxo32* or *Atrogin1*), a gene associated with muscle atrophy. Further investigation is needed to identify additional transcriptional targets of PITX1, since no known target could as yet account for the increased angiogenesis in FSHD-associated retinal vasculopathy (109).

Osteoarthritis. In 2007, PITX1 was shown to play a role in osteoarthritis (OA), an unrelated disease characterized by joint inflammation and increased angiogenesis (110). Downregulation of *PITX1* was observed in knee cartilage samples of OA patients when compared to age-matched controls. Recent results, however, showed that *PITX1* expression levels were elevated at the end stage of the disease, characterized by increased cell death (C.P., A.M., unpublished data). These effects may be attributable to *PITX1* expression levels (Fig. 2) or to a recapitulation of the endochondral ossification program whereby an initial proliferative stage is associated with chondrocyte dedifferentiation, leading to hypertrophy and terminal differentiation, accompanied by apoptosis, angiogenesis and matrix calcification (111). Cartilage calcification and subchondral bone thickening, hallmarks of OA, were easily observable in the knees of aging *Pitx1*^{+/-} mice (110). Interestingly, in a study of monozygotic twins discordant for osteoporosis, *PITX1* expression was increased 8.6-fold in hip samples of the affected twin (112), a *PITX1* upregulation corresponding to lower bone density. These findings confirm the inverse relationship between osteoporosis and osteoarthritis noted over 30 years ago (113). Osteoarthritis can be caused, beyond normal aging, by endocrine dysfunction, like in acromegaly, as well as by developmental anomalies like clubfoot, congenital hip dislocation or epiphyseal dysplasias (114-116).

X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda (SEDТ). SEDТ is a rare skeletal disorder characterized by a disproportionately short stature, with a short neck and trunk,

barrel chest, scoliosis, and moderate epiphyseal dysplasia leading to premature osteoarthritis (117). *TRAPPC2*, the only gene known to cause X-linked SEDT, is mutated in over 80% of males with a clinical diagnosis. SEDT mutations entail a loss of interaction with PITX1, explaining the commonality of features associated with *PITX1* downregulation (62).

2.4 Conclusions

Contrary to its original moniker, *PITX1* is expressed in many tissues beyond the pituitary gland, including bone, cartilage, muscle and fibroblast cells. All originate from mesenchymal stem cells. *PITX1* is involved in musculoskeletal development and *PITX1* dysregulation is observed in a host of human diseases. Not surprisingly, *PITX1* plays a role in cancer as well, as it is widely acknowledged that tumor-associated neoplastic growth shares many pathways with normal development. *PITX1* is a purported regulator of the dedifferentiation process as seen in reepithelialization in Barrett's esophagus, a process similar to that found in early embryogenesis (84). Similarly, *PITX1* dysregulation in osteoarthritis could account for the re-initiation of the endochondral ossification program. Although not considered tumors, osteophytes appearing at the margins of osteoarthritic joints are classified as neoplastic cartilaginous and osseous outgrowths (118). The most pressing challenge is to understand the mechanisms leading to *PITX1* misexpression, as signalling pathways involving *PITX1* are still unelucidated. Mouse and fish genomic studies reveal a distal cis-acting regulatory element responsible for *Pitx1* tissue-specific expression that has been highly conserved during evolution. Furthermore, in certain cancers, hypermethylated regulatory elements lead to *PITX1* repression. *PITX1* gene mutation, deletion, or misexpression, both in humans and mouse models, reveal common phenotypes including short stature, cleft palate, micrognathia, scoliosis, clubfoot and osteoarthritis. The dose-dependent relationship of *PITX1* with cell proliferation and differentiation, highlighted in this review, will undoubtedly serve as a basis for future investigations into cancers and other proliferative or degenerative diseases. Clearer identification of *PITX1* regulatory pathways and downstream targets should enable the design of more effective therapeutic interventions.

2.5 Acknowledgments

The authors are grateful to Danielle Buch, medical writer/editor at the Applied Clinical Research Unit of the CHU Sainte-Justine Research Center, for critical revision and substantive editing of the manuscript. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-62791 and PP1-110826). Cynthia Picard is supported by the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) and a Canadian Institutes of Health Research-supported MENTOR scholarship.

2.6 References

1. 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.
2. Semina EV, Reiter R, Leysens NJ, Alward WL, Small KW, Datson NA, Siegel-Bartelt J, Bierke-Nelson D, Bitoun P, Zabel BU, Carey JC, Murray JC. Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat Genet*1996 Dec;14(4):392-9.
3. Ryan AK, Blumberg B, Rodriguez-Esteban C, Yonei-Tamura S, Tamura K, Tsukui T, de la Pena J, Sabbagh W, Greenwald J, Choe S, Norris DP, Robertson EJ, Evans RM, Rosenfeld MG, Izpisua Belmonte JC. Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature*1998 Aug 6;394(6693):545-51.
4. St Amand TR, Ra J, Zhang Y, Hu Y, Baber SI, Qiu M, Chen Y. Cloning and expression pattern of chicken Pitx2: a new component in the SHH signaling pathway controlling embryonic heart looping. *Biochem Biophys Res Commun*1998 Jun 9;247(1):100-5.
5. Yoshioka H, Meno C, Koshiba K, Sugihara M, Itoh H, Ishimaru Y, Inoue T, Ohuchi H, Semina EV, Murray JC, Hamada H, Noji S. Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell*1998 Aug 7;94(3):299-305.
6. Logan M, Pagan-Westphal SM, Smith DM, Paganessi L, Tabin CJ. The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell*1998 Aug 7;94(3):307-17.
7. Piedra ME, Icardo JM, Albajar M, Rodriguez-Rey JC, Ros MA. Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell*1998 Aug 7;94(3):319-24.
8. Campione M, Steinbeisser H, Schweickert A, Deissler K, van Bebber F, Lowe LA, Nowotschin S, Viebahn C, Haffter P, Kuehn MR, Blum M. The homeobox gene Pitx2: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development*1999 Mar;126(6):1225-34.
9. Semina EV, Reiter RS, Murray JC. Isolation of a new homeobox gene belonging to the Pitx/Rieg family: expression during lens development and mapping to the aphakia region on mouse chromosome 19. *Hum Mol Genet*1997 Nov;6(12):2109-16.
10. Semina EV, Ferrell RE, Mintz-Hittner HA, Bitoun P, Alward WL, Reiter RS, Funkhauser C, Daack-Hirsch S, Murray JC. A novel homeobox gene PITX3 is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD. *Nat Genet*1998 Jun;19(2):167-70.
11. Smidt MP, van Schaick HS, Lanctot C, Tremblay JJ, Cox JJ, van der Kleij AA, Wolterink G, Drouin J, Burbach JP. A homeodomain gene Ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*1997 Nov 25;94(24):13305-10.

12. Nunes I, Tovmasian LT, Silva RM, Burke RE, Goff SP. Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*2003 Apr 1;100(7):4245-50.
13. Hwang DY, Fleming SM, Ardayfio P, Moran-Gates T, Kim H, Tarazi FI, Chesselet MF, Kim KS. 3,4-dihydroxyphenylalanine reverses the motor deficits in Pitx3-deficient aphakia mice: behavioral characterization of a novel genetic model of Parkinson's disease. *J Neurosci*2005 Feb 23;25(8):2132-7.
14. Fuchs J, Mueller JC, Lichtner P, Schulte C, Munz M, Berg D, Wullner U, Illig T, Sharma M, Gasser T. The transcription factor PITX3 is associated with sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*2009 May;30(5):731-8.
15. Bergman O, Hakansson A, Westberg L, Nordenstrom K, Carmine Belin A, Sydow O, Olson L, Holmberg B, Eriksson E, Nissbrandt H. PITX3 polymorphism is associated with early onset Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*2010 Jan;31(1):114-7.
16. Meyer U, Engler A, Weber L, Schedlowski M, Feldon J. Preliminary evidence for a modulation of fetal dopaminergic development by maternal immune activation during pregnancy. *Neuroscience*2008 Jun 23;154(2):701-9.
17. Bergman O, Westberg L, Nilsson LG, Adolfsson R, Eriksson E. Preliminary evidence that polymorphisms in dopamine-related transcription factors LMX1A, LMX1B and PITX3 are associated with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*2010 Aug 16;34(6):1094-7.
18. Gage PJ, Suh H, Camper SA. The bicoid-related Pitx gene family in development. *Mamm Genome*1999 Feb;10(2):197-200.
19. Shang J, Li X, Ring HZ, Clayton DA, Francke U. Backfoot, a novel homeobox gene, maps to human chromosome 5 (BFT) and mouse chromosome 13 (Bft). *Genomics*1997 Feb 15;40(1):108-13.
20. Shang J, Luo Y, Clayton DA. Backfoot is a novel homeobox gene expressed in the mesenchyme of developing hind limb. *Dev Dyn*1997 Jun;209(2):242-53.
21. Logan M, Simon HG, Tabin C. Differential regulation of T-box and homeobox transcription factors suggests roles in controlling chick limb-type identity. *Development*1998 Aug;125(15):2825-35.
22. Szeto DP, Rodriguez-Esteban C, Ryan AK, O'Connell SM, Liu F, Kioussi C, Gleiberman AS, Izpisua-Belmonte JC, Rosenfeld MG. Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev*1999 Feb 15;13(4):484-94.
23. Logan M, Tabin CJ. Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity. *Science*1999 Mar 12;283(5408):1736-9.
24. Margulies EH, Kardina SL, Innis JW. A comparative molecular analysis of developing mouse forelimbs and hindlimbs using serial analysis of gene expression (SAGE). *Genome Res*2001 Oct;11(10):1686-98.
25. Gibson-Brown JJ, Agulnik SI, Chapman DL, Alexiou M, Garvey N, Silver LM, Papaioannou VE. Evidence of a role for T-box genes in the evolution of limb

morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity. *Mech Dev*1996 May;56(1-2):93-101.

26. Minguillon C, Del Buono J, Logan MP. Tbx5 and Tbx4 are not sufficient to determine limb-specific morphologies but have common roles in initiating limb outgrowth. *Dev Cell*2005 Jan;8(1):75-84.

27. 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.

28. Ouimette JF, Jolin ML, L'Honore A, Gifuni A, Drouin J. Divergent transcriptional activities determine limb identity. *Nat Commun*2010;1:35.

29. 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.

30. Menke DB, Guenther C, Kingsley DM. Dual hindlimb control elements in the Tbx4 gene and region-specific control of bone size in vertebrate limbs. *Development*2008 Aug;135(15):2543-53.

31. Gudbjartsson DF, Walters GB, Thorleifsson G, Stefansson H, Halldorsson BV, Zusmanovich P, Sulem P, Thorlacius S, Gylfason A, Steinberg S, Helgadottir A, Ingason A, Steinthorsdottir V, Olafsdottir EJ, Olafsdottir GH, Jonsson T, Borch-Johnsen K, Hansen T, Andersen G, Jorgensen T, Pedersen O, Aben KK, Witjes JA, Swinkels DW, den Heijer M, Franke B, Verbeek AL, Becker DM, Yanek LR, Becker LC, Tryggvadottir L, Rafnar T, Gulcher J, Kiemenev LA, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Many sequence variants affecting diversity of adult human height. *Nat Genet*2008 May;40(5):609-15.

32. Cole NJ, Tanaka M, Prescott A, Tickle C. Expression of limb initiation genes and clues to the morphological diversification of threespine stickleback. *Curr Biol*2003 Dec 16;13(24):R951-2.

33. Pennisi E. Evolutionary biology. Changing a fish's bony armor in the wink of a gene. *Science*2004 Jun 18;304(5678):1736.

34. Shapiro MD, Marks ME, Peichel CL, Blackman BK, Nereng KS, Jonsson B, Schluter D, Kingsley DM. Genetic and developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks. *Nature*2004 Apr 15;428(6984):717-23.

35. Chan YF, Marks ME, Jones FC, Villarreal G, Jr., Shapiro MD, Brady SD, Southwick AM, Absher DM, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Petrov D, Jonsson B, Schluter D, Bell MA, Kingsley DM. Adaptive evolution of pelvic reduction in sticklebacks by recurrent deletion of a Pitx1 enhancer. *Science*2010 Jan 15;327(5963):302-5.

36. Tanaka M, Hale LA, Amores A, Yan YL, Cresko WA, Suzuki T, Postlethwait JH. Developmental genetic basis for the evolution of pelvic fin loss in the pufferfish *Takifugu rubripes*. *Dev Biol*2005 May 15;281(2):227-39.

37. Takeuchi JK, Koshihara-Takeuchi K, Matsumoto K, Vogel-Hopker A, Naitoh-Matsuo M, Ogura K, Takahashi N, Yasuda K, Ogura T. Tbx5 and Tbx4 genes determine the wing/leg identity of limb buds. *Nature*1999 Apr 29;398(6730):810-4.

38. St Amand TR, Zhang Y, Semina EV, Zhao X, Hu Y, Nguyen L, Murray JC, Chen Y. 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.
39. Ozeki H, Kurihara Y, Tonami K, Watatani S, Kurihara H. Endothelin-1 regulates the dorsoventral branchial arch patterning in mice. *Mech Dev*2004 Apr;121(4):387-95.
40. 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.
41. Stender JD, Stossi F, Funk CC, Charn TH, Barnett DH, Katzenellenbogen BS. The estrogen-regulated transcription factor PITX1 coordinates gene-specific regulation by estrogen receptor-alpha in breast cancer cells. *Mol Endocrinol*2011 Oct;25(10):1699-709.
42. Jefferson WN, Padilla-Banks E, Phelps JY, Gerrish KE, Williams CJ. Permanent oviduct posteriorization after neonatal exposure to the phytoestrogen genistein. *Environ Health Perspect*2011 Nov;119(11):1575-82.
43. Bobola N, Carapuco M, Ohnemus S, Kanzler B, Leibbrandt A, Neubuser A, Drouin J, Mallo M. Mesenchymal patterning by Hoxa2 requires blocking Fgf-dependent activation of Ptx1. *Development*2003 Aug;130(15):3403-14.
44. Smith TM, Wang X, Zhang W, Kulyk W, Nazarali AJ. Hoxa2 plays a direct role in murine palate development. *Dev Dyn*2009 Sep;238(9):2364-73.
45. Zacchetti G, Duboule D, Zakany J. Hox gene function in vertebrate gut morphogenesis: the case of the caecum. *Development*2007 Nov;134(22):3967-73.
46. Goodyer CG, Tremblay JJ, Paradis FW, Marcil A, Lanctot C, Gauthier Y, Drouin J. Pitx1 in vivo promoter activity and mechanisms of positive autoregulation. *Neuroendocrinology*2003 Sep;78(3):129-37.
47. Dixit M, Anseau E, Tassin A, Winokur S, Shi R, Qian H, Sauvage S, Matteotti C, van Acker AM, Leo O, Figlewicz D, Barro M, Laoudj-Chenivresse D, Belayew A, Coppee F, Chen YW. 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.
48. Sonna LA, Cullivan ML, Sheldon HK, Pratt RE, Lilly CM. Effect of hypoxia on gene expression by human hepatocytes (HepG2). *Physiol Genomics*2003 Feb 6;12(3):195-207.
49. Chen X, Ma WL, Liang S, Liao ZJ, Shang T, Zheng WL. [Effect of Epstein-Barr virus reactivation on gene expression profile of nasopharyngeal carcinoma]. *Ai Zheng*2008 Jan;27(1):1-7.
50. Liao X, Collins MD. All-trans retinoic acid-induced ectopic limb and caudal structures: murine strain sensitivities and pathogenesis. *Dev Dyn*2008 Jun;237(6):1553-64.
51. 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.
52. Liu DX, Lobie PE. Transcriptional activation of p53 by Pitx1. *Cell Death Differ*2007 Nov;14(11):1893-907.

53. Calvisi DF, Ladu S, Conner EA, Seo D, Hsieh JT, Factor VM, Thorgeirsson SS. Inactivation of Ras GTPase-activating proteins promotes unrestrained activity of wild-type Ras in human liver cancer. *J Hepatol*2011 Feb;54(2):311-9.
54. Kolfschoten IG, van Leeuwen B, Berns K, Mullenders J, Beijersbergen RL, Bernards R, Voorhoeve PM, Agami R. A genetic screen identifies PITX1 as a suppressor of RAS activity and tumorigenicity. *Cell*2005 Jun 17;121(6):849-58.
55. Quirk J, Brown P. Hesx1 homeodomain protein represses transcription as a monomer and antagonises transactivation of specific sites as a homodimer. *J Mol Endocrinol*2002 Jun;28(3):193-205.
56. Lo A, Zheng W, Gong Y, Crochet JR, Halvorson LM. GATA transcription factors regulate LHbeta gene expression. *J Mol Endocrinol*2011;47(1):45-58.
57. 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.
58. Jorgensen JS, Nilson JH. AR suppresses transcription of the LHbeta subunit by interacting with steroidogenic factor-1. *Mol Endocrinol*2001 Sep;15(9):1505-16.
59. Melamed P, Koh M, Preklathan P, Bei L, Hew C. Multiple mechanisms for Pitx-1 transactivation of a luteinizing hormone beta subunit gene. *J Biol Chem*2002 Jul 19;277(29):26200-7.
60. Luo Z, Wijeweera A, Oh Y, Liou YC, Melamed P. Pin1 facilitates the phosphorylation-dependent ubiquitination of SF-1 to regulate gonadotropin beta-subunit gene transcription. *Mol Cell Biol*2010 Feb;30(3):745-63.
61. Ghosh AK, Steele R, Ray RB. Modulation of human luteinizing hormone beta gene transcription by MIP-2A. *J Biol Chem*2003 Jun 27;278(26):24033-8.
62. 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.
63. Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Ray R, Ray RB. Modulation of interferon expression by hepatitis C virus NS5A protein and human homeodomain protein PTX1. *Virology*2003 Feb 1;306(1):51-9.
64. Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, Berriz GF, Gibbons FD, Dreze M, Ayivi-Guedehoussou N, Klitgord N, Simon C, Boxem M, Milstein S, Rosenberg J, Goldberg DS, Zhang LV, Wong SL, Franklin G, Li S, Albala JS, Lim J, Fraughton C, Llamosas E, Cevik S, Bex C, Lamesch P, Sikorski RS, Vandenhaute J, Zoghbi HY, Smolyar A, Bosak S, Sequerra R, Doucette-Stamm L, Cusick ME, Hill DE, Roth FP, Vidal M. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*2005 Oct 20;437(7062):1173-8.
65. Sun Y, Ding L, Zhang H, Han J, Yang X, Yan J, Zhu Y, Li J, Song H, Ye Q. Potentiation of Smad-mediated transcriptional activation by the RNA-binding protein RBPMS. *Nucleic Acids Res*2006;34(21):6314-26.
66. Lee YN, Gao Y, Wang HY. Differential mediation of the Wnt canonical pathway by mammalian Dishevelleds-1, -2, and -3. *Cell Signal*2008 Feb;20(2):443-52.

67. Kioussi C, Briata P, Baek SH, Rose DW, Hamblet NS, Herman T, Ohgi KA, Lin C, Gleiberman A, Wang J, Brault V, Ruiz-Lozano P, Nguyen HD, Kemler R, Glass CK, Wynshaw-Boris A, Rosenfeld MG. Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell*2002 Nov 27;111(5):673-85.
68. Vadlamudi U, Espinoza HM, Ganga M, Martin DM, Liu X, Engelhardt JF, Amendt BA. PITX2, beta-catenin and LEF-1 interact to synergistically regulate the LEF-1 promoter. *J Cell Sci*2005 Mar 15;118(Pt 6):1129-37.
69. Ai D, Wang J, Amen M, Lu MF, Amendt BA, Martin JF. Nuclear factor 1 and T-cell factor/LEF recognition elements regulate Pitx2 transcription in pituitary development. *Mol Cell Biol*2007 Aug;27(16):5765-75.
70. Tahara S, Kurotani R, Sanno N, Takumi I, Yoshimura S, Osamura RY, Teramoto A. Expression of pituitary homeo box 1 (Ptx1) in human non-neoplastic pituitaries and pituitary adenomas. *Mod Pathol*2000 Oct;13(10):1097-108.
71. Pellegrini-Bouiller I, Manrique C, Gunz G, Grino M, Zamora AJ, Figarella-Branger D, Grisoli F, Jaquet P, Enjalbert A. Expression of the members of the Ptx family of transcription factors in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*1999 Jun;84(6):2212-20.
72. Thomson HA. Acromegaly, with the Description of a Skeleton. *J Anat Physiol*1890 Jul;24(Pt 4):475-92.
73. Shibli-Rahhal A, Van Beek M, Schlechte JA. Cushing's syndrome. *Clin Dermatol*2006 Jul-Aug;24(4):260-5.
74. Newell-Price J. Proopiomelanocortin gene expression and DNA methylation: implications for Cushing's syndrome and beyond. *J Endocrinol*2003 Jun;177(3):365-72.
75. Chamberlain RS, Herman BH. A novel biochemical model linking dysfunctions in brain melatonin, proopiomelanocortin peptides, and serotonin in autism. *Biol Psychiatry*1990 Nov 1;28(9):773-93.
76. Philippi A, Tores F, Carayol J, Rousseau F, Letexier M, Roschmann E, Lindenbaum P, Benajjou A, Fontaine K, Vazart C, Gesnouin P, Brooks P, Hager J. Association of autism with polymorphisms in the paired-like homeodomain transcription factor 1 (PITX1) on chromosome 5q31: a candidate gene analysis. *BMC Med Genet*2007;8:74.
77. Wierinckx A, Auger C, Devauchelle P, Reynaud A, Chevallier P, Jan M, Perrin G, Fevre-Montange M, Rey C, Figarella-Branger D, Raverot G, Belin MF, Lachuer J, Trouillas J. A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer*2007 Sep;14(3):887-900.
78. Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Iinuma H, Ikeuchi H, Eshima K. Differential gene expression signatures between colorectal cancers with and without KRAS mutations: crosstalk between the KRAS pathway and other signalling pathways. *Eur J Cancer*2011 Sep;47(13):1946-54.
79. Qi DL, Ohhira T, Fujisaki C, Inoue T, Ohta T, Osaki M, Ohshiro E, Seko T, Aoki S, Oshimura M, Kugoh H. Identification of PITX1 as a TERT suppressor gene located on human chromosome 5. *Mol Cell Biol*2011 Feb 7.

80. Kugoh H, Shigenami K, Funaki K, Barrett JC, Oshimura M. Human chromosome 5 carries a putative telomerase repressor gene. *Genes Chromosomes Cancer*2003 Jan;36(1):37-47.
81. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, Chinnaiyan AM. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia*2004 Jan-Feb;6(1):1-6.
82. Singh D, Febbo PG, Ross K, Jackson DG, Manola J, Ladd C, Tamayo P, Renshaw AA, D'Amico AV, Richie JP, Lander ES, Loda M, Kantoff PW, Golub TR, Sellers WR. Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. *Cancer Cell*2002 Mar;1(2):203-9.
83. Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, Mukherjee S, Yeang CH, Angelo M, Ladd C, Reich M, Latulippe E, Mesirov JP, Poggio T, Gerald W, Loda M, Lander ES, Golub TR. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A*2001 Dec 18;98(26):15149-54.
84. Lord RV, Brabender J, Wickramasinghe K, DeMeester SR, Holscher A, Schneider PM, Danenberg PV, DeMeester TR. Increased CDX2 and decreased PITX1 homeobox gene expression in Barrett's esophagus and Barrett's-associated adenocarcinoma. *Surgery*2005 Nov;138(5):924-31.
85. Chen Y, Knosel T, Ye F, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Petersen I. Decreased PITX1 homeobox gene expression in human lung cancer. *Lung Cancer*2007 Mar;55(3):287-94.
86. Huang YD, Huang YX, Li LJ, Xia H, Wen YM. [Analyses of differential expression of Homeobox genes between lingual squamous cell carcinoma and normal mucosa]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*2007 Oct;25(5):500-3.
87. Chen YN, Chen H, Xu Y, Zhang X, Luo Y. Expression of pituitary homeobox 1 gene in human gastric carcinogenesis and its clinicopathological significance. *World J Gastroenterol*2008 Jan 14;14(2):292-7.
88. Xia H, Li LJ, Han B, Pan J, Gao N. [Research on the differently expressed homeobox genes related to adenoid cystic carcinoma]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*2010 Apr;28(2):190-4.
89. Freed WJ, Chen J, Backman CM, Schwartz CM, Vazin T, Cai J, Spivak CE, Lupica CR, Rao MS, Zeng X. Gene expression profile of neuronal progenitor cells derived from hESCs: activation of chromosome 11p15.5 and comparison to human dopaminergic neurons. *PLoS One*2008;3(1):e1422.
90. Difilippantonio S, Chen Y, Pietas A, Schluns K, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Padilla-Nash HM, Ried T, Petersen I. Gene expression profiles in human non-small and small-cell lung cancers. *Eur J Cancer*2003 Sep;39(13):1936-47.
91. Chen Y, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Ye F, Petersen I. 5-Bromodeoxyuridine induced differentiation of a human small cell lung cancer cell line is associated with alteration of gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*2007 Feb 16;353(3):559-64.

92. Bell A, Bell D, Weber RS, El-Naggar AK. CpG Island Methylation Profiling in Human Salivary Gland Adenoid Cystic Carcinoma. *Cancer* 2011 Jan 11.
93. Crawford MJ, Lanctot C, Tremblay JJ, Jenkins N, Gilbert D, Copeland N, Beatty B, Drouin J. Human and murine PTX1/Ptx1 gene maps to the region for Treacher Collins syndrome. *Mamm Genome* 1997;8(11):841-5.
94. Li C, Mernagh J, Bourgeois J. Novel craniofacial and extracraniofacial findings in a case of Treacher Collins syndrome with a pathogenic mutation and a missense variant in the TCOF1 gene. *Clin Dysmorphol* 2009 Jan;18(1):63-6.
95. Macaya D, Katsanis SH, Hefferon TW, Audlin S, Mendelsohn NJ, Roggenbuck J, Cutting GR. A synonymous mutation in TCOF1 causes Treacher Collins syndrome due to mis-splicing of a constitutive exon. *Am J Med Genet A* 2009 Aug;149A(8):1624-7.
96. Goto M, Takita J, Hashimoto N, Tateshita F, Toyoji H, Kato H, Egi S, Hayashi Y. Lack of aberrations of the BMP4, BMP2, and PTX1 genes in a patient with pituitary hypoplasia, os odontoideum, renal dysplasia, and right leg anomalies. *Int J Mol Med* 2002 Sep;10(3):293-7.
97. Felding I, Kristoffersson U. A child with interstitial deletion of chromosome No. 5. *Hereditas* 1980;93(2):337-9.
98. Rosenfeld JA, Drautz JM, Clericuzio CL, Cushing T, Raskin S, Martin J, Tervo RC, Pitarque JA, Nowak DM, Karolak JA, Lamb AN, Schultz RA, Ballif BC, Bejjani BA, Gajecka M, Shaffer LG. Deletions and duplications of developmental pathway genes in 5q31 contribute to abnormal phenotypes. *Am J Med Genet A* 2011 Aug;155A(8):1906-16.
99. Gurnett CA, Alaei F, Kruse LM, Desruisseau DM, Hecht JT, Wise CA, Bowcock AM, Dobbs MB. Asymmetric lower-limb malformations in individuals with homeobox PITX1 gene mutation. *Am J Hum Genet* 2008 Nov;83(5):616-22.
100. Alvarado DM, Aferol H, McCall K, Huang JB, Techy M, Buchan J, Cady J, Gonzales PR, Dobbs MB, Gurnett CA. Familial isolated clubfoot is associated with recurrent chromosome 17q23.1q23.2 microduplications containing TBX4. *Am J Hum Genet* 2010 Jul 9;87(1):154-60.
101. Alvarado DM, McCall K, Aferol H, Silva MJ, Garbow JR, Spees WM, Patel T, Siegel M, Dobbs MB, Gurnett CA. Ptx1 haploinsufficiency causes clubfoot in humans and a clubfoot-like phenotype in mice. *Hum Mol Genet* 2011 Oct 15;20(20):3943-52.
102. Klopocki E, Kahler C, Foulds N, Shah H, Joseph B, Vogel H, Luttgen S, Bald R, Besoke R, Held K, Mundlos S, Kurth I. Deletions in PITX1 cause a spectrum of lower-limb malformations including mirror-image polydactyly. *Eur J Hum Genet* 2012 Jan 18.
103. Lee S, Chae H, Park IY, Kim M, Kim Y, Shin JC, Lee J, Son J. Genotype-phenotype correlation of a 5q22.3 deletion associated with craniofacial and limb defects. *Gene* 2012 Feb 15;494(1):105-8.
104. Reed PW, Corse AM, Porter NC, Flanigan KM, Bloch RJ. Abnormal expression of mu-crystallin in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Exp Neurol* 2007 Jun;205(2):583-6.
105. Lemmers RJ, van der Vliet PJ, Klooster R, Sacconi S, Camano P, Dauwerse JG, Snider L, Straasheijm KR, van Ommen GJ, Padberg GW, Miller DG, Tapscott SJ, Tawil R,

- Frants RR, van der Maarel SM. A unifying genetic model for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Science*2010 Sep 24;329(5999):1650-3.
106. Vanderplanck C, Anseau E, Charron S, Stricwant N, Tassin A, Laoudj-Chenivresse D, Wilton SD, Coppee F, Belayew A. The FSHD atrophic myotube phenotype is caused by DUX4 expression. *PLoS One*2011;6(10):e26820.
107. Klooster R, Straasheijm K, Shah B, Sowden J, Frants R, Thornton C, Tawil R, van der Maarel S. Comprehensive expression analysis of FSHD candidate genes at the mRNA and protein level. *Eur J Hum Genet*2009 Dec;17(12):1615-24.
108. Wallace LM, Garwick SE, Mei W, Belayew A, Coppee F, Ladner KJ, Guttridge D, Yang J, Harper SQ. DUX4, a candidate gene for facioscapulohumeral muscular dystrophy, causes p53-dependent myopathy in vivo. *Ann Neurol*2011 Mar;69(3):540-52.
109. Wuebbles RD, Long SW, Hanel ML, Jones PL. Testing the effects of FSHD candidate gene expression in vertebrate muscle development. *Int J Clin Exp Pathol*2010;3(4):386-400.
110. 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.
111. 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.
112. Mak YT, Hampson G, Beresford JN, Spector TD. Variations in genome-wide gene expression in identical twins - a study of primary osteoblast-like culture from female twins discordant for osteoporosis. *BMC Genet*2004 Jun 4;5:14.
113. Dequeker J. Inverse relationship of interface between osteoporosis and osteoarthritis. *J Rheumatol*1997 Apr;24(4):795-8.
114. Nabarro JD. Acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)*1987 Apr;26(4):481-512.
115. van Gelder JH, van Ruiten AG, Visser JD, Maathuis PG. Long-term results of the posteromedial release in the treatment of idiopathic clubfoot. *J Pediatr Orthop*2010 Oct-Nov;30(7):700-4.
116. Arai M. Pressure on the femoral head in osteoarthritis secondary to congenital dislocation of the hip. *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi*1970 Feb 25;44(2):153-9.
117. Tiller GE, Hannig VL. X-Linked Spondyloepiphyseal Dysplasia Tarda. 1993.
118. Aigner T, Dietz U, Stoss H, von der Mark K. Differential expression of collagen types I, II, III, and X in human osteophytes. *Lab Invest*1995 Aug;73(2):236-43.
119. Hiroi N, Kino T, Bassett M, Rainey WE, Phung M, Abu-Asab M, Fojo T, Briata P, Chrousos GP, Bornstein SR. Pituitary homeobox factor 1, a novel transcription factor in the adrenal regulating steroid 11beta-hydroxylase. *Horm Metab Res*2003 May;35(5):273-8.
120. Kioussi C, Briata P, Baek SH, Wynshaw-Boris A, Rose DW, Rosenfeld MG. Pitx genes during cardiovascular development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*2002;67:81-7.

121. Tremblay JJ, Lanctot C, Drouin J. The pan-pituitary activator of transcription, Ptx1 (pituitary homeobox 1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol Endocrinol*1998 Mar;12(3):428-41.
122. Zakaria MM, Jeong KH, Lacza C, Kaiser UB. Pituitary homeobox 1 activates the rat FSHbeta (rFSHbeta) gene through both direct and indirect interactions with the rFSHbeta gene promoter. *Mol Endocrinol*2002 Aug;16(8):1840-52.
123. 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.
124. Aikawa S, Susa T, Sato T, Kitahara K, Kato T, Kato Y. Transcriptional activity of the 5' upstream region of the porcine glycoprotein hormone alpha subunit gene. *J Reprod Dev*2005 Feb;51(1):117-21.
125. Sarapura VD, Strouth HL, Wood WM, Gordon DF, Ridgway EC. Activation of the glycoprotein hormone alpha-subunit gene promoter in thyrotropes. *Mol Cell Endocrinol*1998 Nov 25;146(1-2):77-86.
126. Bach I, Carriere C, Ostendorff HP, Andersen B, Rosenfeld MG. A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes Dev*1997 Jun 1;11(11):1370-80.
127. 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.
128. Kimura N, Tomizawa S, Arai KN, Osamura RY. Characterization of 5'-flanking region of rat somatostatin receptor sst2 gene: transcriptional regulatory elements and activation by Pitx1 and estrogen. *Endocrinology*2001 Apr;142(4):1427-41.
129. Lopez S, Island ML, Drouin J, Bandu MT, Christeff N, Darracq N, Barbey R, Doly J, Thomas D, Navarro S. Repression of virus-induced interferon A promoters by homeodomain transcription factor Ptx1. *Mol Cell Biol*2000 Oct;20(20):7527-40.
130. Island ML, Mesplede T, Darracq N, Bandu MT, Christeff N, Djian P, Drouin J, Navarro S. Repression by homeoprotein pitx1 of virus-induced interferon a promoters is mediated by physical interaction and trans repression of IRF3 and IRF7. *Mol Cell Biol*2002 Oct;22(20):7120-33.
131. Mesplede T, Island ML, Christeff N, Petek F, Doly J, Navarro S. The POU transcription factor Oct-1 represses virus-induced interferon A gene expression. *Mol Cell Biol*2005 Oct;25(19):8717-31.
132. Charles MA, Suh H, Hjalt TA, Drouin J, Camper SA, Gage PJ. PITX genes are required for cell survival and Lhx3 activation. *Mol Endocrinol*2005 Jul;19(7):1893-903.
133. Jiang Q, Jeong KH, Horton CD, Halvorson LM. Pituitary homeobox 1 (Pitx1) stimulates rat LHbeta gene expression via two functional DNA-regulatory regions. *J Mol Endocrinol*2005 Aug;35(1):145-58.

134. 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.
135. Fortin J, Lamba P, Wang Y, Bernard DJ. Conservation of mechanisms mediating gonadotrophin-releasing hormone 1 stimulation of human luteinizing hormone beta subunit transcription. *Mol Hum Reprod*2009 Feb;15(2):77-87.
136. 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.
137. Luo M, Koh M, Feng J, Wu Q, Melamed P. Cross talk in hormonally regulated gene transcription through induction of estrogen receptor ubiquitylation. *Mol Cell Biol*2005 Aug;25(16):7386-98.
138. Melamed P, Zhu Y, Tan SH, Xie M, Koh M. Gonadotropin-releasing hormone activation of c-jun, but not early growth response factor-1, stimulates transcription of a luteinizing hormone beta-subunit gene. *Endocrinology*2006 Jul;147(7):3598-605.
139. Johnston JD, Messenger S, Ebling FJ, Williams LM, Barrett P, Hazlerigg DG. Gonadotrophin-releasing hormone drives melatonin receptor down-regulation in the developing pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*2003 Mar 4;100(5):2831-5.
140. Johnston JD, Schuster C, Barrett P, Hazlerigg DG. Regulation of the ovine MT1 melatonin receptor promoter: interaction between multiple pituitary transcription factors at different phases of development. *Mol Cell Endocrinol*2007 Mar 30;268(1-2):59-66.
141. Quentien MH, Manfroid I, Moncet D, Gunz G, Muller M, Grino M, Enjalbert A, Pellegrini I. Pitx factors are involved in basal and hormone-regulated activity of the human prolactin promoter. *J Biol Chem*2002 Nov 15;277(46):44408-16.
142. Poulin G, Turgeon B, Drouin J. NeuroD1/beta2 contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol*1997 Nov;17(11):6673-82.
143. Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, Gauthier Y, Brue T, Enjalbert A, Drouin J. A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell*2001 Mar 23;104(6):849-59.
144. Bilodeau S, Vallette-Kasic S, Gauthier Y, Figarella-Branger D, Brue T, Berthelet F, Lacroix A, Batista D, Stratakis C, Hanson J, Meij B, Drouin J. Role of Brg1 and HDAC2 in GR trans-repression of the pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease. *Genes Dev*2006 Oct 15;20(20):2871-86.
145. Murakami I, Takeuchi S, Kudo T, Sutou S, Takahashi S. Corticotropin-releasing hormone or dexamethasone regulates rat proopiomelanocortin transcription through Tpit/Pitx-responsive element in its promoter. *J Endocrinol*2007 May;193(2):279-90.
146. Chung MI, Nascone-Yoder NM, Grover SA, Drysdale TA, Wallingford JB. Direct activation of Shroom3 transcription by Pitx proteins drives epithelial morphogenesis in the developing gut. *Development*2010 Apr;137(8):1339-49.
147. Lebel M, Gauthier Y, Moreau A, Drouin J. Pitx3 activates mouse tyrosine hydroxylase promoter via a high-affinity binding site. *J Neurochem*2001 Apr;77(2):558-67.

2.7 Table

Table I. List of genes regulated by PITX1 acting alone or with cofactors.

Target gene	Action of PITX1*	Cofactors	Experimental model	Reference
Cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 1				
<i>CYP11B1</i>	Act	-	Y1	(119)
<i>CYP11B1</i>	Act, syn	NR5A1	CV-1, HeLa	(119)
Endothelin receptor type A				
<i>EDNRA</i>	Act	-	HEK293	(120)
Follicle stimulating hormone beta				
<i>Fshb</i>	Act	-	CV-1, GGH ₃ , LβT2	(121-123)
<i>Fshb</i>	Act	SMAD3	LβT2	(123)
<i>Fshb</i>	Act, syn	PIN1	LβT2	(60)
Follistatin				
<i>FST</i>	Rep	ESR1	MDA-MB-231	(41)
Glycoprotein hormones, alpha polypeptide (alpha subunits of chorionic gonadotropin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and thyroid stimulating hormone)				
<i>CGA</i>	Rep	-	LβT2	(124)
<i>Cga</i>	Act	-	CV-1	(121, 125)
<i>Cga</i>	Act, syn	Alone or LHX3 and LDB2	HeLa	(126)
Gonadotropin-releasing hormone receptor				
<i>Gnrhr</i>	Act	-	CV-1	(121)
<i>Gnrhr</i>	Act, syn	JUN	CV-1	(127)
Growth hormone 1				
<i>Gh1</i>	Act	-	HeLa	(128)
<i>Gh1</i>	Act	Alone or POU1F1	CV-1	(121)
Homeobox C				
<i>Hoxc10-11</i>	Act	-	Chick wing	(23)
Interferon alpha				
<i>IFNA4</i>	Act	-	HepG2	(63)
<i>IFNA4</i>	Less act	NS5A (viral protein)	HepG2	(63)
<i>Ifna4-11</i>	Rep	-	L929, HeLa	(129)
<i>Ifna5-11</i>	Rep	IRF3, IRF7	L929	(130, 131)
LIM homeobox 3				
<i>Lhx3</i>	Act	-	CV-1 transgenic mouse	(121, 132)
Luteinizing hormone beta				
<i>LHB</i>	Act, syn	Alone or NR5A1	CV-1, LβT2	(121, 133)
<i>LHB</i>	Act, syn	EGR1, NR5A1	CV-1, LβT2	(134, 135)
<i>LHB</i>	Rep	AR, NR5A1	LβT2	(58)
<i>LHB</i>	Rep	TRAPPC2, NR5A1	CV-1	(61)
<i>Lhb</i>	Act	SMAD2-3-4	LβT2	(136)
<i>Lhb</i>	Act, syn	ESR1, NR5A1	COS-1	(137)
<i>Lhb</i>	Act, syn	ESR1, NR5A1, JUN	COS-1, LβT2	(138)
<i>Lhb</i>	Act, syn	PIN1, NR5A1, EGR1	LβT2	(60)

Table I. (continued)

Target gene	Action of PITX1*	Cofactors	Experimental model	Reference
Melatonin receptor 1				
<i>Mtnr1</i>	Act	-	COS-7	(139, 140)
<i>Mtnr1</i>	Less act	EGR1	COS-7	(139, 140)
Patched homolog 1				
<i>Ptch1</i>	Rep	-	Mouse forelimb	(27)
POU class 1 homeobox 1				
<i>Pou1f1</i>	Act	-	CV-1	(121)
Prolactin				
<i>PRL</i>	Act, syn	Alone or POU1F1	CV-1	(121, 141)
Proopiomelanocortin (adrenocorticotrophic hormone precursor)				
<i>Pomc</i>	Act	-	AtT-20, CV-1	(1, 121)
<i>Pomc</i>	Act, syn	NEUROD1	AtT-20	(142)
<i>Pomc</i>	Act, syn	TBX19	CV-1	(143)
<i>Pomc</i>	Rep	SMARCA2	AtT-20	(144)
<i>Pomc</i>	Rep	NR3C1 (suggested)	AtT-20	(145)
RAS protein activator like 1				
<i>RASAL1</i>	Act	-	SNU449, HEK293	(53, 54)
Shroom family member 3				
<i>Shroom3</i>	Act	-	Frog embryo	(146)
Somatostatin receptor 2				
<i>Sstr2</i>	Act	-	HeLa	(128)
Sonic hedgehog				
<i>Shh</i>	Rep	-	Mouse forelimb	(27)
T-box				
<i>Tbx1</i>	Act	-	Mouse mandible	(40)
<i>Tbx4</i>	Act	-	Chick wing	(23)
Telomerase reverse transcriptase				
<i>TERT</i>	Rep	-	A2058	(79)
<i>Tert</i>	Rep	-	B16F10	(79)
Thyroid stimulating hormone beta				
<i>Tshb</i>	Act	-	CV-1	(121)
Trefoil factor 1				
<i>TFF1</i>	Rep	ESR1	MDA-MB-231	(41)
Tumor protein p53				
<i>TP53</i>	Act	-	MCF-7	(52)
Tyrosine hydroxylase				
<i>Th</i>	Act	-	P19	(147)

* Abbreviations:

Act, activation;

Rep, repression;

Less act, lesser activation of target when PITX1 acts with partner molecule (cofactor);

Syn, stronger, synergistic activation of target when PITX1 acts with cofactor.

2.8 Figure legends

Figure 1. Homeodomain of the three human paired-like homeodomain (PITX) protein family members, showing their 59-amino-acid sequence. Amino acids making specific contact with DNA are shaded in grey. Arrows point to the only two non-conserved amino acids in the sequence (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Figure 2. Hypothetical model associating functional PITX1 expression levels with cell proliferation rate. Gradient from white (absence) to black (high) represents functional PITX1 expression levels (left) and associated degree of cell proliferation (right). Extremely low PITX1 levels are associated with abnormally high proliferation rates leading to cancer. High levels of PITX1 are associated with an absence of proliferation, a state seen in terminal cell differentiation and/or apoptosis. The middle grey zone represents a normal cell proliferation rate, capable of sustaining either differentiation or dedifferentiation.

Figure 3. Model of gene regulation in polydactyly. Images represent lock-and-key mechanisms of protein-protein binding and protein-DNA binding. Mutations in key positions would prevent binding to the promoter and thereby affect gene expression. (A) Wild-type PITX1, EGR1, and hypothetical protein X. (B) Binding of PITX1 and EGR1 to a regulatory element in the sonic hedgehog (*SHH*) gene promoter inhibits *SHH* expression, leading to normal phenotype. (C) In the absence of PITX1, as in the arm (front limb), protein X replaces PITX1, producing normal phenotype. (D) A mutation in the PITX1 DNA-binding domain (e.g. E130K) prevents its binding to the *SHH* promoter. The gene is now activated, producing polydactyly. (E) Mutated PITX1 protein-protein interaction site prevents EGR1 binding, resulting in polydactyly.

2.9 Figures

```

          ↓           ↓
PITX1 RRQRTHTFTSQQLQELEATFQRNRYPDMSMREEIAVWTNLTEPRVRVWFKNRRAKWRKRE
PITX2 RRQRTHTFTSQQLQELEATFQRNRYPDMSTREEIAVWTNLTEARVRVWFKNRRAKWRKRE
PITX3 RRQRTHTFTSQQLQELEATFQRNRYPDMSTREEIAVWTNLTEARVRVWFKNRRAKWRKRE
    
```

Figure 1. Homeodomain protein sequence of the three human PITX family members.

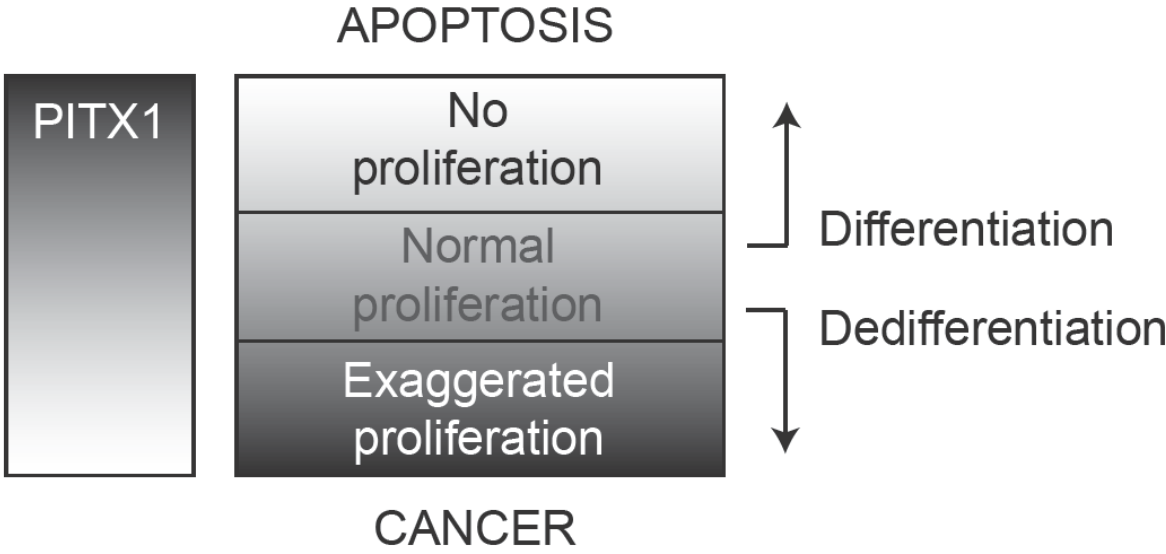


Figure 2. Hypothetical model depicting different roles attributed to PITX1 according to its expression levels.

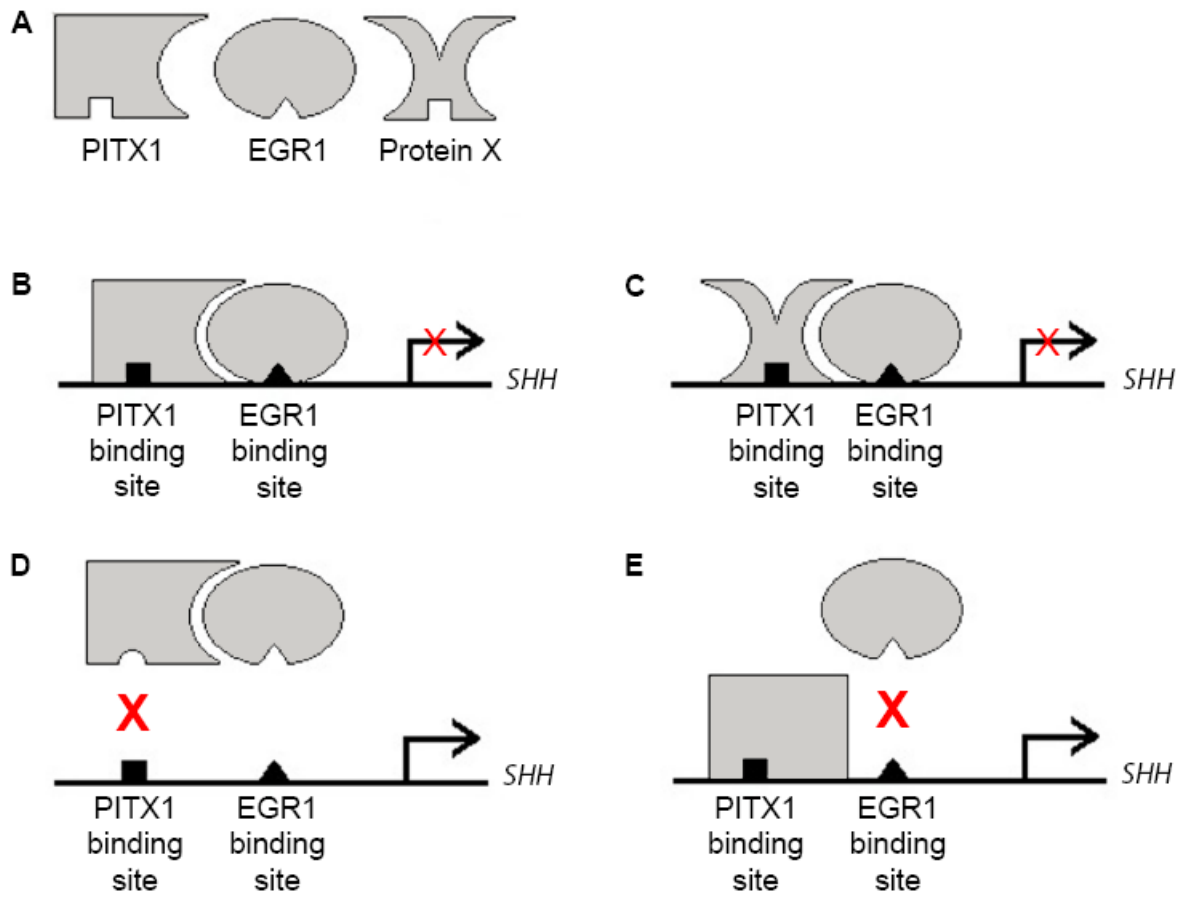


Figure 3. Model of gene regulation in polydactyly.

Préface au chapitre 3

Ce chapitre est présenté sous forme d'article, ce dernier ayant été publié en septembre 2007 dans le journal *Clinical Orthopaedics and Related Research* (97). Au moment de soumettre ce manuscrit, le rôle de PITX1 dans le développement des membres inférieurs était bien connu. Par contre, peu de travaux avaient été entrepris chez l'humain et son implication dans le cancer n'était qu'à ses balbutiements. Nous avons été les premiers à associer PITX1 avec la pathogenèse de l'arthrose et les résultats qui suivent ont servi de fondement pour plusieurs études subséquentes au sein de notre laboratoire.

Les travaux présentés concernant les souris déficientes pour le gène *Pitx1* ont été initiés au moment où Dr Moreau était chercheur associé à l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal. Il a donc pris lui-même les radiographies ayant servi de figure de base pour cet article. Lors de son départ pour le centre de recherche du CHU Sainte-Justine, seuls quelques coupes histologiques et quelques échantillons d'ARN ont été récupérés. Grâce à ces spécimens ainsi que d'autres qui se sont rajoutés par la suite, tels que les embryons de souris normales et le cartilage de patients arthrosiques, j'ai pu entreprendre la majorité des expériences d'histologie et de réaction en chaîne par polymérase. J'ai contribué à l'écriture de la première version du manuscrit, qui a été par la suite revue et corrigée par le Dr Moreau, directeur de thèse et de maîtrise.

Les autres personnes listées à titre de co-auteurs de cet article ont contribué principalement de la façon suivante: Dr Bouziane Azeddine, ancien étudiant au doctorat, support technique et aide à la rédaction; Dre Florina Moldovan, co-directrice de thèse et de maîtrise, soutien pour les expériences histologiques, correction du manuscrit; Dre Johanne Martel-Pelletier, collaboratrice ayant fourni des échantillons de cartilage et d'ARN de patients OA et de sujets contrôles.

Nous avons pu ainsi démontrer que les souris ayant perdu une copie du gène *Pitx1* développaient des symptômes arthrosiques en vieillissant. De plus, une perte d'expression de *PITX1* était également observable dans le cartilage articulaire provenant de genoux de patients souffrant d'arthrose. Dans la discussion de cet article, nous avons abordé l'hypothèse selon laquelle le processus d'ossification endochondrale pouvait être réinitié lors du développement de l'arthrose, menant à une sclérose osseuse et à une formation d'excroissances au niveau de l'os sous-chondral. Ces deux phénotypes semblaient être associés à une diminution d'expression de *PITX1*, autant dans notre modèle murin que chez les patients arthrosiques.

Pour conclure cet article, nous avons mentionné avoir déjà entrepris des expériences permettant d'identifier les mécanismes responsables de la perte d'expression de *PITX1* chez les patients arthrosiques. En effet, les travaux concernant la régulation de *PITX1* ont été achevés depuis et ils ont été l'objet d'un article (voir Annexe II) et d'une thèse de doctorat rédigée en 2010 par mon collègue Martin Pellicelli. Comme ma contribution à ces résultats m'a valu une place à titre de co-premier auteur, ceux-ci seront abordés dans la discussion de la présente thèse.

Chapitre 3 - Article #1

Nouveau rôle du facteur de transcription PITX1 dans la pathogenèse de l'arthrose

3.1 Title page

New Emerging Role of Pitx1 Transcription Factor in Osteoarthritis Pathogenesis

Cynthia Picard, BSc^{*}; Bouziane Azeddine, MSc^{*}; Florina Moldovan, MD, PhD^{*,†}; Johanne Martel-Pelletier, PhD[‡]; and Alain Moreau, PhD^{*,†,||}

From the ^{*}Research Centre, Sainte-Justine University Hospital, Montreal, Canada; the [†]Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montréal, Canada; the [‡]Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Canada; ^{||}Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Canada.

The authors (AM, JM-P) have received funding from The Canadian Institute of Health Research (CIHR grant MOP-62791). Each author certifies that his or her institution has approved the human protocol for this investigation that all investigations were conducted in conformity with ethical principles of research, and that informed consents were obtained.

Correspondence to: Alain Moreau, PhD

Running title: Role of Pitx1 in Osteoarthritis

3.2 Abstract

Osteoarthritis is the most common form of arthritis and the precise etiology of this disease remains unclear. We took a candidate gene-driven strategy approach based on the observation that Pitx1 transcription factor was found during hind limb development in regions giving rise to cartilage joints, long bones and skeletal muscles, while its partial inactivation led to a progressive formation of osteoarthritis-like phenotype in aging Pitx1^{+/-} mice. To determine whether Pitx1 plays a role in osteoarthritis pathogenesis in humans, we performed an expression analysis of the *pitx1* gene using RNA prepared from articular chondrocyte cultures derived from knee cartilage of patients with osteoarthritis and age- and gender-matched control subjects. Pitx1 expression was detected in articular chondrocytes derived from matched control subjects, whereas in osteoarthritic articular chondrocytes, Pitx1 expression was barely detectable by reverse transcription–polymerase chain reaction. Immunostaining with anti-Pitx1 antibodies of histologic sections of human osteoarthritic and control cartilage showed Pitx1 proteins in the cartilage of control subjects, whereas Pitx1 proteins were hardly detected in human osteoarthritic sections. Collectively, our results uncovered an unrecognized role for Pitx1 in osteoarthritis and elucidation of the mechanism turning off its expression will clarify its pathophysiological relevance.

3.3 Introduction

Osteoarthritis (OA) is one of the most common age-related chronic disorders of articular cartilage and bone tissues. It is characterized by degradation of articular cartilage and overgrowth of adjacent bone, which results in pain and loss of joint function. The etiology of OA remains unclear, although multiple factors, including genetic and developmental, metabolic, and traumatic factors, have been considered in primary OA.^{10; 19} It has become increasingly apparent that distinct genetic risk factors may predispose different joint sites to OA as demonstrated by the degree of OA heritability (ie, hand versus knee), suggesting a high level of heterogeneity in the nature of the encoded susceptibility. This is also reflected by the multiplicity of loci identified in OA linkage studies and their discrepancies. Moreover, the majority of OA genetic susceptibility loci cannot be attributed to structural genes or genes regulating bone mass.^{11; 13; 15} Unfortunately, identifying genes that are switched on and off in OA cartilage using cDNA array technology adds to the complexity in differentiating the primary causes from the consequences of the disease. This problem arises from the focus of these works on late-stage disease because the early stages of OA progression are not well understood.

Here we took a different approach, considering a candidate gene-driven strategy based on the observation that in general, candidate genes for a late-onset disease such as OA may include those genes having a fundamental role during skeletal development. Among candidate genes involved in cartilage development, we choose to investigate the pituitary transcription factor 1 (Ptx1/Pitx1) because the spatiotemporal expression pattern of Pitx1 during hind limb development strongly argues in favor of its role in the control of endochondral growth and articular joint formation.

The Pitx family contains three related members, Pitx1, Pitx2, and Pitx3, which are members of the paired class of homeodomain proteins. The three Pitx factors have similar transcription properties; they all bind as monomers to a TAATCC sequence leading to

activation of transcription (reviewed in ^{3; 4; 6}), although depending on the promoter context, they can also act as transcription repressors.⁹ During mouse development, Pitx1 is highly expressed in articular joints and in the perichondrium of hind limb long bones.^{6; 18} Inactivation of Pitx1 gene by us and others confirmed the importance of this transcription factor in skeletal development.^{7; 20} Mice that are homozygous for the Pitx1 deletion are born with the expected Mendelian ratio, but they die soon after birth, exhibiting severe craniofacial and hind limb skeletal malformations.

We asked whether the Pitx1 transcription factor is essential to maintain cartilage function during adulthood by comparing aging wild-type and Pitx1^{+/-} heterozygous mice. Pitx1 expression at the mRNA and protein levels was also examined in human OA articular chondrocytes through comparison with matched controls.

3.4 Material and methods

Cartilage specimens (tibial plateaus) were obtained from 15 OA patients (mean 71 \pm 8 years) undergoing total knee replacement. Normal cartilage specimens were obtained postmortem at the autopsy from knee condyles within 12 hours of death from 12 donors with no history of joint diseases (mean 54 \pm 16 years). All OA patients were evaluated by a certified rheumatologist based on the American College of Rheumatology Diagnostic Subcommittee for OA criteria.¹ Human tissues were collected with the consent of patients and the study protocol was approved by The Institutional Ethics Committees of Sainte Justine and Notre Dame Hospitals, Montreal, Canada.

For immunohistochemistry assays, cartilage sections from eight patients with OA (two males, six females, mean 59 \pm 10 years) and eight control subjects (two males, six females, mean 67 \pm 8 years) were used. OA severity was previously evaluated under blinded conditions by two independent observers (FM, CP), and the variation between observers findings was \leq 5%. This evaluation was performed on adjacent sections using the histologic/histochemical scale of Mankin et al.¹²

Femur samples from 18 wild-type BALB/C mouse embryos at different embryonic stages (E13.5, E15.5 and E17.5; day one of pregnancy was defined by the detection of a vaginal plug) and human articular cartilage from 8 OA patients and 8 controls were used for immunohistochemistry using goat polyclonal anti-Pitx1 antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Tissues were processed for immunohistochemistry as previously described.¹⁶ Briefly, specimens were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (6 μ m) of paraffin-embedded specimens were deparaffinized in toluene, hydrated in a degraded series of ethanol, and preincubated with chondroitinase ABC (0.25 U/mL in PBS; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) for 60 minutes at 37°C. For each embryo and human cartilage 20 sections were generated and half of them processed. All tissue sections were incubated for 16 hours with anti-Pitx1

antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; dilution 1:200) and stained using the avidin-biotin complex method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The color was developed using 1,4-dimethylaminoazobenzene (Dako Diagnostics Inc, Mississauga, ON, Canada) containing hydrogen peroxide, and the slides were counterstained with hematoxylin (Digene Diagnostics Inc, Silver Spring, MD). We evaluated antibody specificity by omitting the primary antibody following the same experimental protocol. Positively stained chondrocytes were evaluated using our previously published methods.¹⁶ For each human cartilage specimen, we (CP, FM) examined six microscopic fields (x40; Leitz Diaplan, Wetzlar, Germany), three fields at the superficial and upper intermediate layers (superficial zone) and three fields at the lower intermediate and deep layers (deep zone). The total number of chondrocytes and the number of chondrocytes staining positive for Pitx1 were evaluated separately for each zone of cartilage and for the full-thickness cartilage (superficial and deep zones). Each slide was evaluated by two independent observers (CP and FM) with a maximum inter-observer variation of $\leq 5\%$ recorded. Results were expressed as the percentage of total chondrocytes staining positive for Pitx1 (cell score), the maximum score being 100%.

Adult mouse specimens were fixed with 70% ethanol and embedded in methyl methacrylate. Then, 6- μm thick midsagittal sections of the femoral metaphysis ($n = 6$) underwent trichrome staining according to the Masson-Goldner method. Briefly, methyl methacrylate was removed by Egma (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) treatment for 40 minutes and then nuclei were stained in 1% Weigert hematoxylin solution (Fisher Scientific) for 20 minutes and directly washed for 10 minutes in running tap water. Subsequently, sections were stained with Fushin Ponceau solution (Fisher Scientific) for 30 minutes and rinsed in 1% acetic acid. Then, Orange G solution (Sigma-Aldrich, St.Louis MO, USA) was applied to the slides for 8 minutes followed by another rinse in 1% acetic acid. Counterstaining was performed with Light Green solution (Fisher Scientific) for 20 minutes followed by a rinse in 1% acetic acid. After dehydration in butanol and toluene, the

sections were mounted in Histomount (National Diagnostics, Atlanta, GA). Representative pictures of the tibial metaphyses just below the proximal growth plate were taken.

Degenerative changes of knee joints in Pitx1^{+/-} adult mice were evaluated initially by the detection of gait abnormalities through observation periods, measurement of the stiffness of hind limb articulation by direct hand manipulation and X-ray evaluation to monitor the presence of increased calcification of articular cartilage and adjacent bones. Radiographs were performed (by AM) by comparing 24-months old BALB/C Pitx1^{+/-}, 129/Sv Pitx1^{+/-}, and wild-type 129/Sv male mice under anesthesia using a Faxitron x-ray cabinet (Faxitron Corp. Madison, WI, USA).

Human cartilage from 7 OA patients and 4 controls were sectioned from the tibial plateaus, 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. For RNA extraction, GTC lysis buffer (2 M GTC, β -mercaptoethanol 3.6/1000 v/v and 0.1 M sodium acetate in diethyl pyrocarbonate-treated water) was added to phosphate-buffered saline-rinsed cells. Thereafter, the cells were scraped and ruptured using an 18-gauge needle. Chloroform:IAA was added to the lysate and it was kept on ice for 15 minutes. After spinning, the upper aqueous layer was carefully put in another tube. Isopropanol was added and the mixed solution was incubated overnight at -20°C. After centrifugation, the pellet was washed twice with 70% ethanol, dried, and reconstituted in diethyl pyrocarbonate water.

For RT-PCR, 2 μ g of total RNA was reverse transcribed using ThermoScript reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the equivalent of 0.1 μ g of reverse-transcribed RNA used for PCR reactions. These were carried out in a final volume

of 25 μ L containing 200 μ mol dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 pM of each primer, and 1U of Pfx DNA-polymerase (Invitrogen). PCR reactions were performed using the following primers and conditions: human Pitx1 (960 base pair PCR product), forward primer 5'-CCCACCTCCATGGACGCCTT-3'; reverse primer 5'-GTCAGCTGTTGTAAGTGGC ACGC-3' (35 cycles: 94°C/45 seconds, 65°C/45 seconds, 68°C/1 minute) and human β -actin (233 base pair PCR product), forward primer 5'-GGAAATCGTGCGTGACAT-3', reverse primer 5'-TCATGATGGAGTTGAATGTAGTT-3' (32 cycles: 94°C/1 minute, 55°C/1 minute, 72°C/1 minute). For semi-quantitative analysis, all amplifications were normalized against those of the housekeeping gene β -actin. PCR amplified product were separated on 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

For statistical analysis of immunohistochemistry experiments, human chondrocytes were scored as positive when nuclei were stained after immunodetection with anti-Pitx1 antibodies (dependent variables) using 8 controls and 8 OA cartilage specimens (independent variables). Data were expressed as mean \pm standard error of mean. Significance was assessed by Mann-Whitney U-test and $p < 0.05$ was considered significant.

3.5 Results

During normal mouse hind limb development, Pitx1 was highly expressed in the articular joint and in the perichondrium of long bones of wild-type BALB/C mouse embryos. At E13.5, E15.5 and E 17.5 (Figs 1A-C), specific immunostaining was observed in the nuclei of chondrocytes from the proliferating and reserve zone. More abundant staining was observed in tissues taken at E17.5 (Fig 1C) when compared to E13.5 (Fig 1A) including the adjacent skeletal muscles. These results suggest a particular role for Pitx1 protein in the progressive development of hind limb articulations. The specificity of the staining was demonstrated by the absence of staining observed in the negative control (Fig 1D).

Heterozygous mice harboring only one mutated pitx1 allele were phenotypically normal at birth, although adult mice (males and females) exhibited an abnormal gait and an increased stiffness of their hind limb articulations. This finding led us to perform radiographic examinations that revealed an increased radiodensity at the cortical and articular levels contrasting with age-and gender-matched mouse controls (Fig 2). This age-related phenotype associated with the partial loss of Pitx1 prompted us to further study the articulations of Pitx1 +/- mice.

Histological analysis of sections (stained with the Goldner method) of Pitx1 +/- femurs further confirmed abnormal thickening of the subchondral, trabecular, and cortical bone complicated with marked calcification of the cartilage (Fig 3). Taken together, these observations were consistent with the early stages of OA, and the affected areas correspond to the joint and adjacent tissues where Pitx1 was normally expressed.

In humans, in contrast to the same cell type obtained from matched controls, Pitx1 expression was hardly detected at the mRNA level in OA articular chondrocytes (Fig 4). These in vitro results indicate also that Pitx1 expression is intrinsically deregulated in OA

articular chondrocytes even when they are exposed to favorable cell culture conditions, suggesting a more direct influence of genetics over metabolic changes associated with OA.

At the protein level, Pitx1 was detected on histological sections of human control and OA cartilage, being far less abundant in the latter tissue (Fig 5). By immunohistochemistry assays using anti-Pitx1 antibodies, the normal cartilage showed Pitx1 positive staining all over the superficial and deep zones. In OA cartilage, we noticed Pitx1 proteins were restricted, when detected, to the more superficial zone.

3.6 Discussion

We hypothesized that primary knee joint OA could involve changes in genes playing a role in the development and formation of articular cartilage, bone and skeletal muscles, three tissues affected in primary OA. Previous works clearly demonstrated Pitx1 plays a role in the regulation of chondrogenesis during development.⁷ Indeed, Pitx1-null mice displayed poorly developed joints with reduced length of adjacent skeletal elements,^{7;}²⁰ exhibiting a marked expansion of the hypertrophic chondrocyte zone in the growth plate⁷, this has been correlated *in vivo* by a drastic increase in type X collagen expression. In absence of Pitx1, proliferation and increasing expression of hypertrophic hallmarks indicates impairment in the programmed process that normally constrains articular chondrocytes to differentiate into a mature phenotype. Thus, loss of Pitx1 expression alters the differentiation program of articular chondrocytes.⁷ Indeed, chondrogenesis regulation is relevant for OA development, and particularly for the early phase of OA. Also, in OA development, the endochondral ossification process appears reinitiated, leading to thickening of the bone underlying the joint cartilage and to the formation of bony spurs at the joint margins as observed in older Pitx1^{+/-} mice by X-rays radiographies (Fig 2). In the early OA stage, the process of cartilage remodeling seems to mimic that of cartilage development during embryogenesis.¹⁷ Overall, our results suggest inhibition of Pitx1 expression, at the mRNA and protein levels, is associated with osteoarthritis pathogenesis.

Interestingly, aging Pitx1^{+/-} heterozygous mice, which are normal at birth, progressively developed degenerative changes of the knee resembling human OA associated with the thickening of subchondral bone, a common finding observed in primary OA. Collectively these results prompted us to investigate the role of this homeobox transcription factor in primary knee joint OA. The calcification of articular cartilage in primary OA is of interest because chalky deposits of calcium crystals are frequently formed in cartilage of patients with OA, but calcification may also be seen in the joint capsule or synovial membrane.⁵ Cartilage calcifications often appear before they are radiographically

apparent, providing a means of early disease detection. Similar changes were observed in the present study during both histologic and radiographic examinations of the knees of Pitx1^{+/-} heterozygous mice. The radiographs showed increased radiodensity, and Goldner staining confirmed subchondral, cortical, and trabecular bone thickening on femoral heads of Pitx1^{+/-} heterozygous mice but not on the femoral head of control mice. Phenotypic characterization of aging Pitx1 ^{+/-} mice clearly demonstrated bony changes precede cartilage erosion and calcification even at the early stages of OA. The latter aspect seems more recognized, and it is accepted that OA is not only a joint disease, but also a bone disease because the underlying subchondral and trabecular bones are both severely affected. In 1978, Radin et al¹⁴ postulated the increased bone mass and thickening of the subchondral bone might in fact be the primary event of joint degeneration.^{2; 8} This hypothesis remains highly controversial and it has never been confirmed.

Lack of Pitx1 function in articular cartilage resulted in severe calcification, erosion of the articular surface and increased thickening of adjacent bones as demonstrated in aging Pitx1^{+/-} mice. These observations in Pitx1-deficient mice raise the possibility that defects in regulation of Pitx1 activity also contribute to human joint disease. Indeed, our expression analysis revealed a loss of Pitx1 expression in all human OA knee joints tested when compared with matched controls. In fact, Pitx1 mRNA expression was hardly detected in primary OA articular chondrocytes, whereas Pitx1 proteins were detected in both the superficial and deep zones of control cartilage contrasting with OA cartilage sections in which Pitx1 was almost abolished in the deep zone of cartilage and weakly detected in the superficial zone. The presence of Pitx1 in mature cartilage of control subjects and the fact that inactivation of only one Pitx1 allele in mice is sufficient to trigger an OA-like phenotype strongly argues that Pitx1 gene dosage is probably essential for the maintenance of healthy cartilage and the normal mechanical properties of adjacent bones, which go far beyond of the role of Pitx1 during embryonic development as initially expected.

Interestingly, Wang et al. previously reported a six-fold down-regulation of early growth response protein-1 (Egr-1), a well known Pitx1 transcriptional interacting partner,

in multiple human OA cartilage samples when compared to normal tissue^{21; 22}. It remains possible that both transcription factors could be required to fully activate common downstream genes in normal cartilage although in the scope of this study we did not assess changes in Egr-1 expression in Pitx1^{+/-} cartilage as well as in human OA cartilage.

This study was limited to primary knee OA and it remains conceivable that loss of Pitx1 expression could occur also in individuals suffering of primary hip OA since during mouse development Pitx1 expression is detected also in normal hip joints and adjacent skeletal elements.⁶ It is unclear whether individuals genetically predisposed to develop primary knee OA exhibit only one Pitx1 functional allele or if additional mechanisms induced by aging process are involved. The molecular switch turning off Pitx1 expression in human OA cartilage remains unknown and additional investigations have been undertaken to identify and characterize such mechanisms.

Our data demonstrated that Pitx1 transcription factor is expressed in normal human knee joint cartilage and its loss occurs in patients with primary knee OA. This may be a transcription factor associated with OA pathogenesis and contrasting with other genes encoding structural proteins and more recently signaling molecules. Notwithstanding the multiplicity of factors associated with primary knee OA, the data presented here clearly demonstrate a loss of Pitx1 expression in OA. This could cause the functional loss of mechanisms that arrest articular cartilage differentiation although conclusion about the specific role of Pitx1 in human subjects awaits for future studies.

3.7 Acknowledgments

We thank the subjects and families who participated in this study. We also thank the orthopedic surgeon (Dr. Julio Fernandes) and rheumatologist (Dr. Jean-Pierre Pelletier) who referred the OA subjects and provided cartilage specimens. Pitx1 $-/-$ and $+/-$ mice were initially generated in Dr. Jacques Drouin's Laboratory (Clinical Research Institute of Montreal). We finally thank Dr. Cristina Manacu, Dr. Ginette Tardif, Mrs. Ginette Lacroix, and Mrs. Isabelle Turgeon for their technical support and helpful assistance.

3.8 References

1. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, Howell D, Kaplan D, Koopman W, Longley S, Mankin H, McShane DJ, Medsger TJR, Meenan R, Mikkelsen W, Moskowitz R, Murphy W, Rothschild B, Segal M, Sokoloff L, Wolfe F. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum.* 1986;29:1039–1049.
2. Bailey AJ, Mansell JP. Do subchondral bone changes exacerbate or precede articular cartilage destruction in osteoarthritis of the elderly? *Gerontology.* 1997;43:296–304.
3. Drouin J, Lamolet B, Lamonerie T, Lanctot C, Tremblay JJ. The PTX family of homeodomain transcription factors during pituitary developments. *Mol Cell Endocrinol.* 1998;140:31–36.
4. Drouin J, Lanctôt C, Tremblay JJ. La famille Ptx des facteurs de transcription à homéodomaine. *Med Sci (Paris).* 1998;14:335–339.
5. Eckstein F, Putz R, Muller-Gerbl M, Steinlechner M, Benedetto KP. Cartilage degeneration in the human patellae and its relationship to the mineralisation of the underlying bone: a key to the understanding of chondromalacia patellae and femoropatellar arthrosis? *Surg Radiol Anat.* 1993;15:279–286.
6. Lanctôt C, Lamolet B, Drouin J. The bicoid-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development.* 1997;124:2807–2817.
7. Lanctôt C, Moreau A, Chamberland M, Tremblay ML, Drouin J. Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development.* 1999;126:1805–1810.
8. Li B, Aspden RM. Mechanical and material properties of the subchondral bone plate from the femoral head of patients with osteoarthritis or osteoporosis. *Ann Rheum Dis.* 1997;56:247–254.
9. Lopez S, Island ML, Drouin J, Bandu MT, Christeff N, Darracq N, Barbey R, Doly J, Thomas D, Navarro S. Repression of virusinduced interferon A promoters by homeodomain transcription factor Ptx1. *Mol Cell Biol.* 2000;20:7527–7540.
10. Loughlin J. Genetic epidemiology of primary osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2001;13:111–116.
11. Loughlin J. Polymorphism in signal transduction is a major route through which osteoarthritis susceptibility is acting. *Curr Opin Rheumatol.* 2005;17:629–633.
12. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips: II: correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am.* 1971;53:523–537.

13. Peach CA, Carr AJ, Loughlin J. Recent advances in the genetic investigation of osteoarthritis. *Trends Mol Med*. 2005;11:186–191.
14. Radin EL, Abernethy PJ, Townsend PM, Rose RM. The role of bone changes in the degeneration of articular cartilage in osteoarthritis. *Acta Orthop Belg*. 1978;44:55–63.
15. Reginato AM, Olsen BR. The role of structural genes in the pathogenesis of osteoarthritic disorders. *Arthritis Res*. 2002;4:337–345.
16. Roy-Beaudry M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, M'Barek KN, Christgau S, Shipkolye F, Moldovan F. Endothelin 1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via matrix metalloprotease 1 and matrix metalloprotease 13 induction. *Arthritis Rheum*. 2003;48: 2855–2864.
17. Sandell LJ, Adler P. Developmental patterns of cartilage. *Front Biosci*. 1999;4:D731–D742.
18. Shang J, Luo Y, Clayton DA. Backfoot is a novel homeobox gene expressed in the mesenchyme of developing hind limb. *Dev Dyn*. 1997;209:242–253.
19. Spector TD, MacGregor AJ. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12(Suppl A):S39–S44.
20. Szeto DP, Rodriguez-Esteban C, Ryan AK, O'Connell SM, Liu F, Kioussi C, Gleiberman AS, Izpisua-Belmonte JC, Rosenfeld MG. Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev*. 1999;13:484–494.
21. 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; 19:2567–2576.
22. Wang FL, Connor JR, Dodds RA, James IE, Kumar S, Zou C, Lark MW, Gowen M, Nuttall ME. Differential expression of egr-1 in osteoarthritic compared to normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2000;8:161–169.

3.9 Figure legends

Fig 1A-D. Pitx1 protein is localized in the articular joint-forming region and in articular chondrocytes in developing mice hind limb long bones. Immunohistochemistry was performed with anti-Pitx1 antibodies on tissue section from wild-type BALB/C mouse embryo at E13.5 (A), E15.5 (B) and E17.5 (C). Note that Pitx1 (brownish-colored nuclei) is abundantly detected in the perichondrium (p), hyperprophic zone (h), proliferative zone (pr), reserve hyaline cartilage (r) and skeletal muscles (m). (D) No staining was observed when the primary antibody was omitted as a negative control. (Stain, diaminobenzidine and hematoxylin; original magnification, x5 and x20)

Fig 2A-C. Radiographs of different strains of 24-months old mice were taken. BALB/C Pitx1^{+/-} male (A), 129/Sv Pitx1^{+/-} male (B) and wild-type 129/Sv male are shown. Note the abnormal thickening of the cortical bone (white arrows) in both heterozygous mice. The BALB/C Pitx1^{+/-} male also exhibits a striking skeletal outgrowth deforming the knee joint (A). These radiographic abnormalities were also detected in 24-months old Pitx1^{+/-} female mice (BALB/C analyzed n = 3; 129/Sv analyzed n = 4) and in other aging Pitx1 ^{+/-} males (analyzed n = 7) but never in comparable wild-type mice analyzed so far (n = 5).

Fig 3A-D. Pitx1 ^{+/-} mice show histological changes of osteoarthritis at 7-months of age. This bone histology focuses on distal end of the right femur of a 7-months old wild-type mouse (A-B) and Pitx1^{+/-} mouse (C-D). Goldner staining shows bone and calcified tissues as green and cartilage and bone marrow cells as red. Subchondral, cortical, and trabecular bone thickening is observed in Pitx1^{+/-} mouse (C) as compared to wild-type one (A). At higher magnification (40x), a substantial increase of calcification and cartilage stain changes are observed in the articular cartilage of heterozygous mouse (D) as compared with wild-type one (B). (Stain, Goldner; original magnification, A-C x2.5 and B-D x40)

Fig 4A-B. (A) Reverse transcription-polymerase chain reaction was performed for Pitx1 gene expression in human articular chondrocytes derived from knee cartilage of control subjects (N, n = 4) and patients with osteoarthritis (OA, n = 7). Pitx1-specific mRNA transcripts were detected in all control tissues (N1-N4). Loss of Pitx1 gene expression was observed in all examined osteoarthritis samples (OA1-OA7) and β -actin expression was used as an internal control. (B) The relative expression of Pitx1 mRNA was indicated by ratio of the band densities over β -actin, which served as internal RNA loading controls. The PCR bands were scanned with the FluorChemTM imaging system (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA). Data were calculated as a ratio of Pitx1/ β -actin for Normal (n=4) versus OA (n=7) specimens. The data were expressed as mean \pm SEM. Significance was assessed by Mann-Whitney *U*-test, ($p < 0.01$).

Fig 5A-G. Representative samples of control (A-B) and osteoarthritic cartilage specimens (C-D) were immunostained using anti-Pitx1 antibody (control: n = 8 and OA: n = 8). In control cartilage sections (A-B), specific immunoreactivity was demonstrated in chondrocytes from the superficial and deep zones. In osteoarthritic cartilage (C-D), only a few cells stained specifically for Pitx1. These were located mainly in the superficial layer. (E-F) The specificity of staining was evaluated by omission of the primary antibody following the same experimental protocol. No staining was observed. (G) Cell scores for Pitx1-positive chondrocytes, indicating differences between osteoarthritis and normal (control) cartilage and between the deep zones for each cartilage type by Mann-Whitney *U*-test. Values are the mean \pm standard error of mean of eight normal and eight osteoarthritis specimens (Stain, diaminobenzidine and hematoxylin; original magnification, A-C-E x10 and B-D-F x40).

3.10 Figures

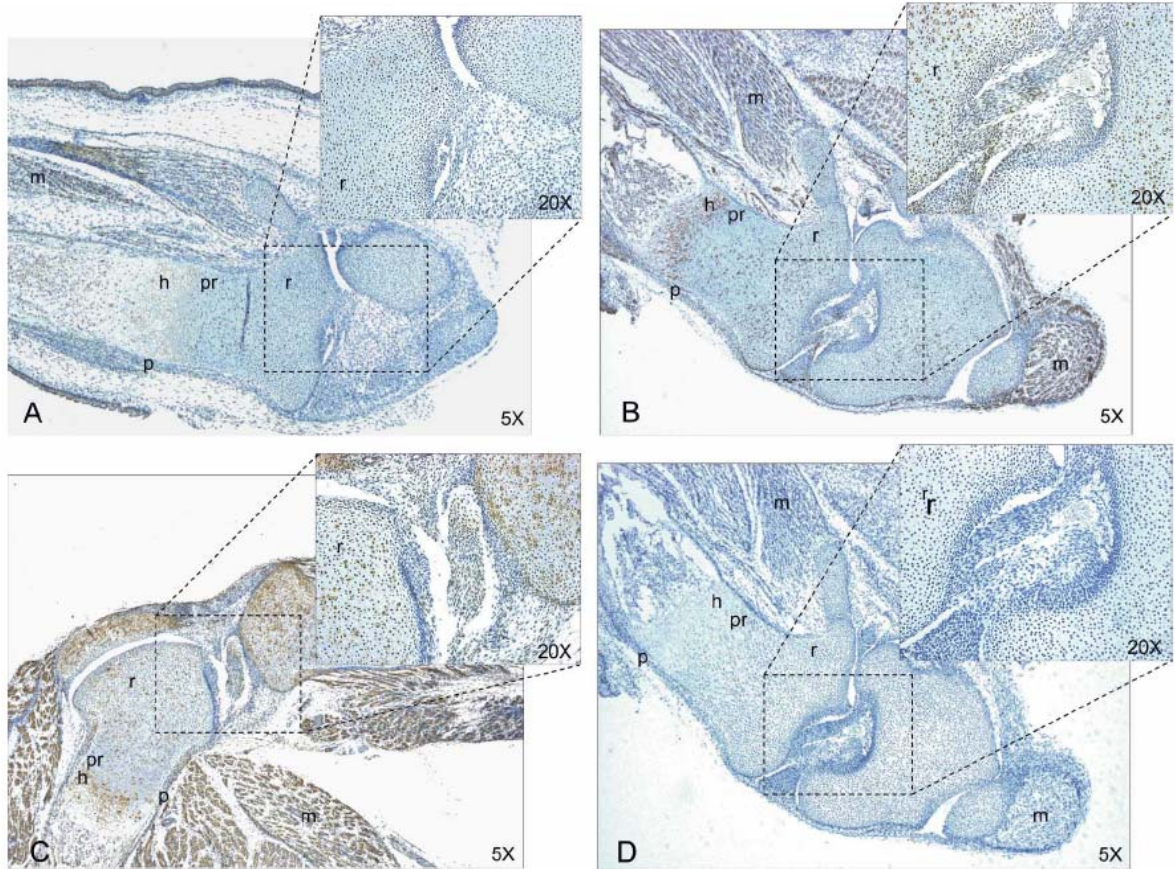


Figure 1. Pitx1 protein is localized in the articular joint-forming region and in articular chondrocytes in developing mice hind limb long bones.



Figure 2. Radiographs of different strains of 24-months old Pitx1 +/- mice.

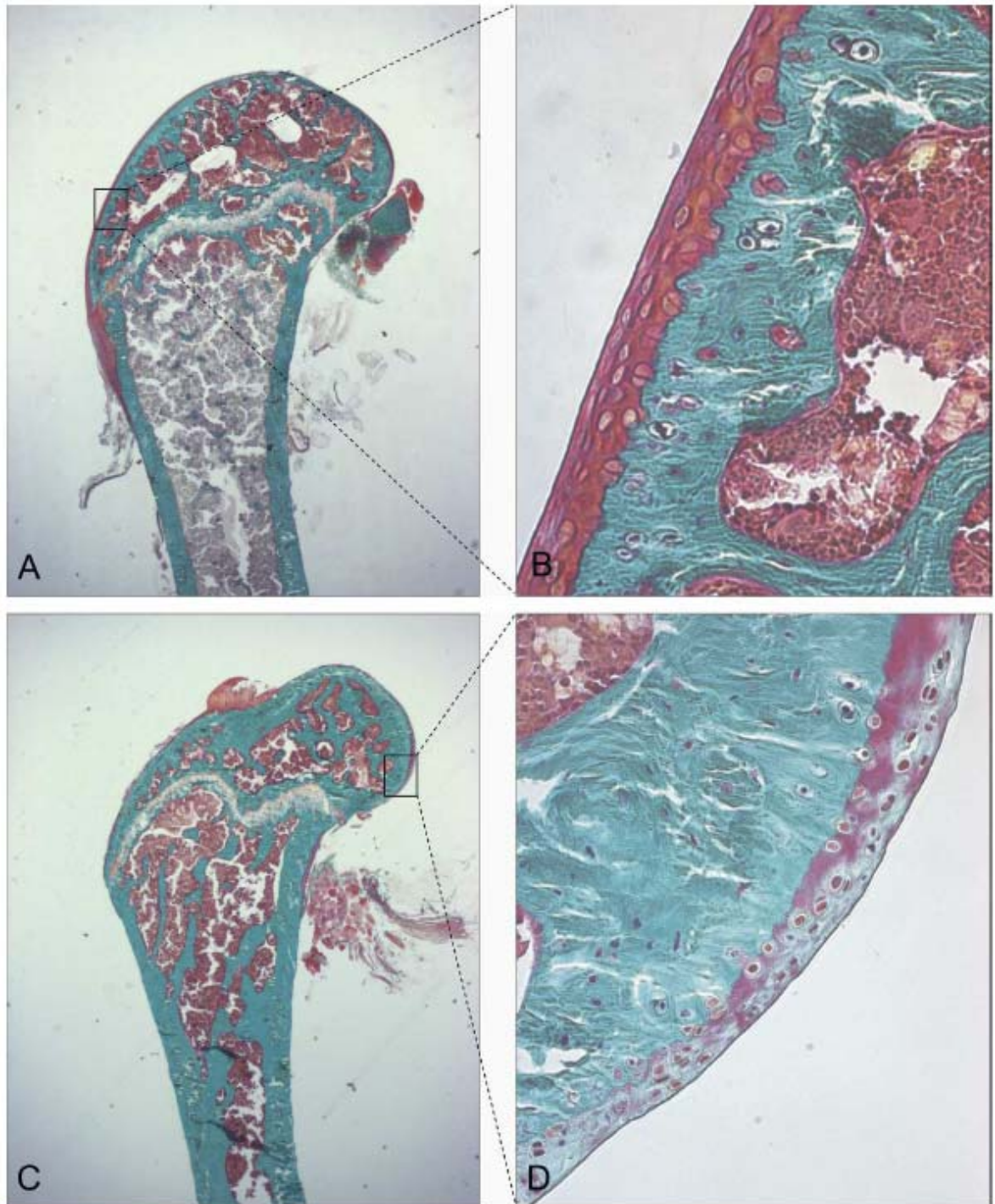


Figure 3. Pitx1 +/- mice show histological changes of osteoarthritis at 7-months of age.

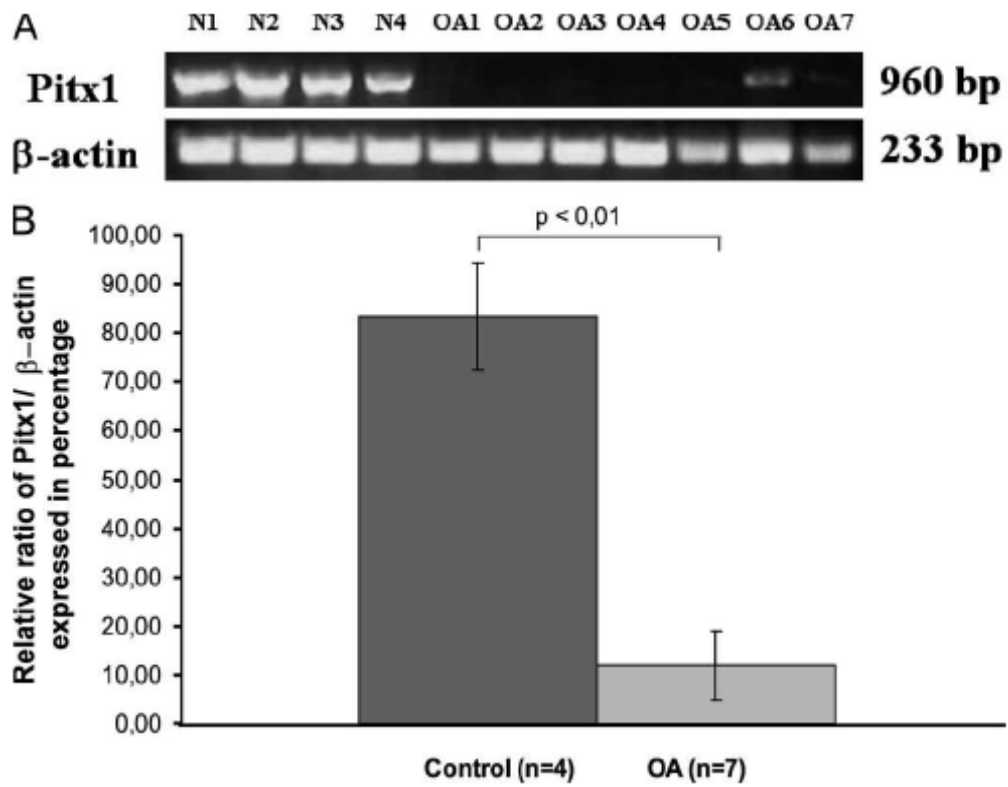


Figure 4. Reverse transcription-polymerase chain reaction shows loss of Pitx1 gene expression in osteoarthritis samples.

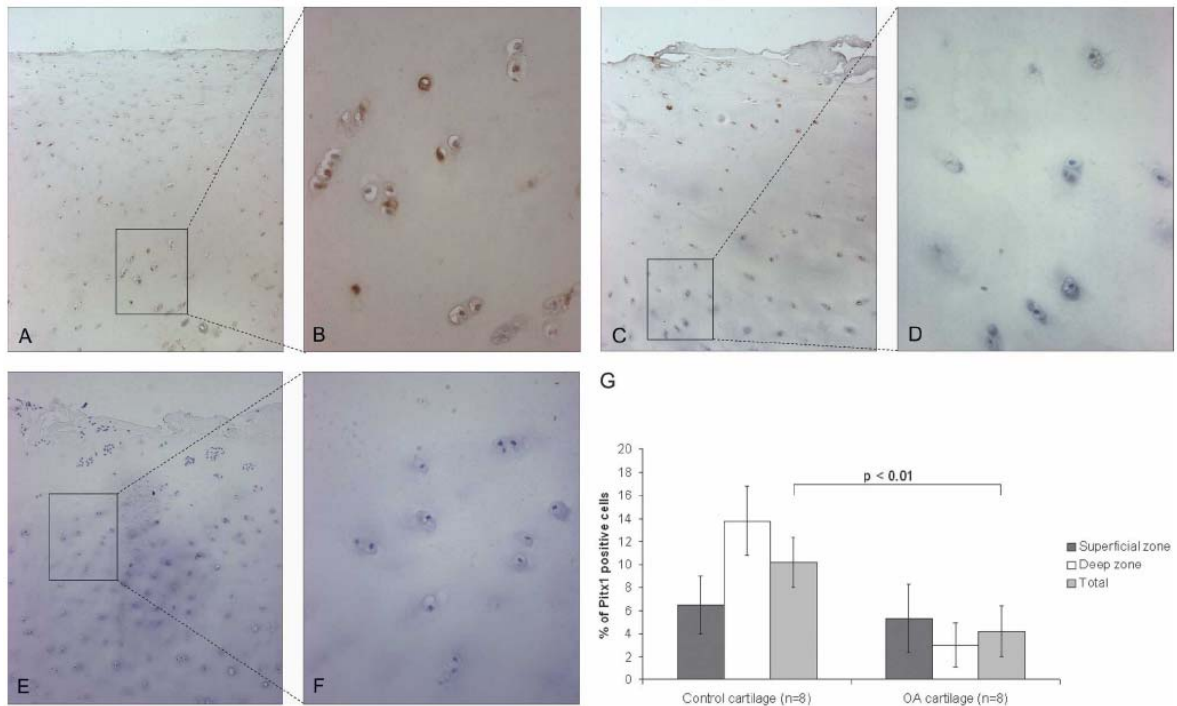


Figure 5. Cartilage specimens immunostained with anti-Pitx1 antibody show loss of Pitx1 expression in osteoarthritis samples.

Préface au chapitre 4

Ce chapitre, également sous forme d'article, fait suite logique à l'article #1 présenté dans le chapitre précédent. Dans un contexte où l'identification de marqueurs biologiques de l'arthrose est devenue une quête omniprésente, nous avons voulu trouver de nouvelles cibles de PITX1 jamais associées à l'arthrose dans le passé. Les cibles identifiées, soit EXTL3, REG1 et PARP1, sont toutes impliquées à divers degrés dans la régénération tissulaire, d'où notre intérêt d'explorer leurs rôles potentiels dans la pathogenèse de l'arthrose.

Dans les phases précoces de l'arthrose, il est connu que le cartilage répond aux injures en initiant un processus de réparation (discuté dans l'introduction de la thèse). Comme il est difficile de mesurer cet aspect avec les techniques conventionnelles d'évaluation de la sévérité de l'arthrose, j'ai développé une nouvelle méthode de classification des dommages arthrosiques, tenant compte de ce problème. Cette méthode est détaillée dans le manuscrit intitulé "New method of osteoarthritis classification: using Photoshop imaging to measure cartilage autofluorescence" (169).

L'article présenté ici, concernant les cibles de PITX1 pouvant potentiellement servir de biomarqueurs d'arthrose, est une version corrigée du manuscrit ayant été soumis en juillet 2011 dans le journal *Arthritis & Rheumatism*. Dans cette version, les transfections nécessitant l'utilisation de siRNA ont été réalisées par les Drs Jean-François Lavoie et Maryam Taheri. Le Dr DaShen Wang a procédé à la préparation du matériel biologique pour l'histologie et la culture cellulaire. Anita Franco, assistante de recherche, a contribué par son support technique et par la correction initiale de l'anglais écrit. Dre Florina Moldovan a fourni un soutien matériel pour les expériences d'histologie et a approuvé la version finale du manuscrit. Le Dr Patrick Lavigne, chirurgien orthopédiste, a fourni des échantillons de cartilage sain et arthrosique.

Le Dr Alain Moreau a participé à la conception de l'étude ainsi qu'à la correction et l'approbation de la version finale. J'ai effectué toutes les expériences de PCR en temps réel, les infections avec les lentivirus et l'histologie. J'ai rédigé la majeure partie du texte avec l'aide du Dr Lavoie. La version quasi finale a ensuite été revue et corrigée par Mme Danielle Buch, rédactrice médicale professionnelle.

Chapitre 4 - Article #2

Nouveaux marqueurs biologiques de l'arthrose modulés par le facteur de transcription PITX1

4.1 Title page

Novel Osteoarthritis Biomarkers Modulated by PITX1 Transcription Factor

Cynthia Picard,¹ Jean-François Lavoie,¹ Maryam Taheri,² DaShen Wang,² Anita Franco,² Florina Moldovan,³ Patrick Lavigne,⁴ and Alain Moreau⁵

¹Cynthia Picard, MSc, and Jean-François Lavoie, PhD: Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases, Sainte-Justine University Hospital Research Center, Montreal, QC, Canada, and Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada; ²Maryam Taheri, PhD, DaShen Wang, MD, PhD, Anita Franco, MSc: Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases, Sainte-Justine University Hospital Research Center, Montreal, QC, Canada; ³Florina Moldovan, MD, PhD, Sainte-Justine University Hospital Research Center, Montreal, QC, Canada, and Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, University of Montreal, Montreal, QC, Canada; ⁴Patrick Lavigne, MD, PhD, Orthopedic Division, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, QC, Canada, and Department of Surgery, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada; ⁵Alain Moreau, PhD, Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases, Sainte-Justine University Hospital Research Center, Montreal, Qc, Canada, and Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, University of Montreal, Montreal, QC, Canada, and Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada.

Corresponding author:

Prof. Alain Moreau

Director, Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases
Sainte-Justine University Hospital Research Center

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR MOP-62791). The study was approved by the institutional review boards of Sainte-Justine University Hospital, Maisonneuve-Rosemont Hospital, and Notre-Dame Hospital at the University of Montreal Hospital Centre (CHUM).

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Running head: Novel OA biomarkers

4.2 Abstract

Objective: To further understand the molecular mechanisms leading to osteoarthritis (OA) onset and progression. We previously showed that loss of PITX1 expression occurs in human OA cartilage when compared to age-matched control individuals. The objective of this study was to investigate the impact of such a dysregulation by identifying new downstream targets of PITX1 potentially involved in OA pathogenesis.

Methods: Using a candidate gene approach, *Extl3*, *Reg1* and *Parp1* expression levels were evaluated *in vivo* by RT-PCR in transgenic (Pitx1 +/- and -/-) and wild type (Pitx1 +/+) mice. In human articular chondrocytes from 23 OA patients and 5 control subjects, mRNA and protein levels of EXTL3, REG1 and PARP1 were measured by qPCR and immunohistochemistry. To confirm that these genes were downstream targets of PITX1, we used either transfections with siRNA or lentivirus infections *in vitro* to modulate *PITX1* expression levels in cultured human chondrocytes.

Results: *In situ* expression of EXTL3, REG1 and PARP1 proteins is up-regulated in cartilage of OA patients. Forced *in vivo* (transgenic mice) or *in vitro* (cultured human chondrocytes) *PITX1* down-regulation resulted in the up-regulation of candidate genes and also induced OA biomarker expression (*COL10A1*, *MMP13*). Forced *PITX1* over-expression slightly repressed *COL10A1* and *MMP13*.

Conclusion: This study is the first to identify the PITX1 regulated genes, *EXTL3*, *REG1* and *PARP1* as novel OA biomarkers. Although mechanisms responsible for the down-regulation of *PITX1* in OA are yet to be characterized, these results suggest new therapeutic targets due to the role of these biomarkers in tissue regeneration.

4.3 Introduction

Osteoarthritis (OA) is one of the most common age-related disorders of articular cartilage, joints and bone tissues, and constitutes the leading cause of chronic disabilities worldwide. The most prevalent forms of OA manifest in the knees (13%), followed by the hip (5%) and the hand (3%) (1). Primary knee OA is a complex phenotype that may occur as a consequence of multiple genetic defects (2) in pathways involved in the formation of knee joints, skeletal elements and in the maintenance of cartilage integrity and stability. Identification of genes and biological pathways is critical in the understanding of OA etiopathogenesis and of the gene-environment interactions that modulate the incidence and severity of a given phenotype. In this context, we have previously identified paired-like homeodomain 1 (*PITX1*), a homeobox transcription factor, as a relevant OA candidate gene (3). *Pitx1* was shown to play an important role in mouse and chick hind limb development and identity (4-6). This homeobox transcription factor determines the morphology of diarthrodial joint tissues such as muscles, tendons, bones and cartilage (7, 8), all of which are involved in OA (9). Mice null for *Pitx1* display poorly developed joints with marked expansion of the hypertrophic chondrocyte zone in the growth plate (8), correlating with a dramatic increase in type X collagen expression (A.M., unpublished observations). Heterozygous mice (*Pitx1*^{+/-}) are phenotypically normal at birth but later exhibit degenerative changes in knee joints reminiscent of the clinical pathogenesis observed in human OA cartilage (3). Furthermore, a loss of *PITX1* expression has been observed in patients suffering from primary knee joint OA (3).

Little is known about the transcriptional targets of *PITX1* in bone and cartilage. The presence of cartilaginous-like outgrowths on femur condyles of *Pitx1* heterozygous mice (3) prompted us to investigate genes that were differentially expressed following the loss of *Pitx1*. In the literature, the exostosin (*EXT*) family of genes had a strong association with outgrowth formation. *EXT1* has been linked to osteophyte formation (10). Both *EXT1* and *EXT2* are involved in hereditary multiple exostoses, although the exostosin-like gene 3 also

known as exostosin (multiple)-like 3 (*EXTL3*), another EXT family member, is not associated with this disorder.

The objectives of this study, therefore, were to identify candidate genes that are downstream targets of PITX1 that might have an impact on OA pathogenesis, as well as to better define the genes and molecules involved in the early stages of OA in humans. We particularly investigated EXT1, EXT2, *EXTL3*, as well as regenerating islet-derived 1 (*REG1*) which is a putative ligand of the *EXTL3* receptor, and poly (ADP-ribose) polymerase 1 (*PARP1*) which is a *REG1* transcriptional regulator. We also examined collagen type X alpha 1 (*COL10A1*) and matrix metalloproteinase 13 (*MMP13*), two known OA biomarkers.

4.4 Material and methods

Mouse model: Transgenic *Pitx1* heterozygous (+/-) and knock-out (-/-) mice were bred on a 129/Sv genetic background at the laboratory of Dr. Jacques Drouin (Clinical Research Institute of Montreal) (8). For histological analysis, wild-type (+/+) and heterozygous mice were sacrificed at 7 months of age; femurs were surgically removed, fixed in formaldehyde, dehydrated and embedded in methyl methacrylate until sectioned. For polymerase chain reaction (PCR) analysis, RNA was extracted from whole knee joints of *Pitx1* +/+, +/-, and -/- embryos aged 18.5 days using TRIzol reagent (Invitrogen, Burlington, ON, Canada).

Human cartilage sections: We obtained OA cartilage specimens from tibial plateaus, femoral condyles, and femoral heads from 23 OA patients (15 females and 8 males, mean age 66 ± 20 years) undergoing total knee and hip joint replacement. Three control cartilage specimens were obtained from unused material following knee cartilage transplantation from non-OA patients who had died from other causes (1 female, 2 males; ages at death 16, 18 and 34 years, respectively). Two additional control cartilage specimens came from the knee of a 50-year-old male and a 72-year-old female with trauma and no history of joint disease. All patients were evaluated by a certified rheumatologist using criteria based on the American College of Rheumatology Subcommittee diagnostic guidelines. Human tissues were collected with the consent of patients or of their relatives for post-mortem tissues. The study protocol was approved by the institutional review boards of Sainte Justine University Hospital, Maisonneuve-Rosemont Hospital, and Notre-Dame Hospital at the University of Montreal Hospital Centre (CHUM), Montreal, Canada.

Cell cultures: Human OA and normal cartilage specimens were sectioned, rinsed and finely minced. After digestion with 0.25% trypsin for 1 hour at 37°C, they were 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 in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (HyClone, Logan, UT) and 1% penicillin and streptomycin. This medium was also used for culturing the human embryonic kidney cell line HEK293, which we used to generate the lentiviruses as well as a control vehicle to measure lentivirus infection. Immortalized human chondrocytes C28/I2 cell line (generously provided by Dr. Mary Goldring, Hospital for Special Surgery, Cornell University) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium mixed 1:1 with F-12K Nutrient Mixture, Kaighn's Modification (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin and streptomycin.

Transfection assays: To silence endogenous *PITX1* expression (gene knockdown), we transfected chondrocyte cell cultures from patients or the C28/I2 cell line using Lipofectamine RNAiMAX Transfection Agent (Invitrogen) as per manufacturer's guidelines. Briefly, cells were plated at a density of 2.0×10^5 cells/cm² and transfected with either scrambled sequence or *PITX1*-silencing oligonucleotide (5'-AAACGACGAGUGC-UGUUUGGACUUG-3') (Invitrogen). After 76 hours, cells were harvested with TRIzol reagent for RNA analysis or with lysis buffer for protein analysis.

Infection with lentivirus: Lenti-X Lentivirus Expression Systems (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) were used to infect HEK293 cells or chondrocytes, according to manufacturer's instructions. The entire coding region of human *PITX1* was amplified using cDNA from the C28/I2 cell line with primers 5'-ATGGATCCATGGACGCCTTCAAGGGGG-3' and 5'-TTGCGGCCGCTCAGCTGTTG-ACTGGCACGC-3'. After double digestion with restriction enzymes BamHI and NotI for the underlined sites (Invitrogen), the fragment was subcloned into the pLVX-DsRed-Monomer-N1 vector (Clontech Laboratories). DNA sequencing confirmed that the cloned fragment of *PITX1* was identical to the sequence available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (Nucleotide Sequence ID NM_002653).

Western blot: Whole cell extracts from transfected or infected cells were separated on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) Gradient Gel (7-15%). Western blot was performed using classical methods. The following primary antibodies were used: anti-PITX1 (1:5000, Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-EXTL3 (1:800, in-house antibody produced in chicken), anti-PARP1 (1:1000, Epitomics, Burlingame, CA, USA), and anti-tubulin (1:10 000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

Quantitative, or real-time, reverse transcription-polymerase chain reaction (qPCR): Cells were rinsed twice in phosphate buffered saline before RNA extraction with TRIzol reagent. Total RNA was reverse-transcribed using ThermoScript reverse transcriptase (Invitrogen). The amplification efficiency was determined for each set of primers, and only those primers showing a single peak for dissociation temperature were selected. Amplified products were run on agarose gel to verify size. Human primer sequences were the following: *PITX1* forward 5'-GCTACCCCGACATGAGCA-3', *PITX1* reverse 5'-GTTACGCTCGCGCTTACG-3', *EXTL3* forward 5'-TGCTGAGGTGTTGCAAA-3', *EXTL3* reverse 5'-TGCCTTTGCCAACAATCAG-3', *REG1* forward 5'-GACAGCAATGTCTGGATTGG-3', *REG1* reverse 5'-AAGTCAGGCTTGACAGTAG-3', *PARP1* forward 5'-CTTCAGCCTCCTTGCTACAG-3', *PARP1* reverse 5'-CTTCGCCACTTCATCCACTC-3', *COL10A1* forward 5'-ACGATACCAAAGC-CACAG-3', *COL10A1* reverse 5'-GTACCTTGCTCTCCTCTTACTG-3', *MMP13* forward 5'-CCAGTCTCCGAGGAGAAACA-3', *MMP13* reverse 5'-AAAAACAGCTCGCA-CAAC-3', *β -actin* forward 5'-GGAAATCGTGCGTGACAT-3', and *β -actin* reverse 5'-TCATGATGGAGTTGAAGGTAGTT-3'. Each amplification was performed in duplicate using 7.5 μ l of 3 μ M primer solution, 5 μ l of diluted cDNA and 12.5 μ l of 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (QIAGEN, Ontario, Canada). All reactions were run on the Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, La Jolla, CA) and analysed using Stratagene MxPro QPCR Software (Agilent Technologies). Relative quantification was calculated with the delta-delta CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method using *β -actin* as the endogenous control.

Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR):

The generation of cDNA was obtained as for qPCR and the equivalent of 0.1 µg of cDNA was used for PCR reactions. These were carried out in a final volume of 25 µl containing 200 µmol deoxyribonucleotide triphosphates, 1.5 mM magnesium chloride, 10 pM of each primer, and 1 unit of Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen). Mouse primer sequences were the following: *Pitx1* forward 5'-CCCACCTCCATGGACGCCTT-3', *Pitx1* reverse 5'-GTCAGCTGTTGTACTGGCAAGCGT-3', *Extl3* forward 5'-CCTGATCGTTGGTATGCAT-3', *Extl3* reverse 5'-CGCAACATGGTATAGCCTGTC-3', *Reg1* forward 5'-TCGTGGCTACTGTGTATCTCTG-3', *Reg1* reverse 5'-CAACATTGTAAAGGTGTTT-ATTTTC-3', *Parp1* forward 5'-AGGCCCTCAAGGCTCAGAAT-3', *Parp1* reverse 5'-CCTTTAACTTCTTGAGGTAGG-3', *β-actin* forward 5'-GGAAATCGTGCGTGACAT-3' and *β-actin* reverse 5'-TCATGATGGAATTGAATGTAGTT-3'. For semi-quantitative analysis, all amplifications were normalized against those of the housekeeping gene *β-actin*. PCR-amplified products were separated on 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining; the intensity was measured using ImageJ software version 1.43u (National Institutes of Health, USA).

Safranin O staining for histological samples: Rehydrated methyl methacrylate sections were stained in Weigert's iron hematoxylin (ACP Chemicals, Montreal, QC, Canada) and ferric chloride solution (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA), rinsed in water, differentiated with acid alcohol, rinsed in water, counterstained with Fast Green FCF dye (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), resolved in 1% acetic acid and stained in Safranin O solution (Sigma-Aldrich). Slides were then dehydrated in 100% ethanol and toluene, and finally mounted with Permount mounting media (Fisher Scientific).

Immunohistochemical analysis: Histological sections embedded in paraffin were deparaffinized in toluene, rehydrated and heated at 80°C for 15 minutes in 0.01M citrate buffer, rinsed in phosphate-buffered saline and then put in 0.3% Triton phosphate-buffered saline solution for 30 minutes. Endogenous peroxidase was inactivated by incubation with

2% hydrogen peroxide in methanol for 30 minutes. Sections were then blocked in 1% bovine serum albumin/phosphate-buffered saline solution and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: anti-EXTL3 (10588-1-AP, dilution 1:100, ProteinTech Group, Chicago, IL, USA), anti-REG1B (13519-1-AP, dilution 1:50, ProteinTech Group), or anti-PARP1 (1072-1, dilution 1:25, Epitomics, Burlingame, CA, USA). Following phosphate-buffered saline washes, tissue sections were incubated with the appropriate biotinylated antibodies for 45 minutes. Staining was revealed using the avidin-biotin enzyme complex method, Vectastain ABC-AP kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), and the 3,3'-diaminobenzidine (DAB) detection system (Dako Diagnostics, Mississauga, ON, Canada). Sections were counterstained with Harris modified hematoxylin (Fisher Scientific). To assess antibody specificity, each antibody solution was pre-incubated for 30 minutes with 10 times the concentration of the corresponding blocking peptide. For each set of antibody and blocking peptide, loss of signal was observed (data not shown).

Statistical analysis: Total chondrocytes and chondrocytes with positive staining were assessed separately for each cartilage zone (superficial and deep zones). Three to six pictures from each zone were taken and subjected to double-blind evaluation (C.P. and F.M.); the maximum interobserver variation recorded was 5%. Data were reported for minimum, maximum, median, and first and third quartiles. *P* values, as determined by Student's t-test, were considered significant if less than 0.05.

4.5 Results

Partial loss of *Pitx1* expression related to OA-like symptoms in transgenic mice.

After Goldner trichrome staining, two-thirds of the bone and cartilage sections from *Pitx1* +/- mice revealed the presence of cartilaginous outgrowths (3). Safranin O staining showed faint red staining in these outgrowths (Figures 1A and 1B), indicating low proteoglycan content. At higher magnification, chondrocyte-like cells in columnar arrangement were readily observable (Figure 1B), suggestive of fibrocartilage-like tissue. The articular cartilage of these animals showed surface irregularities, reduced thickness, and clear loss of staining, all features associated with moderate-to-severe OA (Figures 1C and 1D).

***Extl3*, *Reg1* and *Parp1* expression in *Pitx1*-null mice.** The presence of fibrocartilaginous-like outgrowths prompted us to investigate whether loss of *Pitx1* resulted in the modulation of genes involved in abnormal outgrowths. We first investigated the expression of *Ext* gene family. As *Pitx1* -/- mice die at birth, total RNA was isolated from whole knees dissected from *Pitx1* +/+, +/- and -/- mouse embryos. RT-PCR analysis showed that the expression of *Ext1* and *Ext2* was not modulated by the loss of *Pitx1* (data not shown). However, *Extl3*, another *Ext* family member which is not associated with hereditary multiple exostoses, was found to be up-regulated 4.7-fold in *Pitx1* -/- knees when compared to wild-type (Figure 2). We thus decided to focus on *Extl3*.

Because *Extl3* can also act as a receptor for Reg growth factors, we investigated whether the loss of *Pitx1* could affect the expression of Reg ligands. Using the same RT-PCR approach, *Reg1* expression was found to be increased 6.3-fold in *Pitx1* -/- mice when compared to wild-type mice. *Parp1*, a known *Reg1* transcriptional regulator, was up-regulated by a factor of 2 (Figure 2). Thus, *in vivo*, the loss of *Pitx1* resulted in the over-expression of *Extl3*, *Reg1* and *Parp1*, with maximal expression when *Pitx1* was completely knocked-out.

EXTL3, REG1 and PARP1 in cartilage samples of OA patients. We had previously shown, with immunohistochemical methods, that PITX1 protein level was greatly reduced in human OA articular cartilage (3). This was confirmed by expression analysis at the transcription level, which revealed a significant decrease (1.6-fold, $P = 0.008$) in *PITX1* expression levels in primary cultures of OA patient chondrocytes as compared to healthy controls (Figure 3A). Similar analysis for *EXTL3*, *REG1* and *PARP1* (Figure 3B, 3C, and 3D) showed a non-significant trend toward increased expression (*EXTL3*: 1.2-fold, $P = 0.637$; *REG1*: 1.2-fold, $P = 0.600$; *PARP1*: 1.14-fold, $P = 0.309$). To assess whether culture conditions could have tempered the expression of these genes, we explored an alternative approach, measuring *in situ* protein levels of EXTL3, REG1 and PARP1 in knee cartilage. Immunohistochemical analysis on sections from healthy subjects and OA patients demonstrated a significant increase in the number of cells expressing proteins EXTL3 (3.2-fold, $P < 0.01$), REG1 (2.2-fold, $P < 0.001$) and PARP1 (2.6-fold, $P < 0.02$) in OA samples as compared to controls, in both superficial and deep zones of cartilage (Figure 4).

Effects of acute down-regulation of PITX1 on human chondrocytes. To test whether acute loss of PITX1 would be sufficient to induce up-regulation of *EXTL3*, *REG1* and *PARP1* in non-OA chondrocytes, as observed in *Pitx1*^{-/-} mice, expression analysis by qPCR was performed on C28/I2 cells transfected with either siRNA targeting *PITX1* (siPITX1) or scrambled-sequence siRNA (control). Transfections with siPITX1 resulted in a 4-fold down-regulation of *PITX1* and in a 1.5-, 1.6- and 1.5-fold up-regulation of *EXTL3*, *REG1* and *PARP1*, respectively (Figure 5A). Down-regulation of PITX1 expression and up-regulation of PARP1 and EXTL3 were confirmed at the protein level by Western blotting (Figure 5B). Interestingly, down-regulation of *PITX1* in C28/I2 cells also resulted in the up-regulation at the mRNA level of two known OA biomarkers, *COL10A1* (6.2-fold) and *MMP13* (2.6-fold). Similar and slightly higher values were obtained using primary articular chondrocyte cultures derived from a normal human knee joint cartilage (Figure

5A). Acute decreased expression of *PITX1* was thus sufficient to induce up-regulation of *EXTL3*, *REG1*, *PARP1*, *COL10A1* and *MMP13*.

Effects of forced PITX1 up-regulation on OA biomarkers in human cell line and OA chondrocytes. To determine whether PITX1 up-regulation could repress *EXTL3*, *REG1*, *PARP1*, *COL10A1*, and *MMP13*, we generated lentiviruses coding for DsRed (control) or PITX1 and used them for infection of cells. The number of DsRed-positive cells two days post-infection, counted using a fluorescent microscope, indicated an infection efficiency rate of over 90% for C28/I2 chondrocytes (data not shown). Expression analysis of C28/I2 revealed a 5-fold increase in *PITX1* expression as compared to controls (Figure 6A). This was accompanied by a slight reduction in the expressions of *REG1*, *PARP1* and *MMP13*, while *EXTL3* mRNA was marginally affected. The up-regulation of PITX1 and the down-regulation of PARP1 were confirmed at the protein level by Western blotting (Figure 6B). Surprisingly, expression analysis of primary chondrocyte cultures derived from OA patients (Figure 6A) showed that a 2.5- to 3.4-fold increase in PITX1 expression resulted in a small increase in *EXTL3* (1.6- and 1.7-fold) and *PARP1* (1.3- and 1.2-fold), respectively, with a decrease in *COL10A* (-1.1-fold and -1.8-fold) and *MMP13* (-1.5 and -2.7). Over-expression of PITX1 (48.1-fold), however, in HEK293 cells (Figure 6C) resulted in the down-regulation of *EXTL3* (-1.9-fold), *REG1* (-1.8-fold) and *PARP1* (-1.5-fold). Taken together, these results showed that *in vitro* over-expression of PITX1 was capable of repressing OA biomarkers, though with variable effects on the regulation of *EXTL3*, *REG1* and *PARP1* according to the cell types.

4.6 Discussion

Although it is commonly assumed that OA is an end phenotype caused by multiple factors, the etiology of the disease remains unclear. The search for specific and sensitive biomarkers for early OA detection is complicated by the fact that the early stages of progression are not well understood, mainly due to difficulties in assessing these events in aging men and women (11). The identification of genes and biological pathways involved in cartilage homeostasis is critical to the understanding of OA etiopathogenesis. In this context, we have previously identified PITX1, a homeobox transcription factor, as a relevant OA candidate gene. We showed that *PITX1* expression was down-regulated in OA cartilage and that the loss of one copy of *Pitx1* in a mouse model was sufficient to induce OA-like symptoms. In the current study, we have demonstrated for the first time that acute down-regulation of *PITX1* in normal human chondrocytes was sufficient to induce the up-regulation of *COL10A1* and *MMP13*, two well-known OA biomarkers, thereby strengthening the clinical relevance of PITX1 in OA pathogenesis. Furthermore, REG1, a putative EXTL3 ligand, is strongly associated with tissue regeneration. EXTL3 is part of the EXT family of genes that may play a role in osteophyte formation. Together, REG1, EXTL3, and PARP1 open new possibilities for OA therapeutic targets and biomarkers.

The present study used a candidate gene approach to test possible downstream targets of PITX1 and to explore their relationship to OA. *In vivo* results obtained with *Pitx1* transgenic mice and *in vitro* results on cartilage sections from OA patients clearly showed that a loss of PITX1 was associated with the up-regulation of *EXTL3*, *REG1* and *PARP1*. However, the basal expressions of *EXTL3*, *REG1* and *PARP1* in OA chondrocyte cultures were only slightly increased compared to those of controls and failed to reach statistical significance. A possible explanation for these discrepancies may be attributable to cell culture conditions. It is well known that chondrocytes in culture tend to dedifferentiate (12). PITX1 is suspected of maintaining a differentiated state in several cell types (13-15). Indeed, *PITX1* expression was found to be reduced in chondrocyte cultures as compared to

freshly isolated chondrocytes (data not shown). This finding may explain the relatively small differences in *PITX1* between cultures of normal vs. OA chondrocytes. When we circumvented cell culture by performing an immunohistochemical analysis for *EXTL3*, *REG1* and *PARP1* proteins on cartilage sections, we actually observed a significant increase in the number of OA chondrocytes expressing these proteins.

There is abundant literature about PITX interacting protein partners and how they control the regulation of specific targets, but very little of it concerns cartilage. In general, PITX1 alone has a moderate effect on gene regulation but can synergize with various partners, either significantly activating or repressing transcription (16-18). Knockdown of PITX1 protein levels can disrupt these necessary protein interactions, thus helping to explain the results obtained in our loss of function experiments. On the other hand, gain of PITX1 expression alone might not be sufficient to exert an effect if the necessary partners were not all available in adequate amounts. In OA chondrocytes, therefore, up-regulated PITX1 may require the correct stoichiometry of cofactors to maximally repress *EXTL3*, *REG1* and *PARP1* at levels comparable to those seen in control cell types such as HEK293 cells. This may explain the limited repression observed in our PITX1 over-expression experiments.

Early growth response 1 (EGR1) is one of the partners known to interact with PITX1 in activating (17) or repressing complexes (18). EGR1 is expressed in normal cartilage; in OA chondrocytes, except those present in clusters (19), its expression is down-regulated. EGR1 participates in regenerative tissue repair and has been successfully used in rodents as therapy to accelerate wound healing (20). It has been proposed that EGR1 may regulate chondrocyte apoptosis during skeletal remodeling (21), which could be linked to osteophyte formation in the course of OA. Osteophytes, enchondromas and exostoses are distinct pathological cartilaginous or bony outgrowths that seemingly form by reinitiating the programming for endochondral ossification (9, 22, 23). Providing insights on these abnormal phenomena, various gene association studies suggest a role for two of the members of the *EXT* gene family: *EXT1*, *EXT2*. However, all members of this family

possess more than one glycosyltransferase activity (24) and it has been proposed that they affect not only the quality but also the quantity of cell surface glycosaminoglycan (25). Several inactivating mutations in *EXT1* and *EXT2* genes have been reported in patients affected with hereditary multiple exostoses (26-28). More recently, *EXT1* was found to be up-regulated in the synovium of OA patients presenting with osteophytes (10). Our data showed that *EXTL3* was the only EXT family member up-regulated following the loss of *PITX1* in knee OA.

EXTL3 encodes α -*N*-acetylglucosaminyltransferases involved in heparan sulphate chain elongation (29). Heparan sulphate chains are found on cartilage matrix proteins like syndecan or perlecan, both up-regulated in OA (30-31). These observations are consistent with our finding that loss of *PITX1* in OA chondrocytes results in up-regulation of *EXTL3*. *EXTL3* over-expression has also been implicated in at least two biological responses that might have consequences in OA disease. It enhances cell response to tumor necrosis factor- α , a pro-inflammatory cytokine, by altering the synthesis of surface glycosaminoglycan (25). *EXTL3* was also identified as a putative receptor for REG1 (32), which we showed to be up-regulated in OA. Thus the up-regulation of both REG1 and its receptor *EXTL3* in chondrocytes may lead to a REG/*EXTL3* auto- or paracrine signalling loop somehow involved in the regeneration process.

Many regenerating gene (REG) and REG-related genes have been isolated from human, rat and mouse tissues, revealing a multigene family of small secretory proteins (32). The *Reg1* gene is the prototype of the Reg family (33) and has been associated with the regeneration of various tissues including pancreas (34), liver (35), stomach (36) and small intestine (37). In a number of cancer types including liver (38), stomach (39), colon (40) and lung (41), REG1 expression levels were shown to be up-regulated, while unrelated studies demonstrated a down-regulation of *PITX1* in the same cancers (liver (42), stomach (43), colon (44) and lung (45)). It is noteworthy that this inverse relationship between *REG1* expression and *PITX1* was also observed in Barrett's esophagus, where *PITX1* expression was decreased (46) while *REG1* was among the genes up-regulated in affected

tissues (47). It was proposed that PITX1 acted as a regulator of epithelial cell dedifferentiation (46). Our results have now demonstrated for the first time the existence of a similar inverse relationship in OA. Moreover, *REG1* can be activated following interleukin-6 (IL-6) and dexamethasone treatment (48). It is possible that the combination of decreased expression of *PITX1* and the presence of IL-6 in OA can further increase *REG1* expression *in vivo*. This may be part of a regenerative response as seen in the early phases of OA and which might involve REG1-EXTL3 signalling.

Among known transcriptional regulators of *Reg1* is poly (ADP-ribose) synthetase/polymerase (PARP) (48). This enzyme is a prominent nuclear enzyme involved in DNA damage detection and apoptosis signalling, and it may play a critical role in mechanisms regulating cellular stress (48). Indeed, PARP1 recognizes a cis-binding element between nucleotide -81 and -70 (5'-TGCCCCTCCAT-3') in the promoter region of mouse *Reg1* (48). Dependent upon its post-translational modification, i.e. auto poly(ADP-ribosylation) of PARP, PARP1 can either promote or prevent the transcription of *Reg1* (48). When PARP1 is not poly(ADP-ribosylated), it up-regulates *Reg1* gene transcription (48).

It is not known whether PITX1 acts directly on the promoters of the genes under discussion. We have excluded the possibility that over-expression of EXTL3, REG1 and PARP1 in OA could result from the loss of the RAS protein activator like 1 (RASAL1), a known transcriptional repressor positively regulated by PITX1 (44), because *RASAL1* expression was only slightly detected in normal and OA articular chondrocytes (data not shown). Of note, researchers have shown that Sirtuin 1 (SIRT1) negatively regulated activity of the *PARP1* gene promoter (49). Recently, *SIRT1* expression was reported to be down-regulated in OA (50). This raises the following question: Does down-regulation of PITX1 result in *SIRT1* down-regulation? The answer to this question lies beyond the goal of this study and will require further investigation.

While this study has provided potential new OA biomarkers modulated by PITX1 and further strengthened its pathophysiological relevance in OA pathogenesis by showing that *COL10A1* and *MMP13* expression are regulated also by PITX1, there are some limitations to the analysis. First, the study focused on a candidate driven approach using a limited number of OA patients and control subjects. As a result, a large scale study involving many more subjects will be necessary to confirm if the selected genes should be considered as clinically relevant OA diagnostic biomarkers. More investigations will also be required to determine whether additional genes are affected by the loss of PITX1 in OA cartilage and other affected tissues. Second, the putative roles of EGR1 and SIRT1 as transcriptional partners and/or targets of PITX1 remain to be examined in normal and OA cartilage. Third, the role of EXTL3, REG1 and potentially other related REG family members as well as PARP1 in cartilage homeostasis remains to be investigated in more depth, so it is unclear to what extent they contribute in either OA pathogenesis or their role in cartilage regeneration. This may be particularly important for other connective tissues such as bone, tendon and ligament which contain cells known to express some of the genes identified here.

In conclusion, this study was the first to explore the links between PITX1, EXTL3, REG1 and PARP1 in primary knee OA. The present work proposes EXTL3, REG1 and PARP1 as new OA biomarkers that are involved in tissue regeneration and are associated with PITX1, a transcription factor known for its role in joint development.

4.7 Acknowledgments

We thank the subjects and families who participated in this study. We thank Dr. Daniel Lajeunesse and Dr. Johanne Martel-Pelletier (Osteoarthritis Research Unit, Notre-Dame Hospital, CHUM) who kindly provided additional RNA from normal and OA chondrocytes. We thank Dr. Cristina Manacu, Dr. Ginette Tardif, Mrs. Ginette Lacroix, and Mrs. Anne-Marie Chatelain for clinical coordination, Mrs. Josée Dépôt and Isabelle Turgeon for their technical support and helpful assistance, Dr. Kristen F. Gorman (Sainte-Justine University Hospital Research Centre) for editing this manuscript. We are grateful to Danielle Buch, medical writer/editor at the Applied Clinical Research Unit of the Sainte Justine Research Centre, for critical revision and editing of the manuscript. Mrs. Cynthia Picard and Dr. Jean-François Lavoie are recipients of a Canadian Institutes of Health Research/MENTOR training program scholarship. Mrs. Cynthia Picard is also the recipient of a Fonds de la recherche en santé du Québec doctoral scholarship and Dr. Jean-François Lavoie of a Network for Oral and Bone Health Research Fellowship.

4.8 References

1. Andrianakos AA, Kontelis LK, Karamitsos DG, Aslanidis SI, Georgountzos AI, Kaziolas GO, et al. Prevalence of symptomatic knee, hand, and hip osteoarthritis in Greece. The ESORDIG study. *J Rheumatol*. 2006 Dec;33(12):2507-13.
2. Cicuttini FM, Spector TD. Genetics of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 1996 Sep;55(9):665-7.
3. 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.
4. Logan M, Simon HG, Tabin C. Differential regulation of T-box and homeobox transcription factors suggests roles in controlling chick limb-type identity. *Development*. 1998 Aug;125(15):2825-35.
5. 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.
6. Logan M, Tabin CJ. Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity. *Science*. 1999 Mar 12;283(5408):1736-9.
7. 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.
8. 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.
9. Brandt KD, Dieppe P, Radin EL. Etiopathogenesis of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2008 Aug;34(3):531-59.
10. Kato H, Matsumine A, Wakabayashi T, Hasegawa M, Sudo A, Shintani K, et al. Large-scale gene expression profiles, differentially represented in osteoarthritic synovium of the knee joint using cDNA microarray technology. *Biomarkers*. 2007 Jul-Aug;12(4):384-402.
11. Kraus VB, Burnett B, Coindreau J, Cottrell S, Eyre D, Gendreau M, et al. Application of biomarkers in the development of drugs intended for the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011 Mar 23.
12. Aigner T, Gluckert K, von der Mark K. Activation of fibrillar collagen synthesis and phenotypic modulation of chondrocytes in early human osteoarthritic cartilage lesions. *Osteoarthritis Cartilage*. 1997 May;5(3):183-9.
13. Chen Y, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Ye F, Petersen I. 5-Bromodeoxyuridine induced differentiation of a human small cell lung cancer cell line is associated with alteration of gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Feb 16;353(3):559-64.
14. Wierinckx A, Auger C, Devauchelle P, Reynaud A, Chevallier P, Jan M, et al. A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2007 Sep;14(3):887-900.

15. Freed WJ, Chen J, Backman CM, Schwartz CM, Vazin T, Cai J, et al. Gene expression profile of neuronal progenitor cells derived from hESCs: activation of chromosome 11p15.5 and comparison to human dopaminergic neurons. *PLoS One*. 2008;3(1):e1422.
16. Tremblay JJ, Lanctot C, Drouin J. The pan-pituitary activator of transcription, Ptx1 (pituitary homeobox 1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol Endocrinol*. 1998 Mar;12(3):428-41.
17. 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.
18. Johnston JD, Schuster C, Barrett P, Hazlerigg DG. Regulation of the ovine MT1 melatonin receptor promoter: interaction between multiple pituitary transcription factors at different phases of development. *Mol Cell Endocrinol*. 2007 Mar 30;268(1-2):59-66.
19. 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.
20. Bryant M, Drew GM, Houston P, Hissey P, Campbell CJ, Braddock M. Tissue repair with a therapeutic transcription factor. *Hum Gene Ther*. 2000 Oct 10;11(15):2143-58.
21. Braddock M. The transcription factor Egr-1: a potential drug in wound healing and tissue repair. *Ann Med*. 2001 Jul;33(5):313-8.
22. Silve C, Juppner H. Ollier disease. *Orphanet J Rare Dis*. 2006;1:37.
23. Legeai-Mallet L, Rossi A, Benoist-Lassel C, Piazza R, Mallet JF, Delezoide AL, et al. EXT 1 gene mutation induces chondrocyte cytoskeletal abnormalities and defective collagen expression in the exostoses. *J Bone Miner Res*. 2000 Aug;15(8):1489-500.
24. Kim BT, Kitagawa H, Tamura J, Saito T, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, et al. Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode alpha 1,4- N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/ heparin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 19;98(13):7176-81.
25. Mizuno K, Irie S, Sato TA. Overexpression of EXTL3/EXTR1 enhances NF-kappaB activity induced by TNF-alpha. *Cell Signal*. 2001 Feb;13(2):125-30.
26. Wuyts W, Van Hul W, De Boulle K, Hendrickx J, Bakker E, Vanhoenacker F, et al. Mutations in the EXT1 and EXT2 genes in hereditary multiple exostoses. *Am J Hum Genet*. 1998 Feb;62(2):346-54.
27. Bernard MA, Hall CE, Hogue DA, Cole WG, Scott A, Snuggs MB, et al. Diminished levels of the putative tumor suppressor proteins EXT1 and EXT2 in exostosis chondrocytes. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2001 Feb;48(2):149-62.
28. Li Y, Wang D, Wang W, Wang J, Li H, Wang X, et al. Identification of four novel EXT1 and EXT2 mutations in five Chinese pedigrees with hereditary multiple exostoses. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2009 Dec;13(6):825-30.
29. Busse M, Feta A, Presto J, Wilen M, Gronning M, Kjellen L, et al. Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to heparan sulfate chain elongation. *J Biol Chem*. 2007 Nov 9;282(45):32802-10.

30. Salminen-Mankonen H, Saamanen AM, Jalkanen M, Vuorio E, Pirila L. Syndecan-1 expression is upregulated in degenerating articular cartilage in a transgenic mouse model for osteoarthritis. *Scand J Rheumatol*. 2005 Nov-Dec;34(6):469-74.
31. Tesche F, Miosge N. Perlecan in late stages of osteoarthritis of the human knee joint. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004 Nov;12(11):852-62.
32. Kobayashi S, Akiyama T, Nata K, Abe M, Tajima M, Shervani NJ, et al. Identification of a receptor for reg (regenerating gene) protein, a pancreatic beta-cell regeneration factor. *J Biol Chem*. 2000 Apr 14;275(15):10723-6.
33. Miyashita H, Nakagawara K, Mori M, Narushima Y, Noguchi N, Moriizumi S, et al. Human REG family genes are tandemly ordered in a 95-kilobase region of chromosome 2p12. *FEBS Lett*. 1995 Dec 27;377(3):429-33.
34. Okamoto H. The Reg gene family and Reg proteins: with special attention to the regeneration of pancreatic beta-cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 1999;6(3):254-62.
35. Wang J, Koyota S, Zhou X, Ueno Y, Ma L, Kawagoe M, et al. Expression and localization of regenerating gene I in a rat liver regeneration model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Mar 13;380(3):472-7.
36. Fukuhara H, Kadowaki Y, Ose T, Monowar A, Imaoka H, Ishihara S, et al. In vivo evidence for the role of RegI in gastric regeneration: transgenic overexpression of RegI accelerates the healing of experimental gastric ulcers. *Lab Invest*. 2010 Apr;90(4):556-65.
37. Ose T, Kadowaki Y, Fukuhara H, Kazumori H, Ishihara S, Udagawa J, et al. Reg I-knockout mice reveal its role in regulation of cell growth that is required in generation and maintenance of the villous structure of small intestine. *Oncogene*. 2007 Jan 18;26(3):349-59.
38. Harada K, Zen Y, Kanemori Y, Chen TC, Chen MF, Yeh TS, et al. Human REG I gene is up-regulated in intrahepatic cholangiocarcinoma and its precursor lesions. *Hepatology*. 2001 May;33(5):1036-42.
39. Judd LM, Alderman BM, Howlett M, Shulkes A, Dow C, Moverley J, et al. Gastric cancer development in mice lacking the SHP2 binding site on the IL-6 family co-receptor gp130. *Gastroenterology*. 2004 Jan;126(1):196-207.
40. Lee WS, Seo G, Shin HJ, Yun SH, Yun H, Choi N, et al. Identification of differentially expressed genes in microsatellite stable HNPCC and sporadic colon cancer. *J Surg Res*. 2008 Jan;144(1):29-35.
41. Minamiya Y, Kawai H, Saito H, Ito M, Hosono Y, Motoyama S, et al. REG1A expression is an independent factor predictive of poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2008 Apr;60(1):98-104.
42. Calvisi DF, Ladu S, Conner EA, Seo D, Hsieh JT, Factor VM, et al. Inactivation of Ras GTPase-activating proteins promotes unrestrained activity of wild-type Ras in human liver cancer. *J Hepatol*. 2011 Feb;54(2):311-9.
43. Chen YN, Chen H, Xu Y, Zhang X, Luo Y. Expression of pituitary homeobox 1 gene in human gastric carcinogenesis and its clinicopathological significance. *World J Gastroenterol*. 2008 Jan 14;14(2):292-7.

44. 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.
45. Chen Y, Knosel T, Ye F, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Petersen I. Decreased PITX1 homeobox gene expression in human lung cancer. *Lung Cancer*. 2007 Mar;55(3):287-94.
46. Lord RV, Brabender J, Wickramasinghe K, DeMeester SR, Holscher A, Schneider PM, et al. Increased CDX2 and decreased PITX1 homeobox gene expression in Barrett's esophagus and Barrett's-associated adenocarcinoma. *Surgery*. 2005 Nov;138(5):924-31.
47. Chinuki D, Amano Y, Ishihara S, Moriyama N, Ishimura N, Kazumori H, et al. REG Ialpha protein expression in Barrett's esophagus. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Feb;23(2):296-302.
48. Okamoto H, Takasawa S. Recent advances in the Okamoto model: the CD38-cyclic ADP-ribose signal system and the regenerating gene protein (Reg)-Reg receptor system in beta-cells. *Diabetes*. 2002 Dec;51 Suppl 3:S462-73.
49. Rajamohan SB, Pillai VB, Gupta M, Sundaresan NR, Birukov KG, Samant S, et al. SIRT1 promotes cell survival under stress by deacetylation-dependent deactivation of poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Mol Cell Biol*. 2009 Aug;29(15):4116-29.
50. Gabay O. OARSI poster presentation for the 2009 World Congress on Osteoarthritis. 2009.

4.9 Figure legends

Figure 1. Aging *Pitx1* heterozygous mice show fibrocartilaginous outgrowths and exhibit OA-like phenotype. Femurs of 7-month-old *Pitx1* heterozygous (+/-) or wild-type (+/+) mice were embedded in methyl methacrylate, sectioned and stained with safranin O. **A)** *Pitx1* +/- mouse femur section displaying fibrocartilaginous outgrowth, original magnification 50X. **B)** 200X magnification of the area corresponding to the box shown in **A**. The faint red staining demonstrates low proteoglycan content. Note the cellular organization typical of the columnar arrangement seen in chondrocytes. **C)** Femoral condyle region of wild-type (+/+) mouse, corresponding to the area of the right-most box shown in **A**, 400X magnification. **D)** Region corresponding to the area of the right-most box shown in **A**, *Pitx1* +/- mouse, 400X magnification. Surface irregularities and diminished thickness of the cartilage are visible. The arrow shows a moderate reduction in staining of the matrix near the top of the calcified cartilage zone. All these observations are reminiscent of osteoarthritis symptoms found clinically in humans. In contrast, the smooth surface, full cartilage thickness and evenly distributed red staining in the matrix of the wild-type mouse demonstrate no such signs.

Figure 2. *In vivo* loss of *Pitx1* expression is associated with up-regulation of *Extl3*, *Reg1* and *Parp1*. *Pitx1* wild-type (+/+), heterozygous (+/-), and knock-out (-/-) mice were sacrificed at embryonic age 18.5 days and RNA extracted from whole knees. **A)** Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed for the indicated genes. RT-PCR amplified products were separated on a 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. **B)** For semi-quantitative analysis, the intensity of each band from **A** was measured and normalized against the housekeeping gene Beta-actin. Relative expressions of *Extl3*, *Reg1* and *Parp1*, calculated with *Pitx1* +/+ RNA levels set to 1, were comparable between unborn *Pitx1* +/+ and +/- mice but significantly larger in *Pitx1* -/- mice. These results suggest a total absence of *Pitx1* as a requisite for the full expression of *Extl3*, *Reg1*, and *Parp1*.

Figure 3. Expression analysis of *PITX1*, *EXTL3*, *REG1* and *PARP1* in cultured human articular chondrocytes from controls and patients suffering from osteoarthritis. Cartilage specimens from controls and OA patients were digested with trypsin and collagenase prior to cell culturing and RNA extraction. Real-time polymerase chain reaction was performed for **A) *PITX1***, **B) *EXTL3***, **C) *REG1*** and **D) *PARP1*** with β -actin as internal control. For statistical purposes, relative quantification (RQ) was expressed as $\log_{10}(\text{RQ})$ and mean values (represented by horizontal bars) for control groups were set to 0. Positive results represent genes upregulated while negatives represent genes downregulated as compared to controls. A significant down-regulation of *PITX1* was demonstrated in OA patients, whereas *EXTL3*, *REG1* and *PARP1* up-regulation did not reach significance. Ctrl, control group; OA, osteoarthritis patients.

Figure 4. Immunohistochemical analysis of *EXTL3*, *REG1* and *PARP1* proteins shows significant up-regulation in articular cartilage of patients with osteoarthritis (OA). Cartilage specimens from controls and OA patients were embedded in paraffin, sliced, mounted on histological slides and immunostained with **A) *EXTL3***, **B) *REG1***, and **C) *PARP1*** antibodies, and then counterstained with Harris hematoxylin (original magnification, 400X). Left: Representative sections of control and OA cartilage, including the magnification of a single cell staining (marked with an arrow) in the upper left corner. Note the typical membranous staining of *EXTL3*, the cytoplasmic and extracellular staining of secreted *REG1* and the nuclear staining of *PARP1*. Right: Statistical analysis showing the percentage of positive cells for **A) *EXTL3***, **B) *REG1***, and **C) *PARP1*** in deep and superficial zones of control and OA cartilage. $P < 0.02$ for deep* and surface** zones.

Figure 5. Down-regulation of *PITX1* in human chondrocytes leads to increased expression of *EXTL3*, *REG1*, *PARP1*, and known osteoarthritis biomarkers. The C28/I2 chondrocyte cell line (C28) and primary chondrocytes from a normal subject (N1) were transfected with either control siRNA or siRNA against human *PITX1* (siPITX1). **A)** Relative levels of

mRNA in siPITX1-transfected cells as compared to control siRNA-transfected cells (level set to 1), determined by real-time polymerase chain reaction. **B)** Protein extracted from C28/I2 cells cultured under the same conditions as in **A** and immunoblotted with the indicated antibodies after sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. α -TUBULIN was used to reflect the amount of protein loaded onto the gel. Combined results show that down-regulation of PITX1 is associated with the up-regulation of EXTL3, REG1 and PARP1, as well as COL10A1 and MMP13, two markers known to be elevated in osteoarthritis.

Figure 6. *PITX1* over-expression has a variable effect on *EXTL3*, *REG1*, and *PARP1*, depending on cellular context. Infections with lentiviruses containing DsRed or the human *PITX1* coding region were performed on the C28/I2 chondrocyte cell line (C28), on primary chondrocytes from two patients with osteoarthritis (OA1 and OA2), and on the HEK293 cell line. **A)** Real-time polymerase chain reaction shows mRNA levels in cells infected with *PITX1* relative to those of DsRed-infected cells, which were set to 1. In C28/I2 chondrocytes, transient *PITX1* over-expression did not significantly down-regulate *EXTL3*, *REG1* or *PARP1* but did down-regulate *COL10A1* (*not detected in C28/I2) and *MMP13*. Variable effects were observed in OA cells. **B)** Western blot shows PARP1 down-regulation associated with PITX1 over-expression. Protein was extracted from C28/I2 cells cultured under the same conditions as in **A** and immunoblotted with the indicated antibodies. α -TUBULIN was used to reflect the amount of protein loaded onto the gel. **C)** Real-time polymerase chain reaction using the HEK293 cell line, as in **A**. In these cells, PITX1 over-expression led to down-regulation of EXTL3, REG1 and PARP1.

4.10 Figures

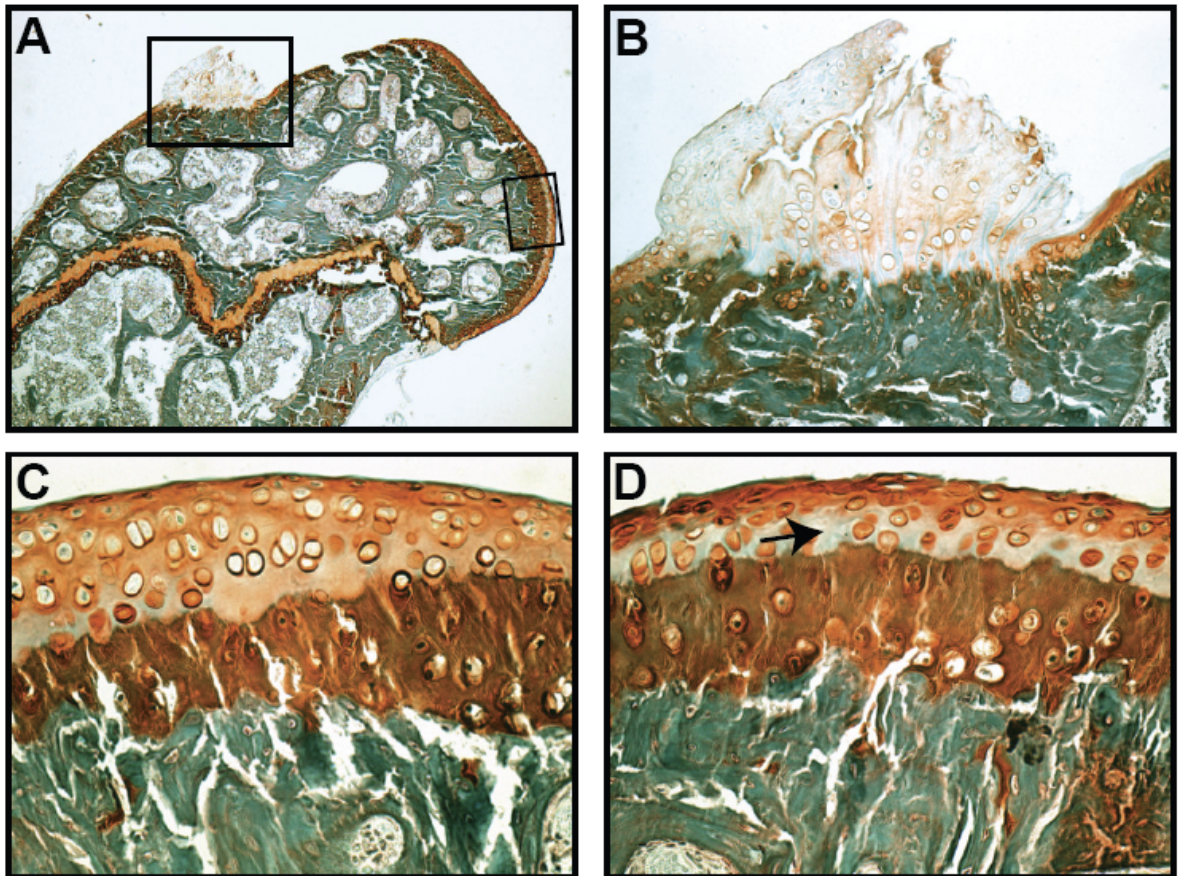


Figure 1. Aging *Pitx1* heterozygous mice show fibrocartilagenous outgrowths and exhibit OA-like phenotype.

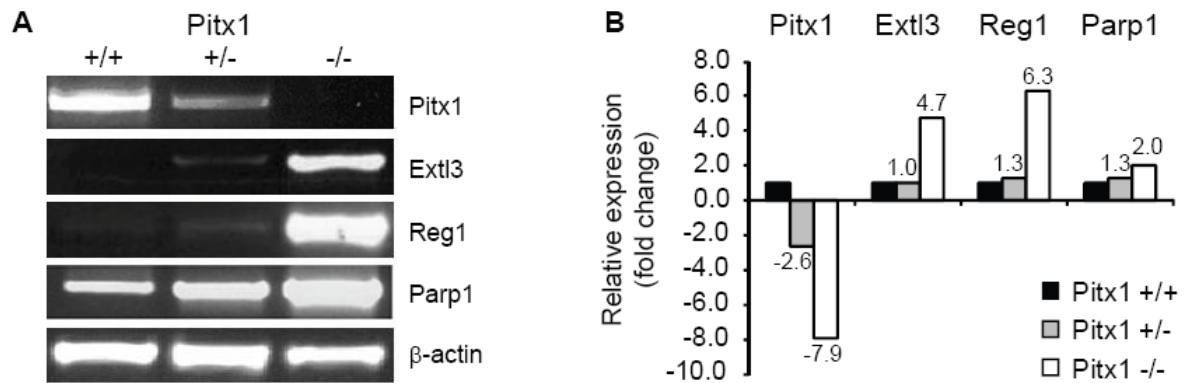


Figure 2. *In vivo* loss of *Pitx1* expression is associated with up-regulation of *Extl3*, *Reg1* and *Parp1*.

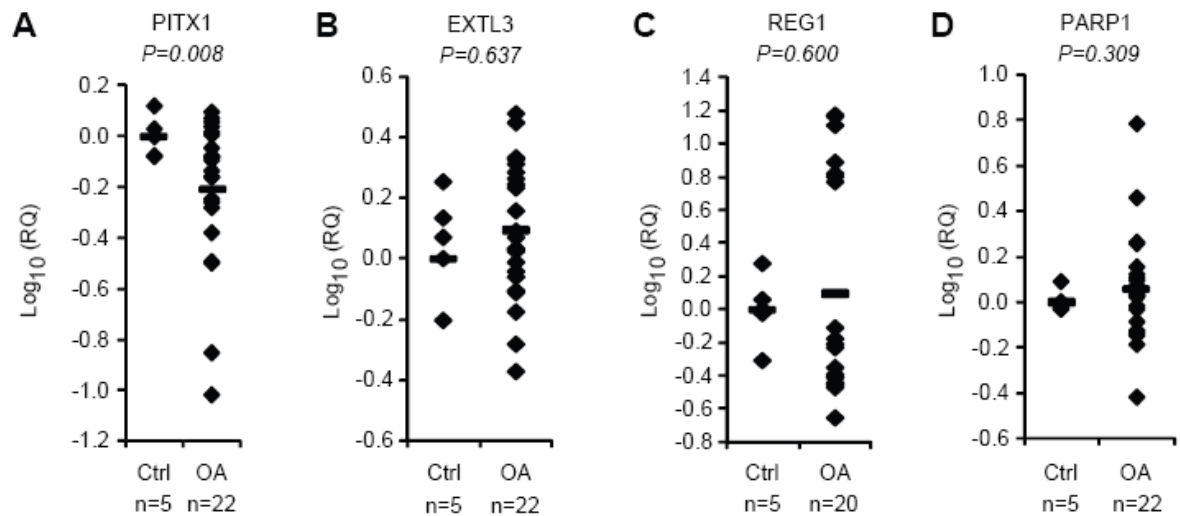


Figure 3. Expression analysis of *PITX1*, *EXTL3*, *REG1* and *PARP1* in cultured human articular chondrocytes from controls and patients suffering from osteoarthritis.

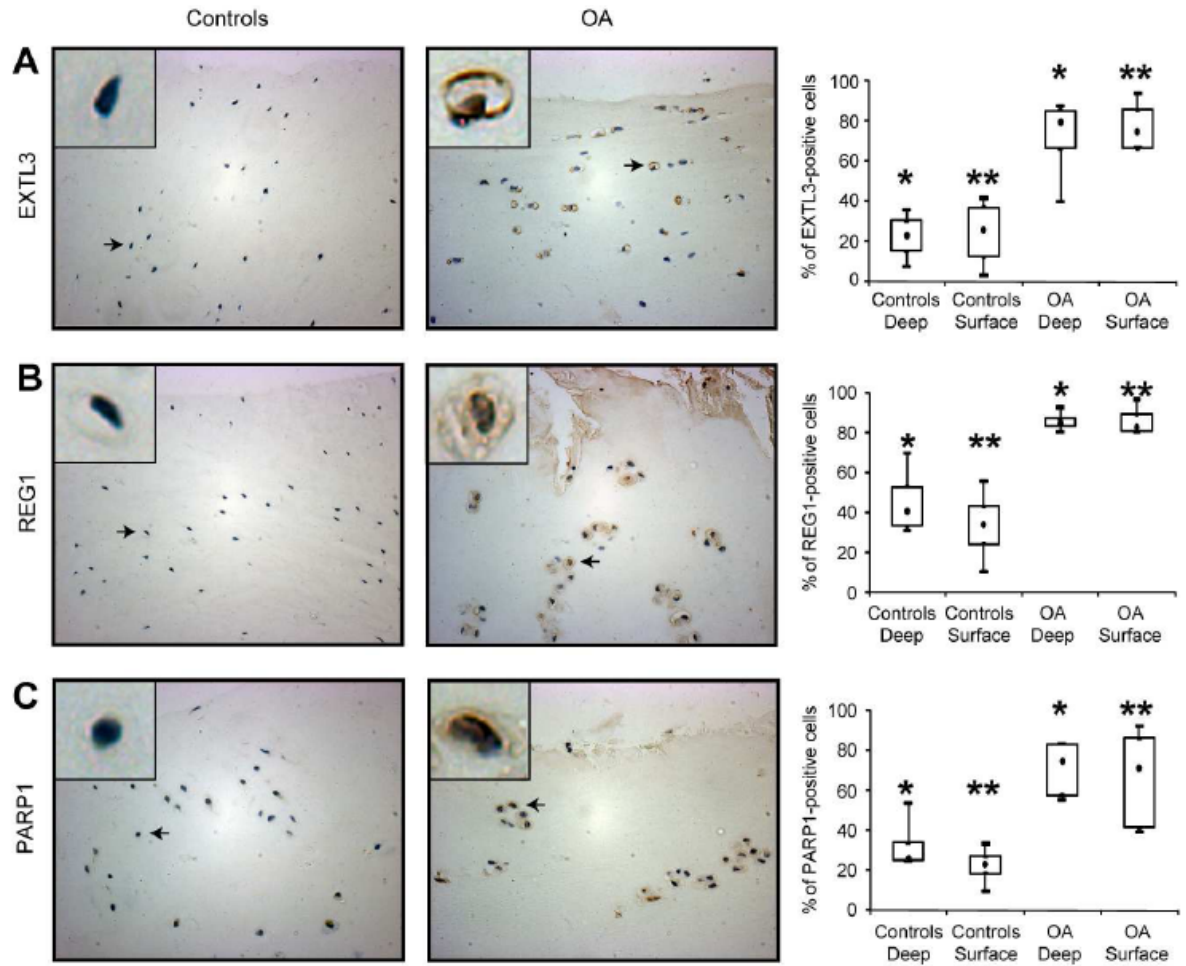


Figure 4. Immunohistochemical analysis of EXTL3, REG1 and PARP1 proteins shows significant up-regulation in articular cartilage of patients with osteoarthritis (OA).

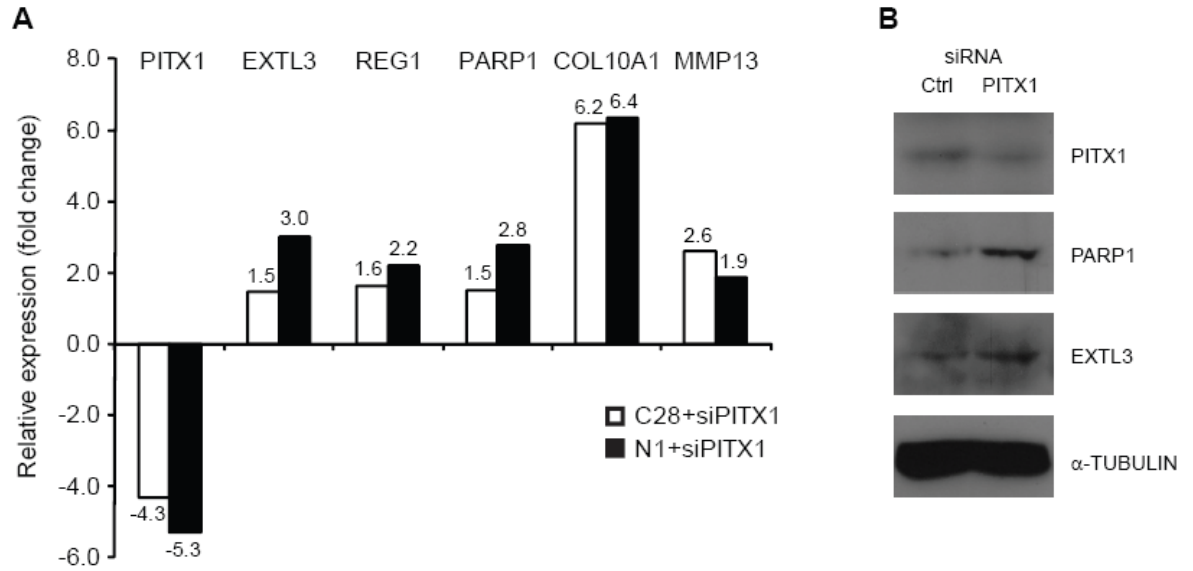


Figure 5. Down-regulation of *PITX1* in human chondrocytes leads to increased expression of *EXTL3*, *REG1*, *PARP1*, and known osteoarthritis biomarkers.

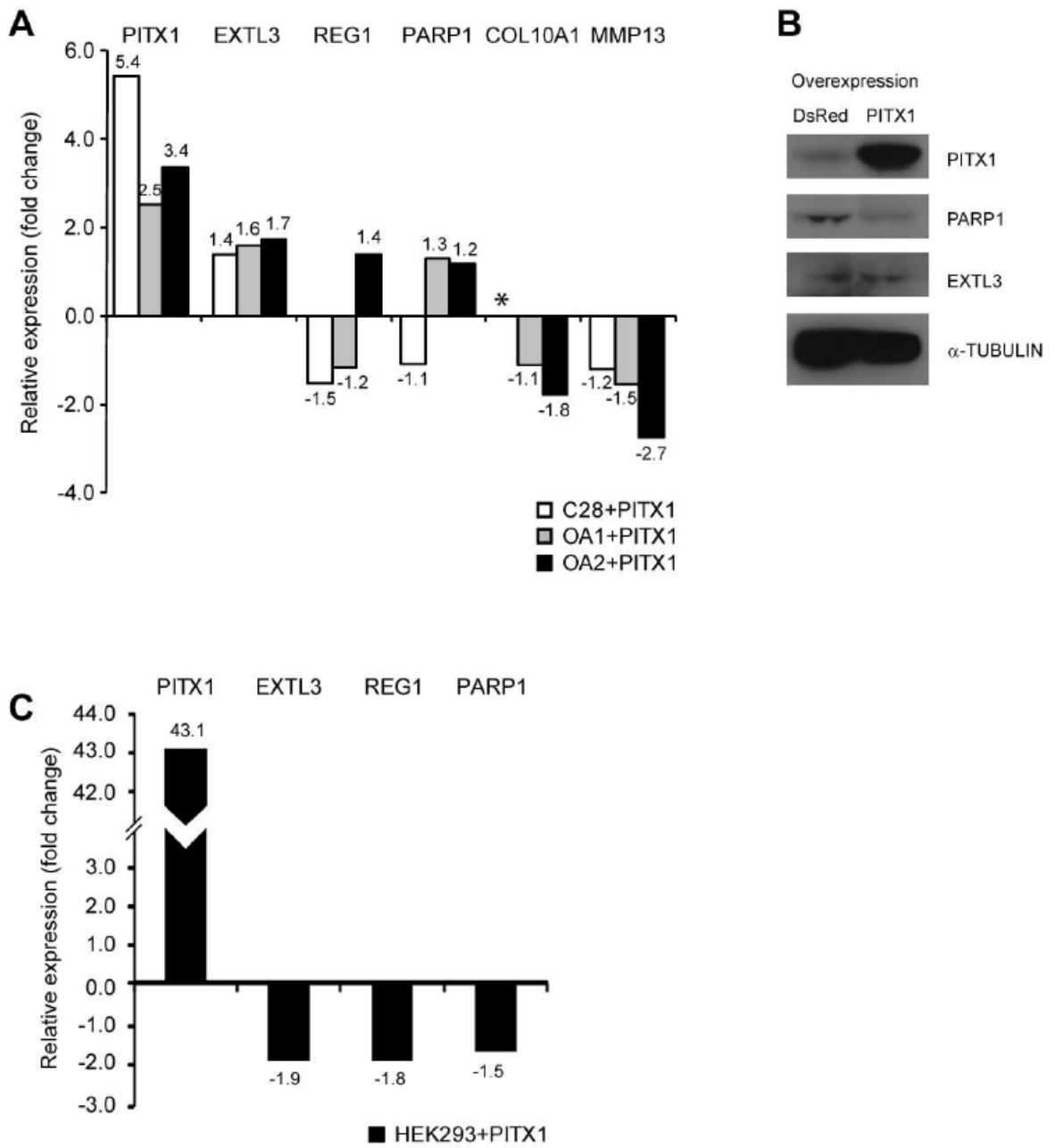


Figure 6. *PITX1* over-expression has a variable effect on *EXTL3*, *REG1*, and *PARP1*, depending on cellular context.

Chapitre 5 - Discussion

5.1 Expression de PITX1 durant l'ossification endochondrale et la progression de l'arthrose

Dans le cadre de l'article #1 présenté précédemment, nous avons procédé à l'immunodétection de PITX1 sur des coupes histologiques de genoux d'embryons de souris contrôles (Figure 1, Article #1). Comme les tissus avaient été prélevés à différents âges, soit aux jours embryonnaires 13.5, 15.5 et 17.5, il était possible de suivre l'expression de PITX1 à travers les étapes de l'ossification endochondrale.

Pour un maximum de clarté concernant la présente discussion, j'ai refait une figure à partir d'une de ces coupes histologiques (Figure 1). Cette figure nous permet de mieux distinguer les niveaux d'expression de PITX1 selon la localisation cellulaire. Nous pouvons clairement y observer une expression diminuée de PITX1 au niveau du périchondre ainsi que de la zone de prolifération. Ces affirmations corrélerent avec la littérature et le schéma hypothétique présenté dans l'article de revue (Figure 2, Chapitre 2).

En effet, les cellules souches du périchondre, non différenciées, doivent leur potentiel de réplication illimité au maintien de la longueur de leurs télomères. TERT, une télomérase à activité transcriptase inverse essentielle au maintien des télomères, serait inhibée par la présence de PITX1 (196). De nombreux exemples dans la littérature appuient également une diminution de PITX1 durant la prolifération cellulaire (voir section 2.3.9.2), ce qui pourrait expliquer une expression amoindrie de PITX1 durant la prolifération chondrocytaire associée à l'ossification endochondrale. Par ailleurs, la mise en culture de cellules provenant d'un échantillon de tissu cartilagineux est suffisante pour diminuer l'expression de *PITX1* (Figure 5, Annexe I).

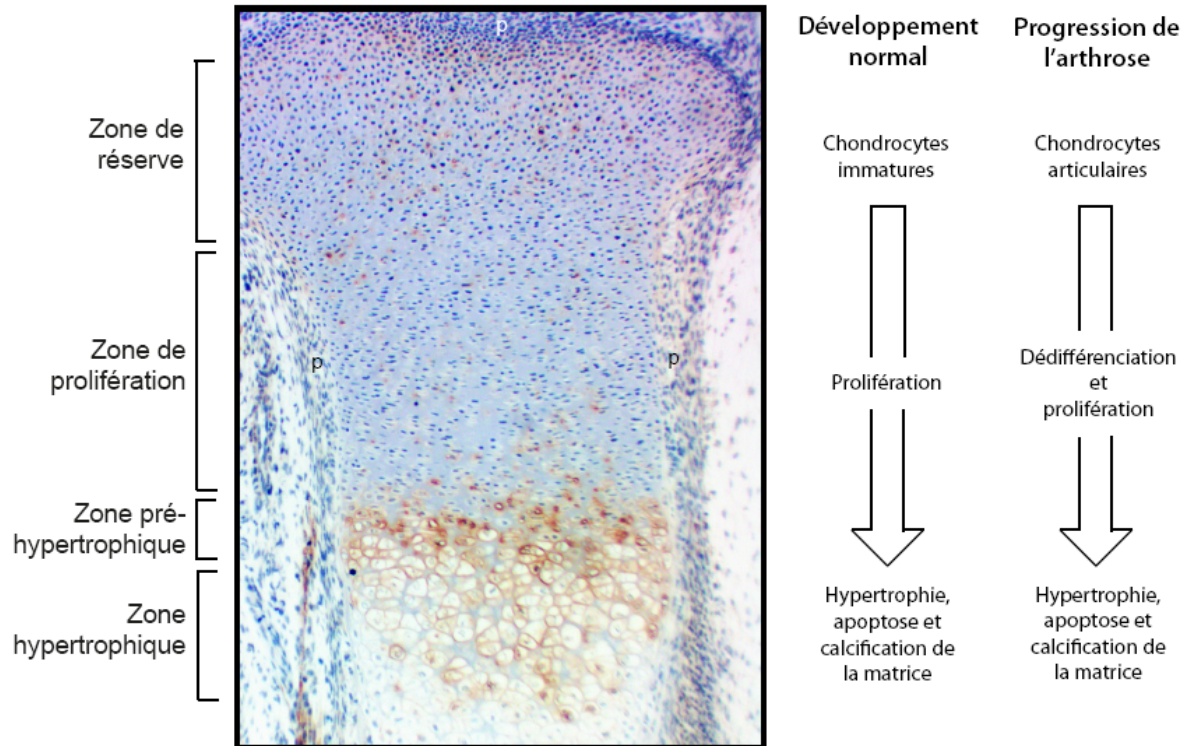


Figure 1. Figure hypothétique démontrant le parallèle entre le développement normal et la progression de l'arthrose

L'image encadrée représente une coupe histologique de la partie proximale d'un tibia prélevé chez un embryon de souris contrôle âgée de 13.5 jours. La protéine PITX1 (coloration brune) est détectée par immunohistochimie et la contre-coloration à l'hématoxyline (violet) permet de visualiser les noyaux des cellules. Sur cette image, nous pouvons voir l'expression de PITX1 dans la partie supérieure de la zone de réserve, qui donnera naissance au cartilage articulaire. Notez la diminution de la coloration brune au niveau de la zone de prolifération et l'augmentation dans la zone d'hypertrophie, avec une intensité maximale au niveau de la zone pré-hypertrophique. p: périchondre. Le parallèle entre le développement normal et la progression de l'arthrose est schématisé à l'aide de flèches dans la partie de droite. L'hypothèse suggère que les chondrocytes artrosiques pourraient suivre le même cheminement que les chondrocytes immatures lors du processus d'ossification endochondrale. (Picard, 2012)

Également dans le cadre de l'article #1, nous avons démontré une perte d'expression de *PITX1* dans les chondrocytes articulaires de patients OA, tant au niveau de l'ARNm (Figure 4, Article #1) que de la protéine (Figure 5, Article #1). À ce moment-là, les patients OA avaient tous été regroupés, peu importe la sévérité de la maladie, pour être comparés aux sujets sains.

Suite à la publication de ces résultats, j'ai demandé à ce que les radiographies des futurs patients étudiés soient évaluées par un clinicien, permettant l'attribution d'un stade d'arthrose selon Kellgren et Lawrence, tel que décrit plus tôt (Tableau I de l'introduction). Grâce à cette classification, j'ai pu observer une forte expression de *PITX1* dans le cartilage articulaire prélevé chez des sujets sains (stades 0 et 1) et une diminution significative pour les patients de stades 2 et 3. À mon grand étonnement, la perte d'expression de *PITX1* ne s'emblait pas significative chez les patients de stade 4, stade le plus avancé de la maladie (Figure 3A, Annexe I).

En comparaison avec les niveaux d'expression de *PITX1* lors de l'ossification endochondrale (Figure 1), il est probable que la perte d'expression de *PITX1* soit associée à la dédifférenciation et la prolifération des chondrocytes OA, plutôt qu'à leur mort cellulaire caractérisant le stade final de la maladie. De façon analogue à la mise en culture des chondrocytes (Figure 5, Annexe I), la dédifférenciation cellulaire accompagnée d'une diminution des niveaux de *PITX1* pourrait être caractéristique de la phase précoce de l'OA. À l'opposé, l'expression élevée de *PITX1* dans le cartilage articulaire sain pourrait être nécessaire pour empêcher la maturation des chondrocytes. Plusieurs résultats dans la littérature vont dans le même sens que ces hypothèses, tels que résumés dans la figure 2 du chapitre 2.

5.2 Conséquences de la perte d'expression de *PITX1*

5.2.1 Les souris *Pitx1* -/-

Le phénotype des souris déficientes en *Pitx1* a été décrit pour la première fois en 1999 par les Drs Lanctôt et Moreau (98), discuté dans le chapitre 2 (section 2.3.4). Il est à noter qu'en plus des zones étendues de chondrocytes hypertrophiés, les centres secondaires d'ossification étaient absents dans la partie proximale du tibia. Ces caractéristiques particulières pourraient laisser croire qu'il n'y a pas eu invasion des vaisseaux sanguins dans cette région, probablement due à une absence d'apoptose dans cette population de chondrocytes. L'expression de *Pitx1* semble nécessaire aux étapes menant vers l'apoptose, aussi discuté dans le chapitre 2 (section 2.3.7) et résumé par le schéma hypothétique (Figure 2, Chapitre 2). Cette hypothèse est également soutenue par une forte présence de la protéine PITX1 dans les zones d'hypertrophie retrouvées dans les tibias d'embryons de souris contrôles (Figure 1). En résumé, la perte totale de *Pitx1* semble bloquer les chondrocytes à l'état hypertrophique, empêchant l'apoptose et la croissance normale de l'os.

5.2.2. Les souris *Pitx1* +/-

Les souris *Pitx1* +/- ont tout d'abord été décrites comme ayant un phénotype comparable aux souris *Pitx1* +/+ à la naissance (98). Le Dr Moreau a eu la chance de recueillir des données sur les souris hétérozygotes vieillissantes, telles que présentées dans l'article #1. En effet, il a observé une raideur au niveau des articulations des pattes arrières qui semblait gêner leur démarche. Les radiographies confirmèrent la présence d'excroissances osseuses ainsi qu'un épaississement général de l'os cortical (Figure 2, Article #1). La coloration de Goldner sur les coupes histologiques de fémurs de souris *Pitx1* +/- âgées de 7 mois révélait un épaississement de l'os cortical mais aussi de l'os trabéculaire et sous-chondral (Figure 3, Article #1). Une calcification du cartilage articulaire était

également observable à fort grossissement. Toutes ces données nous ont permis de conclure que ces souris souffraient de symptômes apparentés aux stades précoces de l'arthrose.

Bien que non mentionné dans l'article #1, nous avons aussi noté la présence d'excroissances cartilagineuses, identifiables par une coloration rouge, chez environ deux souris hétérozygotes sur trois (Figure 3C, Article #1). Dans le but de mieux caractériser ces excroissances, j'ai coloré quelques coupes histologiques restantes à la safranine-O. Cette coloration m'a permis de constater que les excroissances étaient en fait d'origine fibrocartilagineuse, dû à un faible contenu en protéoglycanes (Figure 1A-B, Article #2). La comparaison du cartilage articulaire des souris *Pitx1* +/- avec celui des souris ++ a permis de déceler des irrégularités de surface, une diminution de l'épaisseur du cartilage ainsi qu'une perte de coloration à la safranine-O dans la zone profonde du cartilage (Figure 1C-D, Article #2). Ce phénotype, typique de l'arthrose, venait supporter nos conclusions quant au diagnostic des souris hétérozygotes vieillissantes.

De façon indépendante, une autre équipe a dénoté une déformation de type pied-bot chez environ 9% des jeunes souris *Pitx1* +/- (197). L'incidence était plus élevée chez les femelles, avec un ratio de 2,5 contre 1. Les membres inférieurs des souris affectées présentaient également des anomalies vasculaires et musculaires, ainsi qu'une légère augmentation de la masse adipeuse. L'hypoplasie musculaire semblait être due à un développement musculaire anormal plutôt qu'à une atrophie causée par un manque d'activité. Les profils d'expression géniques démontraient une diminution d'expression des gènes impliqués dans le développement musculaire, lorsque les bourgeons des membres inférieurs des souris *Pitx1* -/- étaient comparés à ceux des souris de type sauvage, toutes deux âgées de 12,5 jours de vie embryonnaire.

5.2.3 Défauts génétiques associés à *PITX1* chez des patients atteints de maladies musculosquelettiques

Des délétions chromosomiques incluant la région 5q31 ont été rapportées chez quelques rares patients depuis plus de trois décennies (198, 199). Récemment, une délétion de 241 kb touchant seulement quatre gènes dont *TXNDC15*, *PCBD2*, *CATSPER3* et *PITX1*, a été identifiée chez tous les membres d'une famille de trois générations atteints de pied-bot (197). Ces résultats confirment l'association directe de *PITX1* avec la maladie de pied-bot. De plus, aucun des membres affectés ne présentaient de polydactylie, la région en aval contenant le gène *EGR1* étant intacte (discuté au paragraphe sur la polydactylie, section 2.3.9.3). Cette remarque appuie l'hypothèse voulant qu'une inactivation à la fois de *PITX1* et de *EGR1* soit nécessaire au développement de la polydactylie (Figure 3, Chapitre 2). Chez d'autres patients avec une délétion beaucoup plus importante, allant parfois jusqu'à 40 Mb en amont du gène *PITX1*, la présence de pied-bot a été notée quatre fois sur neuf, mais sans polydactylie (200). Dans une autre étude comprenant cinq nouveaux cas, seulement un cas de pied-bot avec polydactylie a été répertorié, encore une fois avec une délétion chromosomique comprenant à la fois *PITX1* et *EGR1* (199).

Parmi tous les autres symptômes énumérés chez les patients ayant une délétion chromosomique de la région 5q31, plusieurs semblent être en commun. Nous y retrouvons, à divers degré de pénétrance: retard de développement, petite taille, scoliose, arthrose, micrognathie ainsi que fente labiale, tous présents chez les souris *Pitx1* *-/-* ou *Pitx1* *+/-*. La perte du gène *PITX1*, autant d'origine humaine que murine, peut causer des symptômes apparentés à l'arthrose. Dans certains cas, comme par exemple en présence de pied-bot ou de dysplasie spondylo-épiphysaire (SED), l'arthrose pourrait être qualifiée de secondaire, due à la friction causée par les déformations affectant les articulations. Pour être qualifiée de primaire, l'arthrose ne doit pas être reliée à une prédisposition évidente. Chez les souris *Pitx1* *+/-* étudiées dans le cadre de l'article #1, l'arthrose n'était pas reliée à aucune malformation détectable, puisque ces souris avaient un phénotype qui se rapprochait de la souris de type sauvage.

5.3 Gènes cibles potentiellement régulés par PITX1

Une liste exhaustive de gènes connus pour être régulés par PITX1 a été présentée dans le chapitre 2 (Tableau I, Chapitre 2, section 2.3.8). Ici nous allons discuter de gènes cibles à l'étude dans notre laboratoire.

5.3.1 Membres de la famille Hedgehog

5.3.1.1 IHH

Un membre de la famille Hedgehog pour lequel nous avons un intérêt particulier est *IHH*. Lorsque nous regardons attentivement la figure 1, nous pouvons apercevoir que l'expression de PITX1 est à son maximum dans la zone pré-hypertrophique, zone associée à la synthèse de IHH. Cette co-localisation laisse penser qu'il pourrait y avoir un lien entre l'expression de PITX1 et celle de IHH. En effet, des résultats provenant de notre laboratoire indiquent que PITX1 aurait un effet dose-dépendant sur l'activité du promoteur de *Ihh* (Figure 6, Annexe I). Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle PITX1 pourrait participer de façon active aux différentes étapes de l'ossification endochondrale. Parallèlement, les hauts niveaux de *PITX1* enregistrés chez les patients OA de stade 4 (Figure 3A, Annexe I) pourraient contribuer à l'augmentation d'expression de *IHH* chez ces derniers (Figure 7, Annexe I). Dans la littérature, il a aussi été démontré que l'activité de la voie IHH était plus élevée dans le cartilage sévèrement atteint par l'arthrose lorsque comparé au cartilage moins atteint (81).

5.3.1.2 SHH

Lors du développement des membres des mammifères, l'expression de *SHH* est localisée dans la zone d'activité polarisante (ZPA) et son expression ectopique dans la partie antérieure du mésenchyme est suffisante pour induire une polydactylie (201). Chez plusieurs patients atteints de polydactylie pré-axiale, différentes mutations ont été identifiées, toutes localisées dans une région régulatrice distante du gène *SHH* (202). Les

auteurs ont suggéré que ces mutations pouvaient causer une expression antérieure ectopique de *SHH*, laissant une activité normale dans la zone postérieure. De façon intéressante, une étude indépendante démontrait que l'expression forcée de *Pitx1* dans les membres supérieurs de souris causait une perte d'expression de *Shh* et l'absence de deux doigts postérieurs (203). Ces résultats portent à croire que PITX1 se situerait en amont de *SHH* et pourrait bloquer l'expression de ce dernier. La figure 3 du chapitre 2 en fait mention et la situation en C pourrait correspondre aux membres supérieurs, là où l'expression de *PITX1* est normalement absente.

5.3.2 PARP1, REG1 et EXTL3

Dans le cadre de l'article #2, nous avons démontré qu'il y avait une augmentation de l'expression de *Extl3*, *Reg1* et *Parp1* dans les tissus provenant des genoux de souris *Pitx1*^{-/-} (Figure 2, Article #2). Comme nous avons déjà démontré qu'une perte d'expression de *PITX1* était observable dans le cartilage de patients OA (Figures 4 et 5, Article #1), nous avons voulu vérifier si celle-ci correspondait à une élévation de EXTL3, REG1 et PARP1. En effet, les résultats d'immunohistochimie ont révélé que les protéines EXTL3, REG1 et PARP1 étaient retrouvées en quantité plus importante dans les zones profondes et superficielles du cartilage OA, comparé au cartilage sain (Figure 4, Article #2). Cependant, les résultats de PCR en temps réel étaient moins convaincants (Figure 3, Article #2). Il faut noter que ces résultats ont été obtenus à partir de cellules en culture et non à partir de tissus cartilagineux.

Les points communs soulevés dans la littérature concernant PITX1 peuvent aider à expliquer cette situation (Figure 2, Chapitre 2). Lorsque des cellules quiescentes sont mises en culture, les conditions de prolifération pourraient contribuer à diminuer l'expression de *PITX1* (tels qu'observé à la figure 5, Annexe I). Les variations d'expression entre les chondrocytes en prolifération, contrairement aux chondrocytes retrouvés dans le tissu cartilagineux, pourrait donc être amoindries. De même, l'écart entre l'expression des cibles de PITX1 s'en trouvera affecté.

Pour vérifier si l'élévation de *EXTL3*, *REG1* et *PARP1* dans le cartilage OA était reliée seulement à la perte d'expression de *PITX1*, nous avons entrepris des expériences *in vitro* permettant de moduler l'expression de *PITX1*. Comme en fait preuve le tableau I du chapitre 2, *PITX1* agit souvent en synergie avec d'autres facteurs de transcription. Le fait de moduler l'expression d'un seul facteur de transcription à la fois permet de mieux comprendre sa contribution.

Dans des chondrocytes en culture, l'inhibition forcée de *PITX1*, grâce à l'utilisation de siRNA, a eu pour conséquences l'élévation des niveaux de *EXTL3*, *REG1* et *PARP1* (Figure 5, Article #2). Bien que ces résultats démontrent que ces gènes sont effectivement régulés par *PITX1*, ils ne permettent pas de conclure si cette action est directe ou non. Ce point devra être étudié plus en détails mais pour le moment, des études *in silico* suggèrent que *PITX1* pourrait lier directement les régions promotrices de *EXTL3*, *REG1* ou *PARP1* (Figure 8, Annexe I).

Les expériences de surexpression de *PITX1*, à l'aide de lentivirus, ont donné des résultats variables (Figure 6, Article #2). Combinés aux résultats obtenus avec les siRNA, ceux-ci suggèrent que la régulation de *EXTL3*, *REG1* et *PARP1* nécessite l'apport de facteurs de transcription additionnels pour reproduire totalement les effets observés *in vivo*. L'identification de ce ou ces facteurs de transcription, qui seront étudiés dans un projet futur, permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la pathologie de l'arthrose. Pour l'instant, la littérature nous permet de soupçonner *SMAD3* et *EGR1*, puisqu'ils sont capables de lier *PITX1* et d'influencer la régulation de gènes cibles dans différents contextes (Tableau I, Chapitre 2).

5.4 Rôles potentiels de PARP1, REG1 et EXTL3 dans la pathogenèse de l'arthrose

Jusqu'à présent dans la littérature, seule la protéine PARP1 a été associée à l'arthrose alors que REG1 et EXTL3 n'y ont jamais été reliées. Dans cette section, nous allons donc discuter des différents rôles à jouer dans l'arthrose, soit connus ou potentiels, des gènes de la famille PARP, REG et EXT.

5.4.1 Membres de la famille PARP

Dans l'arthrite rhumatoïde, maladie apparentée à l'arthrose, une élévation des niveaux de PARP1 dans les cellules synoviales serait responsable de la transactivation du gene *ERBB2* (204). Il a été proposé que ERBB2, un récepteur à activité tyrosine kinase, pourrait engendrer une prolifération accrue des cellules synoviales, phénomène typique à l'arthrite rhumatoïde (205).

Dans l'arthrose, une prolifération cellulaire accrue est également notée, bien qu'associée aux chondrocytes plutôt qu'aux cellules synoviales. Il serait donc possible que l'élévation des niveaux de PARP1 dans les chondrocytes puisse stimuler leur prolifération. Cette hypothèse est appuyée par les résultats démontrant que PARP1 peut activer de façon directe la transcription des gènes *REG*, ceux-ci étant impliqués dans la régénération tissulaire (192).

5.4.2 Membres de la famille REG

Dans une maladie non apparentée à l'arthrose, la présence de REG1 était plus souvent observée chez des patients présentant une réépithélialisation squameuse de l'oesophage, alors appelé oesophage de Barrett (206). Dans cet article, les auteurs ont noté que REG1 était impliquée dans plusieurs maladies associées à une inflammation chronique. Ils ont également suggéré que certaines cytokines pro-inflammatoires pourraient être

responsables de l'élévation des niveaux de *REG1* dans la pathologie de Barrett. D'autres études ont en effet démontré que IL-6 pouvait induire l'expression de *Reg1* en présence de dexaméthasone (207).

Bien que le rôle de REG1 n'ait jamais été étudié dans l'arthrose, il serait logique de penser qu'il pourrait stimuler la régénération du cartilage suite à une inflammation locale. De plus, nous nous sommes intéressés à REG1 parce que son récepteur, EXTL3 (186), pouvait lui aussi être potentiellement impliqué dans la pathogenèse de l'arthrose.

5.4.3 Membres de la famille EXT

Il est intéressant de constater que bien que les protéines EXT soient exprimées abondamment et de façon ubiquitaire chez l'humain, les effets de leurs mutations semblent être limités aux tissus osseux. Contrairement aux gènes *EXT1* et *EXT2* qui ont été directement associés à la formation d'exostoses, aucune mutation dans le gène *EXTL3* n'a été répertoriée chez les patients HME. Ceci n'est pas étonnant puisqu'une perte d'expression de EXTL3 engendrerait la synthèse de chaîne HS plus longues, alors qu'une perte de EXT1 ou EXT2 engendre des chaînes HS plus courtes (177).

Comparé au cartilage sain, nous avons démontré qu'il y avait une augmentation de l'expression de EXTL3 dans le cartilage arthrosique (Figure 4, Article #2). Il serait donc tentant de spéculer que cette augmentation puisse mener à la synthèse de chaînes HS plus courtes et ainsi participer à la formation non pas d'exostoses, mais bien d'ostéophytes. Tel que décrit à la section 1.6, la formation d'exostoses, tout comme celle d'ostéophytes, nécessite la récapitulation du processus d'ossification endochondrale. Ce processus est finement contrôlé par un gradient de IHH qui dépend de la présence de chaînes d'héparane sulfate (179). Bien que très élégant, ce modèle aura besoin d'être mis à l'épreuve en étudiant les niveaux d'expression de EXTL3 durant la formation d'ostéophytes, ce qui dépasse le cadre de cette thèse.

5.5 Régulation de *PITX1*

5.5.1 Analyses de polymorphismes sur la région promotrice du gène *PITX1* humain

Dans le but d'identifier les causes menant à la perte d'expression de *PITX1* dans le cartilage articulaire OA, nous avons entrepris des études de promoteur. Nous avons tout d'abord voulu vérifier que la région promotrice du gène *PITX1* humain ne contenait aucune anomalie. Pour ce faire, nous avons séquencé une région de 10 Kb, retrouvée en amont du gène *PITX1*, chez une quarantaine de patients OA. Puis, nous avons comparé ces résultats avec ceux obtenus avec de l'ADN génomique d'une dizaine de sujets contrôles. Les quelques variations enregistrées ont ensuite été contrôlées chez un plus grand nombre de patients, par une autre technique permettant de vérifier la présence de polymorphismes pré-identifiés. Ces résultats nous ont permis de conclure qu'il n'y avait pas de différence significative entre les régions promotrices de *PITX1* retrouvées chez les patients OA lorsque comparées aux sujets sains (Tableau supplémentaire S-I, Annexe II).

5.5.2 Mesure de l'activité de différentes régions du promoteur de *PITX1*

Dans la littérature, il y a très peu d'études concernant le promoteur de *PITX1* alors nous avons débuté en mesurant les niveaux d'activité de régions assez larges. Nous avons observé que les régions contenues entre -3895 et +61 (par rapport au site d'initiation de la transcription) étaient capables d'induire une activité au moins 25 fois supérieure au signal de base (Figure 1B, Annexe II). Une activité maximale était enregistrée lorsque la région -3895/-729 était déléetée, suggérant que cette dernière puisse contenir des éléments pouvant réduire l'expression de *PITX1*. À la position -3751, un polymorphisme (SNP rs6867012) avait initialement été identifié de façon plus significative chez les patients OA. De façon intéressante, ce SNP est situé dans un site E2F et plusieurs de ces sites ont d'ailleurs été relevés tout au long du promoteur de *PITX1* (Figure 1C, Annexe II). Nous avons donc

décidé d'étudier plus en profondeur la contribution des facteurs E2F concernant la régulation du gène *PITX1*.

5.5.3 Contribution des facteurs de transcription E2F

Comme les facteurs de transcription E2F n'avaient jamais été étudiés dans le contexte de l'arthrose, nous avons voulu vérifier s'ils étaient exprimés de façon différentielle entre les sujets sains et les patients OA. Dans les chondrocytes en culture, seulement *E2F1* démontrait un changement significatif d'expression et ce, lorsque les patients OA de stade KL 4 étaient comparés aux patients OA de stades KL 2-3 (Figure 3B, Annexe I). Il est important de noter que l'expression de *PITX1* était elle aussi augmentée de façon significative dans les mêmes conditions (Figure 3A, Annexe I). L'hypothèse que E2F1 pourrait réguler positivement et directement *PITX1* a alors été émise et elle a été vérifiée avec succès (Figures 2A et 2B, Annexe II). Ces résultats n'aidaient toutefois pas à comprendre pourquoi une perte d'expression de *PITX1* était observée chez les patients OA de stades KL 2-3 (Figure 3A, Annexe I). Des études supplémentaires ont donc été entreprises dans le but d'identifier d'autres facteurs responsables de l'inhibition de *PITX1*.

5.5.4 Identification de la prohibitine (PHB1) comme élément régulateur du gène *PITX1*

La région d'ADN contenant le SNP rs6867012, retrouvée dans un secteur ayant une activité amoindrie, a été utilisée comme appât dans des expériences de capture de protéines. La spectrométrie de masse a permis d'identifier plusieurs peptides correspondant à la protéine PHB1 (Tableau supplémentaire S-II, Annexe II). PHB1 est connue pour lier E2F1 et empêcher la régulation de ses cibles transcriptionnelles. Normalement retrouvée au niveau des mitochondries, nous avons démontré que PHB1 s'accumulait dans les noyaux des chondrocytes OA (Figure 3, Annexe II). De plus, la surexpression de PHB1 était suffisante pour induire une perte d'expression de *PITX1* et ce, de manière directe (Figures 4 et 5A, Annexe II). L'utilisation de siRNA contre *PHB1* a permis d'augmenter les niveaux

d'expression de *PITX1* dans des chondrocytes OA (Figure 5C, Annexe II). Elle a également permis d'augmenter l'expression d'autres cibles connues de E2F1, soit *CCNA2* et *CCNE1*, des cyclines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Figure 5E, Annexe II).

5.5.5 Validation de résultats à l'aide du modèle murin STR/ort

Telles que décrites à la section 1.1, les souris STR/ort sont un excellent modèle d'arthrose spontanée. La lignée établie par notre équipe développe des symptômes arthrosiques à un très jeune âge, dès 15 semaines environ. L'utilisation de ces souris aide grandement à comprendre l'initiation et le développement de la maladie. Grâce à elles, nous avons pu démontrer qu'une perte de *Pitx1*, tant au niveau de l'ARNm que de la protéine, caractérisait les étapes précoces de l'arthrose (Figure 6, Annexe II). Parallèlement, l'accumulation nucléaire de PHB1 dans les chondrocytes murins semblait s'accroître vers 15 semaines, âge où la dégradation du cartilage est encore très mineure. Il serait donc possible que ces événements précèdent l'apparition des premiers symptômes d'arthrose et logiquement, qu'ils en soient la cause.

5.6 Synthèse générale

Avant mon arrivée au laboratoire du Dr Alain Moreau, aucune donnée dans la littérature n'avait établi de lien entre l'arthrose et le facteur de transcription PITX1. Nous avons été les premiers à démontrer que la perte d'une seule copie du gène *Pitx1* causait des symptômes arthrosiques chez la souris vieillissante (Article #1). Les résultats originaux présentés dans cette thèse ont associé une diminution de la protéine PITX1 non seulement aux conditions d'arthrose affectant le cartilage murin et humain, mais également à une augmentation de la prolifération cellulaire (Figure 1, Chapitre 5).

Dans la littérature, il est bien acquis que les chondrocytes OA subissent une dédifférenciation et que le cartilage traverse une phase de régénération avant de subir les dommages caractérisant l'arthrose. Nous avons démontré que lors de la dédifférenciation associée à la mise en culture des chondrocytes, une perte d'expression de *PITX1* était observable (Figure 5, Annexe I). De plus, l'inhibition *in vitro* de *PITX1* résultait en l'augmentation de *PARP1*, *REG1* et *EXTL3* (Article #2), tous reconnus pour leurs rôles dans la régénération tissulaire.

La récapitulation du processus d'ossification endochondrale comme mécanisme principal causant l'arthrose est un sujet encore débattu. Plusieurs points en faveur de ce concept ont été présentés dans l'introduction. Comme le rôle de PITX1 dans ce processus n'a jamais été établi, nous avons contribué à éclaircir ce sujet. En effet, nous avons été les premiers à démontrer que PITX1 avait un effet dose-dépendant sur l'activité du promoteur de *Ihh* (Figure 6, Annexe I), joueur clé dans le processus d'ossification endochondrale. Ces résultats sont appuyés par la forte intensité de marquage contre PITX1 dans les zones pré-hypertrophiques de tibia en développement (Figure 1, Chapitre 5).

Concernant la régulation de *PITX1*, très peu de données sont disponibles dans la littérature. Les éléments de régulation nouvellement identifiés (dans l'article présenté à l'annexe II) ont grandement contribué à mieux comprendre ces mécanismes. La régulation

positive et directe de *PITX1* par E2F1 est une découverte majeure non seulement pour l'arthrose mais également pour les études sur le cancer. En effet, une question brûlante est encore soulevée: Quel est le lien entre E2F1 et p53? Comme il a déjà été démontré que *PITX1* pouvait activer directement *p53*, ce lien est désormais établi. Toutefois, le rôle de E2F1 dans l'arthrose reste à investiguer plus en détails, puisque la littérature est muette à ce sujet.

L'inhibition des cibles transcriptionnelles de E2F1 par PHB1 avait déjà été élucidée avant l'apport de nos résultats de recherche. Par contre, nos travaux ont démontré pour la première fois qu'il y avait une accumulation nucléaire de PHB1 dans les chondrocytes OA et que ceci menait à une perte d'expression de *PITX1* (Annexe II). Dans les chondrocytes OA, l'inhibition *in vitro* de *PHB1* n'affectait que certaines cibles de E2F1, dont *PITX1*. Il serait intéressant de pouvoir identifier d'autres gènes affectés par la présence nucléaire de PHB1, ce qui pourrait être étudié dans un projet futur.

Il n'est jamais facile de départager les causes et les conséquences d'une maladie, et l'arthrose n'en fait pas exception. L'utilisation d'un modèle murin d'arthrose permet d'étudier les phases précoces de la maladie. Les souris STR/ort nous ont permis de constater que la perte d'expression de *PITX1*, conjointement avec l'accumulation nucléaire de PHB1, survenait avant la dégradation du cartilage (Figure 6, Annexe II). Il serait donc possible que l'inhibition de *PITX1*, ainsi que l'augmentation subséquente de PARP1, REG1 et EXTL3, soient responsables de l'initiation de la phase de régénération observée en début de maladie. Les hauts niveaux de *PITX1*, mesurés dans le cartilage sévèrement atteint par l'arthrose (Figure 3A, Annexe I), pourraient quant à eux contribuer à l'apoptose et la dégradation du cartilage.

Chapitre 6 - Conclusions

6.1 Revue des hypothèses initiales

6.1.1 Expression de *PITX1*

Suite aux résultats présentés dans l'article #1, nous étions préoccupés à savoir si la perte d'expression de *PITX1* chez les patients OA pouvait être due à un défaut génétique. Le séquençage d'une région de 10 kb en amont du gène *PITX1* ainsi qu'une analyse de plusieurs SNP (Tableau supplémentaire S1, Annexe II) chez une centaine de patients OA et de sujets sains n'ont révélé aucune anomalie. Les exemples dans la littérature révèlent qu'une délétion chromosomique de la région 5q31 pourrait influencer non seulement le développement de l'arthrose mais aussi celui du pied-bot, de la scoliose ou d'une fente labiale (section 5.2.3). Comme ces autres symptômes n'étaient pas présents chez nos patients étudiés, il serait peu probable que l'arthrose soit causée par un défaut du gène *PITX1* chez ces derniers.

Dans les articles #1 et #2, nous avons mentionné que *EGR1*, un partenaire connu de *PITX1*, était lui aussi exprimé de façon moins abondante dans le cartilage OA. Si la perte de *PITX1* et de *EGR1* survenait très tôt, comme par exemple suite à un défaut génétique, le risque de développer d'autres anomalies, telle la polydactylie, serait plus élevé (Figure 3, Chapitre 2). Il est donc logique de croire que la perte d'expression de *PITX1* et *EGR1* puisse survenir à l'âge adulte, bien après que la période de croissance soit achevée. D'ailleurs, la figure 4 du chapitre 1 suggère qu'une perte de *PITX1* pourrait être une conséquence de la ménopause ou de l'andropause. Quant à *EGR1*, il semblerait que son expression soit modulée en fonction du degré d'inflammation (208).

Les résultats obtenus avec notre première cohorte de patients OA, soit ceux présentés dans l'article #1, laissaient envisager que la perte de *PITX1* pourrait être observable dans la majorité des échantillons de cartilage OA. Cependant, notre deuxième cohorte de patients OA nous a apporté des résultats un peu différents. Chez les deux tiers de ceux-ci, la perte d'expression de *PITX1* était effectivement notée (Figure 1A, Annexe II).

Pour le tiers restant, il n'est pas exclu qu'une perte de *PITX1* ait précédé une phase de réexpression de ce dernier. Les explications fournies à la section 5.1 démontrent qu'une inhibition de *PITX1* pourrait contribuer à la dédifférenciation et la prolifération des chondrocytes alors que son activation subséquente pourrait conduire à l'apoptose.

6.1.2 Régulation de *PITX1*

Pour mieux comprendre les mécanismes menant à la perte d'expression de *PITX1*, des études approfondies du promoteur de ce dernier ont été entreprises (Annexe II). Ces études ont révélé que le facteur de transcription E2F1 pouvait lier directement le promoteur de *PITX1* et activer ce dernier (Figures 2A et 2B, Annexe II). Nous avons d'abord cru que E2F1 pouvait ainsi faciliter la prolifération des chondrocytes, puisqu'une majorité d'articles le reliait à la prolifération cellulaire. Cette assomption ne correspondait toutefois pas aux niveaux d'expression de *PITX1* observés durant la prolifération cellulaire (Figure 2, Chapitre 2 et Figure 1, Chapitre 5).

Une étude précédente sur les cibles de E2F1 appuie non seulement nos résultats (E2F1 active *PITX1*) mais aide à mieux comprendre le rôle de ce dernier durant l'ossification endochondrale (209). En observant la liste de gènes régulés par E2F1 dans une lignée cellulaire provenant d'un ostéosarcome humain (U2OS), nous pouvons déduire que E2F1 inhibe la prolifération des chondrocytes via la voie de TGF β et favorise plutôt leur maturation, l'angiogenèse et l'ostéoblastogenèse via la voie des WNT (Figure 1).

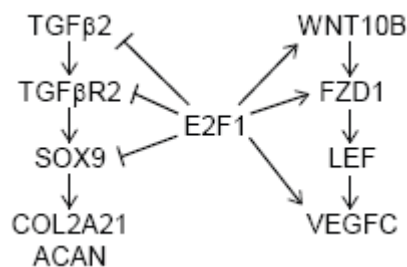


Figure 1. Cibles de E2F1 associées au processus d'ossification endochondrale.

Schéma représentant quelques gènes affectés par la surexpression de E2F1 dans la lignée U2OS. Une liste complète de gènes a été obtenue grâce à l'utilisation de

micropuces à ADN. Résultats sélectionnés provenant de l'article de Müller, 2001 (209).

Dans une lignée cellulaire provenant cette fois-ci d'un chondrosarcome humain (JJ012), il a été démontré qu'un arrêt de prolifération était accompagné d'une élévation des niveaux de E2F1 (210). Ces résultats appuient l'hypothèse voulant que E2F1 et PITX1 puissent bloquer la prolifération des chondrocytes. Dans la section 2.3.7, les résultats présentés démontrent que la surexpression de PITX1 peut induire l'apoptose. Parallèlement, plusieurs articles affirment qu'une élévation de E2F1 peut aussi induire l'apoptose (211, 212).

6.1.3 Rôle de *PITX1*

L'expression de PITX1 dans les chondrocytes articulaires sains murins (Figure 1, chapitre 5) et humains (Figures 4 et 5, article #1) suggère qu'elle pourrait empêcher la maturation des chondrocytes. Cette maturation, qui fait normalement parti du processus d'ossification endochondrale (sections 1.5.1 et 1.5.2), semble être réinitiée dans la pathologie de l'arthrose. Les polymorphismes associés à l'arthrose, la morphologie des chondrocytes retrouvés dans le cartilage OA ainsi que leurs patrons d'expression appuient ce concept (sections 1.4.4 et 1.5.3).

La perte de PITX1 dans le cartilage OA pourrait contribuer à la phase de régénération (section 1.4), facilitée par la présence accrue de facteurs tels que REG1, PARP1 et EXTL3 (Article #2, sections 1.7 et 5.3.2). Cette phase est également caractérisée par l'apparition d'ostéophytes (Figure 8, Chapitre 1), qui pourraient être une conséquence de l'inhibition de PITX1 et de l'augmentation de EXTL3 (section 1.6).

Par un mécanisme encore obscur, la réexpression de PITX1, telle qu'observée dans les chondrocytes hypertrophiés (Figure 1, chapitre 5) et les patients OA de stade 4 (Figure 3A, Annexe I), pourrait être responsable de la phase de dégradation associée à la mort cellulaire. La figure 2 résume le rôle de PITX1 dans la pathogenèse de l'arthrose, tel que mis en valeur par la présente thèse.

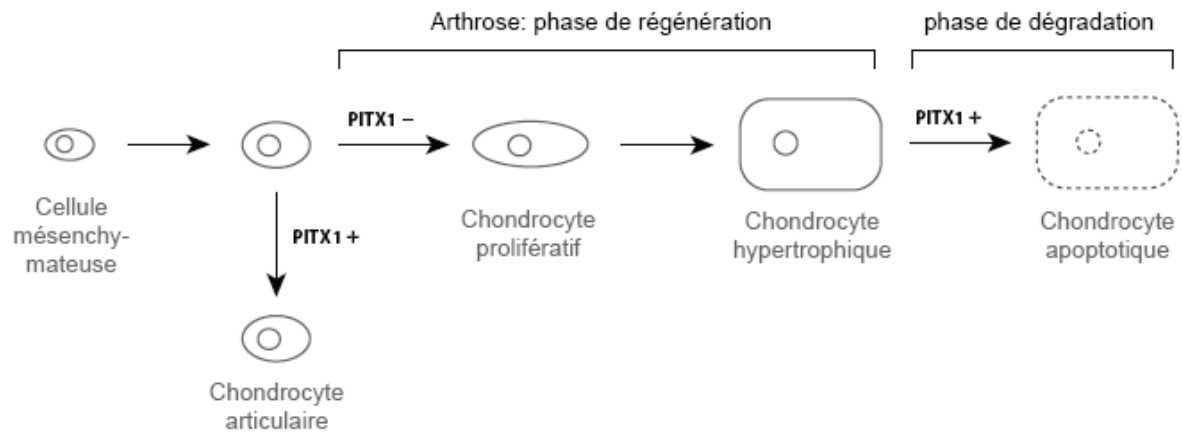


Figure 2. Rôle de PITX1 dans le cartilage artriculaire sain et arthrosique.

Schéma représentant les différentes étapes traversées par les chondrocytes articulaires. Suite à la différenciation des cellules mésenchymateuses, les chondrocytes qui demeureront en permanence dans le cartilage artriculaire doivent l'arrêt de leur maturation à la présence de PITX1. Lors de l'initiation de l'arthrose, les chondrocytes articulaires se différencient et perdent l'expression de PITX1. La première phase de la maladie est caractérisée par une prolifération accélérée, une sécrétion accrue de composants de la matrice extracellulaire puis une hypertrophie des chondrocytes. La seconde phase est accompagnée de mort cellulaire, de destruction de la matrice cartilagineuse et d'une augmentation de l'expression de PITX1. (Picard, 2012)

6.2 Perspectives

La proposition d'un traitement pharmacologique pour l'arthrose nécessite au préalable une bonne connaissance des mécanismes impliqués. La réinitiation du processus menant à l'ossification endochondrale semble être le mécanisme majeur emprunté. Par chance, ce processus a été largement étudié dans le cadre du développement embryonnaire (sections 1.5.1 et 1.5.2). D'ailleurs, le blocage de la voie hedgehog (213), de la voie des WNT ou de RUNX2 (section 1.4.6) a déjà été proposé comme traitement potentiel pour réduire la sévérité de l'arthrose.

Cependant, il serait idéal de pouvoir prévenir l'initiation de l'arthrose plutôt que d'atténuer sa progression. Les résultats présentés dans cette thèse indiquent que la perte de PITX1 survient au tout début de la maladie. Chez la souris, la perte d'une copie du gène *Pitx1* mène à des symptômes semblables à la phase initiale de l'arthrose humaine (Figure 3, Article #1). Dans un modèle d'arthrose murin, les souris STR/ort, la perte de *Pitx1* survient avant qu'une dégradation du cartilage ne soit visible (Figure 6, Annexe II). Pour des raisons évidentes, il est impossible de suivre la progression histologique de l'OA et l'expression correspondante de *PITX1* chez des sujets humains.

Bien qu'il soit admis que la prolifération des chondrocytes soit accélérée durant la phase initiale de l'OA, des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour lier cet événement à la perte d'expression de *PITX1*. Pour clarifier ce point, l'expression de *PITX1* pourrait être inhibée dans des chondrocytes primaires normaux à l'aide de siRNA. Puis, la prolifération cellulaire pourrait être évaluée soit par l'incorporation de bromodéoxyuridine (BrdU) ou de thymidine tritiée (H3). Le nombre de cellules viables, suite aux transfections avec siRNA non spécifiques ou spécifiques à *PITX1*, pourrait également être comparé à l'aide de bleu de trypan et d'un compteur automatisé.

De façon inverse, la viabilité cellulaire pourrait être vérifiée suite à l'augmentation des niveaux d'expression de *PITX1*. Si l'expression forcée de *PITX1*, par exemple à l'aide de

lentivirus, aurait pour effet de provoquer l'apoptose des chondrocytes, cet effet serait mesurable par diverses méthodes. La technique "TUNEL" (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) permettrait de détecter la fragmentation de l'ADN, résultant de l'activation des voies de signalisation pro-apoptotiques. Ces mêmes voies sont également connues pour activer certaines caspases, dont les produits de clivage pourraient être mesurés en autre autre à l'aide d'anticorps spécifiques.

L'association entre les niveaux d'expression de *PITX1* et la différenciation cellulaire, mise en valeur dans cette thèse, n'a pas encore été bien établie en ce qui concerne les chondrocytes. Pour étudier celle-ci, l'utilisation de la lignée chondrocytaire murine ATDC5 serait idéale. Cette lignée possède les caractéristiques de cellules chondroprogénitrices et peut être différenciée entre autre à l'aide d'insuline (214). Des extraits d'ARN pourraient être prélevés à différents moments lors de la différenciation chondrocytaire et les niveaux de *PITX1* pourraient être quantifiés par PCR en temps réel. Une augmentation de l'expression de *PITX1* dans le temps permettrait d'expliquer les hauts niveaux observés dans le cartilage articulaire sain, où les chondrocytes sont différenciés. De plus, cette variation serait en accord avec la perte d'expression de *PITX1* dans les chondrocytes dédifférenciés, tels que retrouvés dans les stades précoces de l'arthrose.

Le but ultime de futurs projets seraient de développer un traitement visant à empêcher la perte initiale de *PITX1* et ainsi éviter la réinitiation du processus d'ossification endochondrale et les dommages subséquents. L'étude de la régulation de *PITX1* prend alors toute son importance. Dans l'annexe II, nos résultats ont démontré que *PITX1* était régulé directement et positivement par E2F1, et que cet effet était atténué par la présence nucléaire de PHB1. La protéine PHB1 est connue pour lier E2F1 et empêcher la régulation de ses cibles transcriptionnelles. Nous avons démontré qu'elle participait à la répression de *PITX1* mais elle pourrait aussi affecter d'autres cibles, comme celles présentées à la figure 1 de la section 6.1.2. Cette hypothèse pourrait facilement être vérifiée par PCR en temps réel, suite à la surexpression de PHB1 dans des chondrocytes.

Normalement retrouvée au niveau des mitochondries, nous avons observé une accumulation nucléaire de PHB1 dans les chondrocytes OA. Cette découverte pourrait avoir un impact majeur sur le diagnostic de l'arthrose ainsi que sur le développement d'un éventuel traitement. Pour vérifier la présence nucléaire de PHB1 dans les chondrocytes, un prélèvement cartilagineux est nécessaire, ce qui ne pourrait évidemment pas servir d'outil diagnostique. Nous nous sommes alors demandé si cette accumulation nucléaire pouvait également être observée dans des cellules plus faciles d'accès, comme les leucocytes. Nos résultats préliminaires ont démontré que PHB1 s'accumulait plus fortement dans les noyaux des monocytes, des lymphocytes et des neutrophiles de patients OA lorsque comparés aux sujets sains (215).

Ce test, qui est présentement à l'étude sur un plus grand nombre de patients, pourrait permettre de suivre l'évolution de l'arthrose dans le temps. Ainsi, nous espérons démontrer que l'accumulation nucléaire de PHB1 précède les premiers symptômes décelables de la maladie. Il s'en suivrait une perte d'expression précoce de *PITX1*, comme c'est le cas chez les souris STR/ort. Ces résultats permettraient également de qualifier ces événements de causes et non de conséquences de l'arthrose. Des agents pharmacologiques capables de moduler l'activité de PHB1 deviendraient alors des cibles de choix pour un éventuel traitement préventif.

Bien que l'augmentation de PHB1 ait d'abord été associée avec l'arrêt de la prolifération cellulaire, des études ont démontré que cet effet était attribuable à la portion 3' non traduite de son ARNm (216). Au contraire, lorsque les niveaux protéiques de PHB1 sont réduits, la prolifération est inhibée et l'apoptose est induite (217). Il ne serait donc pas souhaitable de réduire les niveaux de PHB1 ni d'augmenter ceux de *PITX1*, les deux cas pouvant mener à la mort cellulaire. Une solution envisageable serait d'empêcher l'import de PHB1 vers le noyau. De façon intrigante, la présence nucléaire de PHB1 a été observée dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses (218). Ces résultats appuient la théorie voulant que PHB1 favorise la prolifération cellulaire. Néanmoins, un traitement capable de bloquer cet import aurait des retombées non seulement sur l'arthrose mais également sur le

cancer. Le mécanisme d'import-export de PHB1 est un sujet à l'étude dans notre laboratoire et promet des résultats forts intéressants.

Bibliographie

1. Irlenbusch U, Schaller T. Investigations in generalized osteoarthritis. Part 1: genetic study of Heberden's nodes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006 May;14(5):423-7.
2. Sharma L, Berenbaum F. *Osteoarthritis. A companion to rheumatology*. Mosby Elsevier ed. Philadelphia 2007.
3. van der Kraan PM, van den Berg WB. Osteophytes: relevance and biology. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007 Mar;15(3):237-44.
4. Rytter S, Jensen LK, Bonde JP. Clinical knee findings in floor layers with focus on meniscal status. *BMC Musculoskelet Disord*. 2008;9:144.
5. Brandt KD, Fife RS, Braunstein EM, Katz B. Radiographic grading of the severity of knee osteoarthritis: relation of the Kellgren and Lawrence grade to a grade based on joint space narrowing, and correlation with arthroscopic evidence of articular cartilage degeneration. *Arthritis Rheum*. 1991 Nov;34(11):1381-6.
6. Roth SH, Anderson S. The NSAID dilemma: managing osteoarthritis in high-risk patients. *Phys Sportsmed*. 2011 Sep;39(3):62-74.
7. Colen S, Haverkamp D, Mulier M, van den Bekerom MP. Hyaluronic Acid for the Treatment of Osteoarthritis in all Joints Except the Knee: What is the Current Evidence? *BioDrugs*. 2012 Apr 1;26(2):101-12.
8. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008 Feb;16(2):137-62.
9. Clegg DO, Reda DJ, Harris CL, Klein MA, O'Dell JR, Hooper MM, et al. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N Engl J Med*. 2006 Feb 23;354(8):795-808.
10. Largo R, Alvarez-Soria MA, Diez-Ortego I, Calvo E, Sanchez-Pernaute O, Egido J, et al. Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003 Apr;11(4):290-8.
11. Canas N, Gorina R, Planas AM, Verges J, Montell E, Garcia AG, et al. Chondroitin sulfate inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in rat astrocytes by preventing nuclear factor kappa B activation. *Neuroscience*. 2010 May 19;167(3):872-9.
12. Medifocus. *Osteoarthritis of the knee, a comprehensive guide to symptoms, treatment, research and support*. Silver Spring 2012.
13. Coons DA, Barber FA. Arthroscopic osteochondral autografting. *Orthop Clin North Am*. 2005 Oct;36(4):447-58.
14. Kock L, van Donkelaar CC, Ito K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell Tissue Res*. 2011 Oct 27.
15. Hunter DJ, McDougall JJ, Keefe FJ. The symptoms of osteoarthritis and the genesis of pain. *Rheum Dis Clin North Am*. 2008 Aug;34(3):623-43.
16. Patra D, Sandell LJ. Recent advances in biomarkers in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011 Sep;23(5):465-70.
17. Hunter DJ. Insights from imaging on the epidemiology and pathophysiology of osteoarthritis. *Radiol Clin North Am*. 2009 Jul;47(4):539-51.

18. Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res.* 2001;3(2):107-13.
19. Dell'Accio F, De Bari C, El Tawil NM, Barone F, Mitsiadis TA, O'Dowd J, et al. Activation of WNT and BMP signaling in adult human articular cartilage following mechanical injury. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(5):R139.
20. Im HJ, Muddasani P, Natarajan V, Schmid TM, Block JA, Davis F, et al. Basic fibroblast growth factor stimulates matrix metalloproteinase-13 via the molecular cross-talk between the mitogen-activated protein kinases and protein kinase Cdelta pathways in human adult articular chondrocytes. *J Biol Chem.* 2007 Apr 13;282(15):11110-21.
21. Lorenz H, Richter W. Osteoarthritis: cellular and molecular changes in degenerating cartilage. *Prog Histochem Cytochem.* 2006;40(3):135-63.
22. Temple MM, Bae WC, Chen MQ, Lotz M, Amiel D, Coutts RD, et al. Age- and site-associated biomechanical weakening of human articular cartilage of the femoral condyle. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007 Sep;15(9):1042-52.
23. 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.
24. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am.* 1971 Apr;53(3):523-37.
25. Cicuttini FM, Spector TD. Genetics of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 1996 Sep;55(9):665-7.
26. Gleghorn L, Ramesar R, Beighton P, Wallis G. A mutation in the variable repeat region of the aggrecan gene (AGC1) causes a form of spondyloepiphyseal dysplasia associated with severe, premature osteoarthritis. *Am J Hum Genet.* 2005 Sep;77(3):484-90.
27. Watanabe H, Kimata K, Line S, Strong D, Gao LY, Kozak CA, et al. Mouse cartilage matrix deficiency (cmd) caused by a 7 bp deletion in the aggrecan gene. *Nat Genet.* 1994 Jun;7(2):154-7.
28. Echtermeyer F, Bertrand J, Dreier R, Meinecke I, Neugebauer K, Fuerst M, et al. Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nat Med.* 2009 Sep;15(9):1072-6.
29. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature.* 2005 Mar 31;434(7033):644-8.
30. Pendleton A, Johnson MD, Hughes A, Gurley KA, Ho AM, Doherty M, et al. Mutations in ANKH cause chondrocalcinosis. *Am J Hum Genet.* 2002 Oct;71(4):933-40.
31. Ho AM, Johnson MD, Kingsley DM. Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science.* 2000 Jul 14;289(5477):265-70.
32. Fytili P, Giannatou E, Papanikolaou V, Stripeli F, Karachalios T, Malizos K, et al. Association of repeat polymorphisms in the estrogen receptors alpha, beta, and androgen receptor genes with knee osteoarthritis. *Clin Genet.* 2005 Sep;68(3):268-77.

33. Sato T, Matsumoto T, Yamada T, Watanabe T, Kawano H, Kato S. Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (AR KO) mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jan 3;300(1):167-71.
34. Kizawa H, Kou I, Iida A, Sudo A, Miyamoto Y, Fukuda A, et al. An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet.* 2005 Feb;37(2):138-44.
35. Valdes AM, Van Oene M, Hart DJ, Surdulescu GL, Loughlin J, Doherty M, et al. Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. *Arthritis Rheum.* 2006 Feb;54(2):533-9.
36. Kugimiya F, Kawaguchi H, Kamekura S, Chikuda H, Ohba S, Yano F, et al. Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP) 2 and BMP6 in bone formation. *J Biol Chem.* 2005 Oct 21;280(42):35704-12.
37. Fukui N, Zhu Y, Maloney WJ, Clohisy J, Sandell LJ. Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 3:59-66.
38. Howe JR, Bair JL, Sayed MG, Anderson ME, Mitros FA, Petersen GM, et al. Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nat Genet.* 2001 Jun;28(2):184-7.
39. Bobinac D, Spanjol J, Marinovic M, Zoricic Cvek S, Maric I, Cicvaric T, et al. Expression of bone morphogenetic proteins, cartilage-derived morphogenetic proteins and related receptors in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Coll Antropol.* 2008 Oct;32 Suppl 2:83-7.
40. Liu W, Sun X, Braut A, Mishina Y, Behringer RR, Mina M, et al. Distinct functions for Bmp signaling in lip and palate fusion in mice. *Development.* 2005 Mar;132(6):1453-61.
41. Rountree RB, Schoor M, Chen H, Marks ME, Harley V, Mishina Y, et al. BMP receptor signaling is required for postnatal maintenance of articular cartilage. *PLoS Biol.* 2004 Nov;2(11):e355.
42. Mototani H, Mabuchi A, Saito S, Fujioka M, Iida A, Takatori Y, et al. A functional single nucleotide polymorphism in the core promoter region of CALM1 is associated with hip osteoarthritis in Japanese. *Hum Mol Genet.* 2005 Apr 15;14(8):1009-17.
43. Abzhanov A, Kuo WP, Hartmann C, Grant BR, Grant PR, Tabin CJ. The calmodulin pathway and evolution of elongated beak morphology in Darwin's finches. *Nature.* 2006 Aug 3;442(7102):563-7.
44. Bernardo BC, Belluoccio D, Rowley L, Little CB, Hansen U, Bateman JF. Cartilage intermediate layer protein 2 (CILP-2) is expressed in articular and meniscal cartilage and down-regulated in experimental osteoarthritis. *J Biol Chem.* 2011 Oct 28;286(43):37758-67.
45. Hoornaert KP, Dewinter C, Vereecke I, Beemer FA, Courtens W, Fryer A, et al. The phenotypic spectrum in patients with arginine to cysteine mutations in the COL2A1 gene. *J Med Genet.* 2006 May;43(5):406-13.

46. Ala-Kokko L, Baldwin CT, Moskowitz RW, Prockop DJ. Single base mutation in the type II procollagen gene (COL2A1) as a cause of primary osteoarthritis associated with a mild chondrodysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Sep;87(17):6565-8.
47. Li SW, Prockop DJ, Helminen H, Fassler R, Lapvetelainen T, Kiraly K, et al. Transgenic mice with targeted inactivation of the Col2 alpha 1 gene for collagen II develop a skeleton with membranous and periosteal bone but no endochondral bone. *Genes Dev*. 1995 Nov 15;9(22):2821-30.
48. Loughlin J, Mustafa Z, Dowling B, Southam L, Marcelline L, Raina SS, et al. Finer linkage mapping of a primary hip osteoarthritis susceptibility locus on chromosome 6. *Eur J Hum Genet*. 2002 Sep;10(9):562-8.
49. Nakata K, Ono K, Miyazaki J, Olsen BR, Muragaki Y, Adachi E, et al. Osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia in transgenic mice expressing alpha 1(I) collagen chains with a central deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Apr 1;90(7):2870-4.
50. Thomas JT, Cresswell CJ, Rash B, Hoyland J, Freemont AJ, Grant ME, et al. The human collagen X gene: complete primary sequence and re-expression in osteoarthritis. *Biochem Soc Trans*. 1991 Nov;19(4):804-8.
51. Ho MS, Tsang KY, Lo RL, Susic M, Makitie O, Chan TW, et al. COL10A1 nonsense and frame-shift mutations have a gain-of-function effect on the growth plate in human and mouse metaphyseal chondrodysplasia type Schmid. *Hum Mol Genet*. 2007 May 15;16(10):1201-15.
52. Richards AJ, McNinch A, Martin H, Oakhill K, Rai H, Waller S, et al. Stickler syndrome and the vitreous phenotype: mutations in COL2A1 and COL11A1. *Hum Mutat*. 2010 Jun;31(6):E1461-71.
53. Seegmiller R, Fraser FC, Sheldon H. A new chondrodystrophic mutant in mice. Electron microscopy of normal and abnormal chondrogenesis. *J Cell Biol*. 1971 Mar;48(3):580-93.
54. Briggs MD, Mortier GR, Cole WG, King LM, Golik SS, Bonaventure J, et al. Diverse mutations in the gene for cartilage oligomeric matrix protein in the pseudoachondroplasia-multiple epiphyseal dysplasia disease spectrum. *Am J Hum Genet*. 1998 Feb;62(2):311-9.
55. Svensson L, Aszodi A, Heinegard D, Hunziker EB, Reinholt FP, Fassler R, et al. Cartilage oligomeric matrix protein-deficient mice have normal skeletal development. *Mol Cell Biol*. 2002 Jun;22(12):4366-71.
56. Wu Q, Zhu M, Rosier RN, Zuscik MJ, O'Keefe RJ, Chen D. Beta-catenin, cartilage, and osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Mar;1192:344-50.
57. Jeon J, Oh H, Lee G, Ryu JH, Rhee J, Kim JH, et al. Cytokine-like 1 knock-out mice (Cyt11^{-/-}) show normal cartilage and bone development but exhibit augmented osteoarthritic cartilage destruction. *J Biol Chem*. 2011 Aug 5;286(31):27206-13.
58. Weng LH, Wang CJ, Ko JY, Sun YC, Su YS, Wang FS. Inflammation induction of Dickkopf-1 mediates chondrocyte apoptosis in osteoarthritic joint. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 Jul;17(7):933-43.

59. Chan TF, Couchourel D, Abed E, Delalandre A, Duval N, Lajeunesse D. Elevated Dickkopf-2 levels contribute to the abnormal phenotype of human osteoarthritic osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2011 Jul;26(7):1399-410.
60. Mukhopadhyay M, Shtrom S, Rodriguez-Esteban C, Chen L, Tsukui T, Gomer L, et al. Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell.* 2001 Sep;1(3):423-34.
61. 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.
62. Lee SL, Sadovsky Y, Swirnoff AH, Polish JA, Goda P, Gavrulina G, et al. Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science.* 1996 Aug 30;273(5279):1219-21.
63. Lee K, Jessop H, Suswillo R, Zaman G, Lanyon L. Endocrinology: bone adaptation requires oestrogen receptor-alpha. *Nature.* 2003 Jul 24;424(6947):389.
64. Orfanidou T, Iliopoulos D, Malizos KN, Tsezou A. Involvement of SOX-9 and FGF-23 in RUNX-2 regulation in osteoarthritic chondrocytes. *J Cell Mol Med.* 2009 Sep;13(9B):3186-94.
65. Montero A, Okada Y, Tomita M, Ito M, Tsurukami H, Nakamura T, et al. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J Clin Invest.* 2000 Apr;105(8):1085-93.
66. Yan D, Chen D, Cool SM, van Wijnen AJ, Mikecz K, Murphy G, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 is principally responsible for fibroblast growth factor 2-induced catabolic activities in human articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(4):R130.
67. Zhou YX, Xu X, Chen L, Li C, Brodie SG, Deng CX. A Pro250Arg substitution in mouse Fgfr1 causes increased expression of Cbfa1 and premature fusion of calvarial sutures. *Hum Mol Genet.* 2000 Aug 12;9(13):2001-8.
68. Loughlin J, Dowling B, Chapman K, Marcelline L, Mustafa Z, Southam L, et al. Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 29;101(26):9757-62.
69. Lories RJ, Peeters J, Bakker A, Tylzanowski P, Derese I, Schrooten J, et al. Articular cartilage and biomechanical properties of the long bones in Frzb-knockout mice. *Arthritis Rheum.* 2007 Dec;56(12):4095-103.
70. 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.
71. Storm EE, Kingsley DM. Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development.* 1996 Dec;122(12):3969-79.
72. Liu FL, Lin LH, Sytwu HK, Chang DM. GDF-5 is suppressed by IL-1beta and enhances TGF-beta3-mediated chondrogenic differentiation in human rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Exp Mol Pathol.* 2010 Feb;88(1):163-70.
73. Pfander D, Cramer T, Swoboda B. Hypoxia and HIF-1alpha in osteoarthritis. *Int Orthop.* 2005 Feb;29(1):6-9.

74. Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest.* 2007 Jun;117(6):1616-26.
75. Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, et al. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2alpha during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med.* 2010 Jun;16(6):678-86.
76. Tesche F, Miosge N. Perlecan in late stages of osteoarthritis of the human knee joint. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004 Nov;12(11):852-62.
77. Rodgers KD, Sasaki T, Aszodi A, Jacenko O. Reduced perlecan in mice results in chondrodysplasia resembling Schwartz-Jampel syndrome. *Hum Mol Genet.* 2007 Mar 1;16(5):515-28.
78. Meulenbelt I, Bijkerk C, Miedema HS, Breedveld FC, Hofman A, Valkenburg HA, et al. A genetic association study of the IGF-1 gene and radiological osteoarthritis in a population-based cohort study (the Rotterdam Study). *Ann Rheum Dis.* 1998 Jun;57(6):371-4.
79. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell.* 1993 Oct 8;75(1):59-72.
80. Tchetina EV, Squires G, Poole AR. Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions. *J Rheumatol.* 2005 May;32(5):876-86.
81. 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.
82. Meulenbelt I, Seymour AB, Nieuwland M, Huizinga TW, van Duijn CM, Slagboom PE. Association of the interleukin-1 gene cluster with radiographic signs of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum.* 2004 Apr;50(4):1179-86.
83. Ohmura K, Johnsen A, Ortiz-Lopez A, Desany P, Roy M, Besse W, et al. Variation in IL-1beta gene expression is a major determinant of genetic differences in arthritis aggressivity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 30;102(35):12489-94.
84. Mutabaruka MS, Aoulad Aissa M, Delalandre A, Lavigne M, Lajeunesse D. Local leptin production in osteoarthritis subchondral osteoblasts may be responsible for their abnormal phenotypic expression. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(1):R20.
85. 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.
86. Smith AJ, Gidley J, Sandy JR, Perry MJ, Elson CJ, Kirwan JR, et al. Haplotypes of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene: are they a risk factor in osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage.* 2005 Jul;13(7):608-13.
87. Yadav VK, Ryu JH, Suda N, Tanaka KF, Gingrich JA, Schutz G, et al. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell.* 2008 Nov 28;135(5):825-37.

88. Papathanasiou I, Malizos KN, Tsezou A. Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) expression in human osteoarthritic chondrocytes. *J Orthop Res.* 2010 Mar;28(3):348-53.
89. Stefansson SE, Jonsson H, Ingvarsson T, Manolescu I, Jonsson HH, Olafsdottir G, et al. Genomewide scan for hand osteoarthritis: a novel mutation in matrilin-3. *Am J Hum Genet.* 2003 Jun;72(6):1448-59.
90. Ko Y, Kobbe B, Nicolae C, Miosge N, Paulsson M, Wagener R, et al. Matrilin-3 is dispensable for mouse skeletal growth and development. *Mol Cell Biol.* 2004 Feb;24(4):1691-9.
91. Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest.* 1996 May 1;97(9):2011-9.
92. Inada M, Wang Y, Byrne MH, Rahman MU, Miyaura C, Lopez-Otin C, et al. Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Dec 7;101(49):17192-7.
93. Wang J, Gardner BM, Lu Q, Rodova M, Woodbury BG, Yost JG, et al. Transcription factor Nfat1 deficiency causes osteoarthritis through dysfunction of adult articular chondrocytes. *J Pathol.* 2009 Oct;219(2):163-72.
94. DiBattista JA, Martel-Pelletier J, Cloutier JM, Pelletier JP. Modulation of glucocorticoid receptor expression in human articular chondrocytes by cAMP and prostaglandins. *J Rheumatol Suppl.* 1991 Feb;27:102-5.
95. Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, et al. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell.* 1998 May 15;93(4):531-41.
96. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998 May 1;12(9):1260-8.
97. 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.
98. 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.
99. Valdes AM, Loughlin J, Timms KM, van Meurs JJ, Southam L, Wilson SG, et al. Genome-wide association scan identifies a prostaglandin-endoperoxide synthase 2 variant involved in risk of knee osteoarthritis. *Am J Hum Genet.* 2008 Jun;82(6):1231-40.
100. Zhang X, Schwarz EM, Young DA, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest.* 2002 Jun;109(11):1405-15.
101. Okano K, Tsukazaki T, Ohtsuru A, Osaki M, Yonekura A, Iwasaki K, et al. Expression of parathyroid hormone-related peptide in human osteoarthritis. *J Orthop Res.* 1997 Mar;15(2):175-80.

102. 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.
103. 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.
104. 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.
105. 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.
106. 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.
107. Yamada Y, Okuizumi H, Miyauchi A, Takagi Y, Ikeda K, Harada A. Association of transforming growth factor beta1 genotype with spinal osteophytosis in Japanese women. *Arthritis Rheum*. 2000 Feb;43(2):452-60.
108. Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, et al. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med*. 2009 Jul;15(7):757-65.
109. Scharstuhl A, Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Inhibition of endogenous TGF-beta during experimental osteoarthritis prevents osteophyte formation and impairs cartilage repair. *J Immunol*. 2002 Jul 1;169(1):507-14.
110. Rollin R, Alvarez-Lafuente R, Marco F, Garcia-Asenjo JA, Jover JA, Rodriguez L, et al. Abnormal transforming growth factor-beta expression in mesenchymal stem cells from patients with osteoarthritis. *J Rheumatol*. 2008 May;35(5):904-6.
111. Wurdak H, Ittner LM, Lang KS, Leveen P, Suter U, Fischer JA, et al. Inactivation of TGFbeta signaling in neural crest stem cells leads to multiple defects reminiscent of DiGeorge syndrome. *Genes Dev*. 2005 Mar 1;19(5):530-5.
112. 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.
113. Vinasco J, Beraun Y, Nieto A, Fraile A, Mataran L, Pareja E, et al. Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*. 1997 Jan;49(1):74-8.
114. Guo R, Yamashita M, Zhang Q, Zhou Q, Chen D, Reynolds DG, et al. Ubiquitin ligase *Smurf1* mediates tumor necrosis factor-induced systemic bone loss by promoting proteasomal degradation of bone morphogenetic signaling proteins. *J Biol Chem*. 2008 Aug 22;283(34):23084-92.

115. Gedeon AK, Tiller GE, Le Merrer M, Heuertz S, Tranebjaerg L, Chitayat D, et al. The molecular basis of X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda. *Am J Hum Genet.* 2001 Jun;68(6):1386-97.
116. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, Odding E, Duijn CM, Hofman A, et al. Vitamin D receptor genotype is associated with radiographic osteoarthritis at the knee. *J Clin Invest.* 1997 Jul 15;100(2):259-63.
117. Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y, et al. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet.* 1997 Aug;16(4):391-6.
118. Pfander D, Kortje D, Zimmermann R, Weseloh G, Kirsch T, Gesslein M, et al. Vascular endothelial growth factor in articular cartilage of healthy and osteoarthritic human knee joints. *Ann Rheum Dis.* 2001 Nov;60(11):1070-3.
119. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med.* 1999 Jun;5(6):623-8.
120. Wang M, Shen J, Jin H, Im HJ, Sandy J, Chen D. Recent progress in understanding molecular mechanisms of cartilage degeneration during osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Dec;1240:61-9.
121. Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone.* 1999 Sep;25(3):255-9.
122. Corpas E, Harman SM, Blackman MR. Human growth hormone and human aging. *Endocr Rev.* 1993 Feb;14(1):20-39.
123. Lorenz H, Wenz W, Ivancic M, Steck E, Richter W. Early and stable upregulation of collagen type II, collagen type I and YKL40 expression levels in cartilage during early experimental osteoarthritis occurs independent of joint location and histological grading. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(1):R156-65.
124. Duval E, Bigot N, Hervieu M, Kou I, Leclercq S, Galera P, et al. Asporin expression is highly regulated in human chondrocytes. *Mol Med.* 2011;17(7-8):816-23.
125. 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.
126. Roman-Blas JA, Jimenez SA. NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006 Sep;14(9):839-48.
127. Thyss R, Virolle V, Imbert V, Peyron JF, Aberdam D, Virolle T. NF-kappaB/Egr-1/Gadd45 are sequentially activated upon UVB irradiation to mediate epidermal cell death. *EMBO J.* 2005 Jan 12;24(1):128-37.
128. Sitcheran R, Cogswell PC, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB mediates inhibition of mesenchymal cell differentiation through a posttranscriptional gene silencing mechanism. *Genes Dev.* 2003 Oct 1;17(19):2368-73.

129. Yang S, Kim J, Ryu JH, Oh H, Chun CH, Kim BJ, et al. Hypoxia-inducible factor-2alpha is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction. *Nat Med*. 2010 Jun;16(6):687-93.
130. 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.
131. Marcu KB, Otero M, Olivotto E, Borzi RM, Goldring MB. NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA. *Curr Drug Targets*. 2010 May;11(5):599-613.
132. de Crombrughe B, Lefebvre V, Behringer RR, Bi W, Murakami S, Huang W. Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol*. 2000 Sep;19(5):389-94.
133. Furumatsu T, Tsuda M, Taniguchi N, Tajima Y, Asahara H. Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment. *J Biol Chem*. 2005 Mar 4;280(9):8343-50.
134. 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.
135. Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, et al. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev*. 2004 May 1;18(9):1072-87.
136. Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, et al. Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum*. 2006 Aug;54(8):2462-70.
137. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem*. 2006 Dec 1;99(5):1233-9.
138. Tamamura Y, Otani T, Kanatani N, Koyama E, Kitagaki J, Komori T, et al. Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J Biol Chem*. 2005 May 13;280(19):19185-95.
139. Lee SH, Che X, Jeong JH, Choi JY, Lee YJ, Lee YH, et al. Runx2 Protein Stabilizes Hypoxia-inducible Factor-1alpha through Competition with von Hippel-Lindau Protein (pVHL) and Stimulates Angiogenesis in Growth Plate Hypertrophic Chondrocytes. *J Biol Chem*. 2012 Apr 27;287(18):14760-71.
140. Sampson ER, Hilton MJ, Tian Y, Chen D, Schwarz EM, Mooney RA, et al. Teriparatide as a chondroregenerative therapy for injury-induced osteoarthritis. *Sci Transl Med*. 2011 Sep 21;3(101):101ra93.
141. Shimoyama A, Wada M, Ikeda F, Hata K, Matsubara T, Nifuji A, et al. Ihh/Gli2 signaling promotes osteoblast differentiation by regulating Runx2 expression and function. *Mol Biol Cell*. 2007 Jul;18(7):2411-8.
142. McCarthy TL, Centrella M. Novel links among Wnt and TGF-beta signaling and Runx2. *Mol Endocrinol*. 2010 Mar;24(3):587-97.
143. Katoh M. Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis. *Stem Cell Rev*. 2007 Jan;3(1):30-8.

144. Mancini M, Toker A. NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2009 Nov;9(11):810-20.
145. Yoo SA, Park BH, Yoon HJ, Lee JY, Song JH, Kim HA, et al. Calcineurin modulates the catabolic and anabolic activity of chondrocytes and participates in the progression of experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2007 Jul;56(7):2299-311.
146. Sonna LA, Cullivan ML, Sheldon HK, Pratt RE, Lilly CM. Effect of hypoxia on gene expression by human hepatocytes (HepG2). *Physiol Genomics*. 2003 Feb 6;12(3):195-207.
147. Matys V, Fricke E, Geffers R, Gossling E, Haubrock M, Hehl R, et al. TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic Acids Res*. 2003 Jan 1;31(1):374-8.
148. 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.
149. Stender JD, Stossi F, Funk CC, Charn TH, Barnett DH, Katzenellenbogen BS. The estrogen-regulated transcription factor PITX1 coordinates gene-specific regulation by estrogen receptor-alpha in breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2011 Oct;25(10):1699-709.
150. Gnanapragasam VJ, Robson CN, Neal DE, Leung HY. Regulation of FGF8 expression by the androgen receptor in human prostate cancer. *Oncogene*. 2002 Aug 1;21(33):5069-80.
151. 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.
152. 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.
153. Douchis JS, Goomer RS, Harwood FL, Khatod M, Coutts RD, Amiel D. Chondrogenic phenotype of perichondrium-derived chondroprogenitor cells is influenced by transforming growth factor-beta 1. *J Orthop Res*. 1997 Nov;15(6):803-7.
154. Tortora GJ, Grabowski SR. La physiologie de la formation osseuse: l'ossification. In: CEC, editor. *Principes d'anatomie et de physiologie*. Anjou 1993. p. 159-61.
155. Boskey AL, Coleman R. Aging and bone. *J Dent Res*. 2010 Dec;89(12):1333-48.
156. 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.
157. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
158. Kim DW, Lassar AB. Smad-dependent recruitment of a histone deacetylase/Sin3A complex modulates the bone morphogenetic protein-dependent transcriptional repressor activity of Nkx3.2. *Mol Cell Biol*. 2003 Dec;23(23):8704-17.

159. Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Wakabayashi M, Yoneda T. Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors. *J Biochem.* 2012 Mar;151(3):247-54.
160. Sun F, Chen Q, Yang S, Pan Q, Ma J, Wan Y, et al. Remodeling of chromatin structure within the promoter is important for bmp-2-induced fgfr3 expression. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jul;37(12):3897-911.
161. 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.
162. 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.
163. Zelzer E, Glotzer DJ, Hartmann C, Thomas D, Fukai N, Soker S, et al. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mech Dev.* 2001 Aug;106(1-2):97-106.
164. 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.
165. Zuscik MJ, Baden JF, Wu Q, Sheu TJ, Schwarz EM, Drissi H, et al. 5-azacytidine alters TGF-beta and BMP signaling and induces maturation in articular chondrocytes. *J Cell Biochem.* 2004 May 15;92(2):316-31.
166. Kouri JB, Jimenez SA, Quintero M, Chico A. Ultrastructural study of chondrocytes from fibrillated and non-fibrillated human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 1996 Jun;4(2):111-25.
167. Stokes DG, Liu G, Coimbra IB, Piera-Velazquez S, Crowl RM, Jimenez SA. Assessment of the gene expression profile of differentiated and dedifferentiated human fetal chondrocytes by microarray analysis. *Arthritis Rheum.* 2002 Feb;46(2):404-19.
168. Lotz MK, Otsuki S, Grogan SP, Sah R, Terkeltaub R, D'Lima D. Cartilage cell clusters. *Arthritis Rheum.* 2010 Aug;62(8):2206-18.
169. Picard C, Dépôt J, Wang D, Hébert-Davies J, Lavigne P, Moreau A. New method of osteoarthritis classification: using Photoshop imaging to measure cartilage autofluorescence. *Osteoarthritis and Cartilage.* (En révision).
170. Douthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJ, et al. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci.* 2004 Feb 29;117(Pt 6):889-97.
171. Mansoor A, Beals RK. Multiple exostosis: a short study of abnormalities near the growth plate. *J Pediatr Orthop B.* 2007 Sep;16(5):363-5.
172. van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg WB. Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest.* 1994 Aug;71(2):279-90.

173. van Beuningen HM, Glansbeek HL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998 Sep;6(5):306-17.
174. Lind T, Tufaro F, McCormick C, Lindahl U, Lidholt K. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate. *J Biol Chem*. 1998 Oct 9;273(41):26265-8.
175. Hecht JT, Hogue D, Strong LC, Hansen MF, Blanton SH, Wagner M. Hereditary multiple exostosis and chondrosarcoma: linkage to chromosome II and loss of heterozygosity for EXT-linked markers on chromosomes II and 8. *Am J Hum Genet*. 1995 May;56(5):1125-31.
176. Philippe C, Porter DE, Emerton ME, Wells DE, Simpson AH, Monaco AP. Mutation screening of the EXT1 and EXT2 genes in patients with hereditary multiple exostoses. *Am J Hum Genet*. 1997 Sep;61(3):520-8.
177. Busse M, Feta A, Presto J, Wilen M, Gronning M, Kjellen L, et al. Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to heparan sulfate chain elongation. *J Biol Chem*. 2007 Nov 9;282(45):32802-10.
178. Kim BT, Kitagawa H, Tamura J, Saito T, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, et al. Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode alpha 1,4- N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/ heparin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 19;98(13):7176-81.
179. Koziel L, Kunath M, Kelly OG, Vortkamp A. Ext1-dependent heparan sulfate regulates the range of Ihh signaling during endochondral ossification. *Dev Cell*. 2004 Jun;6(6):801-13.
180. Stickens D, Brown D, Evans GA. EXT genes are differentially expressed in bone and cartilage during mouse embryogenesis. *Dev Dyn*. 2000 Jul;218(3):452-64.
181. Marigo V, Roberts DJ, Lee SM, Tsukurov O, Levi T, Gastier JM, et al. Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the *Drosophila* segment polarity gene hedgehog. *Genomics*. 1995 Jul 1;28(1):44-51.
182. 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.
183. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):332-6.
184. Kraushaar DC, Rai S, Condac E, Nairn A, Zhang S, Yamaguchi Y, et al. Heparan sulfate facilitates FGF and BMP signaling to drive mesoderm differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 2012 May 3.
185. Takahashi I, Noguchi N, Nata K, Yamada S, Kaneiwa T, Mizumoto S, et al. Important role of heparan sulfate in postnatal islet growth and insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 May 22;383(1):113-8.
186. Kobayashi S, Akiyama T, Nata K, Abe M, Tajima M, Shervani NJ, et al. Identification of a receptor for reg (regenerating gene) protein, a pancreatic beta-cell regeneration factor. *J Biol Chem*. 2000 Apr 14;275(15):10723-6.

187. Acquatella-Tran Van Ba I, Marchal S, Francois F, Silhol M, Lleres C, Michel B, et al. Regenerating islet-derived 1alpha (Reg-1alpha) protein is new neuronal secreted factor that stimulates neurite outgrowth via exostosin Tumor-like 3 (EXTL3) receptor. *J Biol Chem.* 2012 Feb 10;287(7):4726-39.
188. Terazono K, Yamamoto H, Takasawa S, Shiga K, Yonemura Y, Tochino Y, et al. A novel gene activated in regenerating islets. *J Biol Chem.* 1988 Feb 15;263(5):2111-4.
189. Wang J, Koyota S, Zhou X, Ueno Y, Ma L, Kawagoe M, et al. Expression and localization of regenerating gene I in a rat liver regeneration model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Mar 13;380(3):472-7.
190. Fukuhara H, Kadowaki Y, Ose T, Monowar A, Imaoka H, Ishihara S, et al. In vivo evidence for the role of RegI in gastric regeneration: transgenic overexpression of RegI accelerates the healing of experimental gastric ulcers. *Lab Invest.* 2010 Apr;90(4):556-65.
191. Ose T, Kadowaki Y, Fukuhara H, Kazumori H, Ishihara S, Udagawa J, et al. Reg I-knockout mice reveal its role in regulation of cell growth that is required in generation and maintenance of the villous structure of small intestine. *Oncogene.* 2007 Jan 18;26(3):349-59.
192. Akiyama T, Takasawa S, Nata K, Kobayashi S, Abe M, Shervani NJ, et al. Activation of Reg gene, a gene for insulin-producing beta -cell regeneration: poly(ADP-ribose) polymerase binds Reg promoter and regulates the transcription by autopoly(ADP-ribosylation). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 2;98(1):48-53.
193. Abd Elmageed ZY, Naura AS, Errami Y, Zerfaoui M. The poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs): new roles in intracellular transport. *Cell Signal.* 2012 Jan;24(1):1-8.
194. Okamoto K, Kobayashi T, Kobata T, Hasunuma T, Kato T, Sumida T, et al. Fas-associated death domain protein is a Fas-mediated apoptosis modulator in synoviocytes. *Rheumatology (Oxford).* 2000 May;39(5):471-80.
195. Shakibaei M, John T, Seifarth C, Mobasher A. Resveratrol inhibits IL-1 beta-induced stimulation of caspase-3 and cleavage of PARP in human articular chondrocytes in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Jan;1095:554-63.
196. Qi DL, Ohhira T, Fujisaki C, Inoue T, Ohta T, Osaki M, et al. Identification of PITX1 as a TERT suppressor gene located on human chromosome 5. *Mol Cell Biol.* 2011 Apr;31(8):1624-36.
197. Alvarado DM, McCall K, Aferol H, Silva MJ, Garbow JR, Spees WM, et al. Pitx1 haploinsufficiency causes clubfoot in humans and a clubfoot-like phenotype in mice. *Hum Mol Genet.* 2011 Oct 15;20(20):3943-52.
198. Felding I, Kristoffersson U. A child with interstitial deletion of chromosome No. 5. *Hereditas.* 1980;93(2):337-9.
199. Rosenfeld JA, Drautz JM, Clericuzio CL, Cushing T, Raskin S, Martin J, et al. Deletions and duplications of developmental pathway genes in 5q31 contribute to abnormal phenotypes. *Am J Med Genet A.* 2011 Aug;155A(8):1906-16.
200. Lee S, Chae H, Park IY, Kim M, Kim Y, Shin JC, et al. Genotype-phenotype correlation of a 5q22.3 deletion associated with craniofacial and limb defects. *Gene.* 2012 Feb 15;494(1):105-8.

201. Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*. 1993 Dec 31;75(7):1401-16.
202. Lettice LA, Heaney SJ, Purdie LA, Li L, de Beer P, Oostra BA, et al. A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet*. 2003 Jul 15;12(14):1725-35.
203. 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.
204. Kitamura T, Sekimata M, Kikuchi S, Homma Y. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase 1 in ERBB2 expression in rheumatoid synovial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 Jul;289(1):C82-8.
205. Satoh K, Kikuchi S, Sekimata M, Kabuyama Y, Homma MK, Homma Y. Involvement of ErbB-2 in rheumatoid synovial cell growth. *Arthritis Rheum*. 2001 Feb;44(2):260-5.
206. Chinuki D, Amano Y, Ishihara S, Moriyama N, Ishimura N, Kazumori H, et al. REG Ialpha protein expression in Barrett's esophagus. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Feb;23(2):296-302.
207. Okamoto H. The Reg gene family and Reg proteins: with special attention to the regeneration of pancreatic beta-cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 1999;6(3):254-62.
208. Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Pelletier J. Suppression of tumor necrosis factor (TNF-alpha) gene expression by prostaglandin E(2). Role Of early growth response protein-1 (Egr-1). *Osteoarthritis Cartilage*. 1999 Jul;7(4):395-8.
209. 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.
210. Tan ML, Choong PF, Dass CR. Anti-chondrosarcoma effects of PEDF mediated via molecules important to apoptosis, cell cycling, adhesion and invasion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Aug 6;398(4):613-8.
211. Rogoff HA, Pickering MT, Frame FM, Debatis ME, Sanchez Y, Jones S, et al. Apoptosis associated with deregulated E2F activity is dependent on E2F1 and Atm/Nbs1/Chk2. *Mol Cell Biol*. 2004 Apr;24(7):2968-77.
212. Udayakumar T, Shareef MM, Diaz DA, Ahmed MM, Pollack A. The E2F1/Rb and p53/MDM2 pathways in DNA repair and apoptosis: understanding the crosstalk to develop novel strategies for prostate cancer radiotherapy. *Semin Radiat Oncol*. 2010 Oct;20(4):258-66.
213. Buckland J. Osteoarthritis: blocking hedgehog signaling might have therapeutic potential in OA. *Nat Rev Rheumatol*. 2010 Feb;6(2):61.
214. Shukunami C, Shigeno C, Atsumi T, Ishizeki K, Suzuki F, Hiraki Y. Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *J Cell Biol*. 1996 Apr;133(2):457-68.
215. Lavoie J-F, Picard C, Moreau A. La prohibitine : un nouveau bio-maqueur sanguin pour le diagnostic de l'arthrose. *Médecine Sciences Amérique*. Numéro spécial MSA/Biotransfert 2011.

216. Manjeshwar S, Branam DE, Lerner MR, Brackett DJ, Jupe ER. Tumor suppression by the prohibitin gene 3'untranslated region RNA in human breast cancer. *Cancer Res.* 2003 Sep 1;63(17):5251-6.
217. Sanchez-Quiles V, Santamaria E, Segura V, Sesma L, Prieto J, Corrales FJ. Prohibitin deficiency blocks proliferation and induces apoptosis in human hepatoma cells: molecular mechanisms and functional implications. *Proteomics.* 2010 Apr;10(8):1609-20.
218. 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.
219. Picard C, Pellicelli M, Wang D, Lavigne P, Moreau A. E2F1 could contribute to late-stage osteoarthritis by upregulating *PITX1* expression levels in articular chondrocytes. (Article en préparation).
220. Ovcharenko I, Nobrega MA, Loots GG, Stubbs L. ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jul 1;32(Web Server issue):W280-6.

Annexe I

Résultats complémentaires

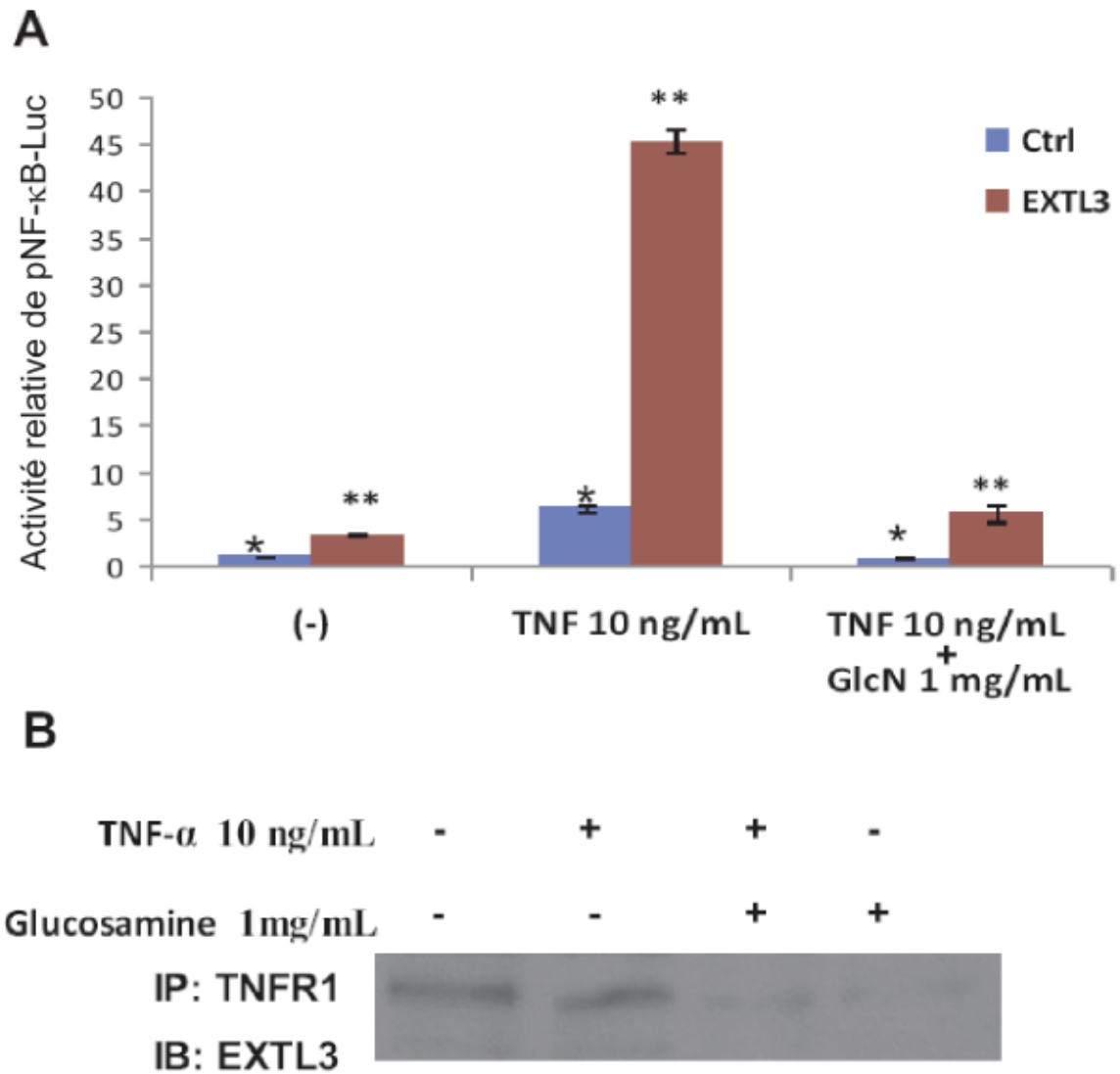


Figure 1. La glucosamine inhibe l'activation de NF- κ B par TNF- α dans les cellules C28/I2 surexprimant EXTL3.

(Légende à la page suivante)

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

Ces résultats démontrent que EXTL3 potentialise l'activité de NF- κ B induite par TNF α . L'ajout de glucosamine inhibe cet effet, en empêchant le couplage de TNFR1 et de EXTL3.

Figure adaptée du mémoire de Mamadou Samba Boiro (mémoire présenté à la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal en juillet 2010, Figure 15, page 79).

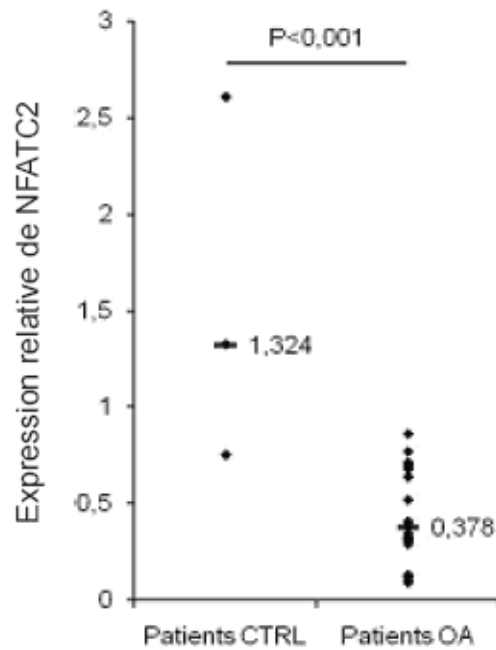


Figure 2. Expression du gène *NFATC2* dans des chondrocytes provenant de sujets sains et de patients OA.

Des analyses de PCR en temps réel ont été réalisées à partir d'ARN extrait de chondrocytes en culture. Les chondrocytes utilisés provenaient de genoux de deux groupes de patients: quatre patients contrôles (deux femmes et deux hommes) et 27 patients OA (17 femmes et 10 hommes). Les valeurs relatives ont été obtenues en utilisant la β -actine comme contrôle endogène. Les traits noirs représentent les valeurs relatives médianes. Une perte d'expression significative de *NFATC2* ($p < 0,001$) est observée lorsque les patients OA sont comparés aux patients contrôles.

Figure adaptée du mémoire de Lauriane Bernard (mémoire présenté à la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal en février 2011, Figure 25A, page 73).

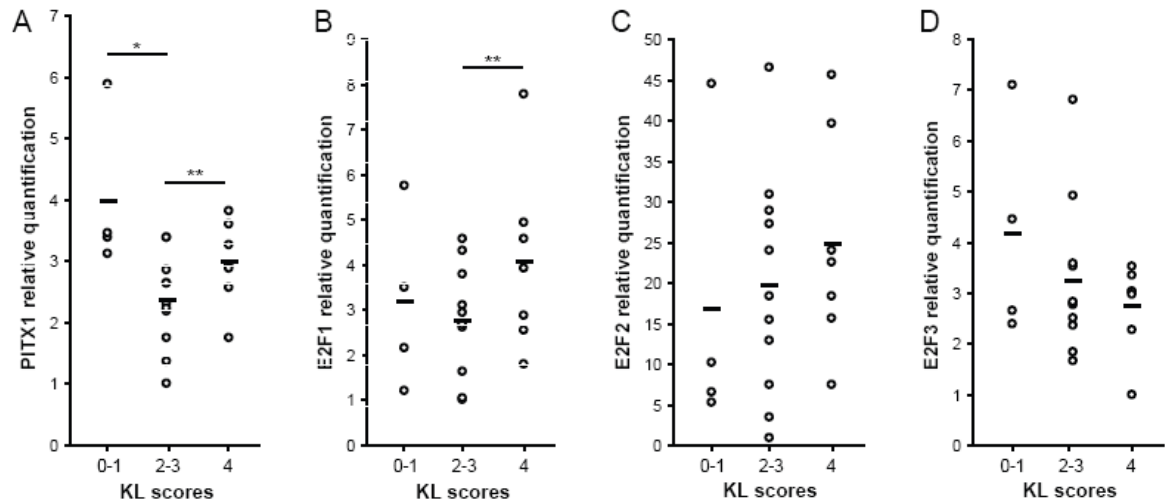


Figure 3. Gene expression levels of *PITX1*, *E2F1*, *E2F2* and *E2F3* in articular chondrocytes from patients classified according to the Kellgren-Lawrence (KL) score.

RNA was extracted from primary cultures of chondrocytes derived from knees of 4 controls and 18 OA patients. Control subjects were attributed KL scores of 0 (n=3) and 1 (n=1) while OA patients accounted for KL scores of 2 (n=6), 3 (n=5) and 4 (n=7). Patients with moderate OA (KL 2-3) were separated from patients with late-stage OA (KL 4) for statistical purposes. Real time RT-PCR was performed against **(A)** *PITX1*, **(B)** *E2F1*, **(C)** *E2F2* and **(D)** *E2F3* genes. **A**, A significant downregulation of *PITX1* was observed when moderate OA patients were compared to control subjects. Late-stage OA was characterized by an upregulation of *PITX1* compared to moderate OA. **B**, No significant downregulation of *E2F1* was observed when moderate OA patients were compared to controls. Upregulation of *E2F1* was noted when late-stage OA were compared to moderate OA patients. No significant changes in gene expression levels for **C**, *E2F2* or **D**, *E2F3* were noted between any represented groups of patients. **(A-D)** Y-axis: relative expression (fold changes) in comparison with the lowest score being set to 1. Short bars: mean values. Long bars: Student's t-test (*p<0.01, **p<0.1).

Figure provenant de l'article en préparation Picard, 2012 (219).

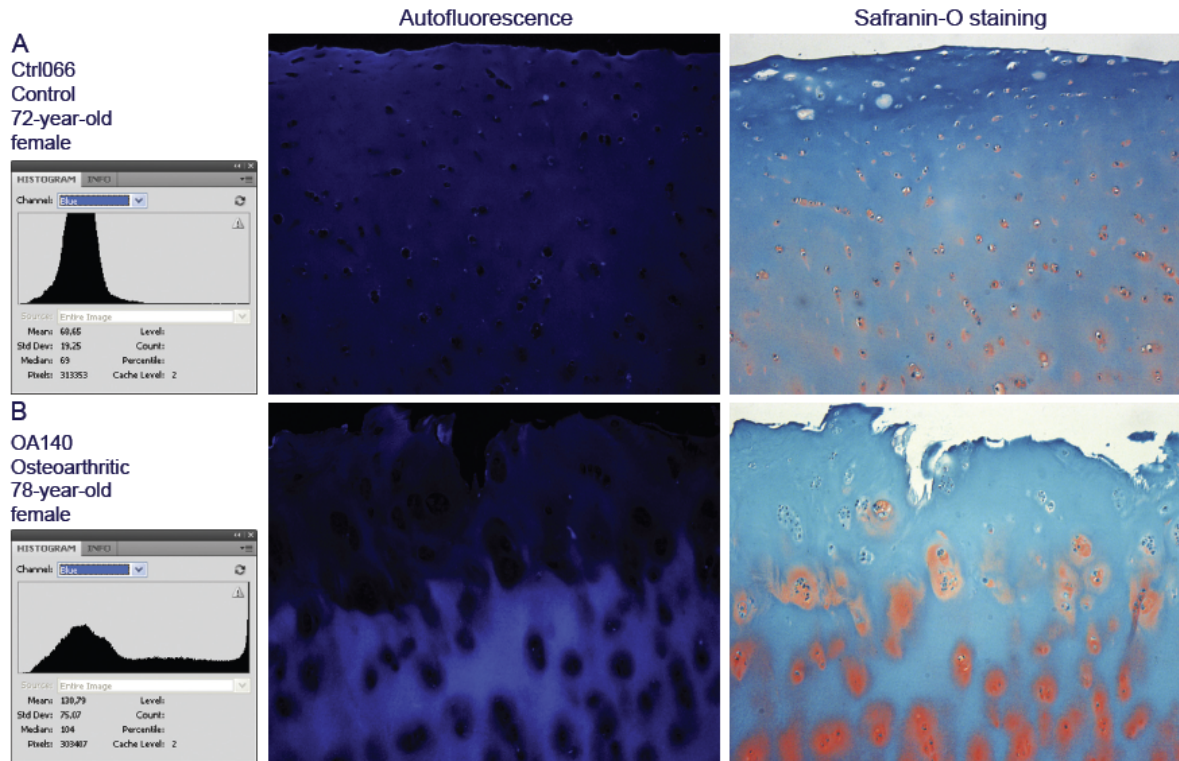


Figure 4. Comparison of Photoshop fluorescence measurement technique and safranin-O staining.

Adjacent cartilage sections from **A**, 72-year-old control subject, and **B**, 78-year-old patient with osteoarthritis, were photographed without staining (middle panels) and after standard safranin-O staining (right panels). Histograms of fluorescence corresponding to the unstained photographs were obtained using Photoshop (left-most panels). Note the difference in histogram curves corresponding to a homogeneous distribution of blue in **A** and a heterogeneous distribution of blue indicative of osteoarthritis in **B**. All four images were taken at 100X magnification. On the safranin-O stained slides, the collagen matrix appears turquoise while nuclei are dark blue. Proteoglycans are stained red. Seemingly low proteoglycan content on the safranin-O images are observed for both patients.

Figure provenant de l'article en révision Picard, 2012 (169).

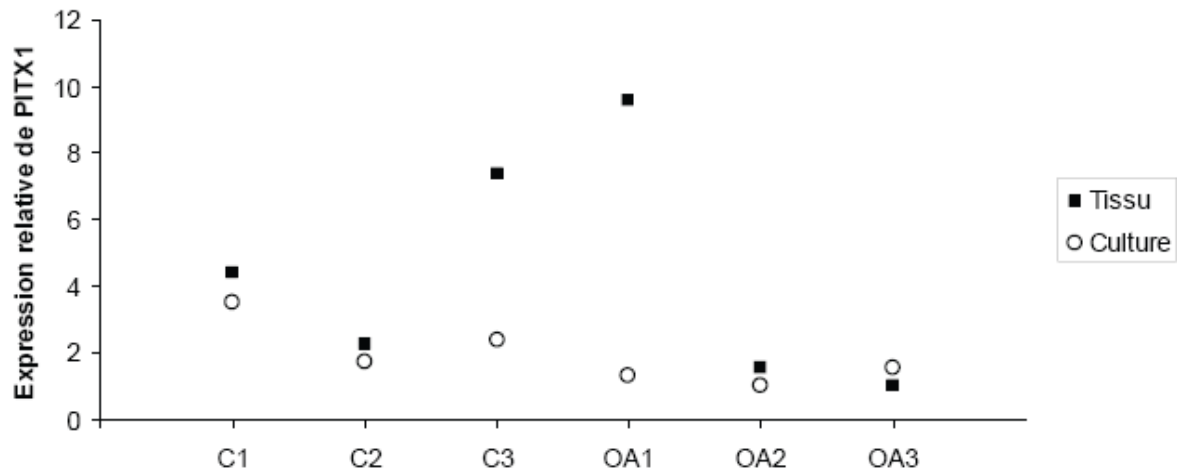


Figure 5. Comparaison des niveaux d'expression de *PITX1* à partir d'ARN extrait directement de tissu cartilagineux ou de chondrocytes mis en culture.

Une partie des échantillons de cartilage articulaire sain (C1-C3) et de cartilage OA (OA1-OA3) a été finement coupée et broyée dans de l'azote liquide. L'ARN a été extrait du tissu à l'aide de TRIzol. Les échantillons restant ont été digérés avec de la trypsine, filtrés, mis en culture dans des pétris et cultivés jusqu'à atteindre une confluence d'environ 80%. L'ARN a été extrait des cellules à l'aide de TRIzol. Par la suite, des expériences de RT-PCR en temps réel ont permis de quantifier les niveaux relatifs de *PITX1*, normalisés avec la β -actine. Sauf pour le patient OA3, la mise en culture provoque une diminution de l'expression relative de *PITX1*.

Figure originale provenant de mes résultats non publiés et non soumis.

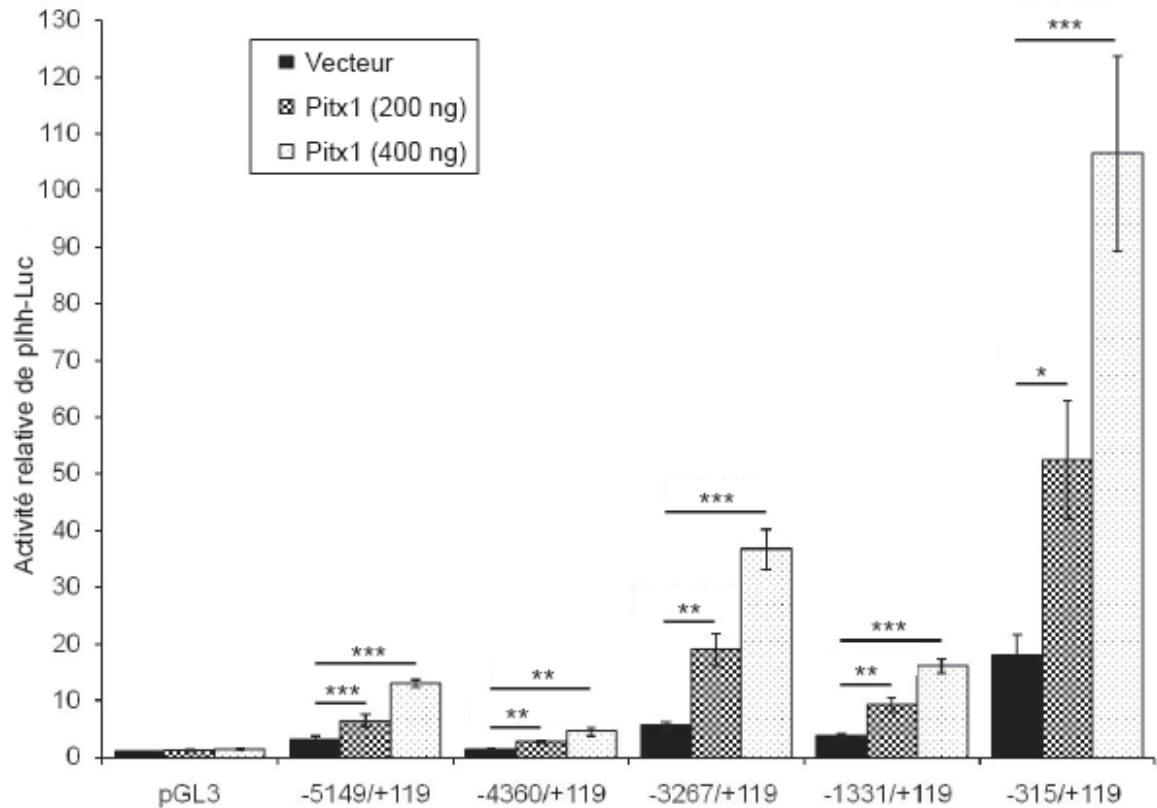


Figure 6. Effets de la surexpression de PITX1 sur l'activité de différentes régions promotrices du gène *Ihh*.

La lignée chondrocytaire C28/I2 a été transfectée avec cinq constructions représentant différentes régions du promoteur de *Ihh* murin couplées au gène rapporteur *luciférase*. Les C28/I2 ont été co-transfectées soit avec le vecteur vide ou différentes quantités du vecteur d'expression codant pour PITX1. Toutes les expériences ont été effectuées en triplicata et les écarts-types ont été calculés et indiqués sur le graphique. L'effet de PITX1 est dose-dépendant et significatif pour toutes les constructions employées (* $p < 0,01$; ** $p < 0,005$; *** $p > 0,001$).

Figure adaptée du mémoire de Lauriane Bernard (mémoire présenté à la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal en février 2011, Figure 27, page 78).

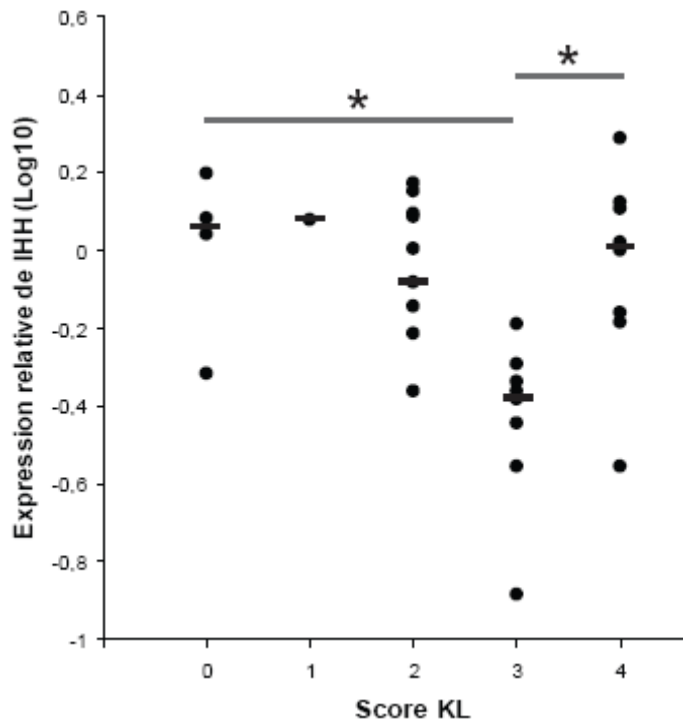


Figure 7. Expression du gène *IHH* dans des chondrocytes articulaires de patients classifiés selon le score de Kellgren-Lawrence.

Des échantillons cartilagineux provenant de genoux de 4 sujets sains et 26 patients OA ont été digérés avec de la trypsine et mis en culture jusqu'à une confluence d'environ 80%. L'ARN a été extrait des cellules à l'aide de TRIzol. Par la suite, des expériences de RT-PCR en temps réel ont permis de quantifier les niveaux relatifs de *IHH*, normalisés avec la β -actine. Les valeurs représentent le Log10 de l'expression relative de *IHH* en fonction de la classification des dommages arthrosiques selon le score de Kellgren-Lawrence. Les valeurs médianes sont représentées par un trait noir. Une perte significative de *IHH* (* $p < 0,01$) est observée entre les patients de stade 3 et les sujets sains (stade 0). Chez les patients de stade 4, les niveaux relatifs de *IHH* sont significativement plus élevés (* $p < 0,01$) que chez les patients de stade 3.

Figure adaptée du mémoire de Lauriane Bernard (mémoire présenté à la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal en février 2011, Figure 26, page 76).

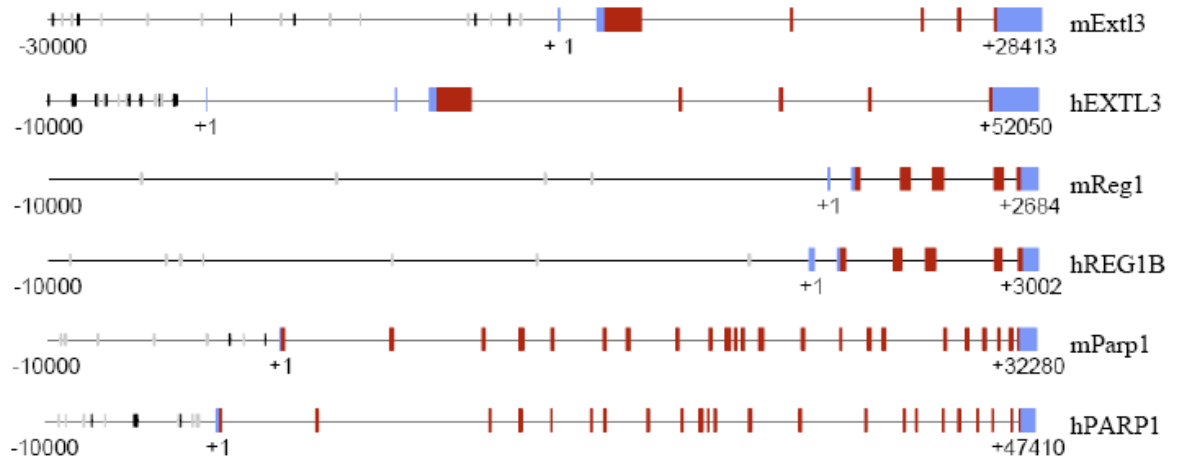


Figure 8. Analyse *in silico* des sites PITX1 sur les régions promotrices des gènes *Extl3*, *Reg1* et *Parp1* d'origine murine et humaine.

La présence d'un site consensus TAATCC, reconnu par PITX1, a été vérifiée à l'aide du logiciel "Clone Manager 9" (Édition Professionnelle). Dans le but de déterminer si ces sites étaient retrouvés dans des régions conservées durant l'évolution, l'outil "ECR Browser" a été employé (220). Les traits noirs indiquent les sites PITX1 conservés alors que les traits gris indiquent les sites PITX1 non conservés. Les boîtes bleues représentent les exons non codant et les boîtes rouges, les exons codant. Les positions sont numérotées selon la référence +1 représentant le site d'initiation de la transcription.

Figure originale provenant de mes résultats non publiés et non soumis.

Annexe II

Préface

Le manuscrit présenté ici, qui est présentement en révision pour le *Journal of Experimental Medicine*, est le fruit de nombreuses années de travail et d'une collaboration active avec le Dr Martin Pellicelli. L'objectif était d'étudier les mécanismes de régulation de *PITX1*, surtout en lien avec sa perte d'expression dans le cartilage arthrosique. Mes analyses de polymorphismes dans la région régulatrice de *PITX1* (Table S-I) ont confirmé qu'aucune mutation n'était responsable de cette perte d'expression. Mes expériences de capture de protéines liées sur une sonde d'ADN (Table S-II) ont permis d'identifier la prohibetine (PHB1) sur une région distale du promoteur de *PITX1*. Des sondes similaires avaient été utilisées dans mes nombreuses expériences de retard sur gel (Figure S1).

Mes premières expériences d'immunohistochimie ont permis de mettre en valeur l'accumulation nucléaire de PHB1 dans les chondrocytes de patients arthrosiques (Figure 3A-B). J'ai également participé aux expériences d'immunofluorescence et de fractionnement cellulaire suivi d'immunobuvardage de type Western, appuyant les résultats d'immunohistochimie (Figure 3C). J'ai contribué au clonage du promoteur de *PITX1* permettant la réalisation des expériences avec la luciférase, ces dernières ayant été effectuées par le Dr Pellicelli. L'étude de la régulation de *PITX1* par PHB1 et E2F1 a été réalisée en majorité par le Dr Pellicelli (Figures 1, 2, 4 et 5). Finalement, j'ai participé à l'écriture et à la révision du manuscrit.

Dre Maryam Taheri, ancienne chef d'équipe pour le projet arthrose, a réalisé quelques expériences de siRNA contre *PHB1* et a aidé à la culture des chondrocytes articulaires. Dr Jean-François Lavoie, post-doctorant, a procédé aux expériences d'immunohistochimie sur les genoux de souris STR/ort (Figure 6A-B). Roxanne Doucet, ancienne étudiante à la maîtrise, est responsable des images d'immunofluorescence présentées aux figures 3D et S2. La dissection et la digestion des échantillons cartilagineux ont été réalisées par le Dr DaShen Wang. Lauriane Bernard, ancienne étudiante à la

maîtrise, a utilisé l'ARN des souris STR/ort pour les expériences de PCR à la figure 6C. Finalement, le Dr Patrick Lavigne a fourni des échantillons de cartilage sain et arthrosique.

En lisant ce manuscrit, vous verrez que *PITX1* est activé de façon directe et positive par E2F1 et que cet effet est atténué par la présence nucléaire de PHB1. La fonction de co-répresseur attribuée à PHB1 est accomplie via la région promotrice distale du gène *PITX1*. Il n'est pas exclu que la présence nucléaire de PHB1 puisse affecter l'expression d'autres gènes normalement régulés par E2F1. Les niveaux protéiques constants de PHB1 suggèrent qu'une déplétion mitochondriale soit nécessaire pour obtenir une accumulation nucléaire accrue. De façon importante, l'utilisation des souris STR/ort nous a révélé que l'accumulation nucléaire de PHB1 et la perte d'expression de *PITX1* dans les chondrocytes murins survenaient dès l'apparition des premiers symptômes de la maladie.

Nuclear accumulation of PHB1 in articular chondrocytes contributes to osteoarthritis pathogenesis

Martin Pellicelli^{1,2,*}, Cynthia Picard^{1,2,*}, Maryam Taheri¹, Jean-Francois Lavoie^{1,2}, Roxanne Doucet¹, DaShen Wang¹, Lauriane Bernard¹, Patrick Lavigne^{3,4}, and Alain Moreau^{1,2,5,**}

¹Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases, Sainte-Justine University Hospital Research Center, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5

²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1J4

³Department of Surgery, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1J4

⁴Orthopedic Division, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, Canada, H1T 4B3

⁵Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1J4

* These authors contributed equally to this work.

****Correspondence:** Alain Moreau, PhD, Sainte-Justine University Hospital Research Center, Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases

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

Running head title: NUCLEAR ACCUMULATION OF PHB1 CONTRIBUTES TO OA

Abstract

Osteoarthritis (OA) is one of the most common age-related chronic disorders. We have previously demonstrated a loss of *PITX1* transcription factor in OA cartilage. To decipher the molecular mechanisms downregulating *PITX1* expression in primary OA, functional *in vitro* analyses were performed and led to the identification of prohibitin (PHB1) bound to a distal E2F-like site within the human *PITX1* promoter. PHB1 is normally localized in the mitochondria where it helps maintain mitochondrial function. In the nucleus, it plays a transient role in the transcriptional regulation of various genes. The involvement of PHB1 in OA pathogenesis is supported by its aberrant nuclear accumulation in articular chondrocytes and the fact that PHB1 overexpression in normal cells was sufficient to inhibit endogenous *PITX1* expression at the mRNA and protein levels. Conversely, siRNA knockdown of PHB1 in OA articular chondrocytes resulted in upregulation of *PITX1* expression. Our data defined a crucial role for PHB1 in primary OA pathogenesis and a novel transcriptional mechanism for switching *PITX1* off. *PITX1* levels and PHB1 nuclear localization may be helpful for OA diagnosis.

Keywords: Chondrocytes/Nuclear accumulation/Osteoarthritis/Pitx1/Prohibitin

Introduction

Osteoarthritis (OA) is a major and much neglected cause of disability in the elderly, with considerable long-term impact on our aging population. OA progresses slowly in humans, making time-limited studies difficult. Further, the heterogeneous nature of the disease has engendered controversy regarding etiology and molecular mechanisms responsible for OA progression. The multifactorial nature of primary OA is well recognized, and genetic factors have now been found to be strong determinants of OA (Jordan et al, 2004; Loughlin, 2001; Mertens et al, 1996; Peach et al, 2005; Spector & MacGregor, 2004; Yao et al, 2003). Epidemiological studies show family clustering, and sources such as twin studies and exploration of rare genetic disorders have highlighted potential differences in the degree of OA heritability, depending upon gender and affected joint (hand versus knee) (Jones et al, 2004; Loughlin, 2003). This diversity suggests a high level of heterogeneity in the nature of the encoded susceptibility genes, as reflected by the increasing number of loci and candidate genes identified in OA linkage and genome-wide association studies, including discrepancies found between studies (Loughlin, 2001). The functional importance of each of the susceptibility genes has yet to be determined, illustrating our incomplete knowledge of the biology and genetics of OA.

Multiple genetic defects in conserved biological pathways can impact on the development of the joint and other skeletal elements, as well as on the structural and functional integrity of cartilaginous structures. In turn, long-term environmental pressures exert dynamic forces on the musculoskeletal and immunological system, the phenotype of which determines the type and extent of interaction; culminating in pain and inflammation for those suffering from OA. To intervene effectively at the preventive and therapeutic levels, it is therefore important to identify and target relevant pathways. One gene that has surfaced as regards primary knee OA is the one encoding paired-like homeodomain 1 (PITX1), a homeobox transcription factor (Picard et al, 2007). Though born normal, heterozygous mice carrying one mutated *Pitx1* allele (*Pitx1*^{+/-}) ultimately progress to degenerative changes resembling those seen in human OA (Picard et al, 2007). Homozygous *Pitx1*^{-/-} fetuses die shortly after birth due to severe skeletal malformations.

Pitx1 is crucial to the development and growth of the long bones of the hind legs (Lanctot et al, 1997). Clinically, we have reported that *PITX1* expression was lower than normal in patients with primary knee joint OA (Picard et al, 2007), though regulation of the gene is unclear at this time.

Expression analyses using microarrays have found that E2F transcription factors E2F1, E2F2 and E2F3 upregulated *PITX1* expression by several-fold in the human osteoblastic cell line U2OS (Muller et al, 2001; Young et al, 2003). Inactivation of E2F targets was shown to be partly mediated by the prohibitin (PHB) family of proteins but the direct role of E2Fs and PHBs has never been ascertained as concerns OA development and progression.

While PHBs are highly conserved in eukaryotic cells (Mishra et al, 2006; Mishra et al, 2005), the function of PHB1 *in vivo* is unclear. PHB1 protects cells from apoptosis caused by cholesterol insufficiency, oxidative stress or inflammation. In mitochondria, where PHB1 is principally located, PHB1 helps maintain mitochondrial function (Artal-Sanz & Tavernarakis, 2009a; Nijtmans et al, 2002; Osman et al, 2009). In the nucleus, it helps regulate transcription of a number of genes, by interacting with proteins such as E2F, retinoblastoma-associated protein (pRb), actin-dependent regulator of chromatin SMARCA4 and SMARCA2, ring finger protein 2 (RNF2) and p53 (Choi et al, 2008; Fusaro et al, 2003; Wang et al, 2002a; Wang et al, 1999; Wang et al, 2002b). PHB1 is implicated in cellular aging, binding with certain co-repressors at the highly conserved marked box region of E2F1 to inhibit E2F1 target genes (Choi et al, 2008; Rastogi et al, 2006a; Wang et al, 2002a; Wang et al, 1999). This repression occurs either independently or concomitantly with the recruitment of pRb (Choi et al, 2008).

In this study, we present a novel transcriptional mechanism for the repression of *PITX1* expression as observed in human primary OA cartilage. This repression occurred in two-thirds of the patients with primary knee joint OA that we tested. Nuclear accumulation of PHB1 was observed in most OA articular chondrocytes while it remained mainly mitochondrial in control cells. This molecular mechanism may help to better stratify OA

patients, with practical implications for diagnosis, prevention, and treatment, and to better define OA pathogenesis in terms of mitochondrial dysfunction and cellular aging.

Material and Methods

Human tissue, human cell lines, and cell culture

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, according to criteria established by the American College of Rheumatology Diagnostic Subcommittee. For comparison (control group), normal cartilage samples were obtained from individuals with trauma. Human tissues were collected with the written consent of patients and the study protocol was approved by the institutional Research Ethics Boards of Sainte-Justine University Hospital and Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Canada.

For primary chondrocyte extraction and culture, human OA and normal cartilage samples were sectioned, rinsed and finely minced. After digestion with 0.25% trypsin for 1 hour at 37°C, they were 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) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (HyClone, Thermo Scientific) and 1% penicillin and streptomycin.

The C28/I2 cell line was provided by Dr. Mary Goldring (Hospital for Special Surgery, New York, NY, USA) and cultured as previously described (Finger et al, 2003). To generate stable C28/I2 cells overexpressing either PHB1 or E2F1, retroviral infection was performed using Phoenix cells generously donated by Dr. Gerardo Ferbeyre, University of Montreal, as previously described (Serrano et al, 1997).

STR/ort mice

STR/ort breeder pairs were graciously provided by Dr. R.M. Mason (William Harvey Research Institute, St. Bartholomew's and The Royal London School of Medicine and Dentistry, London, UK) to establish a colony in our own animal facility. All procedures were carried out according to protocols approved by the Sainte-Justine University Hospital Research Center Animal Care Committee.

Antibodies and reagents

All reagents, unless otherwise specified such as TRIzol Reagent (Invitrogen) or specific stains, were obtained from Sigma-Aldrich and BioShop; oligonucleotides from BioCorp. For Western blots, we purchased antibodies against the following: F1-ATPase (R-20: sc-16689, dilution 1:500), GAPDH (V-18: sc-20357, dilution 1:5000) and PHB1 (H-80: sc-28259, 1:500) from Santa Cruz Biotechnology; PITX1 (ab70273; 1:5000) from Abcam; lamin A/C (#2032; 1:2000) from Cell Signaling Technology; FLAG (Sigma M2 F3165; 1:5000) and α -TUBULIN (Sigma T6074, clone B-5-1-2; 1:10000) from Sigma-Aldrich. For immunohistochemistry, we used anti-PHB1 (Ab-2, 1:100; Lab Vision), anti-Phb1 (A01195, 1:100; GenScript), and anti-Pitx1 (N-15: sc-18922, 1:200; Santa Cruz). For immunofluorescence, we used antibodies against PHB1 (Ab-1; 1:50) and TOM20 (FL-145: sc-11415; 1:50) from Lab Vision and Santa Cruz Biotechnologies, respectively. For chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays, we used 5 μ g of antibodies against PHB1 (N-20: sc-18196) and E2F1 (KH95: sc-251) from Santa Cruz Biotechnologies. For EMSA, we used 4 μ g of the following antibodies: anti-E2F1 (KH95: sc-251x), anti-E2F3 (C-18: sc-878x), anti-E2F4 (A-20: sc-1082x), anti-E2F5 (C-20: sc-1083x), anti-E2F6 (K-20: sc-8179x) and anti TFDP1 (DP1 (K-20): sc-610x) all from Santa Cruz Biotechnologies.

Immunohistochemistry

Cartilage sections from human tissue or STR/ort mice were embedded in paraffin and 5- μ m slices fixed onto microscope slides. For immunohistochemical analysis, these

histological sections were rehydrated and heated at 80°C for 15 minutes in 0.01M citrate buffer, rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) and put into 0.3% Triton-PBS solution for 30 minutes. Tissue sections were soaked in a solution containing 2% hydrogen peroxide in methanol for 30 minutes to inactivate endogenous peroxidase. Sections were washed again, blocked for 15 minutes in PBS with 1% bovine serum albumin and incubated overnight at 4°C with primary antibodies against PHB1 or Phb1 for human or murine cartilage sections, or anti-Pitx1. Following PBS washes, tissue sections were incubated with secondary biotinylated antibody for 45 minutes. Staining was revealed using the avidin-biotin complex method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories) and the 3,3'-diaminobenzidine (DAB) detection system (Dako Diagnostics). Sections were counterstained with Harris Modified Hematoxylin (Fisher Scientific).

Immunofluorescence

Human chondrocytes from OA and non-OA (control) patients were plated on 8-well glass culture slides (BD Biosciences) with 10^4 cells per well. After an incubation period of 24 to 48 hours, cells were washed with PBS, fixed with 3.7% paraformaldehyde solution, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 minutes. Cells were then blocked in 1% bovine serum albumin in PBS for 30 minutes at room temperature and incubated with primary antibodies for 2 hours at 37°C. Secondary antibodies conjugated to Alexa fluor dyes (Invitrogen) were diluted in bovine serum albumin in PBS and applied for 1 hour at 37°C. After a PBS wash, material was mounted on slides using ProLong Gold antifade reagent and DAPI fluorescent stain (Invitrogen).

Gene knockdown using siRNA

To silence PHB1 expression, 1×10^6 cells were plated onto 6-cm plates. After 16 hours, each plate was transfected with 300 pmol of Validated Stealth RNAi siRNA (Invitrogen) and 15 μ l of Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. PHB1 siRNA specifically recognized the sequence GAUGGACGCAAACACUUUGGCAGCC. After 48 or 72 hours, cells were

lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer for protein analysis or in TRIzol Reagent (Invitrogen) for determination of mRNA levels.

RNA extraction and cDNA synthesis for PCR

Total RNA was isolated using TRIzol Reagent according to manufacturer's instructions. cDNA synthesis was performed on 1 µg of total RNA using the Tetro cDNA Synthesis Kit (Bioline) according to manufacturer's instructions. cDNA was then diluted 1:25 in water and real-time PCR performed.

Real-time PCR

Real-time PCR was performed with the Stratagene Mx3000P Real-Time PCR System (Agilent Technologies) and SsoFast EvaGreen control assay (Bio-Rad), using a 96-well plate. Each reaction was performed with 7.5 µl of EvaGgreen qPCR Supermix, 3.75 µl of 2 µM concentrated primer pairs, and 3.75 µl of diluted cDNA (final dilution 1:100) or a DNA sample (final dilution 1:4) from the ChIP assay, for a final volume of 15 µl. All primer sets originating from gene or promoter fragment detection were tested for amplification specificity, and fragment size validated on agarose gels. The sequence of each primer is given in Supplementary Table S-III.

ChIP assay

Primary chondrocytes or C28/I2 cells, as the case may be, were cultured on 10-cm plates, and fixed by adding a concentrated formaldehyde solution directly to the culture media to a final concentration of 1%. Plates were then incubated at room temperature for 15 minutes for crosslinking; the reaction was stopped by adding 1M glycine solution to a final concentration of 125 mM and incubating at room temperature for 5 minutes. After two washes with 5 ml of cold PBS, cells were scraped into 500 µl of cold PBS. To isolate the nuclei, cells were spun for 5 minutes at 4°C at 500 g and the pellet resuspended in 1 ml of cold NCP buffer 1 (10 mM Hepes pH 6.5, 10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA and 0.25% (v/v)

Triton X-100). The homogenate was spun for 5 minutes at 4°C at 500 g and the pellet resuspended in 1 ml of cold NCP buffer 2 (10 mM Hepes pH 6.5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA and 0.5 mM EGTA). After another 5-minute spin, the nuclear pellet was lysed by resuspending in 800 µl of cold RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% (v/v) NP-40, 0.5% (w/v) deoxycholate, 0.1% (w/v) SDS and 1X Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche)). The lysate was sonicated on ice for seven 10-second pulses on a Branson Sonifier S-150D at an output of 10 W, then spun for 10 minutes at 4°C at 17000 g. The supernatant was transferred to a new tube, and total protein quantification performed using the Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad).

Prior to immunoprecipitation, 1 mg of crosslink protein extract was precleared by incubating at 4°C for 4 hours with 30 µl of protein A- or G- streptavidin agarose beads and 6 µg of salmon sperm DNA in a total volume of 800 µl, on a rocker-type shaker. Following preclearing, 5 µg of a specific antibody was added to the protein extract and samples 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 µl of protein A- or G- streptavidin agarose beads. To remove non-specific binding with beads, complexes were washed twice with 500 µl of RIPA buffer, four times with 500 µl of lithium chloride buffer (100mM Tris-HCl pH 8.0, 500mM LiCl, 1% NP-40 (v/v), 1% deoxycholate (w/v)), twice more with 500 µl of RIPA buffer and once with 500 µl of 100 mM Tris solution pH 8.0. Protein/DNA complexes were next eluted from beads by heating to 65°C in 150 µl of a 1% SDS solution. To reverse formaldehyde crosslinks, 200 mM NaCl was added to the supernatant and the extract incubated at 65°C for 5 hours; 100 µg of total nuclear extract was set aside as an input control. The sample volume was increased to 300 µl with 100 mM Tris pH 8.0. DNA was purified by phenol/chloroform extraction and precipitated using 2.5 volume of concentrated ethanol for 16 hours at -20°C. Chromatin from input and CHIP samples were resuspended in 100 µl and 50 µl of a 10 mM Tris solution pH 8.0, respectively. To analyse the immunoprecipitated chromatin fragments, real-time PCR was performed using the primers listed in Supplementary Table S-III, as described in the real-time PCR section.

Statistical analysis

Data are presented as the mean \pm SEM values from three experiments excepted when mentioned in figure legends. A student t-test was used to determine statistical significance between individual means. A *p* value under 0.05 was considered significant.

Results

Study population

Between January 2009 and June 2010, we investigated tissues from 29 consecutive patients suffering from primary knee OA and 4 participants without osteoarthritis presenting with trauma. *PITXI* expression levels were ascertained by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and patients with OA were classified into two subgroups, according to results as compared to controls: OA subgroup 1, no significant difference; OA subgroup 2, significant reduction (over 30%) in *PITXI* expression (Figure 1A). There were no significant age or gender differences between the two subgroups (paired t-test for age, *P* = 0.11). About 60% of the patients met criteria for subgroup 2.

Critical regulatory regions found in *PITXI* promoter

To identify the causes of *PITXI* downregulation in some patients with primary knee joint OA (Figure 1A), we sequenced a 10-Kb region of DNA located upstream of the *PITXI* gene transcription initiation site. No significant single nucleotide polymorphisms (SNPs) or novel mutations associated with knee joint OA were detected in either subgroup when compared to controls (Supplementary Table S-I). We analyzed the activity of different *PITXI* promoter region to identify key regulatory sites. A fragment of 3895 nucleotides located upstream of the initiation site (fragment -3895/+61 bp) was cloned into a luciferase reporter vector. Smaller fragments were subcloned as well, by deleting a variable portion at the 5' extremity (fragments -3034/+61, -1577/+61, -729/+61, -524/+61,

-374/+61 and -84/+61 bp). When these constructs were transfected into C28/I2 human articular chondrocytes, luciferase activity remained high throughout, particularly for -729/+61 (Figure 1B). Of note, deletion of a large distal portion of the promoter (nucleotides -3895 to -729) led to a 6-fold increase in luciferase basal activity, suggesting that the region -3895/-729 contained negative regulatory elements. Further promoter deletion analysis also uncovered an enhancer region (-729/-84 bp), as progressive deletions at its 5' end led to a reduction in luciferase activity. *In silico* analysis on the region -729/+61 using MatInspector 8.0 software (Genomatix Software Suite) (Cartharius et al, 2005) revealed a number of binding sites, among which was the conserved putative binding site for the homeobox transcription factor DUX4, a known *PITX1* activator (Dixit et al, 2007) (Figure 1C). There were also several potential response elements for E2F1, a potential transcriptional activator of *PITX1* (Muller et al, 2001; Young et al, 2003).

E2F1 activates *PITX1* expression by binding to its proximal promoter region

To determine the functionality of the identified E2F1 putative binding sites, *PITX1*-promoter-luciferase constructs were transfected in C28/I2 cells along with a 4-hydroxytamoxifen-inducible form of E2F1. Results showed that E2F1 induction significantly activates all luciferase reporter genes containing the -374/+61 bp promoter region (Figure 2A). Deletion of the -374/-84 bp region completely abrogated E2F1-mediated *PITX1* activation, suggesting the presence of a functional E2F1 binding element in this region. We tested by ChIP assay the recruitment of E2F1 on this region of *PITX1* promoter in several patients and control samples (Figure 2B). The *TK* promoter, a known E2F1 target, was used here as a positive control. Except for one participant out of 6 (4 patients and 2 controls), E2F1 levels were the same for *PITX1* as for *TK* throughout. The reduction in *PITX1* expression observed in OA subgroup 2 as compared to controls and to subgroup 1 suggested a possible differential expression levels of E2F transcriptional activators. We therefore examined the endogenous levels of E2F transcription factors 1 to 3 (*E2F1*, *E2F2*, *E2F3*) and transcription factor dimerization partner 1 (*TFDP1*), an obligate E2F dimerization partner, in patients' articular chondrocytes. We observed no significant

variation between OA subgroups, except for a trend toward increased *E2F1* and *E2F2* expression in OA subgroup 1 as compared to subgroup 2 or controls (Figure 2C). Interestingly, we noticed a significant reduction in *TFDP1* expression in subgroup 2 as compared to either subgroup 1 or controls (Figure 2C). Essential for the binding of E2Fs to DNA, *TFDP1* when knocked down in fibroblasts has been shown to result in total loss of interaction between E2Fs and their cognate DNA binding sites, with consequent reduction in target gene expression (Maehara et al, 2005). Nevertheless, results from CHIP experiments (Figure 2B) showed that reduction of *TFDP1* in 2 patients from subgroup 2 did not prevent the binding of E2F1 to *PITX1* promoter.

PHB1 interacts with the human *PITX1* promoter through a distal E2F-like element

PITX1 promoter analysis showed that the distal part of the human *PITX1* promoter contained putative negative regulatory elements (Figure 1B). The search for mechanisms leading to *PITX1* repression in OA led us to identify a SNP (rs6867012) located within an E2F-like site in the -3753/-3748 bp region of the human *PITX1* promoter (Supplementary Table S-I). However, this SNP was not statistically correlated with primary knee joint OA. Nonetheless, functional analysis performed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) revealed the presence of a bound complex, although no supershift was detected when anti-E2F or anti-*TFDP1* antibodies were added to the EMSA assay (Supplementary Figure S1). To characterize the nature of this complex, a DNA pull-down assay with a biotinylated double-stranded oligonucleotide harbouring 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 five different peptides corresponding to PHB1 (Supplementary Table S-II). The presence of PHB1 in a repressor complex of the *PITX1* promoter is of interest as it is consistent with previous reports showing that PHB1 can repress E2F1 target genes (Choi et al, 2008; Rastogi et al, 2006a; Wang et al, 2002a; Wang et al, 1999).

Nuclear PHB1 accumulation occurs preferentially in OA articular chondrocytes

To further clarify the role of PHB1 in OA pathogenesis and, more specifically, in the transcriptional repression of *PITX1*, we compared the expression levels and cellular localization of PHB1 between normal and OA articular chondrocytes using immunohistochemical assays. A strong positive signal for PHB1 was observed in the nuclei of articular chondrocytes from OA patients (Figures 3A and 3B). To confirm these results, the subcellular compartment distributions of PHB1 in control and OA primary chondrocyte cultures were visualized by separating the nuclei from the cytoplasm using a saccharose cushion and then immunoblotting. PHB1 was detected in both fractions of OA chondrocytes but only in the cytoplasm of controls (Figure 3C). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), F1-ATPase and lamin A/C were used as cytoplasmic, mitochondrial and nuclear markers, respectively, to ensure that there was no contamination between fractions. When we compared nuclear localization with immunofluorescence, a stronger PHB1 signal emerged from OA than control nuclei (Figures 3D, 3E and Supplementary Figure S2). Of note, the punctiform signal detected with the mitochondrial marker TOM-20, a translocase of outer mitochondrial membranes of 20 kDa, was reminiscent of the mitochondrial fission phenotype (Bossy-Wetzel et al, 2003) often seen in primary OA (Blanco et al, 2004) (Figure 3D).

PHB1 incorporates the domains of both the mitochondrial targeting sequence (MTS) (Tatsuta et al, 2005) and the nuclear export signal (NES) (Rastogi et al, 2006b). We therefore investigated whether PHB1 nuclear accumulation in OA articular chondrocytes was due to mutations affecting either of these domains, but found none by direct sequencing. When we checked for increased *PHB1* expression by quantitative real-time RT-PCR and immunoblot analyses, no variation was detected between groups, either at the mRNA or protein level (Figure 3F and G). Taken together, these results showed that PHB1 accumulated specifically in nuclei from OA chondrocytes and this, without any change in total *PHB1* expression.

PHB1 overexpression represses *PITX1* in articular chondrocytes

To evaluate the contribution of PHB1 in *PITX1* repression, a FLAG-tagged PHB1 protein was overexpressed in C28/I2 human chondrocytes. Strong repression of *PITX1* was observed at the mRNA (Figure 4A) and protein levels (Figure 4B). Similarly, overexpression of PHB1 in co-transfection assays with the *PITX1* promoter-luciferase construct -3895/+61 harbouring a distal E2F-like site strongly repressed the luciferase reporter signal (Figure 4C, fragment -3895/+61). A similar but lesser effect was observed with other *PITX1* promoter-luciferase reporter constructs (Figure 4C, fragments -3034/+61, -1577/+61, -729/+61, -524/+61 and -374/+61). PHB1 thus repressed *PITX1* expression mainly through the distal region of the promoter. To verify if PHB1-mediated repression could be counteracted by the presence of E2F1, we overexpressed PHB1 along with E2F1 and analyzed the effect on *PITX1*-promoter-luciferase reporter -3895/+61 and -729/+61 activity. PHB1 blocked the effect of E2F1 with the *PITX1* promoter-luciferase reporter construct -3895/+61, while removal of the -3895/-729 region attenuated this effect in the presence or absence of the E2F1 expression vector (Figure 4D). Finally, ChIP assays were performed to determine more precisely where PHB1 interacted within the normal human *PITX1* promoter *in vivo*. This experiment confirmed our mass spectrometry findings showing that the distal region (-3746/-3643) corresponding to an E2F1-like response element recruited PHB1, while no significant interaction was detected with other promoter regions (Figure 4E). This result was consistent with the luciferase results (Figure 4C) showing that the distal promoter region was essential to mediating a strong *PITX1* repression.

Endogenous PHB1 is sufficient for *PITX1* repression in OA chondrocytes

Because endogenous PHB1 was seen to accumulate in the nucleus of articular chondrocytes under pathological conditions such as OA (Figure 3), we wanted to find out where in the *PITX1* promoter of OA cells PHB1 was being recruited. We performed ChIP assays against PHB1 in chondrocytes from 2 control subjects and 9 OA patients. Amplification of the -3746/-3643 region of the human *PITX1* promoter confirmed the co-

localization of PHB1 to this distal E2F-like element, as previously observed in C28/I2 human chondrocytes (Figure 5A). As expected, the presence of PHB1 at the -272/-218 region of the *PITX1* promoter was not detected, nor was it detected in the negative control corresponding to the proximal region of the TK promoter harbouring classical E2F1 sites. These results showed the selectivity of PHB1 for specific E2F1 response elements.

To evaluate whether PHB1 depletion in OA primary chondrocytes could rescue *PITX1* expression, we knocked down PHB1 using siRNA against *PHB1* (siPHB1). The selection of siPHB1 was first validated in BJ cells, a non-transformed fibroblast cell line, where the efficiency of our selection was demonstrated by an 80% reduction in PHB1 proteins level at 48 and 72 hours post-transfection when compared to controls (Figure 5B). We next knocked down PHB1 in articular chondrocytes of four patients and observed a 3- to 25-fold increase in *PITX1* expression (Figure 5C).

PHB1 has been reported to generally repress E2F1 target genes. We therefore assessed the expression levels of E2F1 target genes *CCNA2*, *CCNE1*, *BRCA1* and *DDB2* by real time RT-PCR. Results showed that their expression was decreased in OA chondrocytes as compared to controls, particularly in OA subgroup 2 where *PITX1* expression was substantially reduced (Figure 5D). However, there was no difference in the expression of other E2F1 target genes, such as *CASP3*, *CDKN1A*, *IL1R1*, *RAD51* and *SERPINE1* (Supplementary Figure S3). Interestingly, knockdown of PHB1 by siRNA also rescued the expression of cyclins *CCNA2* and *CCNE1*, indicating that only specific E2F1 target genes were repressed by nuclear PHB1 in OA primary chondrocytes (Figure 5E).

STR/ort mice exhibit increasing nuclear PHB1 accumulation associated with *Pitx1* repression

To determine if PHB1 nuclear accumulation and *Pitx1* downregulation were associated with the initiation of OA in a recognized OA animal model, we investigated early-stage development of OA-like lesions in STR/ort mice (Das-Gupta et al, 1993; Mason et al, 2001). Indeed, beginning a few weeks after weaning, STR/ort mice demonstrated

increasing nuclear accumulation of PHB1 in knee cartilage (Figures 6A and B), correlating with a loss of *Pitx1* at the mRNA and protein levels (Figure 6A and C).

Discussion

Using transgenic mice, we previously showed that loss of one *Pitx1* allele was sufficient to trigger an osteoarthritis-like phenotype (Picard et al, 2007). Here, the use of an established OA mouse model, the STR/ort, revealed loss of *Pitx1* expression in the early stages of OA. Furthermore, its involvement in hindlimb formation made *Pitx1* an interesting candidate gene for research on knee OA. Hence, the goal of this study was to understand the mechanisms of *PITX1* regulation, more precisely in knee cartilage from patients suffering from osteoarthritis. We found that two-thirds of the OA patients we tested exhibited reduced *PITX1* expression. Promoter analysis allowed us to conclude that *PITX1* was positively regulated by E2F1 in a direct manner. Nevertheless, endogenous levels of E2F family members could not be held responsible for the downregulation of *PITX1* observed in OA patients. E2F target genes can be inhibited when corepressors like prohibitin (PHB1) are recruited to E2F binding sites (Rastogi et al, 2006A). We were able to show that PHB1 interacts directly with a distal E2F-like binding site on the *PITX1* promoter and repressed *PITX1*. Furthermore, PHB1 was demonstrated to preferentially accumulate in the nuclear fraction of chondrocytes from OA patients. In the mouse model STR/ort, PHB1 increasingly accumulated in the nucleus as the mice showed signs of OA, while *PITX1* expression decreased.

E2F transcriptional activators (mostly E2F1 and E2F3a) play an important role in the proliferation of growth plate chondrocytes in murine lower limb bones (Tsai et al, 2008). Inactivation of both genes in compound mutant *E2F1^{-/-}/E2F3a^{-/-}* mice resulted in dysplastic growth plates and an increase in hypertrophic chondrocytes as compared to those of wild-type mice (Tsai et al, 2008). Interestingly, this phenotype was very similar to the one observed earlier in *Pitx1^{-/-}* mice, which also presented with growth plate dysplasia and exaggerated hypertrophic chondrocyte phenotype (Lanctot et al, 1999). However, though

these findings argue in favour of *PITX1* as a downstream transcriptional target of E2Fs, it is unlikely that *PITX1* repression in OA patients would be caused by concomitant inactivation of E2F1 and related family members, as no significant changes were detected in *E2F1*, *E2F2* and *E2F3* expression levels. Although *TFDP1* was significantly reduced in OA subgroup 2, it did not prevent the interaction of E2F1 with the proximal *PITX1* promoter region. These results prompted us to investigate the *PITX1* promoter region for other sources of *PITX1* regulation.

Promoter deletion analysis showed that the distal part of the human *PITX1* promoter contained putative negative regulatory elements at upstream positions -3895 to -729 bp. We were able to identify an E2F-like binding site (-3746/-3643) to which a repressor complex containing PHB1 was recruited in OA articular chondrocytes, as demonstrated in our DNA pulldown and ChIP assays. Although PHB1 was weakly detected on more proximal region of *PITX1* promoter, an inhibitory effect was still observable in luciferase assays. A possible explanation would be that overexpressed PHB1 could sequester E2F1 and prevent its subsequent binding to DNA. PHB1 could also have an indirect effect by affecting the regulation of other transcription factors. Our results show that *PITX1* is not an exclusive target of PHB1. Knockdown of PHB1 in OA chondrocytes also resulted in the upregulation of *CCNA2* and *CCNE1*. Interestingly, the endogenous levels of *CCNA2* and *CCNE1* were significantly downregulated in OA subgroup 2. It would be tempting to hypothesise that not only *PITX1* levels are differentially expressed between the two subgroups but also other E2F1-dependent targets. Of note, *BRCAl* and *DDB2* were significantly downregulated in OA subgroup 2 although their expression was not affected by knockdown of PHB1. Even if previous studies report that PHB1 could repress E2F1 target genes (Choi et al, 2008; Wang et al, 2002a; Wang et al, 1999), not all E2F1 targets seem to be affected by PHB1 knockdown in articular chondrocytes.

That PHB1 should play a regulatory role in primary OA pathogenesis is not surprising, considering the nuclear accumulation we found in OA articular chondrocytes. The mechanisms by which PHB1 would transfer from the mitochondria, where it is normally principally localized, to accumulate in the nucleus are still not fully understood.

Although the nucleocytoplasmic shuttling of proteins smaller than 50 kDa can occur by passive diffusion through aqueous channels surrounding the nuclear pore complex (Allen et al, 2000), the 32-kDa PHB1 may require active transport, as it is frequently bound to multiprotein complexes like the E2F transcription factor family, pRb, p53, RNF2, Brg-1/Brm, or histone deacetylase (Choi et al, 2008; Fusaro et al, 2003; Wang et al, 2002a; Wang et al, 1999; Wang et al, 2002b). Active nuclear export of PHB1 is mediated by NES, a short amino acid sequence (257-ITYLPAGQSVVLQL-270) (Rastogi et al, 2006b), which forms a ternary complex with Exportin 1 (CRM-1) in conjunction with a guanosine-5'-triphosphate (GTP)-bound form of Ran in the nucleus before being exported to the cytoplasm (Rastogi et al, 2006b). We did not find any mutations or post-translational modifications masking or interfering with NES or altering the conformation of PHB1 in the OA patients tested. However, research done in other diseases suggests that PHB1 could be released from mitochondria along with cytochrome C following mitochondrial damage, thus leading to PHB1 accumulation in the cytoplasm (Kartha et al, 2008).

In the mitochondria, PHB1 is bound to PHB2, forming a high molecular weight complex of 1.2 MDa situated on the small inner membrane folds called cristae (Merkwirth & Langer, 2009; Nijtmans et al, 2002). Newly synthesized subunits of mitochondrial proteins bind to this holding complex prior to their assembly (Nijtmans et al, 2002). Disruption of the PHB complex, accompanied by defects in mitochondrial membrane potential, was shown to decrease cellular replicative lifespan (Coates et al, 1997) and organism longevity, albeit in *C. elegans* (Artal-Sanz & Tavernarakis, 2009b). Interestingly, in OA chondrocytes, a reduction in mitochondrial membrane potential was found in association with mitochondrial swelling, suggesting a disorganized mitochondrial inner membrane (Blanco et al, 2004). Our data demonstrated that although total PHB1 was unaffected, the cytoplasmic/nuclear PHB1 expression ratio in OA chondrocytes was decreased as compared to those of control subjects, implying a corresponding decrease at the mitochondrial level, with associated implications of mitochondrial inner membrane disorganization, abnormal cristae formation and mitochondrial fission and fragmentation (Artal-Sanz & Tavernarakis, 2009a). Indeed, immunofluorescent localization of TOM-20, a

known mitochondrial marker, indicated mitochondrial fission and fragmentation in OA articular chondrocytes, contrasting with the mitochondrial web-shaped network seen in control cells. PHB1 also plays a role in the stabilization of the mitochondrial oxidative phosphorylation system (OXPHOS) (Artal-Sanz & Tavernarakis, 2009a). Disruption of this system leads to decreased mitochondrial activity and increased nitric oxide production (Artal-Sanz & Tavernarakis, 2009a). Nitric oxide overproduction has been implicated in matrix degradation and calcification in OA articular cartilage (Johnson et al, 2000).

Previous reports had suggested that PHB1 could be recruited to the E2F1 target gene promoter by interacting with E2F1 (Choi et al, 2008; Rastogi et al, 2006a). Our results suggest instead that PHB1 recruitment to the *PITX1* promoter is independent of E2F, as it did not co-localize with proximal E2F elements of the human *PITX1* promoter in either OA or non-OA articular chondrocytes. Because PHB1 cannot bind to DNA directly, more research is needed to identify nuclear binding partners for PHB1 recruitment on the *PITX1* promoter. Taking into account that PHB1 is a highly conserved and ubiquitously expressed protein that participates in a number of cellular processes including mitochondrial function, growth, cancers, transcription, senescence and apoptosis, it is likely that this research could impact on many other diseases. Elucidation of the mechanisms underlying the nuclear accumulation of PHB1 is important for the development of effective treatments for OA and may lead to improved molecular tools to assess the risk of developing OA and to monitor disease progression.

Acknowledgements

The authors wish to thank the patients and their families who participated in this study. Thanks are also owed to Mrs. Ginette Lacroix and Mrs. Anne-Marie Châtelain for clinical coordination, Ms. Anita Franco, Mrs. Josée Dépôt and Mrs. Isabelle Turgeon for technical support and helpful assistance, and Dr. Kristen Fay Gorman, Mr. Guoruey Wong and Ms. Viviane Calabrese for critical review. The authors are grateful to Danielle Buch, medical writer/editor at the Applied Clinical Research Unit of the Sainte-Justine Research Center, for critical revision and substantive editing of the manuscript.

This work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-62791 and PPP-110826) to Dr. Moreau and Dr. Lavigne. Mr. Martin Pellicelli and Dr. Jean-Francois Lavoie are recipients of a RSBO-FRSQ doctoral and postdoctoral scholarship, respectively. Ms. Cynthia Picard and Dr. Jean-Francois Lavoie are recipients of a Canadian Institutes of Health Research-supported MENTOR scholarship at the doctoral and postdoctoral level, respectively, and Ms. Picard is also the recipient of an FRSQ doctoral scholarship. Ms. Roxanne Doucet received an FRSQ Master's scholarship award.

Conflict of Interest

All authors certify that they have not signed an agreement with any commercial interest related to this study. However, this work led to a patent application (WO/2008/049225) on behalf of Sainte-Justine University Hospital. No other potential conflict of interest relevant to this manuscript is reported.

References

- Allen TD, Cronshaw JM, Bagley S, Kiseleva E, Goldberg MW (2000) The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J Cell Sci* 113 (Pt 10): 1651-1659
- Artal-Sanz M, Tavernarakis N (2009a) Prohibitin and mitochondrial biology. *Trends Endocrinol Metab* 20: 394-401
- Artal-Sanz M, Tavernarakis N (2009b) Prohibitin couples diapause signalling to mitochondrial metabolism during ageing in *C. elegans*. *Nature* 461: 793-797
- Blanco FJ, Lopez-Armada MJ, Maneiro E (2004) Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion* 4: 715-728
- Bossy-Wetzel E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R, Lipton SA (2003) Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol* 15: 706-716
- 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: 2933-2942
- Choi D, Lee SJ, Hong S, Kim IH, Kang S (2008) Prohibitin interacts with RNF2 and regulates E2F1 function via dual pathways. *Oncogene* 27: 1716-1725
- Coates PJ, Jamieson DJ, Smart K, Prescott AR, Hall PA (1997) The prohibitin family of mitochondrial proteins regulate replicative lifespan. *Curr Biol* 7: 607-610
- Das-Gupta EP, Lyons TJ, Hoyland JA, Lawton DM, Freemont AJ (1993) New histological observations in spontaneously developing osteoarthritis in the STR/ORT mouse questioning its acceptability as a model of human osteoarthritis. *Int J Exp Pathol* 74: 627-634
- Dixit M, Anseau E, Tassin A, Winokur S, Shi R, Qian H, Sauvage S, Matteotti C, van Acker AM, Leo O, Figlewicz D, Barro M, Laoudj-Chenivresse D, Belayew A, Coppee F, Chen YW (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
- Finger F, Schorle C, Zien A, Gebhard P, Goldring MB, 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
- Fusaro G, Dasgupta P, Rastogi S, Joshi B, 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
- Johnson K, Jung A, Murphy A, Andreyev A, Dykens J, 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
- Jones G, Ding C, Scott F, Cicuttini F (2004) Genetic mechanisms of knee osteoarthritis: a population based case-control study. *Ann Rheum Dis* 63: 1255-1259
- Jordan JM, Kraus VB, Hochberg MC (2004) Genetics of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 6: 7-13

- Kartha GK, Moshal KS, Sen U, Joshua IG, Tyagi N, Steed MM, Tyagi SC (2008) Renal mitochondrial damage and protein modification in type-2 diabetes. *Acta Diabetol* 45: 75-81
- Lanctot C, Lamolet B, 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
- Lanctot C, Moreau A, Chamberland M, Tremblay ML, Drouin J (1999) Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development* 126: 1805-1810
- Loughlin J (2001) Genetic epidemiology of primary osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 13: 111-116
- Loughlin J (2003) Genetics of osteoarthritis and potential for drug development. *Curr Opin Pharmacol* 3: 295-299
- Maehara K, Yamakoshi K, Ohtani N, Kubo Y, Takahashi A, Arase S, Jones N, 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
- Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A (1971) Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 53: 523-537
- Mason RM, Chambers MG, Flannelly J, Gaffen JD, Dudhia J, Bayliss MT (2001) The STR/ort mouse and its use as a model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 9: 85-91
- Merkwirth C, Langer T (2009) Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1793: 27-32
- Mertens F, Palsson E, Lindstrand A, Toksvig-Larsen S, Knuutila S, Larramendy ML, el-Rifai W, Limon J, Mitelman F, Mandahl N (1996) Evidence of somatic mutations in osteoarthritis. *Hum Genet* 98: 651-656
- Mishra S, Murphy LC, Murphy LJ (2006) The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J Cell Mol Med* 10: 353-363
- Mishra S, Murphy LC, Nyomba BL, Murphy LJ (2005) Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends Mol Med* 11: 192-197
- Muller H, Bracken AP, Vernell R, Moroni MC, Christians F, Grassilli E, Prosperini E, Vigo E, Oliner JD, Helin K (2001) E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* 15: 267-285
- Nijtmans LG, Artal SM, Grivell LA, Coates PJ (2002) The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease. *Cell Mol Life Sci* 59: 143-155
- Osman C, Merkwirth C, Langer T (2009) Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *J Cell Sci* 122: 3823-3830
- Peach CA, Carr AJ, Loughlin J (2005) Recent advances in the genetic investigation of osteoarthritis. *Trends Mol Med* 11: 186-191
- Picard C, Azeddine B, Moldovan F, Martel-Pelletier J, Moreau A (2007) New emerging role of pitx1 transcription factor in osteoarthritis pathogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 462: 59-66

Rastogi S, Joshi B, Dasgupta P, Morris M, Wright K, Chellappan S (2006a) Prohibitin facilitates cellular senescence by recruiting specific corepressors to inhibit E2F target genes. *Mol Cell Biol* 26: 4161-4171

Rastogi S, Joshi B, Fusaro G, Chellappan S (2006b) Camptothecin induces nuclear export of prohibitin preferentially in transformed cells through a CRM-1-dependent mechanism. *J Biol Chem* 281: 2951-2959

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: 593-602

Spector TD, MacGregor AJ (2004) Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage* 12 Suppl A: S39-44

Tatsuta T, Model K, Langer T (2005) Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. *Mol Biol Cell* 16: 248-259

Tsai SY, Opavsky R, Sharma N, Wu L, Naidu S, Nolan E, Feria-Arias E, Timmers C, Opavska J, de Bruin A, Chong JL, Trikha P, Fernandez SA, Stromberg P, Rosol TJ, Leone G (2008) Mouse development with a single E2F activator. *Nature* 454: 1137-1141

Wang S, Fusaro G, Padmanabhan J, Chellappan SP (2002a) Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression. *Oncogene* 21: 8388-8396

Wang S, Nath N, Fusaro G, 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

Wang S, Zhang B, Faller DV (2002b) Prohibitin requires Brg-1 and Brm for the repression of E2F and cell growth. *EMBO J* 21: 3019-3028

Yao JY, Wang Y, An J, Mao CM, Hou N, Lv YX, Wang YL, Cui F, Huang M, Yang X (2003) Mutation analysis of the Smad3 gene in human osteoarthritis. *Eur J Hum Genet* 11: 714-717

Young AP, Nagarajan R, Longmore GD (2003) Mechanisms of transcriptional regulation by Rb-E2F segregate by biological pathway. *Oncogene* 22: 7209-7217

Figure legends

Figure 1. Study of basal *PITX1* expression in human primary chondrocytes and in C28/I2 cell line. **(A)** Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) on chondrocytes from 27 patients with osteoarthritis (OA) and 4 non-OA (control) patients. OA patients were distributed into two groups. In subgroup 1 (OA-gr1), there was no significant reduction in *PITX1* gene expression (n=10). In subgroup 2 (OA-gr2), patients showed an important reduction in *PITX1* gene expression (n=17). Black dashes represent the median for each group. Asterisks represent a significant change in *PITX1* expression between subgroups (paired t-test: $P < 0.002$). **(B)** Luciferase assay in C28/I2 cells transiently transfected with *PITX1* luciferase reporter for promoter region -3895/+61 bp or with luciferase plasmids containing smaller fragments (-3034/+61 bp, -1577/+61 bp, -729/+61 bp, -524/+61 bp, -374/+61 bp or -84/+61 bp). Data represent mean and standard deviation of three independent experiments. **(C)** Sequence of *PITX1* promoter between -700/+100 bp. Response elements predicted by MatInspector 8.0 software from Genomatix Software Suite and found on the positive or complementary strand are represented by a bar above or below the nucleotide sequence, respectively. Arrow shows transcription start site.

Figure 2. E2F1 binds to *PITX1* promoter and acts as a positive regulator. **(A)** Luciferase assays in C28/I2 cell line transiently transfected with different constructions of *PITX1* promoter. Cells were co-transfected with pBabe plasmids expressing ER fused to E2F1 or the empty control vector prior to induction with 4-hydroxytamoxifen for 24h. Data represents mean and standard deviation of three independent experiments. Asterisks represent a significant increase of luciferase activity (paired t-test: $*P < 0.01$). **(B)** Real-time PCR analysis on the -272/-218 bp *PITX1* promoter region or on the proximal *TK* promoter region after chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay against E2F1. Data are presented as DNA relative quantification when compared to the mean amount of DNA present after immunoprecipitation of negative control immunoprecipitation (IP). **(C)** Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) against *E2F1*, *E2F2*, *E2F3* and *TFDP1* genes in chondrocytes from 19 patients with osteoarthritis (OA) and 4 non-OA (control)

patients. OA patients were classified into two subgroups as described in Figure 1A. Black dashes represent the median value for each group. Asterisks represent a significant decrease in *TFDP1* expression in OA subgroup 2 as compared to control cells and to subgroup 1 (paired t-test: * $P < 0.002$; ** $P < 0.01$).

Figure 3. PHB1 accumulates in the nucleus of OA chondrocytes. **(A)** PHB1 immunostaining performed on cartilage sections from individuals without osteoarthritis (non-OA control) (top panels) or with OA (bottom panels). Arrows point to cells with a positive nuclear PHB1 signal. Cartilage sections were counterstained with Harris Modified Hematoxylin. Original magnification: left 100X, right 400X. **(B)** Proportion of cells from 3 control subjects and 5 OA patients showing a PHB1 nuclear signal. Significant increase in OA nuclear PHB1 in both the superficial and deep zones is observed, as compared to controls. (Mann-Whitney U test, * $P < 0.05$). **(C)** Cytoplasmic (C) and nuclear (N) protein extracts from primary chondrocytes of one control subject and 3 OA patients. Proteins were resolved by SDS-PAGE, with the PHB1 protein detected using anti-PHB1 antibody. GAPDH, F1-ATPase and lamin A/C were used as cytoplasmic, mitochondrial and nuclear markers, respectively. PHB1 was found in both compartments of OA cells, but only in the cytoplasm of controls. **(D)** Immunofluorescence against PHB1 and TOM20, a mitochondrial marker, on primary chondrocytes from one control subject and two OA subjects. PHB1 signal appears in green and TOM20 signal in red. The immunofluorescent stain DAPI was used as a DNA marker. Omission of primary antibodies served as negative control. The specificity of the staining was confirmed since no fluorescent signal was detected with the use of fluorescent dye-coupled secondary antibodies alone. Original magnification: 630X, scale bar: 10 μm . **(E)** PHB1 signal quantification of immunofluorescence results, showing the percentage of the signal that co-localizes with DAPI as compared to the total PHB1 signal. Asterisks indicate statistical significance. **(F)** Real-time RT-PCR against *PHB1* gene in chondrocytes from 4 non-OA (control) and 19 OA patients in two subgroups as previously described. Black dashes represent the median value for each group. Differences were not significant. **(G)** Immunoblot against PHB1 on

total cell lysis with primary chondrocytes from 2 control subjects and 5 OA patients (α -TUBULIN used as loading control).

Figure 4. PHB1 represses *PITX1* gene in C28/I2 chondrocyte cell line. **(A-B)** C28/I2 cells stably overexpressing FLAG-PHB1 or empty control vector alone. **(A)** *PITX1* mRNA measured by real-time RT-PCR. Data is presented as relative quantification (RQ); error bars represent standard deviation of experiment done in triplicate (paired t-test: $*P < 0.01$). **(B)** Protein levels measured by immunoblots (IB) of FLAG epitope and *PITX1* (α -TUBULIN protein used as a loading control). **(C-D)** Luciferase assays in C28/I2 cell line transiently transfected with different constructs of the *PITX1* promoter. **(C)** Cells were co-transfected with a vector expressing FLAG-PHB1 or an empty control vector. **(D)** Cells were co-transfected with FLAG-PHB1 vector or an empty control vector and with pBabe plasmid expressing ER fused to E2F1 or to the empty control vector, and induced with 4-hydroxytamoxifen for 24 hours. Data represent mean and standard deviation of three independent experiments. Significant decrease is seen in luciferase activity of PHB1-transfected cells as compared to control cells (paired t-test: $*P < 0.05$; $**P < 0.01$). **(E)** Real-time PCR analysis after ChIP assay against PHB1 showing the preferential co-localization of PHB1 on the distal promoter elements of the human *PITX1* gene harbouring E2F-like sequences. Different primers were used to amplify specific *PITX1* promoter regions. The mean amount of DNA present after immunoprecipitation of control cells was set to one. Data is presented as DNA relative quantification compared to this mean amount

Figure 5. PHB1 is required to maintain repression of *PITX1* gene. **(A)** Real-time PCR analysis on the -3746/-3643 bp and -272/-218 bp *PITX1* promoter regions or on the proximal *TK* promoter region after ChIP assay against PHB1. Data are presented as DNA relative quantification when compared to the mean amount of DNA present after immunoprecipitation of control cells. **(B)** Immunoblots against PHB1 or GAPDH (loading control) in the BJ fibroblast cell line transiently transfected with control siRNA (siCTRL) or with siRNA against PHB1 (siPHB1) for 24, 48 or 72 hours. **(C)** Real time RT-PCR performed against *PITX1* gene in chondrocytes from 4 different OA patients transfected

with control siRNA or PHB1 siRNA. Data represent mean and standard deviation of three independent experiments. A significant increase in *PITX1* expression is seen in siPHB1 transfected cells (paired t-test: $*P < 0.02$). **(D)** Real-time RT-PCR performed against E2F target genes *CCNA2*, *CCNE1*, *BRCA1* and *DDB2* in chondrocytes from 19 patients with osteoarthritis (OA) and 4 non-OA (control) patients. OA patients were classified into two subgroups as described in Figure 1A. Black dashes represent the median value for each group. Asterisks represent a significant decrease in *CCNA2*, *CCNE1*, *BRCA1* and *DDB2* expression as compared to control cells (paired t-test: $*P < 0.05$; $**P < 0.02$; $***P < 0.005$). **(E)** Real-time RT-PCR performed against *CCNA2*, *CCNE1*, *BRCA1* and *DDB2* genes in chondrocytes from 4 different OA patients transfected with control siRNA or PHB1 siRNA. Data represent mean and standard deviation of three independent experiments. A significant increase is seen in *CCNA2* and *CCNE1* expression in siPHB1-transfected cells as compared to control (paired t-test: $*P < 0.02$).

Figure 6. *Pitx1* and *Phb1* levels in STR/ort mice. **(A)** Top panels represent histological sections of healthy knee cartilage whereas bottom panels represent samples at the early stages of osteoarthritis-like disease (OA). Left panels are microphotographs of Safranin O-stained sections; original magnification 200X. Middle panels were immunostained for *Pitx1* (brown) and right panels for *Phb1*; original magnification 400X. Dashed lines indicate the border between cartilage and subchondral bone. Arrows show typical cells with *Phb1* nuclear signal. **(B)** Correlation between the number of chondrocytes expressing *Phb1* in the nucleus and age (in weeks). White square represents value for wild-type mouse; black diamonds, STR/ort. **(C)** Real-time RT-PCR against *Pitx1* gene in knee samples of STR/ort mice aged 6-15 weeks. Five animals per group were analyzed. A significant decrease in *Pitx1* expression is observed between 6- and 15-week-old mice. (ANOVA; Bonferroni multiple comparison test, $*P < 0.01$)

Figure 7. Schematic model showing PHB1 nuclear accumulation in OA chondrocytes. In non-pathological conditions, PHB1 is preferentially located on the inner mitochondrial membrane. Due to cytoplasmic-nuclear shuttling, a small amount of PHB1 can be detected

in the nucleus but, based on our results, it does not bind to the *PITX1* promoter. *PITX1*, along with other E2F targets like *CCNA2* and *CCNE1*, are normally expressed. In OA articular chondrocytes, PHB1 accumulates within the nucleus. When bound to the distal region of the *PITX1* promoter, PHB1 in conjunction with other nuclear partners can efficiently repress *PITX1* expression. As the total PHB1 protein pool does not seem to be increased, it is tempting to hypothesize that mitochondrial stores of PHB1 may become depleted.

Figures

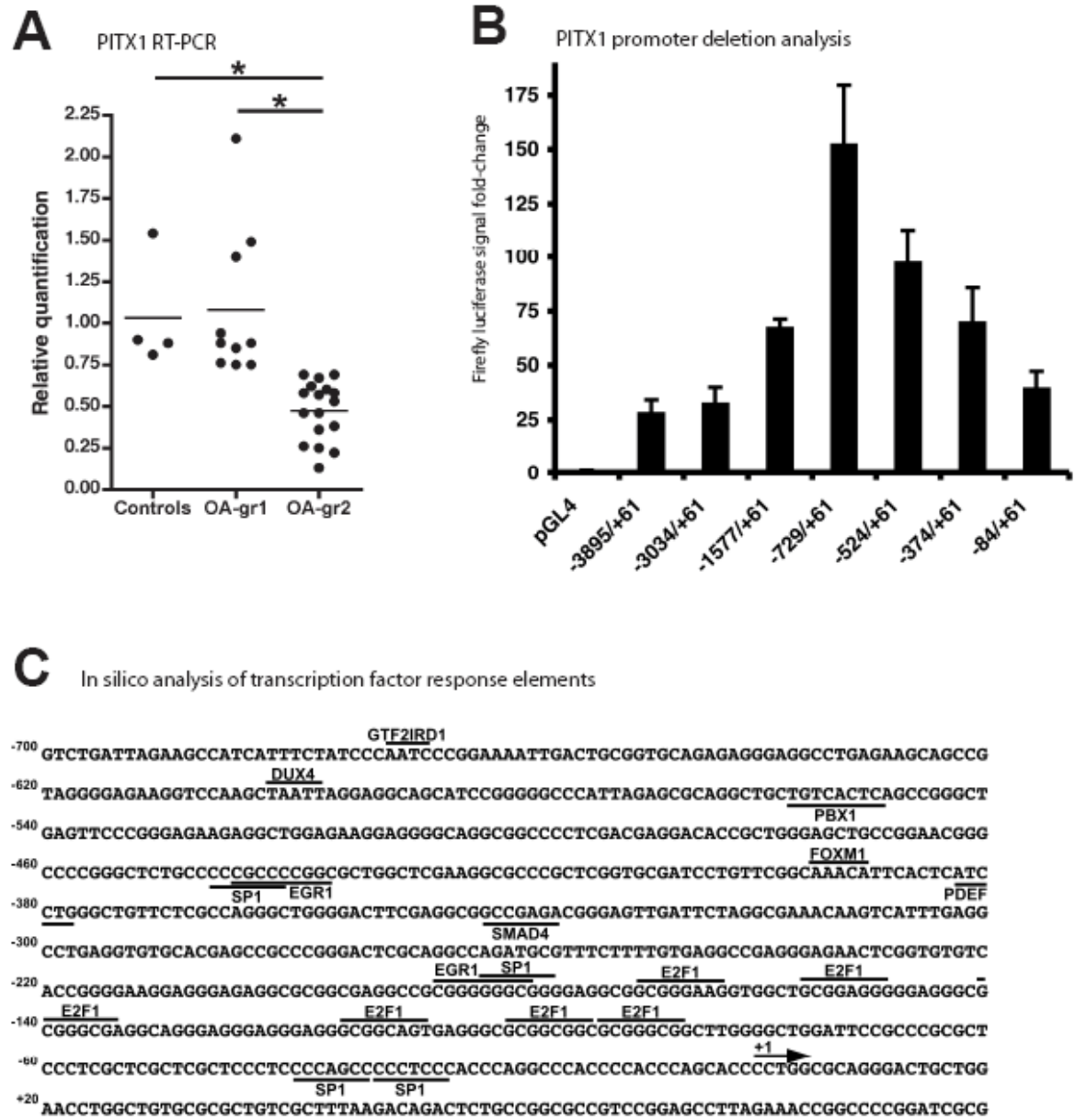


Figure 1. Study of basal *PITX1* expression in human primary chondrocytes and in C28/I2 cell line.

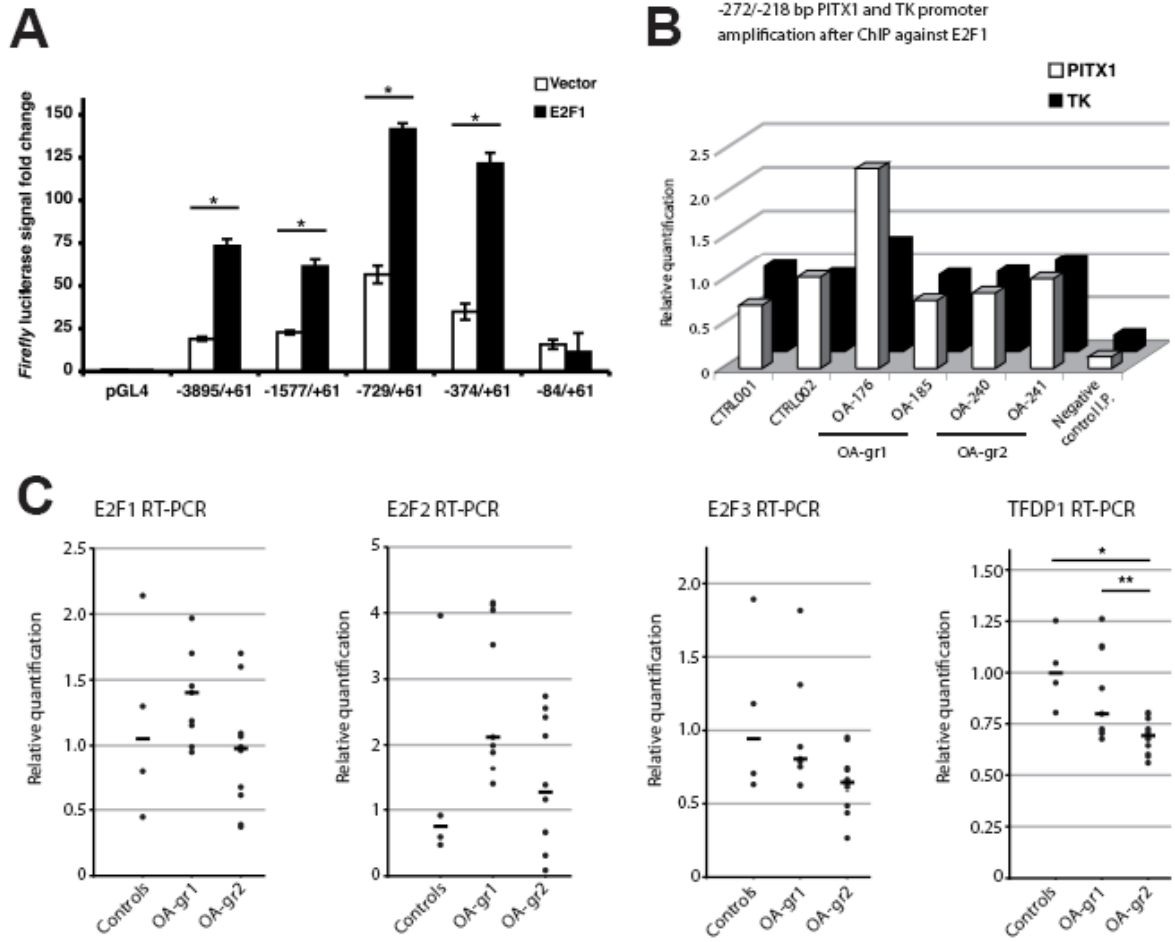


Figure 2. E2F1 binds to *PITX1* promoter and acts as a positive regulator.

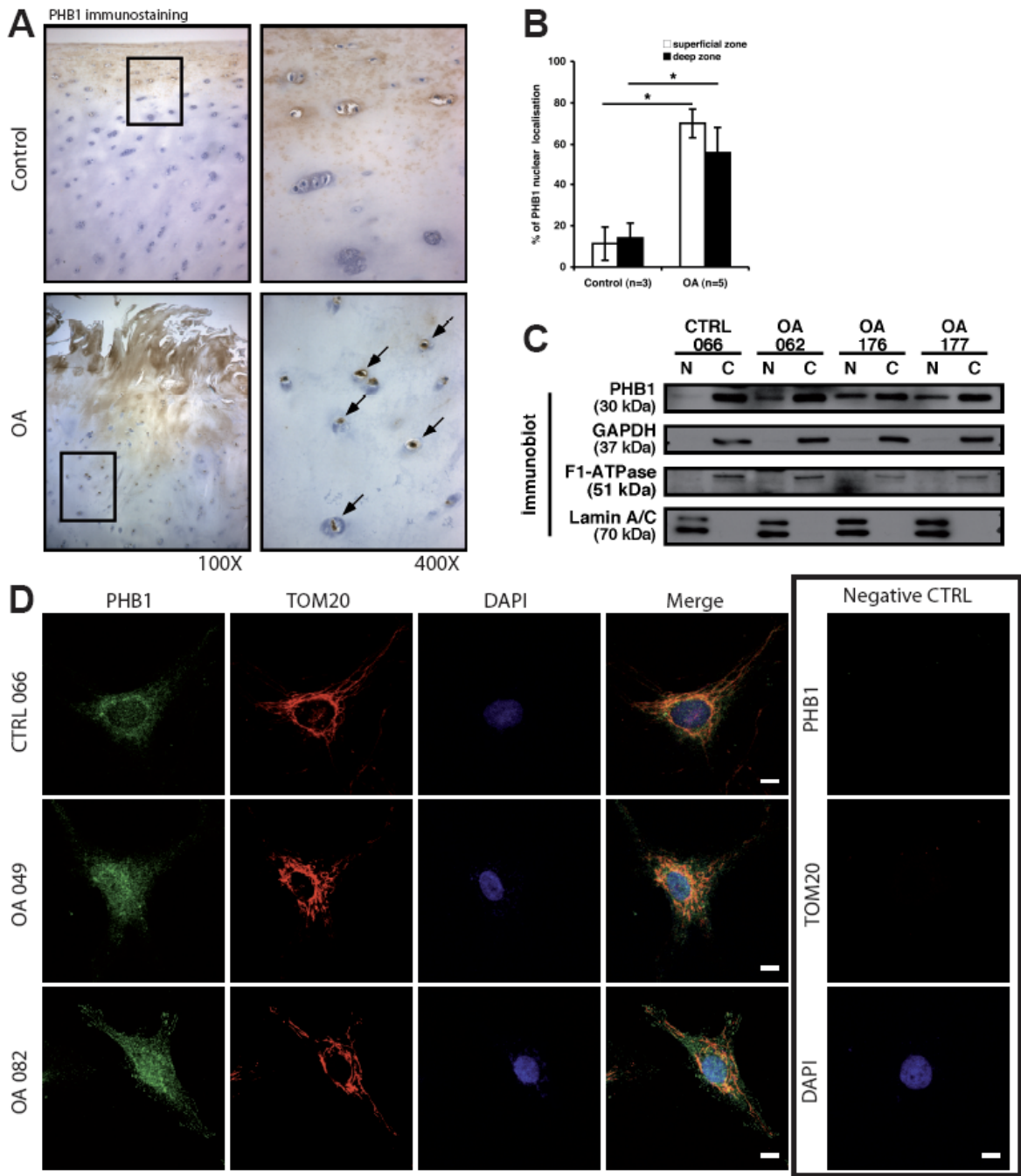


Figure 3. PHB1 accumulates in the nucleus of OA chondrocytes.

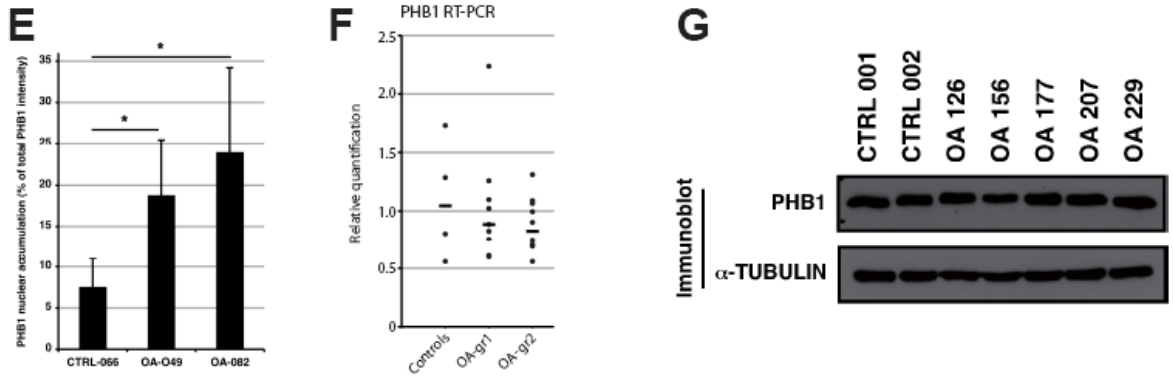


Figure 3 (continued). PHB1 accumulates in the nucleus of OA chondrocytes.

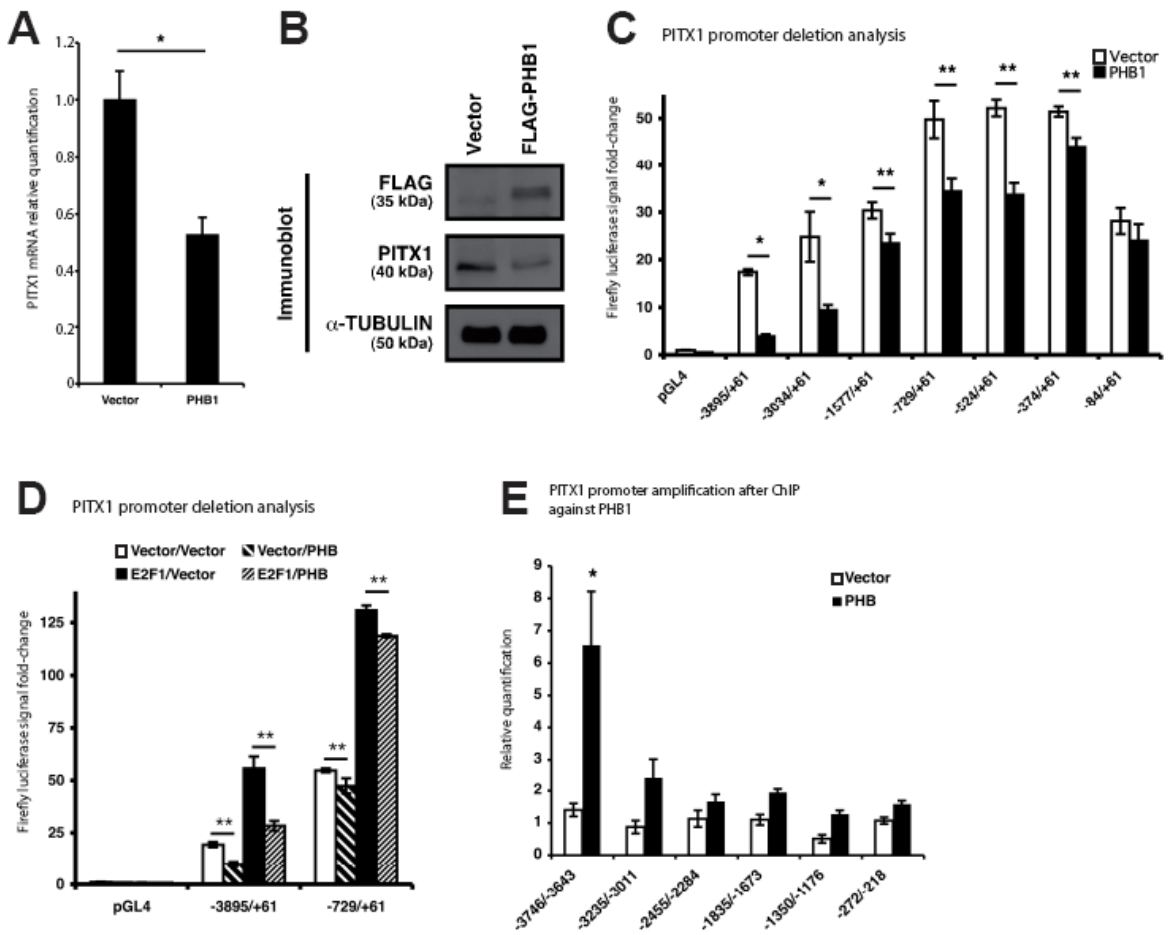


Figure 4. PHB1 represses *PITX1* gene in C28/I2 chondrocyte cell line.

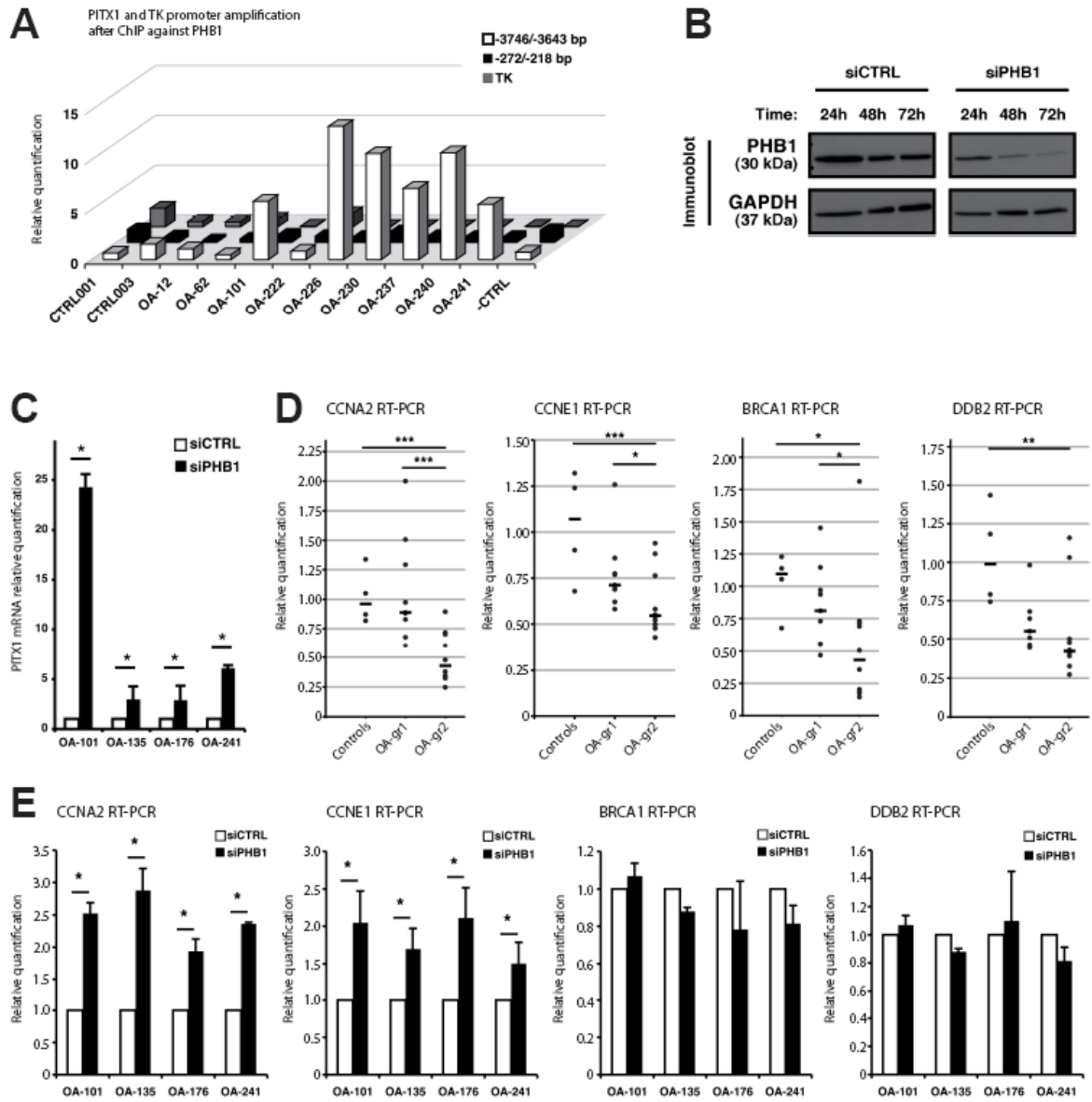


Figure 5. PHB1 is required to maintain repression of *PITX1* gene.

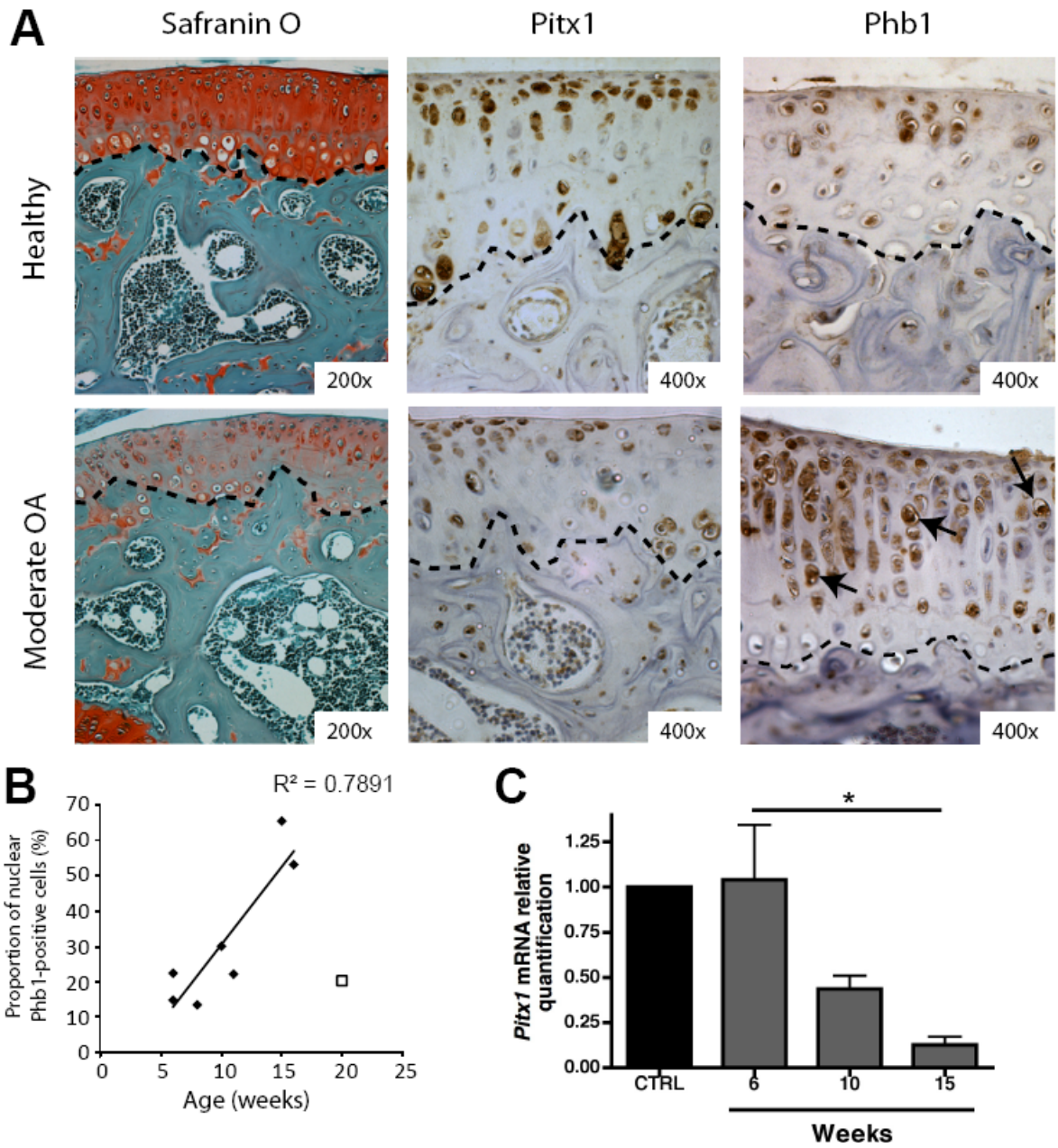


Figure 6. Pitx1 and Phb1 levels in STR/ort mice.

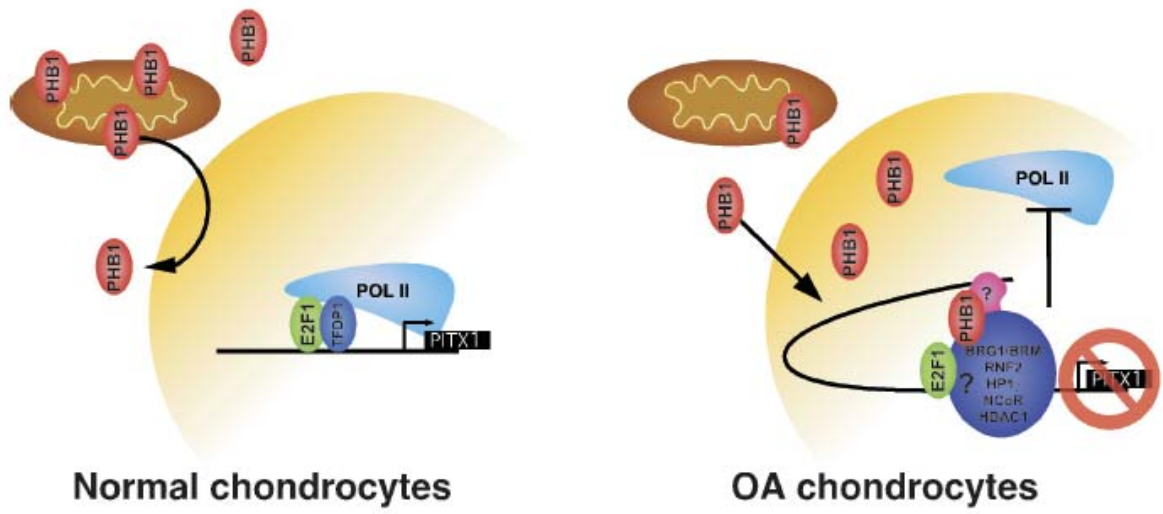


Figure 7. Schematic model showing PHB1 nuclear accumulation in OA chondrocytes.

Supplementary information

Material and methods

Vector constructs

All restriction enzymes were purchased from New England Biolabs. To clone the human *PITX1* promoter segments, regions -3895/+61 and -3034/+61 bp were amplified using genomic DNA extracted from the MG-63 osteoblast-like cell line and various primers containing restriction sites KpnI at the 5' end and EcoRV at the 3' end (Supplementary Table S-IV). Restriction fragments were cloned into a pGL4 reporter vector containing the luciferase gene (Promega). To generate the -1577/+61 *PITX1* promoter-luciferase reporter construct, the -3895/+61 construct was digested with KpnI and SphI restriction enzymes, cohesive ends were blunted using T4 DNA polymerase, and the vector closed by ligating the blunt ends. To generate the -729/+61 *PITX1* promoter-luciferase reporter construct, the -3895/+61 construct was digested with KpnI, cohesive ends blunted using T4 DNA polymerase, DNA digested with XmnI restriction enzyme, and the vector closed by ligation. From the -729/+61 construct, the rest of the *PITX1* promoter-luciferase reporter constructs (-524/+61, -374/+61, -279/+61, -214/+61, -169/+61 and -84/+61) were generated by amplification with various forward primers containing a XhoI restriction site at the 5' end and a single reverse primer binding to the 3' end of the pGL4 vector multiple cloning site (MCS) (Supplementary Table S-IV). By using the XhoI restriction site generated by the forward primer and the HindIII restriction site from the MCS, we cloned this fragment into a pGL4 vector containing the luciferase gene.

For the FLAG-PHB1 construct, human *PHB1* cDNA (OriGene) was amplified from the second codon to the stop codon with specific primer pairs containing EcoRI and XhoI restriction sites at the 5' and 3' ends of the insert, respectively (Supplementary Table S-IV). These inserts were then cloned in-frame, using the same restriction sites in a plasmid

(pLPC) vector containing thrice-repeated FLAG epitopes (generously donated by Dr. Gerardo Ferbeyre's laboratory).

Luciferase assay

1.35×10^5 cells from the C28/I2 cell line were seeded into 12-well plates. Sixteen hours later, the cells were co-transfected in each well with 250 ng of pGL4 vector containing *PITX1* promoter fragments and 100 ng of β -galactosidase (β -gal) reporter vector (Clontech, used as a control to normalize the firefly luciferase signal). To study *PITX1* repression by PHB1, 100 ng of pLPC-FLAG-PHB1 vector or equivalent empty vector were transfected into the cells, using 5 μ l of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) per well, according to manufacturer's instructions. After 48 hours, cells were washed twice with PBS and lysed in 200 μ l of Glo Lysis Buffer (Promega).

Luciferase assays were performed using 30 μ l of cell lysate 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, and 10 mg D(-)-Luciferin (Roche) at pH 7.7). Luciferase counts were obtained using a Wallac VICTOR² plate reader (PerkinElmer). 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) incubated for 5-10 minutes at room temperature. β -gal counts were measured at 405 nm absorbance using the DTX 880 Multimode Detector-Microplate Reader (Beckman Coulter). Firefly luciferase counts were normalized using β -gal values. Each experiment was performed in triplicate.

Nuclear extract

10-cm dishes of confluent OA primary chondrocytes or C28/I2 cells were washed three times, and the cells scraped in cold PBS. These were centrifuged at 500 g for 5 minutes at 4°C and resuspended in 2 ml of buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1% NP-40, 500 nM DTT and 1X Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail). To facilitate cytoplasm disruption, this was followed by a 25-minute incubation on ice with short vortexing pulses every 3 minutes. After centrifugation at 600 g for 10 minutes at 4°C, the crude nuclear fraction pellet was resuspended in buffer B (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.1% Triton X-100 and 1X Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail), layered over 30% sucrose (w/v in buffer B without Triton X-100), and centrifuged at 3500 g 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 with three 15-second pulses using a Sonifier S-150D (Branson) at output 7. The nuclear extract was centrifuged at 13000 g for 10 minutes at 4°C to pellet the debris, and the protein concentration was determined using a Protein Assay Kit (Bio-Rad).

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Nuclear extracts (5 µg of protein) were incubated for 30 minutes on ice in a 20-µl 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 a radiolabelled probe (14 ng, 100000 cpm). For supershift analysis, nuclear extracts were pre-incubated for 30 minutes on ice then incubated for 1 hour on ice in the presence of 4 µg of E2F antibodies. The sequence for the E2F-like (wild-type) probe was 5'-CTGTGCCTCACTGGCGGCAGTCCTGCTCAA-3' and for the E2F-like mutant probe, 5'- CTGTGCCTCACTGGTGGCAGTCCTGCTCAA-3'. Samples were then separated on native 7% polyacrylamide gel (29:1 acrylamide/bisacrylamide) and run in 0.5x Tris-borate-EDTA buffer at 180 V for 3 hours with a recirculation pump for the buffer and a cooling tank.

Nuclear complexes precipitation by DNA pulldown.

Nuclear extracts (300 μ g of protein) prepared from cultured human OA articular chondrocytes were initially incubated in presence of 25 μ l of streptavidin-magnetic beads slurry (BioClone) in order to remove unspecific protein interactions. Following this, pre-cleared nuclear extract were incubated with 5 μ g of biotinylated ds probe (5'-CTGTGCCTCACTGGTGGCAGTCCTGCTCAA-3') for 2 h at 4°C with slow agitation in 1X EMSA binding buffer. 50 μ l of streptavidin-magnetic beads slurry was added and after 1 h of incubation at 4°C the bound complexes were recovered using a magnetic stand and several washes according to the manufacturer's specifications. The complexes were then detached from the beads in a boiling mixture of NuPAGE 4x LDS loading buffer (Invitrogen) and β -mercaptoethanol. After centrifugation, the supernatant was loaded on a SDS-PAGE gel and visualized by Coomassie blue staining.

Peptide sequencing analysis.

Bands containing proteins from the DNA pulldown assay and EMSA were cut, washed, sliced, dried and rehydrated in ammonium bicarbonate buffer. Proteins were digested with trypsin and extracted from the gel pieces using 50% acetonitrile and 0.1% formic acid. Samples were evaporated to dryness and resuspended in 3% acetonitrile-0.1% formic acid in a final volume of 20 μ l.

MS analysis.

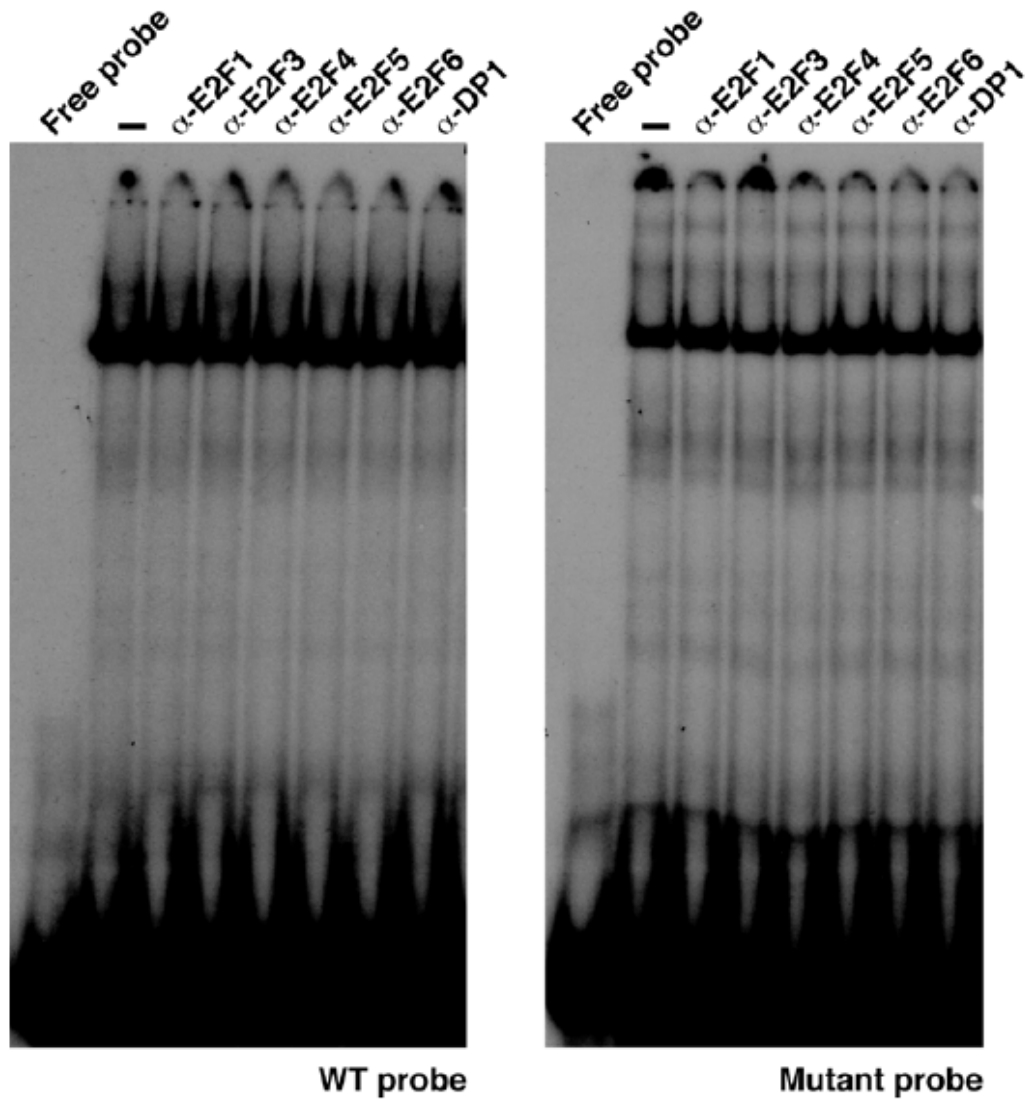
Samples (10 μ l volume) were analyzed using a LC-MS/MS system consisting of Agilent 1100 Series nanoflow liquid chromatography system and 1100 Series LC MSD SL ion trap mass spectrometer (Agilent Technologies). Peptides were enriched on a Zorbax 300SB-C18 trap column (5 μ m, 5 x 0.3 mm) and separated by reversed phase on a Zorbax 300SB-C18 analytical column (3.5 μ m, 150 x 0.075 mm, Agilent) with a gradient of 5-90%

acetonitrile in 0.1% formic acid at a flow rate of 300 nl/min. The column eluent was sprayed directly into the mass spectrometer. Spectra were interpreted using Spectrum Mill software (Agilent) and NCBI NR mammalian database.

Extraction parameters with Spectrum Mill software:

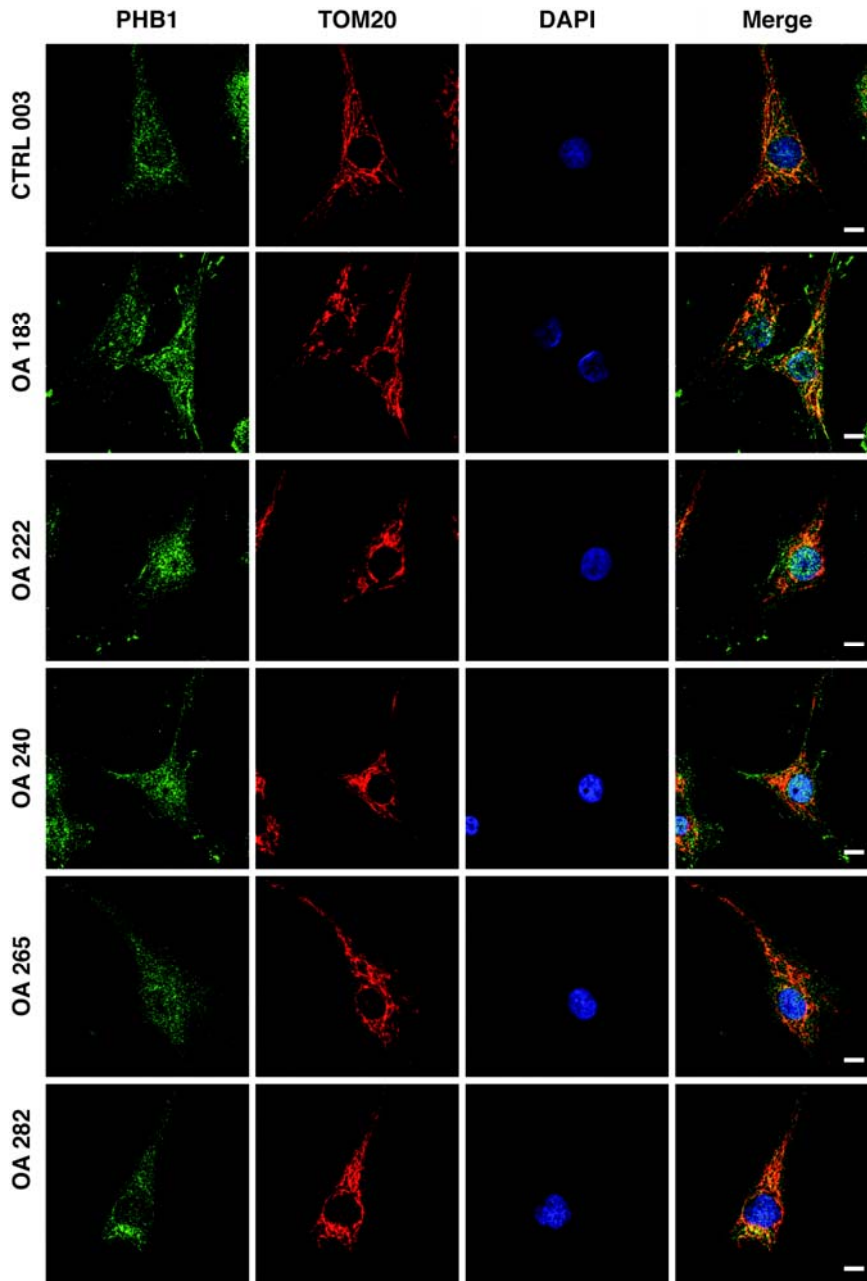
Cysteine modification: carbamidomethylation; sequence tag length >1; mass range of precursor ions: 600.0 to 4000.0 Da; scan time range: 0 to 300 minutes; scans were merged for same precursor m/z: +/- 15 seconds; +/- 1.4 m/z.

Supplementary Figures



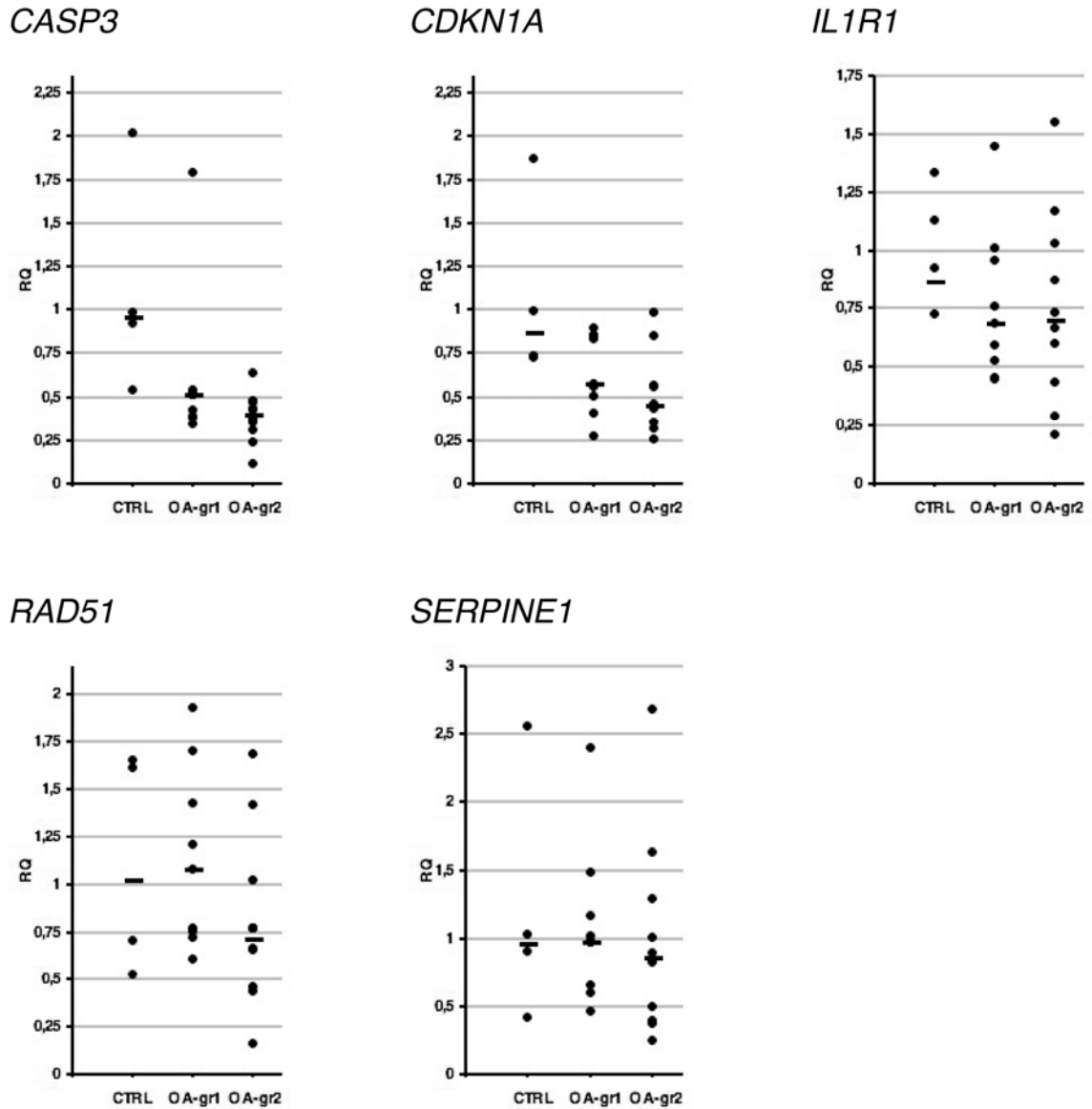
Supplementary Figure S1. EMSA with nuclear extract from OA chondrocytes and different E2F antibodies.

Electrophoretic mobility shift assay performed using nuclear extract from chondrocytes of osteoarthritis patients combined with a wild type (WT) or mutant probe corresponding to the sequence of the E2F-like response element of the *PITX1* promoter. No supershift was detected when the indicated antibodies were added.



Supplementary Figure S2. Immunofluorescence against PHB1 and TOM20 in articular chondrocytes.

Immunofluorescence against PHB1 and TOM20, a mitochondrial marker, on primary chondrocytes from one control subject and five different patients with osteoarthritis (OA). 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 mm).

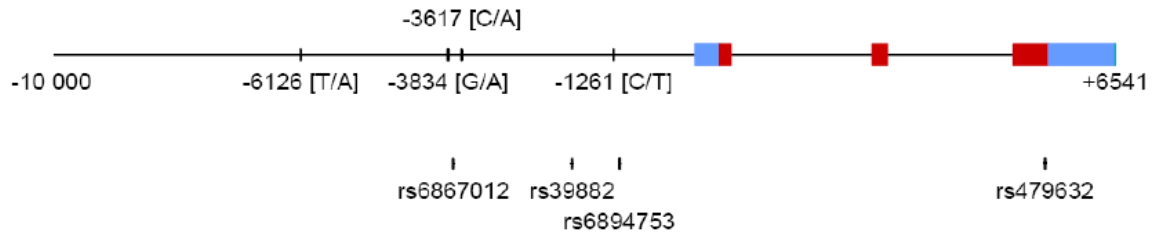


Supplementary Figure S3. Real time RT-PCR performed against E2F target genes in articular chondrocytes.

Real time RT-PCR performed against E2F target genes *CASP3*, *CDKN1A*, *IL1R1*, *RAD51* and *SERPINE1* in chondrocytes from 19 patients with osteoarthritis (OA) and 4 non-OA patients (controls, CTRL). OA patients were classified into two subgroups (OA-gr1, OA-gr2) as described in Figure 1A. Black dashes represent the median value for each group. Differences were not statistically significant.

Supplementary Tables

Supplementary Table S-I. *PITX1* SNP analyses with genomic DNA from 92 control subjects and 91 patients with osteoarthritis (OA).



Position ^a	SNP id	Genotype Controls (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	92	0	0	0	91	0	0	0
-3751	rs6867012	73	17	2	0	69	20	2	0
-3617	n/a	92	0	0	0	91	0	0	0
-1906	rs39882	33	47	11	1	32	46	13	0
-1261	n/a	92	0	0	0	89	0	0	2
-1173	rs6894753	92	0	0	0	90	0	0	1
+5447	rs479632	46	42	4	0	49	36	6	0

^aPositions 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)

Supplementary Table S-II. Prohibitin peptides identified by mass spectrometry.

Peptide number	Peptide sequence	Molecular weight (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

Supplementary Table S-III. List of primers used in real-time RT-PCR to detect mRNA and ChIP-identified genomic DNA.

Primer name	Orientation	Nucleotide sequence
<u>mRNA detection</u>		
<i>ACTB</i>	Forward	5'_GGAAATCGTGCGTGACAT_3'
	Reverse	5'_TCATGATGGAGTTGAAGGTAGTT_3'
<i>BRCA1</i>	Forward	5'_AGGAAATGGCTGAACTAGAAG_3'
	Reverse	5'_TCTGGATTCTGGCTTATAGGG_3'
<i>CCNA2</i>	Forward	5'_CGTGGACTGGTTAGTTGAAG_3'
	Reverse	5'_CAAACCTCTGCTACTTCTGGG_3'
<i>CCNE1</i>	Forward	5'_GGCCTTGTATCATTTCTCGTC_3'
	Reverse	5'_TGTCTCTGTGGGTCTGTATG_3'
<i>DDB2</i>	Forward	5'_GCATCAAGGACAAACCCAC_3'
	Reverse	5'_CCAGGCTACAAAACCAGATG_3'
<i>E2F1</i>	Forward	5'_GTCCAAGAACCACATCCAGTG_3'
	Reverse	5'_TCCTGGGTCAACCCCTCAAG_3'
<i>E2F2</i>	Forward	5'_TGGGTAGGCAGGGGAATGTTTG_3'
	Reverse	5'_AGTCACATAGGCCAGCCTCTTG_3'
<i>E2F3</i>	Forward	5'_AAGCGGTCATCAGTACCTCTCAG_3'
	Reverse	5'_CAAGAGACGTATCATAACCGCGTT_3'
<i>PHB</i>	Forward	5'_TTCACAGAAGCGGTGGAAG_3'
	Reverse	5'_CGCCTTTTTCTGTGTGCTCA_3'
<i>PITX1</i>	Forward	5'_GCTACCCCGACATGAGCA_3'
	Reverse	5'_GTTACGCTCGCGCTTACG_3'
<i>TFDP1</i>	Forward	5'_ACGTCTAACGGCACAAGGTT_3'
	Reverse	5'_CTGAGACCCATTGGAGCTTG_3'
<i>Actb</i> (mouse)	Forward	5'_GGAAATCGTGCGTGACAT_3'
	Reverse	5'_TCATGATGGAATTGAATGTAGTT_3'
<i>Pitx1</i> (mouse)	Forward	5'_GCCTCAACCCGTGAAGTGAATG_3'
	Reverse	5'_GCGTAAACTCCAGCAGTGATCC_3'
<u>Genomic DNA Detection</u>		
<i>PITX1</i> -3746/-3643	Forward	5'_CGGCACAGAGTCCTGAGTTCATA_3'
	Reverse	5'_CTCACTGGCTCCTTAGGCTTCCT_3'
<i>PITX1</i> -3235/-3011	Forward	5'_AGGAAGGGTCCTCATGGTGACTAC_3'
	Reverse	5'_CTGCTTCAGCATCCAGCTCACTTG_3'
<i>PITX1</i> -2455/-2284	Forward	5'_GCACTAACAGTGAGGAAACACGCC_3'
	Reverse	5'_GAATGGTCTGTCTGTGGGCCCTCA_3'
<i>PITX1</i> -1835/-1673	Forward	5'_TCATGGAGGGAGATCTCAGCTTGG_3'
	Reverse	5'_GTGGAGAGACAGCACAGCTCCTTA_3'
<i>PITX1</i> -1350/-1176	Forward	5'_GCTTCTTTCCAGGCAGACAATCC_3'
	Reverse	5'_GACCTCAGCGTCTTGAGCAAACA_G_3'
<i>PITX1</i> -272/-218	Forward	5'_TCGAGGCCAGATGCGTTTCTTT_3'
	Reverse	5'_GGTGACACACCGAGTTCTCCCTC_3'
<i>TK promoter</i> ^a	Forward	5'_TCCCGGATTCCCTCCACGAG_3'
	Reverse	5'_TGCGCCTCCGGGAAGTTCAC_3'

^a Wang S et al, 2002.

Supplementary Table S-IV. List of primers used for vector construction.

Primer name	Nucleotide sequence of primer
<i>PITX1</i> promoter -3895 bp KpnI_(forward)	5'_GGGTACCGCTCAGCCATTCTCAGGAAC_3'
<i>PITX1</i> promoter -3034 bp KpnI_(forward)	5'_GGGTACCCAAGTGAGCTGATGCTGAA_3'
<i>PITX1</i> promoter -524 bp XhoI (forward)	5'_CACTCGAGAGGCTGGAGAAGGAGGGGCA_3'
<i>PITX1</i> promoter -374 bp XhoI (forward)	5'_CACTCGAGTGTTCTCGCCAGGGCTGGGGAC TTC_3'
<i>PITX1</i> promoter -279 bp XhoI (forward)	5'_CACTCGAGACTCGCAGGCCAGATGCGTTTC_3'
<i>PITX1</i> promoter -214 bp XhoI (forward)	5'_CACTCGAGGAAGGAGGGAGAGGCGCG_3'
<i>PITX1</i> promoter -169 bp XhoI (forward)	5'_CACTCGAGAAGGTGGCTGCGGAGGGGGA_3'
<i>PITX1</i> promoter -84 bp XhoI (forward)	5'_CACTCGAGTTGGGGCTGGATTCCGCCCGCG CT_3'
<i>PITX1</i> promoter +61 bp EcoRV (reverse)	5'_GGATATCGGCAGAGTCTGTCTTAAAGCGA_3'
pGL4 3' MCS (reverse)	5'_GTCTTCGAGTGGGTAGAATGGCG_3'
<i>PHBI</i> _EcoRI_(forward)	5'_GCGAATTCTGCTGCCAAAGTGTGTTGAGTCCA TTGGC_3'
<i>PHBI</i> _XhoI_(reverse)	5'_GCCTCGAGTCACTGGGGCAGCTGGAGGA_3'