

Université de Montréal

Altération de l'interaction entre la PTH et LRP6 dans les ostéoblastes humains arthrosiques via  
DKK2

Par

Bichra Madiha

Sciences Biomédicales  
Centre de recherche du CHUM Notre-Dame  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade M.Sc en Sciences Biomédicales  
Option générale

Janvier 2015

©, Bichra Madiha 2015

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé:

Altération de l'interaction entre la PTH et LRP6 dans les ostéoblastes humains arthrosiques via  
DKK2

Présenté par :

Bichra Madiha

est évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Walid Mourad  
président-rapporteur

Dr Daniel Lajeunesse  
directeur de recherché

Dre Florina Moldovan  
membre du jury

## Résumé

L'ostéoarthrose (OA) se caractérise par une perte du cartilage articulaire, une sclérose osseuse, et une inflammation de la membrane synoviale. Des études *in vivo* et *in vitro* indiquent que les modifications du tissu osseux sont responsables de la perte du cartilage articulaire. Les ostéoblastes (Ob) OA présentent une réduction de la réponse à l'hormone parathyroïdienne (PTH), un signal anabolique important pour le tissu osseux, versus les Ob normaux. Le récepteur à la PTH (PTH-R) interagit avec le LRP6, le récepteur des ligands Wnts, et les antagonistes Dickkopf (DKK) bloquent cette interaction. Puisque le niveau de DKK2 est élevé en réponse au TGF- $\beta$ 1 dans les OA Ob, nous proposons que DKK2 altère l'interaction LRP6/PTH-R, le recyclage de PTH-R, et inhibe la réponse à la PTH.

Nous avons utilisé des Ob OA et normaux humains en culture primaire. L'expression de PTH-R, LRP6 et DKK2 est mesurée par RT-PCR. Les niveaux protéiques de LRP6, PTH-R et DKK2 ont été déterminés par immunobuvardage. L'inhibition de DKK2 s'est effectuée par siRNA et l'AMP cyclique (AMPc) a été mesurée par ELISA. L'effet de TGF- $\beta$ 1 sur l'expression de DKK2 et PTH-R a été testé sur des cellules d'ostéosarcome SaOS-2.

L'expression de PTH-R et LRP6 est similaire entre Ob normaux et OA, mais le niveau protéique de PTH-R est réduit dans les Ob OA. Par contre, l'expression et la production de DKK2 sont plus élevées dans les Ob OA. L'inhibition de DKK2 ne modifia pas l'expression de LRP6 et PTH-R dans les Ob OA mais a augmenté le niveau protéique de PTH-R détecté par immunobuvardage alors que celui de LRP-6 demeura inchangé. L'inhibition de DKK2 dans les Ob OA entraîna une augmentation de PTH-R dans la fraction membranaire et une diminution de la fraction intracellulaire. Les résultats de l'inhibition de la voie de clathrine par le triflupromazine ont montré une expression accrue du récepteur PTH dans la fraction membranaire qui peut être due à l'inhibition de sa dégradation par la voie de clathrine.

L'induction de DKK2 dans les cellules SaOS-2 par TGF- $\beta$ 1 entraîna l'inhibition de PTH-R mais non celle de LRP6. L'inhibition de DKK2 dans les Ob OA a stimulé la production d'AMPc en réponse à la PTH par les Ob OA. En outre, le traitement de TGF- $\beta$ 1 dans les cellules SaOS-2 réduit la production d'AMPc en réponse à la PTH.

Ces résultats démontrent que les niveaux élevés de DKK2, via l'inhibition de la signalisation Wnt/b-caténine, sont aussi responsables de l'altération de la réponse à la PTH observée dans les Ob OA. Le niveau élevé de DKK2 diminue spécifiquement l'affichage membranaire de PTH-R dans ces cellules et non son expression. Ces résultats suggèrent donc une altération du cross-talk entre LRP6 et PTH-R dans les Ob OA en lien avec leur niveau de DKK2.

**Mots clés:** Ostéoarthrose, os sous-chondral, ostéoblaste, signalisation Wnt, PTH-R, DKK2, LRP-6

## ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is characterized by loss of articular cartilage, bone sclerosis and synovial membrane inflammation. In vivo and in vitro studies indicate that the changes in bone tissue are responsible for the loss of articular cartilage. OA Osteoblasts (Ob) show a reduced response to parathyroid hormone (PTH), an important anabolic signal for bone tissue, versus normal Ob. The PTH receptor (PTH-R) interacts with LRP6, a receptor of Wnt ligands, and DKK antagonists block this interaction. Since DKK2 production is high in OA Ob whereas DKK2 is increased in normal Ob in response to TGF- $\beta$ 1, we propose that DKK2 alters the LRP6/PTH-R interaction, PTH-R recycling and inhibits the response to PTH.

We used human OA and normal osteoblasts in primary culture. PTH-R, DKK2 and LRP6 expression were measured by RT-PCR. LRP6, PTH-R and DKK2 protein levels were determined by immunoblotting. Inhibition of DKK2 levels in OA Ob was performed by DKK2-siRNA, and cAMP production was measured by ELISA. The effect of TGF- $\beta$ 1 on DKK2, PTH-R and cAMP production was tested in osteosarcoma cells SaOS-2.

In OA Ob, PTH-R and LRP6 mRNA levels were not changed following DKK2 siRNA treatment. However, PTH-R protein expression increased while that for LRP-6 remained unchanged after treatment with DKK2-siRNA. Compared to control, the distribution of PTH-R was higher in the membrane fraction and lower in the intracellular fraction in OA Ob following DKK2 inhibition. In contrast, LRP6 levels remained almost unchanged following these treatments. The results of the inhibition of the clathrin pathway by triflupromazin showed an increased expression of the PTH receptor in the membrane fraction that may be due to inhibition of their degradation by clathrin pathway. In OA Ob, DKK2 inhibition stimulated cAMP production in response to PTH. DKK2 induction by TGF- $\beta$ 1 in SaOS-2 cells, as assessed by qRT-PCR, caused the inhibition of PTH-R

protein expression but not of LRP6. In addition, TGF- $\beta$ 1 treatment in SaOS-2 cells reduced cAMP production in response to PTH.

These results demonstrate that high levels of DKK2 in OA Ob are responsible for the altered response to PTH. DKK2 antagonists decrease specifically PTH-R membrane display while they do not affect LRP6 recycling. These results suggest an altered cross-talk between LRP6 and PTH-R in OA Ob due to high levels of DKK2 in these cells.

**Tags:** Osteoarthritis, subchondral bone, osteoblast, Wnt signaling, PTH-R, DKK2, LRP-6.

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Dédicace.....	ix
Remerciements.....	x
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	1
1. Les pathologies rhumatismales.....	2
1.1. Les ostéoporoses.....	2
1.2. Les arthrites.....	3
1.2.1. L'arthrite dégénérative.....	4
1.2.2. L'arthrite inflammatoire.....	4
2. L'arthrose.....	4
2.1. Les tissus affectés dans l'arthrose.....	5
2.1.1. Le cartilage ariculaire.....	5
2.1.2. La membrane synoviale.....	6
2.1.3. La capsule articulaire, les tendons, et les ligaments des tissus conjonctifs denses.....	7
2.1.4. L'os sous chondral.....	7
2.2. Les différents types d'arthrose: primitive et secondaire.....	7
2.3. Les facteurs de risque.....	8
2.4. L'évolution de l'arthrose.....	9
3. Organisation structurale du tissu osseux.....	11
3.1. Composition du tissu osseux.....	12
3.1.1. Les cellules osseuses.....	13
3.1.1.1. Les ostéoblastes.....	13
3.1.1.2. Les ostéocytes.....	14
3.1.1.3. Les ostéoclastes.....	15
3.1.2. Le remodelage osseux.....	16
4. L'os sous chondral.....	17
4.1. Sclérose de l'os sous chondral.....	18
4.2. Dérégulation du phénotype cellulaire.....	19
5. Les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'arthrose.....	20
5.1. La voie du nuclear Factor-KB (NF-KB).....	20
5.2. La voie des MAPKinases.....	21
5.3. Les voies de signalisation Wnt.....	23
5.3.1. La voie de signalisation canonique Wnt/ $\beta$ -caténine.....	24
5.3.2. Les voies de signalisation Wnt non canoniques.....	26
5.3.3. La signalization Wnt et le remodelage osseux.....	26
6. La parathormone et la formation osseuse.....	28
7. Hypothèse de recherche.....	31
CHAPITRE 2: MANUSCRIT.....	33
CHAPITRE 3: DISCUSSION.....	62
CHAPITRE 4: CONCLUSION.....	71
CHAPITRE 5: RÉFÉRENCES.....	73

## Liste des Figures

### CHAPITRE 1: INTRODUCTION

Figure 1: <b>Structure du cartilage articulaire</b> .....	6
Figure 2: <b>Dégradation protéolytique de la matrice cartilagineuse</b> .....	10
Figure 3: <b>Libération des produits de dégradation dans le liquide synovial</b> .....	11
Figure 4: <b>Transformation d'un ostéoblaste en ostéocyte</b> .....	15
Figure 5: <b>La voie de signalisation de MAPKinase</b> .....	22
Figure 6: <b>Schéma de la signalisation canonique Wnt/<math>\beta</math>-caténine</b> .....	26
Figure 7: <b>Modulation de la signalisation Wnt par les protéines DKK</b> .....	29

### CHAPITRE 2: MANUSCRIT

Figure 1: <b>Effect of DKK2 disruption in OA osteoblasts on the distribution of PTH-R, LRP6 and IGF-1R between the membrane and cytosolic fraction</b> .....	53
Figure 2: <b>Effect of DKK2 disruption in OA osteoblasts on the production of PTH-R and LRP6</b> .....	54
Figure 3: <b>Effect of DKK2 disruption in OA osteoblasts on the production of cAMP in response to PTH</b> .....	55
Figure 4: <b>Effect of TGF-<math>\beta</math>1 stimulation on the regulation of PTH-R abundance and cAMP production in SaOS-2 cells</b> .....	56
Figure 5: <b>Effect of DKK2 disruption and inhibition of clathrin-dependent recycling in OA osteoblasts on the distribution of PTH-R, LRP6 and IGF-1R between the membrane and cytosolic fraction</b> .....	57



## Liste des abréviations

ADAMTS A Disintegrin And Metalloproteinase with a Thrombospondin type-1 motif  
AINS Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens  
ALPase Alkaline Phosphatase  
Ca<sup>2+</sup> calcium ion  
DKK Dickkopf  
Dsh Dishevelled  
ELISA enzyme-linked immunosorbent assay  
ERK Extracellular Signal-Regulated Kinase  
Fz Frizzled  
GSK3 Glycogen Synthase Kinase 3  
IGF Insulin Growth Factor  
IL Interleukin  
LEF Lymphoid Enhancer-binding Factor  
LDL Low density Lipoprotein  
LRP LDL Receptor-related Protein  
OA Osteoarthritis  
Ob Osteoblast  
OPG Osteoprogesterin  
PCP Planar Cell Polarity  
PGE Prostaglandin  
PKC Protein Kinase C  
PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> phosphate ion  
PTH Parathyroid Hormone  
RANKL Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand  
ROR Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor  
RYK Receptor tyrosine Kinase  
sFRP secreted Frizzled-Related Protein  
siRNA small inhibitory RNA

SOST Sclerostin

TCF T-Cell Factor

TGF Transforming Growth Factor

TNF Tumor Necrosis Factor

## **DÉDICACE**

*Je dédie ce travail, à mes très chers parents qui ont toujours su me réconforter et me conseiller durant mes études*

*A Mon mari Hicham*

*A ma fille Nadine*

*À toutes les personnes qui me sont chères.*

## Remerciements

Mes remerciements les plus vifs s'adressent à mon directeur de recherche, le professeur Daniel Lajeunesse pour m'avoir confiée un projet tout aussi passionnant. Je tiens à vous exprimer ma gratitude pour votre encadrement de qualité, suivi, disponibilité, compréhension et pour vos encouragements continus. Je vous remercie aussi pour votre patience lors de la correction de mon manuscrit.

J'exprime ma profonde gratitude, et mes expressions de reconnaissance au Dr Pascal Reboul et Dr Élie Abed de m'avoir apporté une aide très appréciable en plus d'être de formidables collègues. De m'avoir guidée tout en me laissant libre dans mes choix.

J'aimerais aussi particulièrement remercier tous les autres membres de l'unité de recherche en arthrose au centre de recherche de l'université de Montréal pour l'aide qu'ils ont pu m'apporter.

Merci à mes proches notamment mes parents, ma famille, mes deux sœurs et frères et mon mari. Sans vous, rien n'aurait possible, merci de votre soutien moral et de votre amour...

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

## **1. Les pathologies rhumatismales**

Les maladies rhumatismales regroupent plusieurs dizaines d'affection de l'appareil locomoteur qui touchent essentiellement la population âgée. Elles présentent un impact considérable sur la qualité de vie (la société d'arthrite). Les rhumatismes se traduisent souvent par des douleurs, des déformations et de l'impuissance fonctionnelle. Ils se retrouvent particulièrement sous plusieurs niveaux de sévérité (1). Le développement de la maladie rend les patients non autonomes et dépendants de tierces personnes (2, 3).

Généralement, les maladies rhumatismales se manifestent par de l'inflammation, et par une irritation et la dégénérescence du tissu conjonctif et son système nerveux. Elles affectent particulièrement la fonction du système locomoteur provoquant des problèmes de mouvement tout particulièrement au niveau des articulations, des tendons et des muscles (4).

Il existe plus d'une centaine de pathologies considérées comme des maladies rhumatismales dont les plus fréquentes sont l'arthrose, les douleurs lombaires, les ostéopathies, la fibromyalgie et l'arthrite rhumatoïde (5). Le 'National Arthritis Data Workshop Group' aux Etats-Unis (4) estime la prédominance de l'arthrite et les ostéoporoses à partir des données de plusieurs enquêtes différentes sur une large population de 50 à 70 ans, souffrant de maladies rhumatismales, suivis par la fibromyalgie et l'arthrite rhumatoïde qui sont cités ensuite, alors que les douleurs lombaires ont une prédisposition à diminuer dans cette population.

### **1.1. Les ostéoporoses**

L'ostéoporose est une maladie généralisée du squelette. Elle présente un grand problème de santé publique à cause de la morbidité et la mortalité associées aux fractures ostéoporotiques surtout au niveau de la hanche et des vertèbres. L'incidence des fractures liées à l'ostéoporose croît de façon rapide avec l'âge dans les deux sexes. En effet, des études françaises ont montré une augmentation exponentielle de l'incidence des fractures avec l'âge (6,7,8).

L'ostéoporose est une maladie très répandue chez les femmes après la ménopause à cause de la diminution de la masse osseuse et la carence en hormones féminines (œstrogènes). Généralement, la perte osseuse débute quelques années avant la ménopause mais s'accélère nettement lorsque débute la carence ostrogénique. Les formes d'ostéoporose les plus fréquentes se résument en 4 cas cliniques: l'ostéoporose post-ménopausique, l'ostéoporose chez l'homme, l'ostéoporose secondaire

et l'ostéoporose chez l'enfant (9).

La fragilité osseuse causée par l'ostéoporose touche des sites osseux caractéristiques dont les plus fréquents et étudiés sont ceux du poignet, des vertèbres et de l'extrémité supérieure du fémur. Les études biomécaniques montrent que la densité minérale osseuse est le déterminant essentiel de la fragilité osseuse (9). En effet, le tissu osseux joue un rôle métabolique important dans le maintien de l'homéostasie calcique. Il existe un remaniement permanent de ce tissu, appelé le remodelage osseux qui comporte une phase de résorption, assurée par les ostéoclastes, et de formation, assurée par les ostéoblastes. La perte osseuse s'explique par l'augmentation de la résorption du tissu osseux par rapport à sa formation.

## **1.2. Les arthrites**

Le mot « arthrite » veut dire inflammation de l'articulation : « arthr » signifie articulation et « ite », inflammation. L'inflammation est une réaction de défense immunitaire due à une agression (10), et il désigne un état caractérisé par la douleur, la raideur, la rougeur et l'enflure.

Il existe plusieurs formes d'arthrite. C'est la maladie la plus répandue au Canada, touchant des personnes de tous âges, de tous niveaux de condition physique et de toutes les origines (11). Seize pour cent des Canadiens adultes ont reçu un diagnostic d'arthrite, toutes formes confondues, et environ un enfant canadien sur mille est atteint de polyarthrite juvénile. Ce qui en fait une des maladies chroniques infantiles les plus courantes (12). Autrefois, le terme « rhumatisme » était utilisé fréquemment pour désigner l'arthrite alors qu'il est non spécifique et indique tout problème persistant de douleur et de raideur des articulations, des tendons et des ligaments.

L'arthrite et le rhumatisme sont des affections qui augmentent avec l'âge. En effet, d'après un sondage effectué au Canada en 2000 et 2001, moins de 5 % des personnes âgés entre 25 et 34 ans ont reçu un diagnostic d'arthrite ou de rhumatisme, alors que cette proportion passait à près de 40 % chez les personnes de 65 à 74 ans (13).

L'arthrite désigne plusieurs maladies ayant des causes distinctes et chacune présente des caractéristiques particulières. Elle a plusieurs origines par exemple, infectieuse (ex : arthrite septique), réactionnelle/post-infectieuse, ou micro cristalline (ex : goutte).

L'arthrite se divise en 2 catégories: l'arthrite dégénérative (arthrose) et l'arthrite inflammatoire (ex: polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante, etc.).

### **1.2.1. L'arthrite dégénérative**

L'arthrite dégénérative, désignée comme l'ostéoarthrose ou l'arthrose, touche le cartilage, le tissu osseux et la membrane synoviale. De son côté, le cartilage devient dur et commence à s'user et s'amincir. Par ailleurs, le tissu osseux subit un épaissement, ou sclérose osseuse. Diverses hypothèses tendent à expliquer ce phénomène dont la perte de cartilage et une réaction de correction de la part du tissu osseux, un mécanisme inné du tissu osseux, et/ou une cause systémique.

Cet épaissement osseux provoque une diminution de la mobilité de l'articulation. Dans certains cas, il est aussi possible de trouver de petits morceaux de cartilage détachés qui flottent dans l'articulation (14). L'arthrite dégénérative peut devenir douloureuse causant une enflure et commence à présenter des signes inflammatoires mais elle ne peut pas être considérée comme une arthrite inflammatoire proprement dite car la cause de l'inflammation est la dégradation de l'articulation.

### **1.2.2. L'arthrite inflammatoire**

L'arthrite inflammatoire, souvent appelée arthrite, ou polyarthrite rhumatoïde, est due à l'attaque de la synoviale par le système immunitaire. Ce dernier libère des substances chimiques s'attaquant aux articulations et causant par conséquence une enflure, de la douleur, de la chaleur et de la raideur. Ces substances peuvent conduire à l'endommagement du cartilage et de l'os (14,15). La polyarthrite rhumatoïde est trois fois plus fréquente chez la femme que chez l'homme. Elle débute habituellement par des douleurs de fin de nuit avec une raideur matinale et un gonflement des articulations. Les atteintes articulaires se localisent essentiellement au niveau des petites articulations et des extrémités (mains, pieds). Cependant toutes les articulations peuvent aussi être atteintes, y compris le rachis cervical (15).

## **2. L'arthrose**

L'arthrose est la forme la plus courante d'arthrite, touchant environ 27 millions de personnes en Amérique et plus de trois millions de Canadiens. C'est une véritable maladie du cartilage, de l'os



sous-chondral et de la synoviale. Contrairement aux idées reçues, l'arthrose ne répond pas seulement au phénomène d'usure du tissu cartilagineux lié à l'âge mais c'est la résultante de phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral (16).

## **2.1. Les tissus affectés dans l'arthrose**

Pour mieux comprendre le mode d'installation de l'arthrose, nous allons présenter les différents éléments de l'articulation.

### **2.1.1. Le cartilage articulaire (17, 18, 19).**

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif dur non minéralisé. Il présente une faible activité métabolique. Il est constitué d'un seul type cellulaire appelé les chondrocytes et d'une matrice extracellulaire dense composée principalement d'eau, de collagène et de protéoglycanes.

L'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme de la matrice articulaire est crucial pour le cartilage articulaire. Le mélange de liquide et de la matrice fournit un cartilage hyalin avec une viscoélasticité élevée responsable de la répartition des charges. Le cartilage a une structure organisée qui peut être fonctionnellement et structurellement divisée en quatre zones: la zone superficielle, la zone centrale, la zone profonde et la zone de cartilage calcifié (Figure 1).

La zone superficielle est la surface d'articulation qui offre un espace de glissement lisse et résistant au cisaillement. Cette zone constitue environ 10% à 20% de l'épaisseur du cartilage articulaire. C'est la zone la plus riche en collagène.

Les fibrilles de collagène dans cette zone sont denses et présentent un alignement très ordonné parallèlement à la surface articulaire. Les chondrocytes de cette zone présentent un aspect allongé. Ils expriment des protéines qui présentent de bonnes fonctions de lubrification et de protection et sécrètent relativement peu de protéoglycanes.

La zone centrale comprend de 40% à 60% du volume du cartilage articulaire. Cette zone présente une compression supérieure à celle de la zone superficielle et un arrangement organisé de moins de fibres de collagène. Les fibrilles de collagène de la zone centrale sont plus épaisses et alignées obliquement par rapport à la surface.

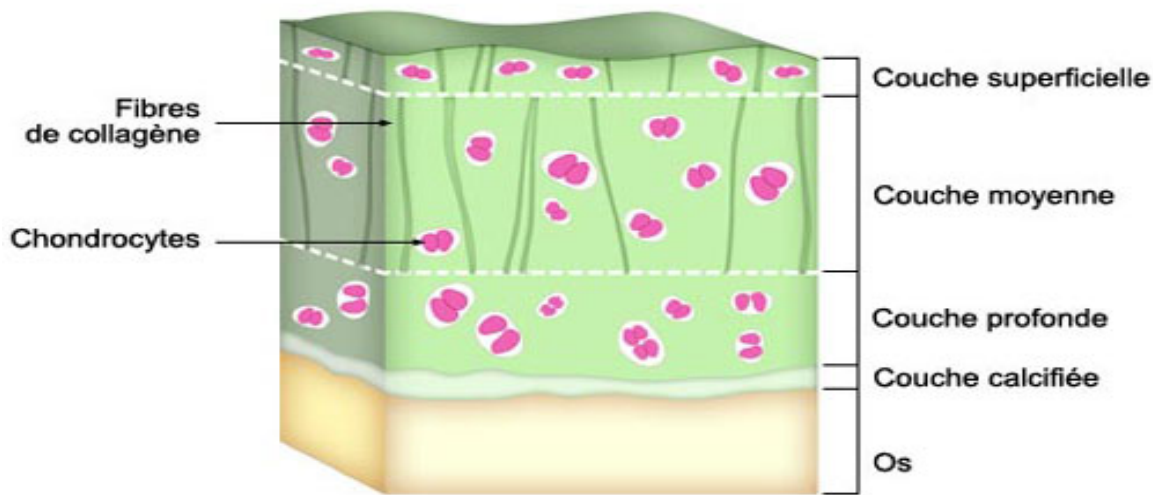
La zone profonde représente 30% du cartilage et se compose d'un grand diamètre de fibrilles de collagène orientées perpendiculairement à la surface articulaire. Cette couche contient la

concentration d'eau et de protéoglycanes la plus faible.

Le cartilage calcifié repose directement sur l'os sous chondral, et il est constitué de petites cellules dans la matrice chondroïde.

Les chondrocytes articulaires sont considérés comme relativement inactifs métaboliquement en raison de l'absence d'un apport vasculaire mais sont responsables du maintien de l'intégrité de la matrice extracellulaire et peuvent répondre à des stimuli mécaniques, des facteurs de croissance et des cytokines.

Le rôle du cartilage articulaire dans l'articulation est principalement mécanique. L'interaction entre sa couche superficielle et le liquide synovial lui confère une qualité de glissement supérieure diminuant les forces du frottement osseux.



**Figure 1: structure du cartilage articulaire.** Becerra, J. *et al.* Articular cartilage: structure and regeneration. *Tissue Engineering Part B Review*, Vol.16, No.6, pp. 617-627 (2010).

### 2.1.2. La membrane synoviale

La membrane synoviale présente des propriétés de viscoélasticité assurant l'étirement et le pliage pendant le mouvement des articulations. Les fonctions supplémentaires de la synoviale normale comprennent le maintien de la lubrification du cartilage, la régulation des volumes de liquide synovial et la nutrition des chondrocytes au sein des articulations. Les cellules de la membrane synoviale produisent deux molécules spécifiques, la lubricine et l'acide hyaluronique (HA), importantes pour la protection et la préservation de l'intégrité des surfaces de cartilage articulaire. Elles réduisent aussi les frottements à la surface articulaire (21).

La membrane synoviale est la zone centrale de la pathologie dans plusieurs maladies articulaires, dont la polyarthrite rhumatoïde (PR) et la spondylarthrite (SpA). En effet, au cours d'une maladie rhumatismale, la membrane synoviale libère une quantité accrue de liquide qui s'accumule dans l'articulation. Cette dernière gonfle et cause une douleur. L'inflammation de la membrane synoviale provoque des lésions du cartilage et de l'os au-dessous dues au pannus synovial et les enzymes inflammatoires contenus dans le liquide qui commencent à agresser ces structures.

### **2.1.3. La capsule articulaire, les tendons et les ligaments, des tissus conjonctifs denses**

Les ligaments sont des structures de tissus mous qui relient les os entre eux, alors que la capsule articulaire est un sac étanche qui entoure l'articulation. Leur rôle est principalement mécanique grâce aux fibres de collagène et d'élastine dont ils sont riches (22).

### **2.1.4. L'os sous-chondral**

L'os sous chondral est un tissu osseux lisse des articulations. Il ressemble à un os lamellaire mais il est moins rigide. Sa rigidité et sa force dépendent de la densité du contenu minéral. L'épaisseur de l'os sous chondral varie d'une espèce à une autre, en fonction de l'âge, du poids, et de l'articulation (23). L'os sous chondral est situé entre le cartilage et l'os.

Cette zone de contact permet l'apport d'énergie aux chondrocytes profonds. Le rôle de l'os sous chondral se résume dans deux fonctions principales: la première est l'amortissement des chocs en minimisant le stress mécanique du tissu cartilagineux (24). En effet, l'os sous-chondral se caractérise par une grande capacité d'amortissement pour l'articulation. Celle-ci se traduit par la déformation des trabécules pour soulager la surcharge ou l'induction de microlésions et de remaniements afin de renforcer l'os. La seconde fonction de l'os sous-chondral est le maintien d'une surface articulaire incongruente qui permet de répartir les forces sur leur ensemble lorsque des charges importantes s'appliquent sur l'articulation (25).

## **2.2. Les différents types d'arthrose: primitive et secondaire**

Il existe deux catégories d'arthrose, dites « primitive » et « secondaire ».

L'arthrose primitive est l'altération d'une articulation que l'on qualifie d'idiopathique, c'est à dire elle n'est attribuable à aucune cause évidente, quels que soit les facteurs de risque présents. Ce type

d'arthrose touche généralement plusieurs articulations, comme la colonne vertébrale, les doigts, les articulations de la racine des pouces et des gros orteils (26).

L'arthrose est qualifiée de secondaire lorsqu'on peut identifier sa cause. Elle est due fréquemment à une blessure antérieure de l'articulation, mais elle peut également y avoir d'autres facteurs de risque.

### **2.3. Les facteurs de risque**

Plusieurs facteurs peuvent contribuer à l'évolution de l'arthrose tels que:

**L'Âge:** L'augmentation de l'incidence de l'arthrose est corrélée avec l'âge. En effet, la fréquence de l'arthrose augmente lorsque le cartilage n'a plus ses qualités originelles de souplesse, d'élasticité suite à un changement de la composition de la matrice et la réduction des fonctions des chondrocytes (27).

**Prédisposition génétique:** Les facteurs héréditaires jouent un rôle primordial dans l'apparition de l'arthrose, du fait qu'ils sont incriminés dans au moins 50 % des cas d'arthrose des mains et de la hanche. Le rôle exact des facteurs génétiques est toujours inconnu dans l'évolution de cette pathologie, mais certaines recherches avancent l'hypothèse d'un lien avec la forme des os et du cartilage (23)

**Obésité:** La prévalence de l'arthrose est dépendante de l'augmentation du poids corporel. En effet, plusieurs études ont démontré un lien certain entre l'indice de masse corporelle (IMC) et l'arthrose. L'hypothèse d'un impact biomécanique comme facteur déclencheur et/ou aggravant de l'arthrose a souvent été présentée (27). Ainsi, suivant cette hypothèse, en éliminant l'excès de poids, il y aurait une diminution de la pression exercée sur les articulations surtout des pieds, des genoux et des hanches et par conséquence, une atténuation de la douleur.

Pourtant, des éléments contradictoires, non encore expliqués, existent :

- Les sujets qui souffrent d'une arthrose des genoux font beaucoup plus souvent que les autres une arthrose des mains.
- L'articulation de la cheville n'est pratiquement jamais altérée chez les patients qui présentent un excès du poids.
- L'arthrose des mains est celle qui a le plus fort lien avec l'IMC suivi de l'arthrose du genou (28).

**Blessures:** L'arthrose peut survenir suite à des lésions articulaires dues à une blessure. Elles mènent à une incongruité articulaire ou une instabilité récurrente qui modifie la façon de bouger de l'articulation, et entraîne une arthrose secondaire (27).

**Sexe:** L'arthrose est plus fréquente chez les femmes que les hommes. Cette pathologie est plus souvent symptomatique et évolutive après la ménopause. La diminution du taux d'oestrogène peut expliquer l'accélération de la dégradation cartilagineuse soit par action sur les chondrocytes ou sur les cellules osseuses (23).

**Complications découlant d'autres formes d'arthrite:** Les articulations atteintes d'autres formes d'arthrite sont susceptibles de développer une arthrose. En effet, une arthrose secondaire peut se développer facilement dans les articulations endommagées par l'inflammation due à une polyarthrite rhumatoïde ou de goutte (27).

**Usure attribuable à l'usage :** L'usage intense des articulations, notamment chez les sportifs, peut mener à l'arthrose. En effet, en dehors des arthroses post-traumatiques (rupture du ligament croisé antérieur), l'arthrose est 10 fois plus fréquente chez les athlètes tout particulièrement au niveau de certaines articulations comme celles des genoux, des hanches et du rachis (28).

#### **2.4. L'évolution de l'arthrose**

L'évolution de l'arthrose peut se résumer en deux étapes principales:

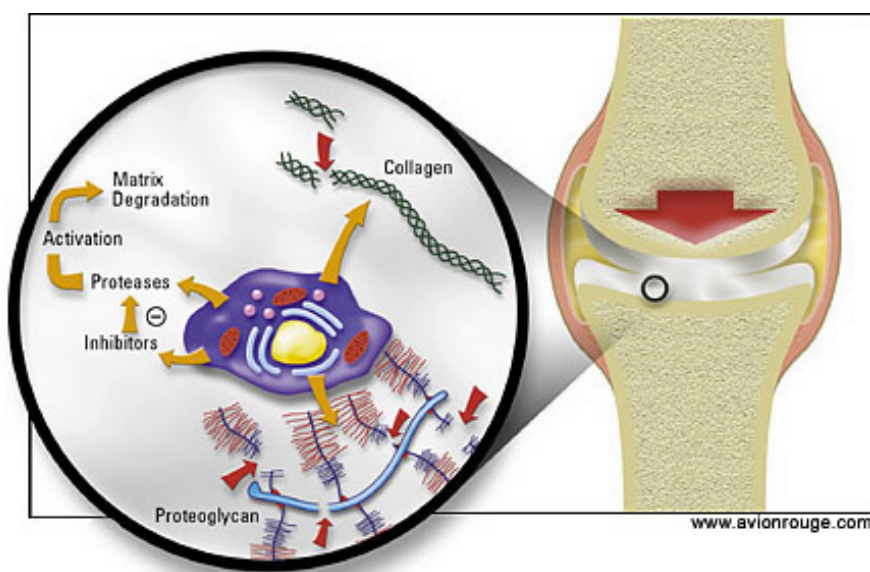
##### **- Au sein du cartilage articulaire**

Le cartilage est un élément essentiel de l'articulation, car il agit comme un amortisseur qui assure la fluidité du mouvement articulaire. Il est composé principalement par une matrice extracellulaire riche en protéines dont les principales sont les collagènes de type II et les protéoglycanes et par un type cellulaire, les chondrocytes, jouant un rôle important dans le maintien de l'intégrité tissulaire par la synthèse et la sécrétion du collagène (29).

La dégradation du cartilage par les métalloprotéases dont les plus importants sont les stromélysines, les collagénases, les gélatinases et les ADAMTS (a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif) conduit au grossissement des articulations atteintes sous l'effet d'une ossification attribuable aux mécanismes de cicatrisation de l'organisme. Dans les cas avancés de l'arthrose, le cartilage peut finir par disparaître complètement. Les os frottant alors les uns contre les autres entraînent une douleur accrue (30).

L'arthrose résulte des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral. Les premières modifications se déroulent au sein du cartilage articulaire (30).

Le début de l'arthrose se caractérise par une perte de cohésion entre les fibres de collagène superficielles (Figure 2). Ce relâchement conduit à l'exposition des charges négatives des protéoglycanes qui attirent des cations comme le sodium et l'eau, et par conséquent l'hyperhydratation du cartilage appelé "chondromalacie" ce qui lui fait perdre ses caractéristiques biomécaniques, et entraîne la fragilisation et le ramollissement du collagène (29).



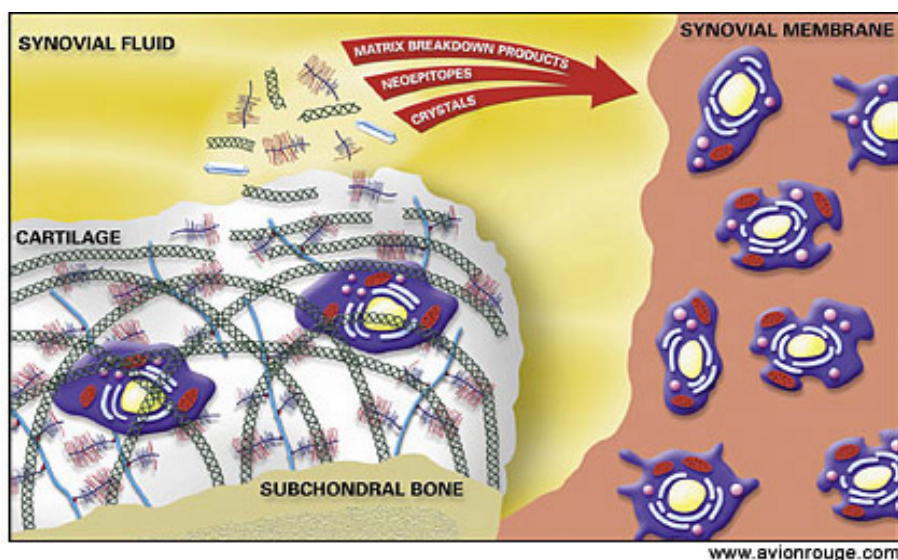
**Figure 2: Dégradation protéolytique de la matrice cartilagineuse.** Woolley DE, Tetlow LC. Observations on the microenvironmental nature of cartilage degradation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1997; 56:151–61.

### Modification de l'activité des chondrocytes

D'autres facteurs interviennent probablement dans la genèse de l'arthrose, comme l'activation métabolique des chondrocytes médiée par des cytokines dont l'interleukine 1 (IL-1). La synthèse de l'ADN, de collagène et de protéoglycanes augmente par les chondrocytes actifs et conduit à l'épuisement de ces derniers. Par conséquent, une phase plus durable de diminution de synthèse de collagène et de protéoglycane est installée. Ce phénomène contribue à rompre l'équilibre entre les enzymes et leurs inhibiteurs (31).

De plus, les nouveaux chondrocytes «épuisés», synthétisent des protéoglycanes et des fibrilles de

collagène plus fragile avec une capacité d'agrégation faible. Les fibres de collagène dégradé se libèrent dans le liquide synovial (Figure 3). La perte de protéoglycanes et la fissuration du cartilage entraînent une perte de chondrocytes par apoptose chondrocytaire (32). Malgré la multiplication des cellules restantes, elles perdent progressivement leur disposition initiale en colonnes pour former des amas de clones (31). Ceci entraîne une balance métabolique négative par prédominance du catabolisme sur l'anabolisme et une destruction progressive du cartilage.



**Figure 3: Libération des produits de dégradation dans le liquide synovial.** Carney, SL *et al.* Changes in proteoglycan turnover in experimental canine osteoarthritic cartilage. *Matrix*, (12): p. 137 (1992).

### 3. Organisation structurale du tissu osseux

L'os est le support du corps caractérisé par sa rigidité, sa dureté et sa puissance de régénération et de réparation. Il protège les organes vitaux. Il agit comme un réservoir pour l'homéostasie minérale de calcium et de facteurs de croissance comme les cytokines (33). Le tissu osseux est le matériel qui forme le squelette. On distingue deux types différents d'os.

Le premier est l'os cortical ou compact. C'est un tissu assez dense, solide qui entoure la moelle. Il est pénétré par les vaisseaux sanguins par l'intermédiaire d'un réseau de canalicules. L'os cortical joue un rôle important dans la croissance par apposition et la réparation des fractures. Il se trouve surtout dans l'arbre des os longs (34).

Le deuxième est l'os trabéculaire ou spongieux. Il est poreux et se trouve principalement près des surfaces articulaires, à la fin des os longs du squelette appendiculaire et dans les corps vertébraux du squelette axial. Il est caractérisé par une structure tridimensionnelle complexe. Sa disposition spatiale contribue à la force maximale pour le squelette dans son ensemble (33).

### **3.1. Composition du tissu osseux**

L'os est composé de cellules de soutien, à savoir, les ostéoblastes et les ostéocytes; des cellules impliquées dans le remodelage, à savoir, les ostéoclastes; d'une matrice minérale, de protéines non collagéniques appelées les ostéoïdes et de sels minéraux inorganiques déposés à l'intérieur de la matrice. Au cours de la vie, les os subissent des processus de croissance longitudinale et radiale, et de cycles de modélisation et de remodelage (34).

La formation osseuse se produit par des procédés intramembranaires ou endochondrale. Dans le processus intramembranaire, la formation osseuse commence lorsque les cellules mésenchymateuses se condensent en amas cellulaires et se différencient directement en ostéoblastes, tandis que dans le processus d'ossification endochondrale, les mêmes cellules forment d'abord une matrice de cartilage formé de collagène de type 2 qui est ensuite remplacé par du tissu ossifié (35). L'ossification intramembranaire est principalement responsable du développement des os plats du crâne (34, 36), tandis que l'ossification endochondrale se produit dans la formation des vertèbres, des os longs, et la réparation des fractures (33). Outre les différents processus sur la formation osseuse, il existe également des lignées embryonnaires distinctes qui sont impliquées dans la formation des différentes parties du squelette.

Un troisième type de développement des os est appelé formation par apposition. Ce processus se produit lors de l'élargissement de l'os et au cours du remodelage (36). Dans ce cas, les ostéoblastes s'attachent à l'os existant et sécrètent la matrice ostéoïde souvent en couches. Les ostéoblastes, emprisonnés dans la matrice qu'ils ont créée, deviennent ensuite des ostéocytes. Les trois types de formation se produisent constamment.

Les deux types d'os sont formés par deux tissus différents: l'os tissé et lamellaire. L'embryon du squelette se compose d'os tissé, qui est plus tard remplacé par de l'os lamellaire. Normalement, l'os tissé n'est plus dans le squelette après quatre ou cinq ans, mais il réapparaît au cours du processus de guérison après une fracture. Les deux types d'os diffèrent dans leur composition, organisation, croissance et propriétés mécaniques. L'os tissé est rapidement formé et mal organisé avec un



arrangement plus ou moins aléatoire de fibres de collagène et de cristaux de minéraux. L'os lamellaire est lentement formé, bien organisé et dispose de couches ou de lamelles parallèles qui le rendent plus fort que l'os tissé. Les os peuvent se développer, modifier leur forme (remodelage externe ou modélisation), et se réparer quand ils sont fracturés (fracture de guérison) et continuellement se renouveler par le remodelage interne. Tous ces processus sont régis par des modèles mécaniques, hormonaux et physiologiques. La croissance et la modélisation surviennent principalement pendant l'enfance (37). Le remodelage se poursuit tout au cours de l'âge adulte lorsque les os ont complété leur croissance. Le remodelage osseux se produit uniquement sur les surfaces internes de la matrice osseuse (surfaces trabéculaires de l'os spongieux et les systèmes haversiens d'os cortical).

### **3.1.1. Les cellules osseuses**

Il existe trois types de cellules osseuses, qui peuvent être classés selon leurs fonctions.

#### **3.1.1.1. Les ostéoblastes**

Les ostéoblastes proviennent des cellules souches mésenchymateuses (cellules ostéoprogénitrices) du stroma de la moëlle osseuse. Elles sont responsables de la création et du maintien de l'architecture du squelette. Ces cellules produisent les protéines et les régulateurs de minéralisation de la matrice extracellulaire lors de la formation, du remodelage osseux et de sa minéralisation postérieure (38).

En plus de la formation de l'os, les ostéoblastes régulent la différenciation des ostéoclastes et la résorption. En effet, l'interleukine 6 (IL6), produite en grande quantité par les ostéoblastes, provoque la prolifération des précurseurs des ostéoclastes. L'hyper-sécrétion d'IL6 pourrait être un des facteurs responsables de l'ostéolyse observée au cours du myélome et dans la perte osseuse liée à la ménopause (39).

Dans de nombreuses maladies humaines, la formation osseuse et le remodelage de l'os sont dérégulées et les ostéoblastes ont un rôle important dans la pathogenèse de ces troubles. Les ostéoblastes peuvent également se différencier en d'autres lignées cellulaires mésenchymateuses telles que les fibroblastes, les chondrocytes, les myoblastes et les cellules stromales de la moëlle osseuse, y compris les adipocytes, en fonction des voies de signalisation de transcription activées (40).

#### **Différenciation des ostéoblastes et formation osseuse**

L'ostéogenèse est un processus complexe qui implique la différenciation des cellules mésenchymateuses en pré-ostéoblastes et par la suite en ostéoblastes, ce qui conduit finalement à la synthèse et au dépôt de protéines de la matrice osseuse (38, 41). Les ostéoblastes expriment les gènes codant pour les protéines de la matrice osseuse, des protéines spécifiques qui servent à leur identification, comme la phosphatase alcaline et l'ostéocalcine, et sont également caractérisées par leur expression du récepteur à l'hormone parathyroïdienne et la production d'AMP cyclique en réponse à cette hormone.

Les protéines de la matrice osseuse comprennent, entre autres, du collagène de type I. Il représente 90% de la matrice organique de l'os et assure la solidité, la structure et l'élasticité du tissu osseux mature. Les protéines non collagéniques de l'os sont, en autres, l'ostéocalcine (protéine osseuse GLA), l'ostéopontine, l'ostéonectine et la sialoprotéine osseuse (42).

En outre, la protéoglycane décorine et la biglycane constituent des éléments importants de la matrice organique osseuse. Ces protéines se lient collectivement au calcium, ce qui est probablement responsable de la réglementation exquise du dépôt de cristaux d'hydroxyapatite et de l'orientation du cristal dans la matrice osseuse minéralisée (43).

Les protéines morphogénétiques osseuses (MPG, TGF- $\beta$ ) jouent un rôle important dans l'orientation des cellules mésenchymateuses. Le TGF- $\beta$  intervient aux premiers stades de la différenciation ostéoblastique et chondroblastique, par contre, quand les ostéoblastes arrivent à un stade avancé, le TGF- $\beta$  inhibe leur différenciation (45, 46).

Les facteurs de transcription sont des déterminants clés de la différenciation des ostéoblastes. En effet, plusieurs facteurs de croissance, des stéroïdes, des cytokines et des hormones polypeptides, régulent non seulement la croissance et le murissement des ostéoprogéniteurs mais aussi l'activité des ostéoblastes et leur apoptose (44).

Les ostéoblastes se disposent les uns à côté des autres pour former une bordure épithélioïde et ils vont synthétiser la matière extracellulaire non minéralisée (ostéoïde). Ces cellules vont se transformer ensuite en ostéocytes. Après l'achèvement de la formation osseuse, un ostéoblaste peut suivre l'une des trois voies suivantes: il peut devenir noyé dans sa propre matrice ostéoïde et poursuivre sa différenciation pour devenir un ostéocyte, il peut se transformer en ostéoblaste inactif, ou subir la mort cellulaire.

### **3.1.1.2. Les ostéocytes**

Les ostéocytes sont dérivés des ostéoblastes. Il a été rapporté que 10 à 20% des ostéoblastes se différencient en ostéocytes. Le mécanisme cellulaire et moléculaire qui régule ce processus n'est pas complètement compris (47). Il existe six types de cellules intermédiaires ou transitoires entre les ostéoblastes et les ostéocytes différenciées avec différentes caractéristiques morphologiques et moléculaires:

1- ostéoblaste, 2- ostéocyte ostéoblastique (préostéocyte I), 3- ostéoïde-ostéocyte, 4- (préostéocyte II), 5- jeune ostéocyte, 6- vieux ostéocyte.

La transformation d'un ostéoblaste à un ostéocyte dure environ 3 jours. Pendant ce temps, un ostéoblaste produit un volume de matrice extracellulaire trois fois son propre volume cellulaire. Chaque ostéocyte est logé dans des cavités creusées préalablement dans la matrice par des ostéoclastes. L'ostéocyte est caractérisé par des contours irréguliers. L'ostéocyte possède des prolongements qui lui permettent de communiquer avec d'autres ostéocytes grâce à des jonctions communicantes. C'est une cellule moins «active» que l'ostéoblaste mais elle participe au maintien de la matrice osseuse (Figure 4).



**Figure 4: Transformation d'un ostéoblaste en ostéocyte.** Johansson, H. *et al.* Sensory role for the cruciate ligaments. Clin Orthop Relat Res; 268:161-178 (1991).

### 3.1.1.3. Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules multinuclées qui dérivent des cellules souches hématopoïétiques. Leur voie de différenciation est commune à celle des macrophages et des cellules dendritiques (48). Elles sont uniques dans leur capacité à résorber l'os. La différenciation des ostéoclastes nécessite la stimulation des précurseurs par le facteur de stimulation des colonies (M-CSF), ainsi que la liaison de l'activateur du ligand NF-kB (RANKL) à son récepteur RANK (49). Les études sur les ostéoclastes constituent un axe important de la recherche qui promet d'avoir des solutions pour de nombreux aspects de maladies humaines, allant de l'ostéoporose au cancer métastatique.

Les ostéoclastes développent un mécanisme efficace et unique pour dégrader la matrice organique osseuse. La compréhension des processus cellulaires et moléculaires qui sont utilisés a augmenté de façon significative au cours de la dernière décennie.

La séquence d'événements cellulaires nécessaires à la résorption osseuse est appelée le cycle de résorption (50). Il nécessite plusieurs activités cellulaires, et il commence par la migration des ostéoclastes au site de la résorption, se poursuit par leur attachement à l'os, la dissolution de l'hydroxyapatite (la phase minérale dissout par acidification du compartiment de résorption) et la dégradation de la matrice organique sous l'action d'enzymes protéolytiques lysosomales. La résorption osseuse se termine par l'élimination des produits de dégradation de la lacune de résorption et l'apoptose des ostéoclastes.

Les cellules ostéoprogénitrices présentes à la surface de la matrice dégradée, au fond de la lacune (appelé ligne cémentante) se divisent et se différencient en ostéoblastes. Ces derniers synthétisent une nouvelle matrice extracellulaire qui remplit la lacune (51).

### **3.1.2. Le remodelage osseux**

L'os est un tissu vivant dynamique dont la forme et la structure s'ajustent en permanence pour fournir principalement un cadre structurel. Même après la croissance et le développement complets du squelette, l'os conserve sa capacité de changer sa structure interne par l'élimination des vieux tissus osseux et leur remplacement par des nouveaux formés par un processus qui s'appelle le remodelage osseux. Le remodelage est une propriété fondamentale de l'os qui permet l'adaptation aux changements mécaniques réduisant ainsi le risque de fracture (52, 53).

Le remodelage osseux résulte de l'activité de plusieurs équipes cellulaires appelées BMU (Basal Multicellular Unit), qui agissent de manière séquentielle et couplée dans le temps et l'espace. Les ostéoclastes vont d'abord détruire l'ancien tissu osseux, et les ostéoblastes interviennent ensuite

pour reconstruire un nouvel os. Dans un premier temps, les ostéoclastes creusent des lacunes dans l'os: c'est la phase de résorption. Ensuite, les ostéoblastes viennent au fond des lacunes creusées précédemment et comblent avec des protéines les trous formés constituant la phase de formation. Enfin arrive la phase de minéralisation, le tissu osseux jeune appelé tissu ostéoïde va se calcifier grâce à un cristal de calcium.

Le remodelage osseux se produit sous l'influence de facteurs exogènes et endogènes dont les plus importants sont des facteurs hormonaux. Les hormones calciotropes (PTH, vitamine D<sub>3</sub> et calcitonine) modulent le renouvellement du tissu osseux, soit directement ou en modifiant la production des facteurs locaux de régulation du métabolisme osseux principalement produits par les ostéoblastes et les cellules du microenvironnement osseux. En effet, la parathormone (PTH) a un effet stimulateur sur la production par les ostéoblastes du TGF- $\beta$ , du facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline (IGF-I) et de certaines protéines porteuses de l'IGF-1 (54).

#### **4. L'os sous-chondral**

Lorsque les articulations sont affectées par l'arthrose, cette dernière stimule le renouvellement de l'os sous-chondral qui semble être 20 fois plus actif par rapport au renouvellement de l'os normal.

Il a été rapporté que les explants de l'os sous-chondral chez les patients atteints d'arthrose produisent des niveaux élevés de phosphatase alcaline (ALP), et sécrètent plus d'ostéocalcine, d'ostéopontine, d'IL-6, IL-8, d'urokinase activateur du plasminogène (uPA), de prostaglandine E<sub>2</sub> et du facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline (IGF-1) par rapport à des explants d'os normaux. Ces facteurs biochimiques sécrétés conduisent à une activité anabolique osseuse accrue des ostéoblastes de l'os sous-chondral, illustrée par la formation d'ostéophytes. Cependant, cette activité de formation osseuse n'est pas nécessairement accompagnée par une minéralisation équivalente (59). La fraction osseuse non minéralisée conduit à des ostéoïdes abondants dans l'os sous-chondral arthrosique qui minéralisent peu.

Le cartilage est l'autre tissu touché principalement par l'arthrose. De nombreuses études sont effectuées pour comprendre l'association du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral à l'arthrose, l'effet des changements du cartilage sur l'os sous chondral et vice versa, ainsi que les interactions physique et moléculaire entre eux (55, 56, 57, 58, 60).

Dans les premières phases de l'arthrose, on constate des micro-fissures au niveau du feutrage hyalin qui devient mou puis les fissures deviennent de plus en plus importantes jusqu'à mettre l'os sous-

chondral à nu. Malgré le concept d'absence de vascularisation ou d'innervation du cartilage articulaire, le contact intime entre l'os sous-chondral et le cartilage articulaire autorise la pénétration de néovaisseaux de l'os vers les couches profondes du cartilage. Ce contact intime permet aussi la diffusion de cytokines et de facteurs de croissance entre les deux tissus (61, 62).

Au cours du processus d'ostéarthrose, l'os sous-chondral va s'épaissir soit suite à la diminution de la capacité du cartilage à amortir les pressions biomécaniques normales ou en réponse à des facteurs intrinsèques ou extrinsèques qui modulent sa réponse anormale au cours de la pathologie. Cette néoformation osseuse est appelée ostéophytose. En général, la constitution des ostéophytes est considérée comme la réponse globale de l'os sous-chondral aux pressions qu'il subit, dans le sens de réparer la perte du cartilage avec la création de masses osseuses à proximité de la zone endommagée. La production locale de facteurs de croissance comme le TGF- $\beta$ , le FGF ou le BMP par les ostéoblastes pourrait être déterminante dans la constitution des ostéophytes (63).

#### **4.1. Sclérose de l'os sous-chondral dans l'arthrose**

La sclérose de l'os sous-chondral est le changement le plus fréquemment discuté dans l'arthrose. Ce phénomène a été décrit dans de nombreuses études cliniques et animales.

Radin *et al.*, ont été les premiers à suggérer que la sclérose osseuse peut jouer un rôle important dans la dégénérescence du cartilage. Ils ont émis l'hypothèse que la sclérose rend l'os sous-chondral plus rigide et diminue sa capacité d'absorption des chocs et, par conséquent, favorise l'augmentation des contraintes dans le cartilage sous-jacent.

La sclérose de l'os sous-chondral se caractérise par une synthèse accrue de la substance ostéoïde et une diminution du taux de minéralisation (65). Par intermittence, la sclérose osseuse peut influencer la dégénérescence du cartilage par la libération de signaux biochimiques. En raison de l'augmentation du métabolisme de l'os (65, 66), diverses cytokines, y compris les facteurs de croissance comme le facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline (IGF-1) et les protéines morphogéniques osseuses, responsables de la modulation de la prolifération et la différenciation des chondrocytes ainsi que la synthèse de la matrice osseuse, sont libérés (67).

La sclérose et la minéralisation de la matrice osseuse peuvent être étroitement liées. En effet, l'augmentation de la masse osseuse est peut être due à l'adaptation de l'os à la diminution de la minéralisation (67, 68).

Il existe également des indications selon lesquelles le volume de l'os et la minéralisation osseuse sont liés à la dégénérescence du cartilage. En effet, la structure osseuse et la minéralisation changent nettement au-dessous du cartilage. Ce changement est corrélé avec le degré de dégénérescence du cartilage sus-jacent (68).

#### 4.2. Dérégulation du phénotype cellulaire

Le rôle de l'os sous-chondral dans le développement des lésions cartilagineuses n'est pas seulement mécanique, mais également biochimique. En effet, des travaux ont montré que le phénotype des ostéoblastes de l'os sous-chondral était modifié. En comparaison avec des ostéoblastes normaux, les ostéoblastes arthrosiques se caractérisent par un comportement différent. Elles produisent davantage le facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline (IGF-I), le facteur de croissance TGF- $\beta$ 1, et l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) (69, 70). Des travaux provenant d'autres équipes ont par la suite émis l'hypothèse que ces changements de phénotype étaient exacerbés pour les ostéoblastes provenant des zones à plus forte lésion du cartilage en comparaison avec les zones avec peu ou pas de lésions du cartilage (71). Par contre, la reproduction de cette pression sur les ostéoblastes OA conduit à des expressions similaires pour tous ces paramètres (72).

De plus, les ostéoblastes arthrosiques modifient le métabolisme du collagène de type I. Elles synthétisent davantage la forme homotrimérique  $\alpha$ 1 du collagène de type I. Cette forme de collagène se caractérise par une capacité de minéralisation plus faible que la forme hétérotrimérique [ $\alpha$ 1 (I)]<sub>2</sub>  $\alpha$ 2 (I) (72).

Lajeunesse *et al.*, (73) a rapporté une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline et du niveau d'ostéocalcine dans les ostéoblastes humains arthrosiques isolés *in vitro*. Ces données ont été confirmées par les résultats de plusieurs études cliniques et études *in vitro* (74, 75, 76).

D'autres chercheurs ont aussi confirmé que les ostéoblastes arthrosiques sont associés à des niveaux élevés de prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) et de l'IL-6, contrairement aux cellules normales (77).

Des données récentes ont suggéré une relation étroite entre les systèmes OPG/ RANK/ RANKL et les changements des ostéoblastes arthrosiques. En effet, des études réalisées sur les ostéoblastes provenant de patients atteints d'arthrose ont démontré une expression anormale de l'OPG et de RANKL et par conséquent, un changement du rapport OPG/RANKL comparativement aux ostéoblastes normaux. Les ostéoblastes OA de stade «précoce» montrent une diminution marquée de l'OPG et une augmentation de niveau de RANKL, alors que les ostéoblastes OA de stade «avancé»

présentent une augmentation marquée de l'OPG et une diminution de RANKL (78). De plus, les ostéoblastes sous-chondraux OA de stade précoce et avancé expriment des isoformes membranaires et des niveaux de RANKL différents et sont modulés différemment par des facteurs ostéotropiques. Cela pourrait expliquer l'augmentation de la résorption osseuse chez les patients OA au stade précoce de la pathologie et la tentative d'une reprise de la formation osseuse chez les ostéoblastes OA de stade avancé.

## **5. Les voies de signalisations intra-cellulaires impliquées dans l'arthrose**

La compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'arthrose présente une évolution importante dans le domaine de la santé. En effet, la connaissance des voies de signalisation permettrait leur inhibition et par la suite le contrôle d'une succession d'évènements qui conduit à la production ou l'activation de plusieurs médiateurs de l'inflammation (79).

L'identification des cellules et molécules majeures impliquées dans l'inflammation arthrosique a conduit au développement de nouveaux médicaments (anticorps monoclonaux, protéines de fusion) orientés vers les cibles thérapeutiques (80).

Les voies majeures de la signalisation cellulaire de l'arthrose sont: la voie du «nuclear factor kappa B» (NF- $\kappa$ B), la voie des «mitogen activated protein kinase» (MAP kinases), la voie de signalisation canonique Wnt/ $\beta$ -caténine, et la voie de signalisation Wnt non-canonique (81).

Les stratégies de blocage des voies de signalisation suggérées sont par exemple l'inhibition d'une activité enzymatique de type kinase, la production d'uninhibiteur physiologique des voies de signalisation ou la diminution de l'expression d'une enzyme qui active la voie de signalisation par des oligonucléotides anti-sens ou des ARN interférents. Être capable de bloquer ces voies représente donc des alternatives thérapeutiques.

### **5.1. La voie du Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)**

Le facteur nucléaire kappa des cellules B activées (NF- $\kappa$ B) est un complexe de protéines qui contrôle la transcription de l'ADN. Le NF- $\kappa$ B est présent dans presque tous les types de cellules animales et est impliqué dans les réponses cellulaires à des stimuli comme le stress, les cytokines, les radicaux libres, l'irradiation ultraviolette, le LDL oxydé, et les antigènes bactériens ou viraux. Le NF- $\kappa$ B joue un rôle clé dans la régulation de la réponse immunitaire aux infections et peut être



compris comme étant une protéine responsable de la production de cytokines et la survie cellulaire (83, 84).

Le NF- $\kappa$ B est important dans la régulation des réponses cellulaires parce qu'il appartient à la catégorie des facteurs de transcription primaires, c'est à dire, des facteurs de transcription qui sont présents dans les cellules dans un état inactif et ne nécessitent pas une nouvelle synthèse de protéines afin de devenir actif. Ceci permet au NF- $\kappa$ B d'être l'un des premiers intervenants à des stimuli cellulaires nocifs (86). Les inducteurs de l'activité de NF- $\kappa$ B sont très variables y compris les espèces réactives de l'oxygène (ROS), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF $\alpha$ ), l'interleukine 1-bêta (IL-1 $\beta$ ), les lipopolysaccharides bactériens (LPS), l'isoprotérénol, et les rayonnements ionisants (86, 87).

Bien que le NF- $\kappa$ B joue un rôle bénéfique essentiel dans la physiologie normale, la régulation inappropriée de son activité est impliquée dans la pathogenèse de plusieurs maladies, y compris les maladies inflammatoires rhumatismales telles la polyarthrite rhumatoïde (RA), l'arthrose, l'athérosclérose, l'asthme, la sclérose en plaques, et la polyradiculonévrite inflammatoire chronique (87).

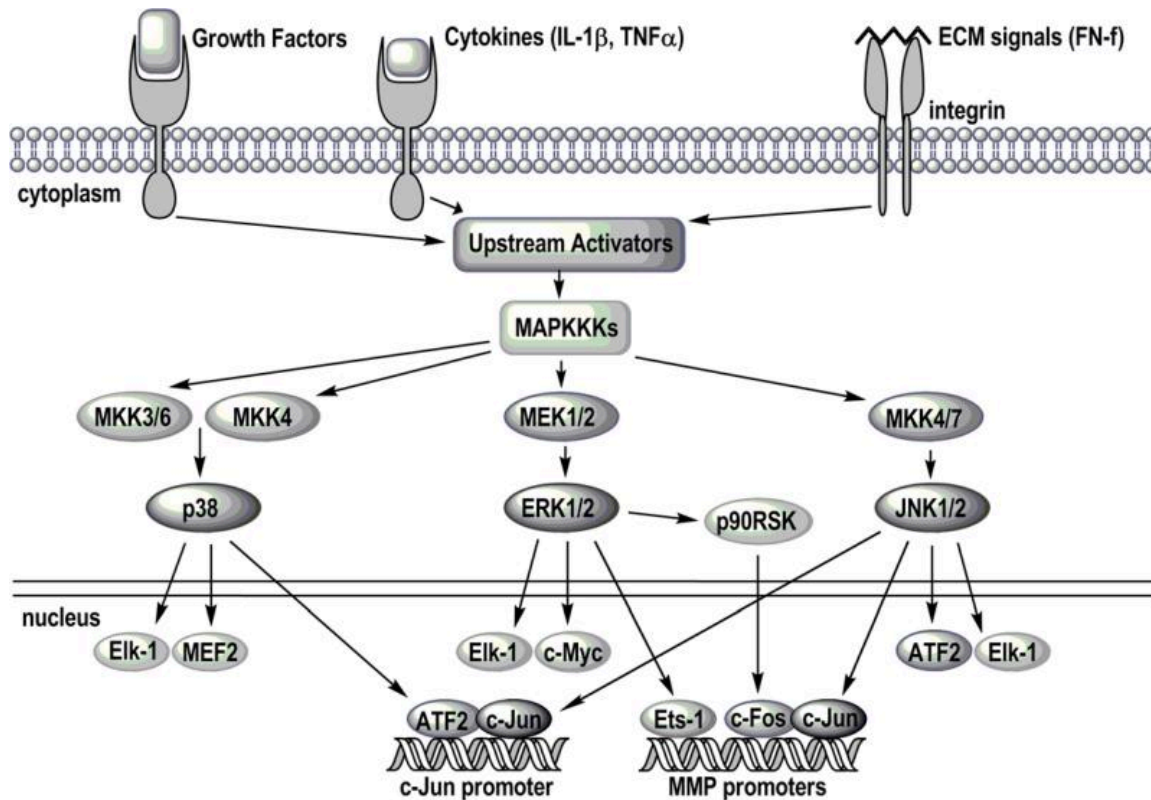
La protéine NF- $\kappa$ B est régulée par un complexe protéique composé des protéines IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  et de la protéine NEMO IKK $\gamma$ . Elle intervient dans la répression ou l'activation des gènes, et est retenue dans le cytoplasme par la protéine inhibitrice I $\kappa$ B- $\alpha$ . La dégradation de cette dernière par phosphorylation permet la translocation de NF- $\kappa$ B jusqu'au noyau et l'activation de la transcription des gènes cibles (88).

Chez les mammifères, la famille NF- $\kappa$ B est composée de cinq membres: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-KB1 (p50 et son précurseur p105) et NF-kB2 (p52 et son précurseur p100). Ils forment une variété d'homodimères et d'hétérodimères, dont chacun active un ensemble caractéristique de gènes. Les formes p50 et p65 NF- $\kappa$ B sont abondantes dans la polyarthrite rhumatoïde et l'arthrose synovite. La voie de signalisation NF- $\kappa$ B intervient dans la réponse inflammatoire des chondrocytes, entraînant des dommages progressifs de la matrice extracellulaire et la destruction du cartilage. Des études ont mis en évidence l'activation puissante de la NF- $\kappa$ B dans les chondrocytes articulaires suite à une stimulation avec les deux cytokines pro-inflammatoires, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ , qui jouent un rôle important dans le catabolisme du cartilage articulaire (89, 90, 91).

## **5.2. La voie des MAP Kinases (Mitogen Activated Protein Kinases)**

Les MAP kinases sont des Serine/ Threonine kinases divisées en 4 sous-familles qui comprennent les deux isoformes de « extracellular regulated kinase », c-Jun NH2-terminal kinase, également appelées les protéines kinases activées par le stress ou SAPK (trois isoformes - JNK 1, 2 et 3), p38 (quatre isoformes -  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), et ERK5. Cette dernière n'a pas été étudiée dans le cadre de l'arthrite. La plupart des études se concentrent sur les autres protéines.

Les MAP kinases sont activées par des cytokines, des facteurs de croissance et des protéines de la matrice qui se lient au divers récepteurs de tyrosine kinases, de la protéine G, des récepteurs couplés à des récepteurs de cytokines, et des intégrines (92). Les signaux générés par ces récepteurs de surface des cellules déclenchent une cascade d'événements qui conduit à l'activation en aval de l'un ou plusieurs MAP kinases (Figure 5).



**Figure 5: La voie de signalisation de MAP Kinase.** Lee, J., et al. Health care guideline: diagnosis and treatment of adult degenerative joint disease (DJD) of the knee. Institute for clinical systems improvement (ICSI). Site des ICSI, [En ligne]. <http://www.icsi.org/knowledge/detail.asp?catID=29&itemID=165> (2003).

Les kinases MAP kinase kinase (MAPKKKs) activent les kinases MAP-kinases (MKKS et MEK), qui à leur tour activent les MAP kinases (p38, ERK1/2 et JNK1/2). Cette activation en cascade se fait par phosphorylation en résidus sérine, thréonine ou tyrosine. Les MAP kinases activent d'autres kinases, comme p90RSK, et les facteurs de transcription qui régulent la transcription de gènes y compris Elk-1, MEF2, ATF2, c-Myc, Ets-1, et c-jun. De cette façon, toutes les trois MAP kinases sont impliquées dans l'expression des métalloprotéinases matricielles (MMP) et d'autres médiateurs impliqués dans le développement de l'arthrose (93).

Il a été montré que les MAP kinases sont activées dans le cartilage arthrosique, surtout l'ERK qui joue un rôle clé dans la destruction du cartilage. Les niveaux de JNK phosphorylée activés dans le cartilage humain arthrosique semblent aussi être plus élevés que ceux dans le cartilage normal (94). La phosphorylation de p38 est également plus élevée dans les tissus articulaires arthrosiques par rapport au tissu normal humain. Des études effectuées sur d'autres modèles comme le chien, dont une OA est induite chirurgicalement, ont prouvé que les ERK1/2, JNK et p38 ont été activées à un degré très élevé par rapport aux tissus provenant d'animaux opérés mais sans induction d'OA («sham»). Cependant, sur le même modèle, un composé (PD-0200347) a pu réduire les niveaux de phosphorylation de ERK et p38. Ce composé a été précédemment utilisé pour réduire le développement des lésions arthrosiques chez le modèle de chien, ce qui suggère que l'inhibition de l'activation de ERK est suffisante pour réduire les lésions d'arthrose chez ce modèle (85). À l'appui de ce fait, une étude réalisée chez le lapin avec une arthrose induite a démontré que l'inhibiteur de MEK 1/2 qui bloque l'activation de ERK, a également réduit la gravité des lésions arthrosiques (95).

### **5.3. La voie de signalisation Wnt**

Les protéines Wnt, pour «wingless-integration site», sont des glycoprotéines qui sont riches en cystéine. Elles sont produites en tant que protéines précurseurs qui contiennent une séquence signal N-terminale courte et un segment mature qui varie en longueur d'environ 320 à 400 acides aminés (96). Les ligands Wnts activent des voies de signalisation médiées par des récepteurs de surface cellulaire spécifiques pour réguler une variété d'activités cellulaires, y compris la détermination du destin cellulaire, la prolifération, la migration, la polarité et l'expression de gènes cibles.

Chez les mammifères, il y a 19 protéines Wnt différentes dont l'expression est spatialement et temporellement régulée au cours du développement. Il s'agit de Wnt-1, Wnt-7b, Wnt-2, Wnt-8a, Wnt-2b, Wnt-8b, Wnt-3a, Wnt-9a, Wnt-4, Wnt-9b, Wnt-5a, Wnt-10a, Wnt-5b, Wnt-10b, Wnt-6,

Wnt-11, Wnt-7a, Wnt-16b, Wnt7a/ b (20, 21). Le rôle général de certains d'eux peut être décrit comme suit:

Le Wnt-11 peut être impliqué dans le développement du cœur. Le Wnt-2 est produit par les cellules myoépithéliales mammaires, les cellules épithéliales et les fibroblastes de l'endomètre mammaires. Une expression accrue de Wnt-2 a été impliquée dans la pathologie du cancer colorectal. Wnt-2 a également été démontré pour être impliqué dans le remodelage dynamique de l'architecture dendritique. Les Wnt-1, -3a, -8 et -8b activent la signalisation par la voie canonique impliquant la  $\beta$ -caténine alors que les Wnt-4, -5a et -11 activent des voies de signalisation non-canoniques alternatives (97).

Les protéines Wnt libérées ou présentées à la surface des cellules de signalisation agissent sur les cellules cibles en se liant à l'un de plusieurs récepteurs de la famille Frizzled et, dans certains cas, un co-récepteur, tels que les protéines des récepteurs des lipoprotéines (LRP-5, LRP-6), liées à une tyrosine kinase. Ces récepteurs transmettent un signal à plusieurs protéines intracellulaires y compris la Dishevelled (Dsh), la glycogène synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3), l'axine, «l'adénomateux polyposis coli» (APC), et le régulateur transcriptionnel  $\beta$ -caténine (98, 99).

En général, il existe trois voies principales de signalisation Wnt primaires. La première est communément appelée la voie canonique bêta-caténine-dépendante et culmine dans l'accumulation de bêta-caténine. Les deux autres voies moins bien définies comprennent la voie Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  et la voie de polarité cellulaire planaire (PCP). Collectivement, ces voies régulent la survie cellulaire, la détermination de la destinée cellulaire, la formation de motifs de tissu, et l'homéostasie tissulaire.

### **5.3.1. La voie de signalisation canonique Wnt/ $\beta$ -caténine**

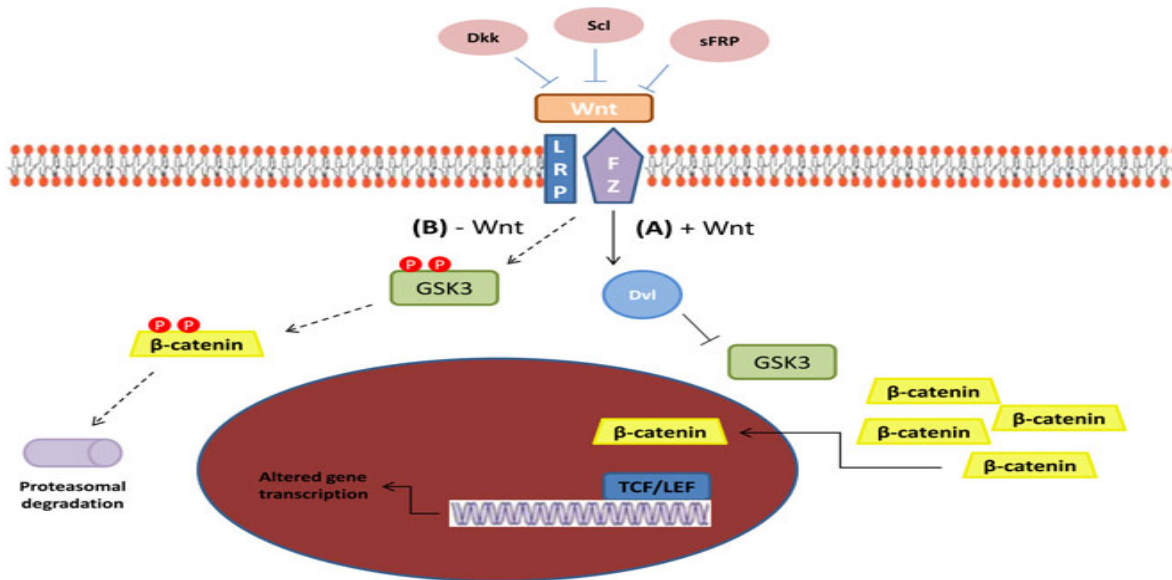
La  $\beta$ -caténine est une protéine cytosolique et nucléaire multi-fonctionnelle impliquée dans plusieurs aspects comme l'adhérence et la migration cellulaires, la prolifération et la différenciation. La fonction principale de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est la régulation de la concentration de la  $\beta$ -caténine dans la cellule (100). Des études antérieures ont proposé que, en absence de la signalisation Wnt, la  $\beta$ -caténine forme un complexe avec les protéines d'échafaudage et l'axine polyose adénomateuse (APC) pour former un complexe de dégradation. Ce dernier facilite la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine par le glycogène synthase kinase-3- $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) et le ciblage de la  $\beta$ -caténine phosphorylée pour la dégradation via la voie du protéasome (99). L'activation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine par les ligands Wnt provoque la rupture du complexe de

dégradation et une accumulation consécutive de la  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme (figure 6). La concentration accrue de la  $\beta$ -caténine conduit à la formation du complexe T-Cell Factor- $\beta$ -caténine dans le noyau de la cellule. Ce complexe active la transcription des gènes favorisant plusieurs fonctions cellulaires (101).

Les co-récepteurs LRP5/6 sont requis pour la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine. Bien que LRP6 soit plus puissant que LRP5 dans certains essais, des expériences n'ont pas révélé de différences qualitatives dans leurs mécanismes d'action.

Il existe plusieurs activateurs connus de la voie  $\beta$ -caténine y compris les R-spondines. La famille de protéines R-spondines a été récemment décrite et bien qu'elles soient structurellement différentes des ligands Wnt classiques, ces protéines R-spondines sont aussi capables d'activer la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine par interaction avec le complexe co-récepteur LRP5/6. De plus, les R-spondines sont en mesure d'empêcher l'interaction du complexe LRP5/6 avec les antagonistes de Wnt (98).

La voie de signalisation Wnt/  $\beta$ -caténine est un système clé de la régulation du remodelage du tissu osseux et cartilagineux. En effet, l'accumulation nucléaire de la  $\beta$ -caténine conduit à la formation de complexes avec des facteurs de transcription LEF/TCF et une augmentation de l'activité ostéoblastique (102).



**Figure 6: Schéma de la signalisation canonique Wnt/β-caténine en présence et en absence de Wnt.** À gauche, on voit qu'en absence d'agoniste, il y'a une phosphorylation de la β-caténine et le maintien de sa dégradation par le protéasome. À droite, on voit qu'en présence d'agoniste, il inhibe l'activité de GSK et par la suite la translocation de la β-caténine dans le noyau où il active la transcription des gènes Wnt-associés. El Hajjaji, H. *et al.* Treatment with calcitonin prevents the net loss of collagen, hyaluronan and proteoglycan aggregates from cartilage in the early stages of canine experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*; 12:904-11 (2004).

### 5.3.2. Les voies de signalisation Wnt non-canoniques

Dans les cellules animales, trois voies Wnt non canoniques, plutôt que les deux voies principales décrites plus haut, ont été décrites dans la littérature et restent mal comprises. Ces voies fonctionnent indépendamment de la β-caténine et, par conséquent, le ligand Wnt non-canonique se lie uniquement à des récepteurs Fz et co-récepteurs tels que ROR2 et RYK mais pas aux co-récepteurs LRP5/6 (103). Les ligands Wnt non-canoniques peuvent activer les voies Wnt/PCP, Wnt/Ca<sup>2+</sup> et Wnt/PKA.

La voie de signalisation Wnt/PCP commande des actions impliquées dans la polarité cellulaire plane (PCP). Elle utilise la protéine adaptatrice DVL pour activer la JUN-N-terminal kinase (JNK) à travers des protéines G de la famille RHO. De plus, cette voie influe l'organisation cellulaire en induisant des modifications dans l'actine du cytosquelette par l'activation de la GTPase RhoA et c-Jun amino (N)-terminal kinase (JNK) (104, 105).

La voie de signalisation Wnt/PKA joue un rôle dans l'expression du gène myogénique par l'activation de l'AMP cyclique.

La voie Wnt/Ca<sup>2+</sup> est activée via la liaison de son Wnt avec FZD qui active ensuite une phospholipase C par l'intermédiaire d'une protéine G. Cela permet d'une part, l'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire à travers la voie classique de l'inositol triphosphate, et d'autre part, l'activation d'une protéine kinase C via la formation de diacylglycerol. Cela régule ensuite l'adhérence cellulaire et la motilité. La voie de signalisation Wnt/Ca<sup>2+</sup> inhibe également la voie Wnt canonique en favorisant la dégradation de la  $\beta$ -caténine GSK3 indépendante (106, 107).

### **5.3.3. La signalisation Wnt et le remodelage osseux**

Depuis la découverte du rôle essentiel joué par la voie de signalisation Wnt dans la différenciation et la fonction des ostéoblastes, ainsi pour sa capacité de diriger les cellules précurseurs vers la formation d'ostéoblastes, des recherches et des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension des liens moléculaires entre la signalisation Wnt et le remodelage osseux (108, 109). Des études ont montré que les mutations de perte de fonction de la protéine LRP5 humaine (requis pour la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine) sont associées au syndrome ostéoporose-pseudogliome, qui se caractérise par une faible densité minérale osseuse et une fragilité du squelette alors qu'une mutation activant le corécepteur LRP5 pouvait produire un phénotype de masse osseuse importante. Ces phénotypes osseux humains sont en grande partie prouvés chez des modèles animaux avec une expression altérée de LRP5. En effet, les souris LRP5<sup>-/-</sup> ont présenté une faible masse osseuse due à une réduction de la prolifération des cellules précurseurs. En outre, les souris qui surexpriment le mutant G171V LRP5 dans les ostéoblastes ont amélioré l'activité de ces derniers, réduit leur apoptose et présenté un phénotype de masse osseuse élevée similaire à celui observé chez l'homme avec ces mutations (112, 113, 114).

De même, il a été montré que la perturbation des inhibiteurs endogènes de LRP augmente la capacité de Wnt à stabiliser la  $\beta$ -caténine et de stimuler l'ostéogenèse, confirmant ainsi davantage la preuve que la signalisation de corécepteurs LRP est important pour le développement des os (110).

La signalisation Wnt est régulée par plusieurs agonistes et antagonistes extracellulaires (111). En effet, malgré le nom que porte cette voie de signalisation, il y a d'autres agonistes, à part les ligands Wnt, qui peuvent activer la cellule via les récepteurs Fz et LRP. Les R-spondines, comme elles sont décrites ci-dessus, agiraient toutefois en synergie avec les protéines Wnt pour activer la  $\beta$ -caténine (115). La R-spondine-1 humaine favorise fortement la prolifération des cellules des cryptes intestinales, un procédé qui comprend la stabilisation de la  $\beta$ -caténine (116). Il a été prouvé que ces

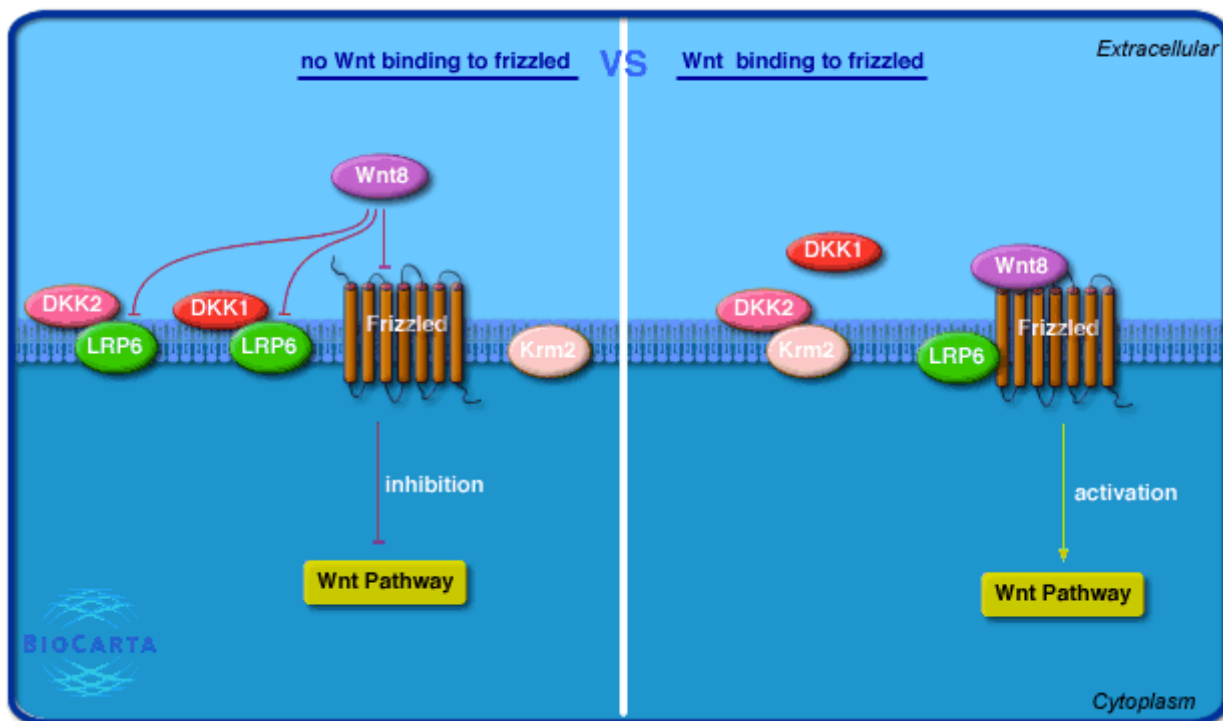
protéines ont un rôle important dans le métabolisme osseux. En effet, des études montrent que sur des ostéoblastes cultivés, les R-spondines peuvent interagir avec les domaines extracellulaires de LRP6 et FZD8 et activent les gènes rapporteurs de Wnt (116).

La classe des agonistes la plus largement utilisée dans la signalisation Wnt est celle qui inhibe le GSK3. Le lithium est le plus important d'entre eux. Il inhibe fortement le GSK3 et conduit à la stabilisation de la  $\beta$ -caténine (117). Ces inhibiteurs de GSK3 activent puissamment la voie Wnt, mais leur utilisation peut être une problématique parce que GSK3 représente un élément majeur pour plusieurs autres voies de signalisation et son inhibition aura certainement une incidence sur d'autres voies en plus de Wnt.

En outre, il existe de nombreux antagonistes extracellulaires de la signalisation Wnt. Ces derniers peuvent agir à différents niveaux. Ils peuvent être divisés en deux grandes classes. La première classe, qui comprend le récepteur Frizzled sécrété (sFRP), se lie principalement à des protéines Wnt; la deuxième classe comprend la famille Dickkopf (DKK), qui se lie à la sous-unité LRP du complexe de récepteur de Wnt. Les deux classes de molécules empêchent les interactions ligand-récepteur par des mécanismes différents (118).

Les quatre membres de la famille Dickkopf (DKK) (DKK-1 à Dkk-4), inhibent la signalisation Wnt. Par contre, les deux protéines Dkk1 et Dkk2 sont les membres les plus étudiés de la famille DKK. Récemment, il a été montré qu'elles sont impliquées dans la formation des os et liées à des maladies osseuses. La délétion d'un seul allèle du gène de DKK chez la souris provoque une augmentation de la formation et de la masse osseuse. En revanche, la surexpression de DKK1 dans les ostéoblastes conduit à une ostéopénie (119, 120). Les antagonistes DKK inhibent la voie de signalisation Wnt canonique par leur association avec la protéine Kremen, et leur liaison aux LRP5/6, ce qui empêche la formation du complexe Wnt-FZD-LRP, bloque le système et empêche l'activation de la  $\beta$ -caténine qui est dégradée par le protéasome (Figure 7). Cela conduit à une inhibition de la formation osseuse.





**Figure 7: Modulation de la signalisation wnt par les proteines DKK.** Reya T., Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005 ; 434 : 843-50.

## 6. La PTH et la formation osseuse

L'hormone parathyroïdienne (PTH) est le principal régulateur de l'homéostasie du calcium à travers son action sur les os. La PTH est critique pour le remodelage de l'os, en exerçant les deux effets anaboliques et cataboliques dans l'os *in vivo*. L'hormone parathyroïdienne intermittente a été le premier agent anabolisant approuvé pour le traitement de l'ostéoporose aux États-Unis. Tous les jours, des injections de PTH augmentent la formation osseuse en défaveur de la résorption, ce qui augmente la masse osseuse, alors que la perfusion continue augmente plus la résorption osseuse.

Dans les ostéoblastes, la PTH agit par l'activation du récepteur PTH, un récepteur couplé à une protéine G ce qui active l'adénylate cyclase et conduit à une production accrue de l'AMPc, et l'activation de la protéine kinase A (PKA), et la protéine kinase C (PKC) (121, 122).

La production de l'AMPc stimulée par la PTH est critique pour l'initiation de la cascade de signalisation qui conduit à une augmentation du nombre d'ostéoblastes (121).

Plusieurs études ont exploré les liens entre la PTH et les voies de signalisation Wnt. Il a été montré que l'administration de PTH à des cellules ostéoblastiques change l'expression de plusieurs parties

de la voie Wnt canonique et augmente la stabilité de la  $\beta$ -caténine dans ces cellules (123, 124). De même, Tobimatsu *et al.*, 2006 a montré que la PTH augmente les niveaux de la  $\beta$ -caténine dans les cellules ostéoblastiques.

Plus récemment, il a été établi que la PTH stimule la formation du complexe ternaire contenant la PTH, PTH1R, et LRP6, la phosphorylation rapide de LRP6, la stabilisation de la  $\beta$ -caténine dans les ostéoblastes avec une augmentation simultanée de la formation des os (125).

### **La voie de dégradation de récepteur PTH**

Le récepteur de l'hormone parathyroïdienne est un récepteur couplé aux protéines (GPCR) qui modulent le remodelage osseux et l'homéostasie extracellulaire. L'activation du récepteur PTH (PTH-R), sa désensibilisation, son internalisation et son recyclage se déroulent dans une voie cyclique. Lors de sa liaison avec l'hormone PTH, une cascade de signalisation enzymatique se déclenche conduisant à la formation osseuse. L'extrémité carboxy-terminale de PTH-R constitue le domaine de contrôle de son interaction avec la  $\beta$ -arrestine et son endocytose. Quand le PTH-R n'est pas recyclé vers la membrane plasmique, il subit une endocytose rapide par un processus lié aux endosomes formés de clathrine (126).

La clathrine est une protéine structurale, constituant l'enveloppe de certaines vésicules (on parle de vésicules mantelées). Elle a été isolée pour la première fois par Barbara pearse en 1975. La clathrine est constituée de trois chaînes lourdes de 192 kDa (HCs) liées à l'une ou l'autre à deux chaînes légères de 30 kDa LCs, LCa ou LCb présentant une forme en triskèle appelée triskélions dont les branches s'assemblent pour former des hexagones et pentagones. La clathrine va permettre l'invagination de la membrane, et la formation de vésicules.

De nombreuses protéines accessoires et adaptatrices sont également recrutées avec la clathrine vers les régions de la membrane plasmique enrichies en phosphatidylinositol-bisphosphate (PIP2) et procèdent ensemble au processus de l'invagination (127).

## 7. Hypothèse de recherche

L'ostéoarthrose (OA) représente la forme la plus répandue d'arthrite, mais les causes de cette pathologie sont toujours inconnues. L'OA se caractérise par une perte du cartilage articulaire, une sclérose osseuse, l'apparition d'ostéophytes et une inflammation tardive de la membrane synoviale. Nous avons proposé que les altérations du tissu osseux OA sont responsables de la perte de cartilage via la production de signaux cellulaires impliqués dans un «cross-talk» entre les ostéoblastes de l'os et les chondrocytes du cartilage articulaire. Les altérations du tissu osseux comprennent une dérégulation du phénotype cellulaire dont une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline, une augmentation de la sécrétion d'ostéocalcine, un dépôt d'une matrice extracellulaire de collagène de type 1 plus abondante mais peu minéralisée, et une diminution de la réponse à la stimulation par l'hormone parathyroïdienne (PTH).

Nous avons démontré que l'altération des trois premiers paramètres peut s'expliquer par la diminution de la signalisation Wnt dans les ostéoblastes OA en raison d'une augmentation des antagonistes de cette voie de signalisation dont le Dickkopf-2 (DKK2). Par ailleurs, des travaux récents ont démontré que le récepteur à la PTH interagit avec le LRP6, le récepteur des ligands Wnts, et que l'antagoniste DKK1 peut bloquer cette interaction.

Notre hypothèse de travail est donc que, puisque les ostéoblastes OA présentent une augmentation de DKK2, ce dernier pourrait jouer un rôle similaire à celui de DKK1 et être responsable de l'inhibition de la réponse à la PTH dans ces cellules. Nos objectifs sont donc de démontrer l'altération de l'interaction entre le récepteur à la PTH et LRP6, le rôle clé de DKK2 dans cette altération, et la correction de la réponse à la PTH suite à la correction de l'inhibition de la signalisation Wnt par DKK2.

# **CHAPITRE 2**

## **MANUSCRIPT**

## **Contribution des auteurs de l'article**

### **- Contribution spécifique de l'étudiante**

Mon travail de maîtrise portait sur la démonstration de l'altération de l'interaction entre les récepteurs à la PTH et LRP6, le rôle clé de DKK2 dans cette altération, et la correction de la réponse à la PTH suite à la correction de l'inhibition de la signalisation Wnt par DKK2. Ma tâche principale dans ce travail était la planification et manipulation des expériences, et l'analyse des données. De plus j'ai été la principale personne à rédiger l'article contenant mes résultats.

### **- Contribution de l'auteur Élie Abed**

Le Dr Élie Abed a contribué à l'analyse des résultats du projet, ainsi à la correction de l'article.

### **- Contribution de l'auteur Pascal Reboul**

Le Dr Reboul Pascal a contribué à la mise au point des premières expériences du projet et à l'analyse des résultats.

### **- Contribution de l'auteur Daniel Lajeunesse**

Le Dr Daniel Lajeunesse est le chercheur principal, qui a rédigé le projet et les hypothèses. Il a assuré l'encadrement et la gestion des expériences ainsi que la rédaction du manuscrit.

**Elevated endogenous Dickkopf-2 levels in human osteoarthritic osteoblasts are responsible for their altered response to parathyroid hormone and altered recycling of PTH receptors.**

BICHRA, M.<sup>1</sup>, ABED, E.<sup>1</sup>, REBOUL, P.<sup>2</sup> & LAJEUNESSE, D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unité de recherche en Arthrose, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM).

<sup>2</sup>Université de Lorraine/CNRS.

All correspondence should be addressed to: Daniel Lajeunesse, PhD, Unité de recherche en Arthrose, Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM).

## **ABSTRACT**

Osteoarthritis (OA) is characterized by loss of articular cartilage, bone sclerosis and synovial membrane inflammation. In vivo and in vitro studies indicate that the changes in bone tissue are responsible for the loss of articular cartilage. OA Osteoblasts (Ob) show a reduced response to parathyroid hormone (PTH), an important anabolic signal for bone tissue, versus normal Ob. The PTH receptor (PTH-R) interacts with LRP6, a receptor of Wnt ligands, and DKK antagonists block this interaction. Since DKK2 production is high in OA Ob whereas DKK2 is increased in normal Ob in response to TGF- $\beta$ 1, we propose that DKK2 alters the LRP6/ PTH-R interaction, PTH-R recycling and inhibits the response to PTH.

We used human OA and normal osteoblasts in primary culture. PTH-R, DKK2 and LRP6 expression were measured by RT-PCR. LRP6, PTH-R and DKK2 protein levels were determined by immunoblotting. Inhibition of DKK2 levels in OA Ob was performed by DKK2-siRNA, and cAMP production was measured by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). The effect of TGF- $\beta$ 1 on DKK2, PTH-R and cAMP production was tested in osteosarcoma cells SaOS-2.

In OA Ob, PTH-R and LRP6 mRNA levels were not changed following DKK2 siRNA treatment. However, PTH-R protein expression increased while that for LRP-6 remained unchanged after treatment with DKK2-siRNA. Compared to control, the distribution of PTH-R was higher in the membrane fraction and lower in the intracellular fraction in OA Ob following DKK2 inhibition. In contrast, LRP6 levels remained almost unchanged following these treatments. The results of the inhibition of the clathrin pathway by triflupromazin showed an increased expression of the PTH receptor in the membrane fraction that may be due to inhibition of their degradation by clathrin pathway. In OA Ob, DKK2 inhibition stimulated cAMP production in response to PTH. DKK2 induction by TGF- $\beta$ 1 in SaOS-2 cells, as assessed by qRT-PCR, caused the inhibition of PTH-R

protein expression but not of LRP6. In addition, TGF- $\beta$ 1 treatment in SaOS-2 cells reduced cAMP production in response to PTH.

These results demonstrate that high levels of DKK2 in OA Ob are responsible for the altered response to PTH. DKK2 antagonists decrease specifically PTH-R membrane display while they do not affect LRP6 recycling. These results suggest an altered cross-talk between LRP6 and PTH-R in OA Ob due to high levels of DKK2 in these cells.



## INTRODUCTION

Osteoarthritis is a clinical syndrome that represents one of the major health problems today. It is often associated with pain, disability, and reduced quality of life. Furthermore, the prevalence of osteoarthritis in elderly patients over 60 years will be even higher in the coming years (1). The failure of the joint is the main cause of this disease, which implies both mechanical and biological process. More specifically, there is an instability between synthesis and degradation of cartilage and subchondral bone (2). In addition, osteoarthritis affects all tissues of joint, and it was shown to induce many morphological, biochemical and molecular changes, such as bone sclerosis, production of osteophytes and subchondral cysts.

In the early stages of osteoarthritis, micro-cracks are observed at the felting hyaline which becomes soft (3). The cracks are becoming increasingly and the subchondral bone becomes exposed naked.

Despite the absence of vascularization or innervation of articular cartilage, the intimate contact between the subchondral bone and articular cartilage allows penetration of new vessels from bone to the deeper layers of cartilage (4). This process grants intimate contact, and diffusion of cytokines and growth factors between tissues (3). One hypothesis proposes that, in the process of OA, subchondral bone will thicken due to the decreased ability of the cartilage to cushion the pressure. Also, intrinsic or extrinsic factors that modulate abnormal response could induce the same effect. This new bone is called osteophytes (3,4). In general, the growth of osteophytes is considered mainly as the response of the subchondral bone to pressure it undergoes.

In contrast, another hypothesis postulates that the role of subchondral bone in the development of cartilage lesions is not only mechanical, but also biochemical (5). Indeed, studies have shown that the osteoblast phenotype of cells isolated from the subchondral bone plate has been changed. In comparison with normal osteoblasts, OA osteoblasts are characterized by a different behavior. They

produce more growth factors such as insulin-like growth factor-1 (IGF-I), transforming growth factor  $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ 1), and urokinase plasminogen activator (uPA) (6,7). Another author have confirmed also an increase in the activity of alkaline phosphatase and osteocalcin levels in human OA osteoblasts (8).

Other investigators have confirmed that, in contrast to normal osteoblasts, OA osteoblasts are associated with elevated levels of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and IL-6 (9). In addition, it was shown a decrease in response to stimulation by parathyroid hormone (PTH).

PTH is stimulated hypocalcemia and she will be responsible for stimulating bone resorption by increasing proliferation and osteoclast activity to increase calcium levels (12). PTH receptors are located on osteoblasts and do not exist in osteoclasts and osteocytes (10).

Depending on the mode of administration, PTH may have different effects *in vivo*. Nevertheless, many of these effects are still poorly understood. An anabolic effect, especially with an increase in the activity of osteoblasts, is observed when administered intermittently (11). Moreover, the continuous injection of PTH has shown an opposite effect. The effect of continuous PTH injection would mainly involve the RANKL/ OPG system (12). PTH is also able to increase the local synthesis of many factors such as IL-6, IGF-1 and TGF- $\beta$ 1. PTH is as well capable of inhibiting the expression of sclerostin (SOST) by osteocytes and thus to stimulate bone formation (13).

PTH receptors are less expressed in osteoblasts OA compared to normal (14). The response to PTH in OA osteoblasts is also reduced due to a lower expression of its receptor. This could reduce the matrix degradation and thus possibly a relative increase in collagen of type 1 (15).

We demonstrated that alteration of these parameters can be explained by the decrease of the Wnt canonical signaling pathway in OA osteoblasts due to the increased of an antagonist of this pathway, DKK2 (16). The Wnt signaling pathway is well known for its involvement in embryonic

development and in particular for its important roles in proliferation, differentiation of various cells types and the polarization of the organs. In the adult stage, this pathway controls a number of important metabolic functions. This is particularly the case of osteoblastogenesis and chondrogenesis where the crucial role of Wnt signaling is better described. In recent years, demonstrations of links between the canonical Wnt signaling pathway and bone diseases, including OA, are increasingly numerous (17). Wnt signaling has been shown to play an important role in OA. Indeed, mice in which the Wnt/  $\beta$ -catenin pathway was specifically inhibited in chondrocytes showed cartilage degradation (18). Wnt signaling has been shown to have a key role in the regulation of bone formation by regulating the differentiation of osteoblasts. Wnt, a secreted glycoprotein, active in osteoblasts a canonical signaling pathway acting on the p-catenin protein, increasing its accumulation in the cytosol. Wnt binds to receptors frizzled (FZD) and LDL receptor-related proteins 5 and 6 (LRP5/6). This will increase the level of  $\beta$ -catenin, which will act as a transcription factor and regulates osteoblast differentiation (19). Studies have demonstrated that the PTH receptor interacts with the LRP6, and that DKK1 can block this interaction (20).

Since, it has been shown that DKK2 increased in OA, it could play a similar role to that of DKK1 and be responsible for the inhibition of the response to PTH in these cells (21). Hence, we studied the potential role of DKK2 in this interaction, and whether correcting DKK2 levels in OA Ob would correct the response to PTH in these cells.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients and clinical parameters**

Tibial plateaus were obtained from OA patients undergoing knee replacement surgery and prepared as previously described (7, 22, 23, 24). A total of 29 patients ( $68.4 \pm 10.1$  years, mean  $\pm$  SD; 12 males/17 females) classified has OA according to the criteria of the American College of Rheumatology were used (25). According to macroscopic criteria, the samples show an osteoarthritis ranging from moderate to severe. No patients received medication that would interfere with bone metabolism. Ethical approval was obtained for the use of all human material following a signed agreement by the patients undergoing knee surgery in accordance with the CHUM ethical committee guidelines.

### **Subchondral bone preparation**

After obtaining tibial plateau samples, cartilage is the first tissue removed with a saw dissection "Stryker" and a scalpel. The cortical subchondral bone is isolated after dissection of the trabecular bone. These manipulations were performed under sterile conditions. Bone samples were cut into small pieces of  $2 \text{ mm}^2$ , washed at least three times in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing penicillin and streptomycin antibiotics 5X. They were then digested in the presence of 1 mg/ ml of collagenase type I (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) in DMEM / F12 medium (Sigma Aldrich) at  $37^\circ \text{C}$  serum-free for three periods of 30, 30 and 240 min with medium change between each step of digestion.

After digestion, the cells are washed with DMEM 5X and cultured in BGJ medium 20%. This medium was replaced every two days until cells are observed in the Petri dishes. At this time, the culture medium is replaced with fresh medium containing 10% FBS. The cells were placed in an incubator at  $37^\circ \text{C}$  and with a constant rate of 5%  $\text{CO}_2$ . At confluence, the cells were passaged once

at 250,000 cells/cm<sup>2</sup> and grown for 5 days in Ham F12/DMEM media (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) containing 10% FBS.

### **Phenotypic characterization of osteoblasts**

Alkaline phosphatase activity and osteocalcin secretion are both phenotypic parameters measured. Cells are kept in BGJ medium containing 1% ITS (Insulin Transferrin Selenium, Sigma-Aldrich) or 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (50 nM). After an incubation of 48 hours, the supernatant is collected and cells are washed three times with PBS prior to lysis with the alkaline phosphatase (ALPase) buffer. Alkaline phosphatase activity was determined by hydrolysis of the substrate p-nitrophenyl phosphate by aliquots of lysed cells. The release of osteocalcin was determined in the cells supernatant with an enzyme immunoassay. Determinations were performed in duplicate for each cell culture preparation.

### **Inhibition of DKK2 in OA osteoblasts by siRNA**

DKK2 expression was inhibited in OA Ob by specific siRNA. Briefly, OA Ob were split at 100,000 cells/ml. DKK2 siRNA preparations (4 different siRNA constructs are provided by the manufacturer in the same sample for each element tested) were obtained at Dharmacon (Lafayette, CO) as well as scramble RNA, and they were added to OA Ob at a final concentration of 100 ng/ml with 6 µl Hi-perfect (Quiagen, Mississauga, Ontario, Canada) per 100 µl total volume in BGJb media without serum for 1 hour on day 0 and day 3. The inhibition of DKK2 expression was followed using qRT-PCR whereas the production of DKK2 was assessed by western blot analysis (see below).

### **Stimulation of DKK2 in SaOA-2 osteoblasts by TGF-β1**

SAOS cells were used as a model of «normal osteoblasts». SaOS-2 cells were obtained from the American Type Culture Collection. SaOS-2 cells were grown in DMEM media containing 10%

FBS. They were passaged once a week at a ratio of 1:6. After recovery from splitting, the cells were stimulated with TGF- $\beta$ 1 at a final concentration of 100 ng/ml or the vehicle in DMEM medium three times a week for a week. Cells were then prepared either for RT-PCR or immunoblotting. In some experiments, cells were prepared for cAMP determination following stimulation with 100 nM rhPTH for 5 minutes.

### **RT- PCR assays**

Total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) according to manufacturer's instructions. This test is done with the "Quanti Tect SYBR Green PCR Kits" kit from Qiagen. The reverse transcriptase reaction (RT) was primed with random hexamers with 1  $\mu$ g of total RNA in a final reaction volume of 100  $\mu$ l followed by PCR amplification with the rotor 6 Gene-RG-3000 A (Corbett Research, Mortlake , NSW, Australia). Primers used for PCR are: DKK2, S: AGGAGTGTGAAGTTGGGAGGTA, AS:GGTTTGAGTAATGACCGTGGTT; LRP6, S: CCCATGCACCTGGTTCTACT, AS: CTGGAACTGGGACTCTGAGC; PTH-R, S: AGTACCGGAAGCTGCTCAAA, AS: CACTCTTCCTGTAGCAGGGC; and GAPDH, S: CAGAACATCATCCCTGCCTCT, AS: GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG. Each sample was amplified in triplicate.

### **Immunoblotting**

After determination of protein content in the cell lysates using the method with bicinchoninic acid (26) samples were applied to SDS-polyacrylamide gel (10%) electrophoresis. After electrophoresis, samples were electroblotted on nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). After blocking the membrane with 5% milk in TTBS, the primary antibody is incubated overnight at 4°C followed by three washing with TTBS. Then, the second antibody is incubated for 2 h at room temperature. The protein bands were visualized with SuperSignalWest Dura Extended Duration

Substrate (Pierce, USA) after its incubation for 5min. Primary antibodies are mouse anti-human LRP6 (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA) at dilutions of 1:1000, mouse anti-human PTH-R (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA) at dilutions of 1:1000, rabbit anti-human-DKK2 (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA) at dilutions of 1:500, and rabbit anti-human  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich) at dilutions of 1:10000. Secondary antibodies are goat anti-mouse and goat anti-rabbit antibodies (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) used at dilution of 1:10000.

### **Isolation of intracellular and membrane proteins**

Separation of membrane and intracellular proteins is performed by a high-speed centrifugation at 4° C of cell lysates. Briefly, cells were grown to confluence and treated as indicated below with or without inhibitors of clathrin vesicles recycling. After washing the cells twice, cells were scraped off the petri dishes by a policeman and the cell pellet was resuspended in 100  $\mu$ l of PBS. Cells were broken by sonication on ice followed by a high speed centrifugation (10,000 g) to separate the membrane fraction (pellet) from the cytosol (supernatant). Samples were resuspended in RIPA lysis buffer and then used for electrophoresis.

### **Inhibition of the clathrin-dependent pathway**

In preliminary experiments we used three inhibitors, Methyl- $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD), triflupromazin (TFP) and monensin (5mg/ml, 25  $\mu$ M, 40  $\mu$ M) respectively, to inhibit clathrin vesicle recycling which is responsible for the degradation of Wnt signaling receptors Fz and LRP (27), and the PTH receptor (28). Trifupromazin was then selected for further experiments and cells were incubated for 60 min prior to assay. LRP6 and PTH receptor recycling were detected by immunoblotting as described above.

### **cAMP formation in response to PTH stimulation**

Prior to hormonal challenge, OA osteoblasts were treated with either scrambled RNA (siSCR) or

siDKK2-RNA and incubated overnight in Ham's F12/ DMEM media containing 1% ITS. For the determination of cAMP, OA osteoblasts that have been treated with DKK2-siRNA or scrambled-siRNA, or SaOS-2 cells treated with TGF- $\beta$ 1 or the vehicle, were preincubated for 10 minutes in presence of the phosphodiesterase inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine (1 mM; Sigma-Aldrich) in Ham's F12/DMEM media containing 0.05% bovine serum albumin (BSA; fatty acid-free fraction V; Sigma-Aldrich). At the end of this preincubation, cells were incubated for 5 minutes in the same medium containing 100 nM of human 1-34 PTH or the vehicle, and the reaction was stopped by the addition of 3% perchloric acid. cAMP levels were then measured by an ELISA assay (Diagnostic Products, Los Angeles, CA) as previously described (7).

### **Statistical analysis**

Quantitative data are expressed as mean  $\pm$  SEM. The data were analyzed by Student's t test when comparing two groups. p values  $< 0.05$  were considered statistically significant.



## RESULTS

Primary subchondral osteoblast cell cultures of OA patients showed elevated markers of osteoblasts in response to 50 nM  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  treatments namely high alkaline phosphatase activity ( $3004.8 \pm 177.4$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein/30 min) and elevated osteocalcin secretion ( $241.3 \pm 17.5$  ng/mg protein/24h). These biomarkers are similar as previously reported for OA osteoblasts (7, 13). Since OA Ob show elevated DKK2 levels (29), reduced cAMP production in response to PTH stimulation due to reduced PTH receptors (7,9), and since exogenous DKK1 addition to the osteoblast-like UMR106 cells (30) lead to enhanced PTH receptor recycling and degradation, we tested herein whether endogenous elevated DKK2 levels in OA osteoblasts were responsible for the alteration of the response to PTH in these cells.

We first determined if reducing DKK2 levels using a siRNA technique would alter the membrane abundance of PTH-R and alter its recycling. Figure 1A shows that membrane levels of PTH-R increased in response to DKK2-siRNA treatment while cytosol levels of PTH-R decreased in response to the same treatment. Indeed, the expression of PTH-R in DKK2-siRNA treated OA Ob was higher in the membrane fraction ( $206.9 \pm 53.3$  %) and lower in the intracellular fraction ( $72.1 \pm 6.8$ %) compared to controls with scrambled-siRNA (Figure 1B). In contrast, neither the membrane nor the cytosol levels of LRP6 were altered by the same treatment (Figure 1A). In addition, IGF-1 receptor levels were also not affected at the membrane and cytosol level by DKK2-siRNA treatments (Figure 1A). These results suggested that PTH-R is recycled to the membrane after the inhibition of DKK2.

As membrane PTH-R levels were affected by DKK2-siRNA treatments, we next evaluated if this could affect the expression of PTH-R and LRP6. Incubations of OA Ob during 24 h with the DKK2-siRNA decreased the expression of DKK2 in these cells by approximately 65% (Figure 2A).

Interestingly, the expression of PTH-R and LRP-6 was not modified by the same treatment. After determining that neither the expression of PTH-R nor that of LRP6 was affected by DKK2 inhibition, we next evaluated how inhibiting the expression of DKK2 would affect the protein levels of DKK2, PTH-R and LRP-6. Immunoblotting of DKK2 and PTH-R protein levels showed a significantly decrease and increase respectively after treatment with DKK2-siRNA, whereas LRP6 protein levels were not significantly affected by this treatment (Figure 2B). Quantification of the immunoblot revealed that DKK2-siRNA reduced DKK2 protein levels by about 50% whereas PTH-R levels rose about 50% (Figure 2C). These data suggested that DKK2 inhibition in OA Ob increases PTH-R display in these cells yet do not alter its expression. Moreover, DKK2-siRNA treatment had no significant effect on LRP-6 protein expression similar to its effect on expression.

Inasmuch as we observed an increase in PTH-R expression following DKK2 inhibition, we then investigated if this treatment would correct the decrease in cAMP production in response to PTH challenge in these cells since a previous report indicated that both DKK1 and sclerostin addition to UMR106 osteoblast-like cells could reduce cAMP production in these cells (30). Figure 3 shows that PTH already promotes cAMP production about 3-fold in OA Ob not treated with DKK2-siRNA, indicating that these cells can respond to this hormonal challenge. However, this response to PTH was multiplied 2-fold in OA Ob following DKK2-siRNA treatment leading to about a 6-fold increase in cAMP production in response to PTH.

We previously indicated that TGF- $\beta$ 1 induces DKK2 expression in normal Ob whereas inhibiting TGF- $\beta$ 1 expression reduced endogenous elevated DKK2 expression in OA Ob (29). Based on these results, we next tested the effect of TGF- $\beta$ 1 on PTH-R and LRP6 expression using the SaOS-2 osteosarcoma cell model. First, we tested whether TGF- $\beta$ 1 would alter the expression of DKK2, PTH-R and LRP6 in these cells. In figure 4A, we first show the induction of the expression of

DKK2 in SaOS-2 cells by TGF- $\beta$ 1 treatment by about 50% while this treatment did not modify the expression of PTH-R and LRP6 mRNA expression. In addition, TGF- $\beta$ 1 increased DKK2 protein levels observed by immunoblot (Figure 4B) while it decreased the levels of PTH-R protein by roughly 55%, but did not modify the protein levels of LRP6 (Figure 4C). The production of cAMP was also measured in the SAOS-2 cells. SaOS-2 cells treated with TGF- $\beta$ 1 released 3-to 4-fold less cAMP than control not treated by TGF- $\beta$ 1 (Figure 4D).

In osteoblasts, the PTH receptor is internalized via a  $\beta$ -arrestin dependent pathway and degraded through a clathrin-dependent endocytosis (31). This clathrin-dependent endocytosis is similar to the situation for LRP-6 following Wnt signalling and/or inhibition with DKK1 (32; 27), whereas the activation of the  $\beta$ -catenin pathway via the activation of LRP6 involves the caveolin pathway (33). The effect of DKK2 has never been tested on PTH-R recycling or on LRP6. However, the inhibition of this pathway could promote the recycling of PTH-R and of LRP6 in OA osteoblasts. In addition, the inhibition of endogenous DKK2 levels in OA Ob should also inhibit this pathway. Using multiple inhibitors of the clathrin endocytic pathway, namely Triflupromazin (TFP), Methyl  $\beta$ -cyclodextrine ( $\beta$ -CD) and Monensin, we observed that triflupromazin had the maximal effect on the clathrin pathway (data not illustrated).

The protein levels of PTH-R in cytosolic and membrane fractions were quantified by immunoblot. As represented in Figure 5, there was an increase of PTH-R levels in the membrane fraction following the treatment with DKK2-siRNA, which was promoted in the presence of triflupromazin. This could be awarded to the inhibition of the clathrin degradation pathway since the reduction in PTH-R levels in the cytosol fraction in response to DKK2-siRNA was almost totally blunted in presence of triflupromazin. In contrast, LRP6 recycling was not affected by DKK2-siRNA or by triflupromazin.

## DISCUSSION

PTH signaling is a key mechanism in bone homeostasis. Downstream targets of PTH stimulation in bone tissue are numerous and control a number of functions. One such target is the Wnt signaling pathway which is controlled by PTH and the protein kinase A second messenger pathway. Indeed, the PTH-PKA pathway has been shown to regulate the expression of genes and/or the function of proteins involved in Wnt signaling including LRP, Dickkopf, axin, and sclerostin whereby under normal conditions, PTH stabilizes  $\beta$ -catenin and promotes the canonical Wnt pathway (34; 35; 20). Thereof, PTH regulates the response to Wnt ligands by promoting the activation of free  $\beta$ -catenin and its target genes. A key interaction between LRP6 and PTH-R is necessary to convey the stimulation of bone cells by PTH (36; 40; 37). Conversely, the regulation of the response to PTH which is mediated by PTH receptors at the cell surface of osteoblasts is controlled by DKKs and the recycling of LRPs in response to Wnt ligands and DKKs. Indeed, evidence to date indicate that exogenous DKK1 addition to cells alters both LRP6 recycling and can alter the response to PTH, namely via a regulation of PTH receptors (27, 38; 35; 39). However, DKK1 is the only member of the four DKK family members that has been tested.

As OA osteoblasts have been shown to produce high levels of endogenous DKK2 and reduced Wnt signaling capacity compared to normal Ob (29), whereas they also show reduced PTH receptor levels, we questioned here if there could be a link between high DKK2 levels and low PTH-R levels in OA Ob. Our results showed that DKK2 levels are higher in OA Ob compared to normal as previously reported, whereas PTH-R levels showed an opposite behavior. Correcting DKK2 levels in OA Ob by siRNA techniques corrected DKK2 expression and levels. However, DKK2-siRNA failed to alter either PTH-R or LRP6 expression, indicating that alterations in DKK2 expression in OA Ob did not modulate their expression. However, at the protein level, the reduction in DKK2

levels lead to an increase in PTH-R production of about 50%. As we previously demonstrated that PTH-R levels were ~40% reduced in OA Ob compared to normal (14), this would suggest that correcting DKK2 levels is sufficient to correct abnormal PTH-R levels in OA Ob. In contrast, this approach did not lead to any significant modification of LRP6 levels in these cells. This observation was somewhat unexpected based on previously reported observation in other cell systems where alterations of DKK1 levels were linked with a redistribution of LRP6 between the surface membrane fraction and recycling endosomes. In particular, DKK1 lead to an increased fraction of LRP6 restricted to the membrane fraction, preventing the capacity of LRP6 to convey a Wnt ligand signal (27; 38; 35; 39). The absence of an effect of alterations of DKK2 levels in OA Ob on membrane LRP6 levels was also mirrored by the absence of an effect on the cytosolic LRP6 levels detected in these cells, in contrast to the decrease in PTH-R cytosol levels detected following DKK2-siRNA treatments. Alterations of DKK2 levels and their effect thereof on PTH-R levels is not linked to a general phenomenon on receptor recycling in OA Ob since besides the absence of an effect on LRP6, we also observed no effect of DKK2-siRNA on IGF-1R levels on either the membrane or cytosol fraction.

Whereas DKK2-siRNA treatments lead to an alteration of the distribution of PTH-R between the membrane and cytosolic fraction, this also leads to alterations of the function of PTH in OA Ob. Indeed, DKK2-siRNA treatments also improved the response to PTH in OA Ob which was observed by an increase in cAMP production. This is of particular interest since we previously demonstrated that cAMP production in OA Ob was blunted in response to PTH but not to prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) whereas this could not be linked with a reduction in adenylate cyclase activity per se in these cells (14). Indeed, this was linked with the alteration in PTH receptors measured by I-PTH binding to osteoblasts. Hence, the present results confirm that a reduction of PTH-R is responsible for the

decrease in PTH response in OA Ob, and that correcting DKK2 levels restored this function.

The present study also links the alteration in PTH-R levels in OA Ob to alterations in TGF- $\beta$ 1 signaling alterations in these cells. We previously demonstrated that elevated TGF- $\beta$ 1 levels in OA Ob were responsible for the increase in DKK2 levels in these cells. Here, we demonstrated that TGF- $\beta$ 1 stimulation of an osteoblast-like cell model, the SaOS-2 cells, increased DKK2 levels in these cells, reduced the levels of PTH-R without affecting PTH-R expression, and that stimulating DKK2 levels in response to TGF- $\beta$ 1 curbed the capacity of SaOS-2 cells to respond to PTH stimulation.

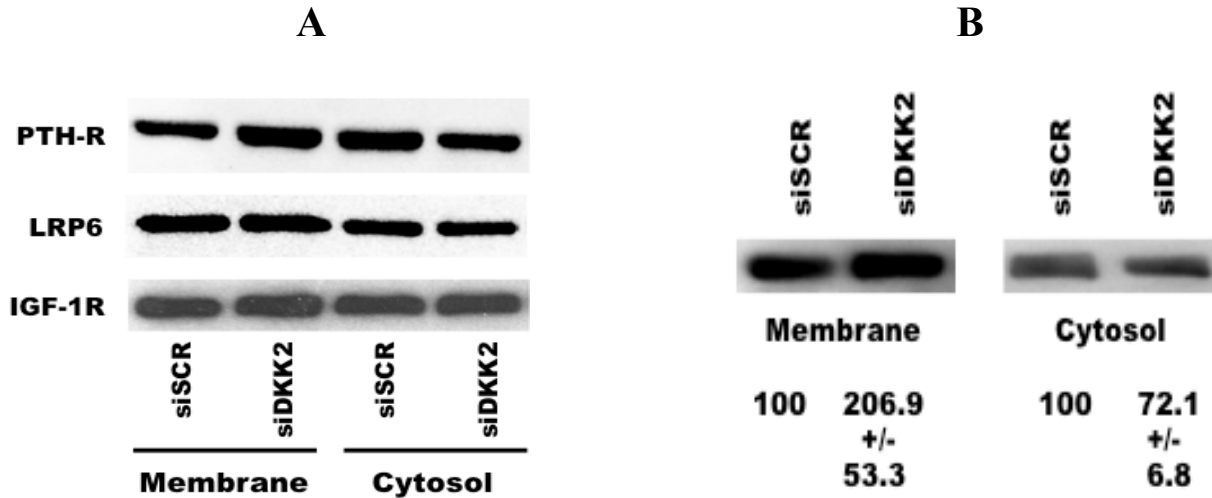
We were also able to demonstrate that PTH-R is recycled via the clathrin endocytosis pathway as previously reported (41, 28), and that altering DKK2 levels alters the recycling of PTH-R. In contrast, clathrin-dependent LRP6 recycling is not very important in OA Ob nor was it significantly affected by DKK2 levels. This is in contrast to previously published articles showing that LRP6 recycling is clathrin-dependent and regulated via canonical Wnt ligand stimulation and DKK1 levels. Hence, since DKK2 levels are elevated in OA Ob, our hypothesis was that DKK2 levels would increase cytosolic LRP6 levels, and that inhibitors of clathrin vesicles would alter its distribution between the membrane and cytosolic fraction. However, LRP6 was poorly affected by both DKK2 and clathrin inhibitors similarly to what we observed for IGF-1R. Overall, our results would suggest that alterations of Wnt signaling via a correction of DKK2 levels as previously observed in OA Ob also alters PTH-R recycling via a clathrin-dependent pathway.

The results presented herein also suggest that although DKK1 and DKK2 are similar protein family members and share a number of functions, they may also have non-redundant activities such as the control of PTH-R. Our results also illustrate that DKK2 does not regulate LRP6 such as previously reported with DKK1, again demonstrating subtle differences between those two protein family

members.

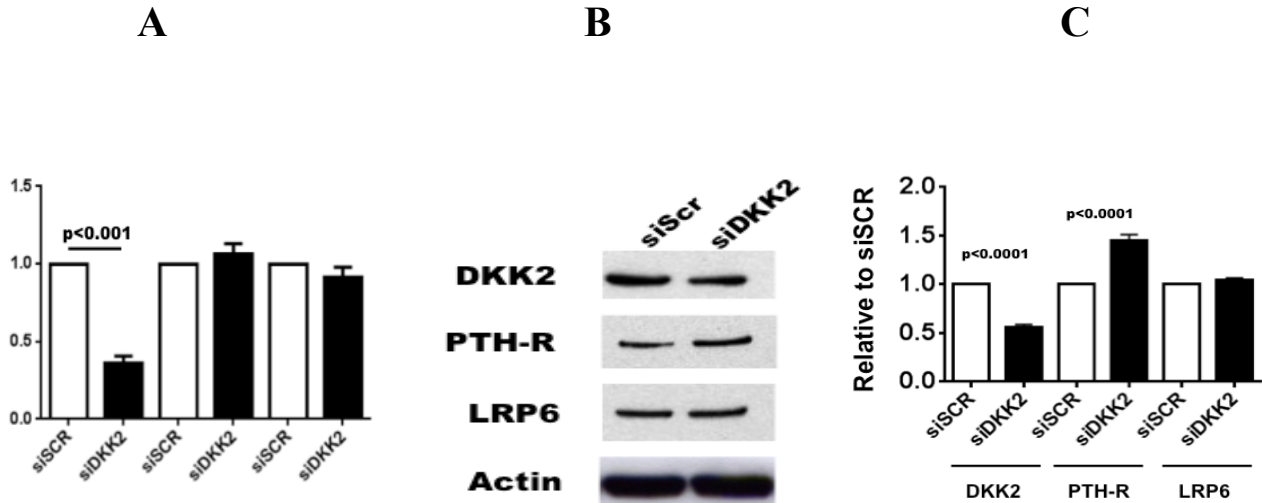
Alterations of PTH-R levels and intracellular signaling in response to PTH in OA osteoblasts is an important observation since a recent study suggested to use teriparatide (intermittent PTH treatment) for the treatment of osteoarthritis (42) as used in osteoporosis. Indeed, as OA bone tissue is undermineralized, a situation we could reproduce with *in vitro* osteoblasts (24), it was suggested that intervention that can promote bone formation, such as teriparatide treatment, may improve bone tissue quality in OA patients. However, the reduction in PTH-R levels in OA osteoblasts may refrain the capacity of teriparatide to trigger PTH-R and ultimately to increase cAMP to levels that would mobilize downstream targets such as the cAMP-PKA pathway and  $\beta$ -catenin stabilization in bone tissue. Hence, careful clinical studies should be undertaken prior to using this approach in OA patients.

In conclusion, our results revealed that PTH-R levels are reduced in OA osteoblasts due to high endogenous levels of DKK2, and that correcting DKK2 expression in these cells increased PTH-R levels in the membrane fraction and increased cAMP production in response to PTH treatment.

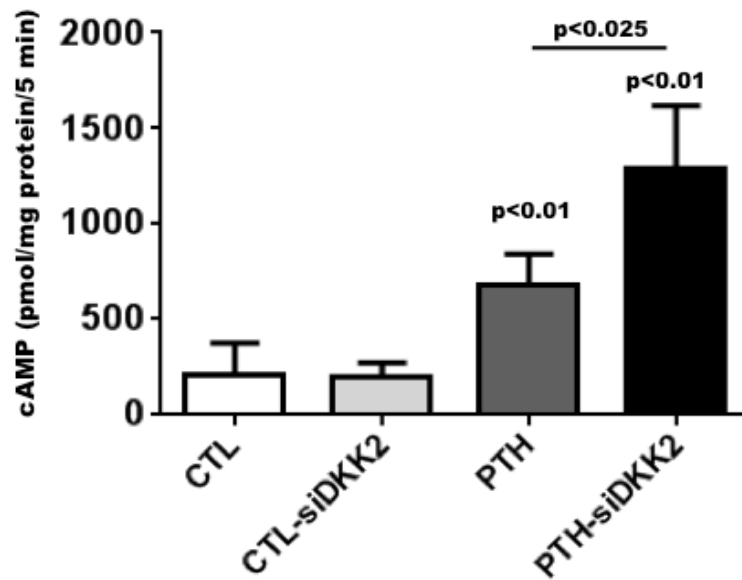


**Figure 1. Effect of DKK2 disruption in OA osteoblasts on the distribution of PTH-R, LRP6 and IGF-1R between the membrane and cytosolic fraction.** OA osteoblasts were treated with DKK2-siRNA or scrambled-siRNA for two days. After washing the cells twice, cells were scraped off the petri dishes by a policeman and the cell pellet was resuspended in 100  $\mu$ l of PBS. Cells were broken by sonication on ice followed by a high-speed centrifugation (10,000 g) to separate the membrane fraction (pellet) from the cytosol (supernatant). Samples were resuspended in RIPA lysis buffer and then used for electrophoresis. A) Representative Western blot analysis of the expression of PTH-R, LRP6 and IGF-1R in OA osteoblasts treated with DKK2-siRNA or scrambled-siRNA. B) Quantification of the distribution of PTH-R levels in the membrane and cytosolic fractions following DKK2-siRNA treatments. Values are the mean  $\pm$  SEM of 4 separate preparations of OA osteoblasts.

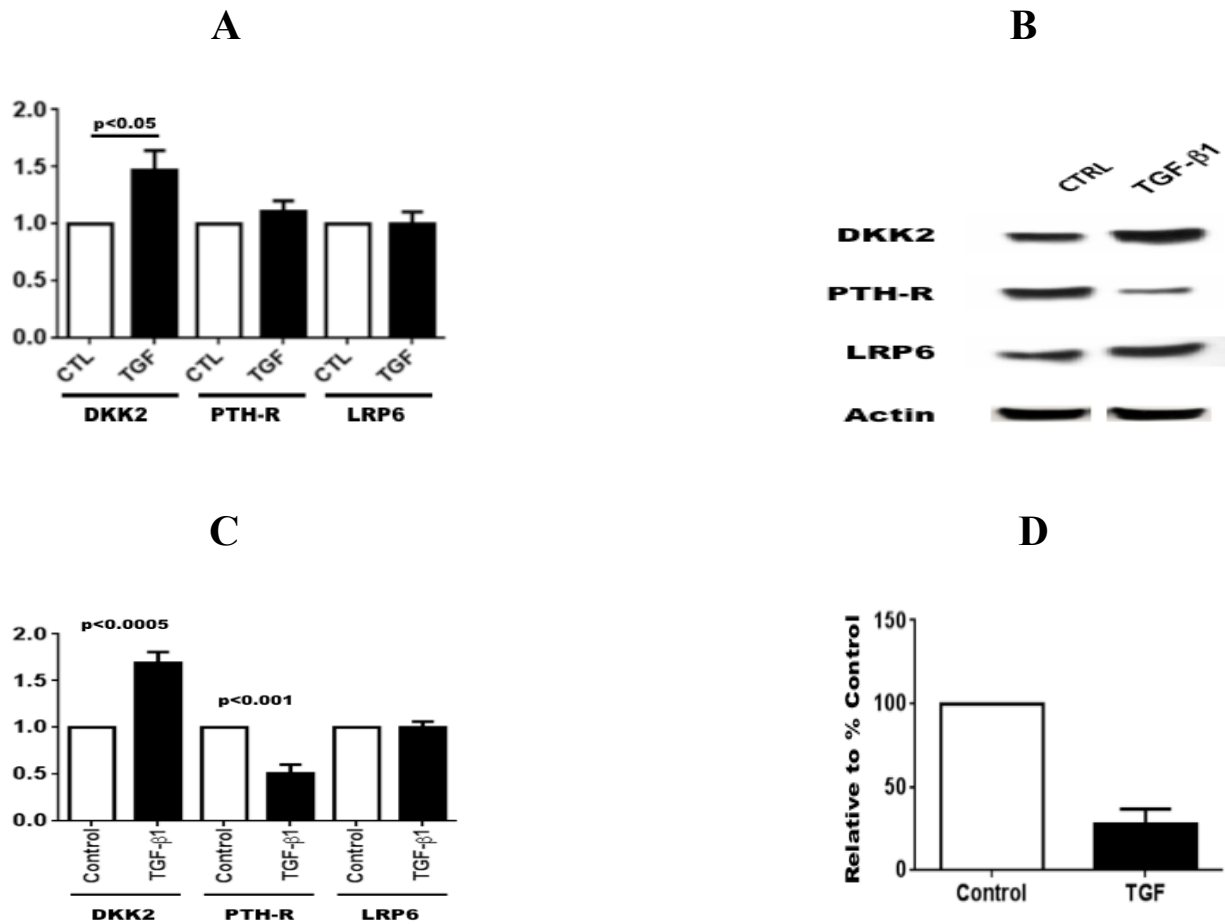




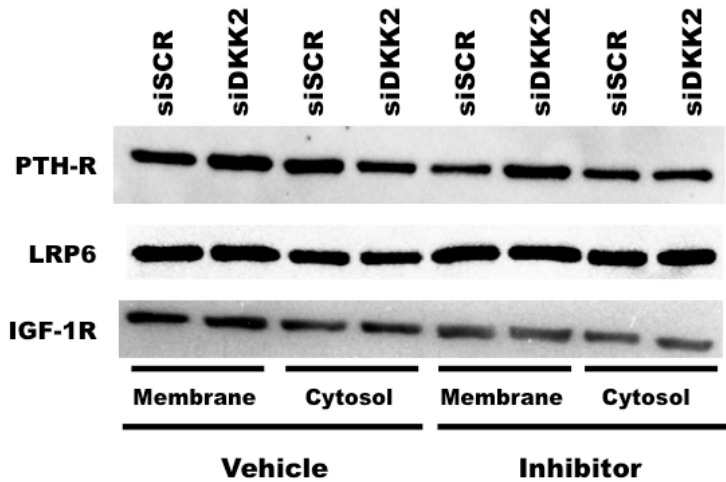
**Figure 2. Effect of DKK2 disruption in OA osteoblasts on the production of PTH-R and LRP6.** OA osteoblasts were treated with DKK2-siRNA or scrambled-siRNA for two days. After washing the cells twice, cells either lysed with TRIZOL to prepare for PCR amplification or in RIPA buffer and prepared for Western blot analysis. RNA was extracted as described in Material and Methods. RNA was reversed transcribed followed by PCR amplification of cDNA using specific primers. Plasmid DNAs containing the target gene sequences were used to generate the standard curves for PTH-R, LRP6 and GAPDH. The value for each sample was calculated as the ratio of the number of molecules of the target gene/number of molecules of GAPDH, and values are reported as the value in scrambled-siRNA samples. A) Expression of PTH-R and LRP6 under DKK2-siRNA treatment. B) Results of immunoblots for PTH-R and LRP6 in OA osteoblasts are expressed as arbitrary scanning units of scrambled-siRNA samples and presented as the mean  $\pm$  SEM of n=9 preparations. C) Representative Western blot analysis of PTH-R and LRP6 production in DKK2-siRNA treated samples. Actin was revealed to assess similar loading.



**Figure 3. Effect of DKK2 disruption in OA osteoblasts on the production of cAMP in response to PTH.** OA osteoblasts were treated with DKK2-siRNA or scrambled-siRNA for two days. Confluent OA osteoblasts were then incubated for their last 24 h of culture in Ham's F12/DMEM media containing 1% ITS. Cells were then preincubated for 10 min in the presence of a phosphodiesterase inhibitor (1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, Sigma-Aldrich), in HAM F12/DMEM media containing 0.05% BSA (fatty acid free fraction V, Sigma) followed by a stimulation with 100 nM PTH for 5 min, and cAMP determined on cell lysates. Results are the mean  $\pm$  SEM of 6 independent individuals. Statistical analyses were performed by using Student's test.



**Figure 4. Effect of TGF- $\beta$ 1 stimulation on the regulation of PTH-R abundance and cAMP production in SaOS-2 cells.** SaOS-2 cells were treated with 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 or the vehicle for 5 days until reaching confluence. Cells were then either lysed with TRIzol to prepare for PCR amplification or RIPA buffer and prepared for Western blot analysis as described in Figure 2, or prepared for cAMP production in response to PTH treatment as described in Figure 3. A) Expression of PTH-R and LRP6 following treatment with TGF- $\beta$ 1 of SaOS-2 cells. Values represent the mean  $\pm$  SEM of 6 preparations. B) Representative Western blot analysis of PTH-R and LRP6 production in TGF- $\beta$ 1- treated SaOS-2 cells. Actin was revealed to assess similar loading. C) Results of immunoblots for PTH-R and LRP6 in SaOS-2 cells are expressed as arbitrary scanning units of control samples and presented as the mean  $\pm$  SEM of n=3 preparations. D) Production of cAMP in response to PTH treatment in control or TGF- $\beta$ 1 treated SaOS-2 cells. Results are the mean  $\pm$  SEM of 4 independent individuals. Statistical analyses were performed by using the Student's test.



**Figure 5. Effect of DKK2 disruption and inhibition of clathrin-dependent recycling in OA osteoblasts on the distribution of PTH-R, LRP6 and IGF-1R between the membrane and cytosolic fraction.** OA osteoblasts were treated with DKK2-siRNA or scrambled-siRNA for two days. Confluent cells were treated with 25  $\mu$ M Triflupromazine to inhibit clathrin-dependent recycling. After washing the cells twice, cells were scraped of the petri dishes by a policeman and the cell pellet was resuspended in 100  $\mu$ l of PBS. Cells were broken by sonication on ice followed by a high-speed centrifugation (10,000 g) to separate the membrane fraction (pellet) from the cytosol (supernatant). Samples were resuspended in RIPA lysis buffer and then used for electrophoresis. The figure shows a representative Western blot analysis of four experiments of the expression of PTH-R, LRP6 and IGF-1R in OA osteoblasts treated with DKK2-siRNA or scrambled-siRNA, in the presence of Triflupromazin or its vehicle.

## REFERENCES

- 1- Centers for Disease Control and Prevention. Prevalence of disabilities and associated health conditions among adults--United States. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 50: 120-125 (1999).
- 2- Lawrence, R.C., Helmick, C.G., Arnett, F.C, Deyo, R.A, Felson, D.T, Giannini, E.H. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. Arthritis Rheum. 41: 778-799 (1998).
- 3- Laadhar, L., Zitouni, M., Kalle-Sella-mi, M., Mahjoub, M., Sellami, S., Makni, S. Physiopathologie de l'arthrose. Du cartilage normal au cartilage arthrosique: facteurs de predisposition et mécanismes inflammatoires. Rev Méd Inter. 28:531-536 (2007).
- 4- Radin, E.L, Paul, I.L, Tolkoff, M.J. Subchondral bone changes in patients with early degenerative joint disease. Arthritis Rheum. 13: 400-5 (1970).
- 5- Bailey, C.J., Reid, S.W.J., Hodgson, D.R et al. Risk factors associated with musculoskeletal injuries in Australian Thoroughbred racehorses, Prev. vet. Med. 32, 47-55 (1997).
- 6- Massicotte, F., Lajeunesse, D., Benderdour, M., Pelletier, J.P., Hilal G., Duval, N. & Martel-pelletier, J. Can altered production of interleukin-1beta, interleukin-6, transforming growth factor-beta and prostaglandin E(2) by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients. Osteoarthritis Cartilage. 10: 491-500 (2002).
- 7- Hilal, G., Martel-pelletier, J., Pelletier, J.P., Ranger P. & Lajeunesse D. *Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis.* Arthritis Rheum. 41: 891-9 (1998).
- 8- Meunier, P. L'ostéoporose. [3e ed.], [entièrement revue et mise à jour]. Issy-les-Moulineaux; Masson ;"Le Quotidien du medecin"; (2005).
- 9- Hilal, G., Massicotte, F., Martel-Pelletier, J., Fernandes, J.C, Pelletier, J.P., Lajeunesse, D. Endogenous prostaglandin E2 and insulin like growth factor 1 can modulate the levels of parathyroid hormone receptor in human osteoarthritic osteoblasts. J. Bone Miner Res 16:713-721. (2001).
- 10- Friedenstein, A.J, Chailakhyan, R.K, Gerasimov, U.V (1987). Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. Cell Tissue Kinet 20: 263-272.
- 11- Bailey, C.J., Reid, S.W.J., Hodgson, and D.R et al. Risk factors associated with musculoskeletal injuries in Australian Thoroughbred racehorses, Prev. vet. Med. 32, 47-55 (1997).
- 12- Tat, S.K., Padrines, M., Theoleyre, S., Couillaud-Battaglia, S., Heymann, D., Redini, F., Fortun, Y. OPG/membranous-RANKL complex is internalized via the clathrin pathway before a lysosomal and a proteasomal degradation. Bone 39:706-715 (2006).

- 13- Massicotte, F., Lajeunesse, D., Benderdour, M., Pelletier, J.P., Hilal, G., Duval, N., Martel-Pelletier, J. Can altered production of interleukin-1beta, interleukin-6, transforming growth factor-beta and prostaglandin E(2) by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients? *Osteoarthritis Cartilage* 10:491–500 (2002).
- 14- Hilal, G., Massicotte, F., Martel-Pelletier, J., Fernandes, J.C., Pelletier, J.P., Lajeunesse, D. Endogenous prostaglandin E2 and insulin like growth factor 1 can modulate the levels of parathyroid hormone receptor in human osteoarthritic osteoblasts. *J. Bone Miner Res* 16:713–721 (2001).
- 15- Yamaguchi, A., Komori, T., and Suda, T. Regulation of Osteoblast differentiation Mediated by Bone Morphogenic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr. Rev.* 21:393–411 (2000).
- 16- Fukayama, S., Tashjian, A.H., Bringham, F.R. Mechanisms of desensitization to parathyroid hormone in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Endocrinology* 131:1757–1769 (1992).
- 17- Zhu, M., et al. Inhibition of beta-catenin signaling in articular chondrocytes results in articular cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 58, 2053–2064 (2008).
- 18- Zhu, M., et al. Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice. *J. Bone Miner Res.* 24, 12–21(2009).
- 19- Potts, J.T, Gardella, T.J. Progress, paradox, and potential: parathyroid hormone. research over five decades. *Ann N Y Acad Sci.* 1117:196–208 (2007).
- 20- Suzuki, A., Ozono, K., Kubota, T., Kondou, H., Tachikawa, K., and Michigami, T. PTH/cAMP/PKA signaling facilitates canonical Wnt signaling via inactivation of glycogen synthase kinase-3beta in osteoblastic Saos-2 cells. *J. Cell. Biochem.* 104, 304–317 (2008).
- 21- Thomas, C., Denis, C., Aline D., Nicolas, D. & Daniel L. Elevated Dickkopf-2 levels contribute to the abnormal phenotype of human osteoarthritic osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research.* 26: 1399-1410 (2011).
- 22- Hilal, G., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Duval, N. & Lajeunesse, D. Abnormal regulation of urokinase plasminogen activator by insulin-like growth factor 1 in human osteoarthritic subchondral osteoblasts. *Arthritis Rheum* 42, 2112–2122 (1999).
- 23- Massicotte F., Lajeunesse D., Benderdour M., Pelletier J.P., Hilal G., Duval N. & Martel-pelletier J. Can altered production of interleukin-1beta, interleukin-6, transforming growth factor-beta and prostaglandin E (2) by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis Cartilage.* 10: 491-500 (2002).
- 24- Couchourel, D., Aubry, I., Delalandre, A., Lavigne, M., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J-P., Lajeunesse, D. Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is due to abnormal

collagen type 1 production. *Arthritis Rheum.* 60:1438-1450 (2009).

25- Altman, R., Asch, E., Bloch, D., Bole, G., Borenstein, D., Brandt, K., et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* 29:1039-49 (1986).

26- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem.* 150:76-85 (1985).

27- Yamamoto, H., Sakane, H., Michiue, T., Kikuchi, A. Wnt3a and Dkk1 regulate distinct internalization pathways of LRP6 to tune the activation of beta-catenin signalling. *Dev Cell* 15:37-48 (2008).

28- Conway, B.R., Minor, L.K., Xu, J.Z., D'Andrea, M.R., Ghosh, R.N., Demarest, K.T. Quantitative analysis of agonist-dependent parathyroid hormone receptor trafficking in whole cells using a functional green fluorescent protein conjugate. *J Cell Physiol.* 189: 341–355. [PubMed: 11748592] (2001).

29- Thomas, C., Denis, C., Aline, D., Nicolas, D. & Lajeunesse, D. Elevated Dickkopf-2 levels contribute to the abnormal phenotype of human osteoarthritic osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research.* 26: 1399-1410 (2011).

30- Shi, Q., et al. Metabolic activity of osteoblasts from periprosthetic trabecular bone in failed total hip arthroplasties and osteoarthritis as markers of osteolysis and loosening. *J Rheumatol* 29, 1437-1445(2002).

31- Sneddon, W.B. *et al.* Ligand-selective dissociation of activation and internalization of the parathyroid hormone receptor. Conditional efficacy of PTH peptide fragments. *Endocrinology* 145, 2815-2823 (2004).

32- Jiang Y, He X, Howe PH. Disabled-2 (Dab2) inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signalling by binding LRP6 and promoting its internalization through clathrin. *EMBO J.*31(10):2336-49 (2012).

33-Yamamoto H, H Komekado, Kikuchi A (2006) Caveolin is necessary for Wnt-3a-dependent internalization of LRP6 and accumulation of beta-catenin. *Dev cellule* 11: 213-223. doi: 10.1016 / j.devcel.2006.07.003.

34- Kulkarni, N.H., Halladay, D.L., Miles, R.R., Gilbert, L.M., Frolik, C.A., Galvin, R.J., Martin, T.J., Gillespie, M.T., and Onyia, J.E. Effects of parathyroid hormone on Wnt signaling pathway in bone. *J. Cell. Biochem.* 95, 1178–1190 (2005).

35- Guo, J., Minlin, L., Dehong, Y., Mary, L., et al. Suppression of Wnt Signaling by Dkk1 Attenuates PTH-Mediated Stromal Cell Response and New Bone Formation. *Cellule Metab fév.* 11 (2): 161-71 (2010).

- 36- Li, C., Xing, Q., Bing, Y., Hui, X., et al. Disruption of LRP-6 in osteoblasts blunts the bone anabolic activity of PTH. *Journal of bone and mineral research*. 341 (1): 37-44 (2013).
- 37- Revollo, L., Kading, J., Yeop Jeong, S., Jiemin, Li., Salazar V., Mbalaviele, G., and Civitelli, R. N-cadherin Restrains PTH Activation of Lrp6/ $\beta$ -catenin Signaling and Osteoanabolic Action. *Journal of Bone and Mineral Research* (2014).
- 38- Ren, S., Johnson, B.G., Kida, Y., et al. LRP-6 is a coreceptor for multiple fibrogenic signaling pathways in pericytes and myofibroblasts that are inhibited by DKK-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(4): 1440–1445 (2013).
- 39- Bao, X., Liu, T., Shan, Y., Li, K., Garofalo, R.P., et al. Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits innate immune responses. *PLoS Pathog* 4: e1000077. doi: 10.1371/journal.ppat.1000077 (2008).
- 40- Wan, M., Yang, C., Li, J., Wu, X., Yuan, H., Ma, H., He, X., Nie, S., Chang, C., and Cao, X. Parathyroid hormone signaling through low-density lipoprotein-related protein 6. *Genes Dev*. 22, 2968–2979.
- 41- Sneddon, W.B., Bisello, A., Magyar, C.E., Willick, G.E., Syme, C.A., Galbiati, F., and Friedman, P.A. Ligand-selective dissociation of activation and internalization of the parathyroid hormone receptor. Conditional efficacy of PTH peptide fragments. *Endocrinology* 145: 2815-2823 (2004).
- 42- Sampson, E.R., Hilton, M.J., Tian, Y., Chen, D., Schwarz, E.M., Mooney, R.A., et al. Teriparatide as a chondroregenerative therapy for injury-induced osteoarthritis. *Sci Transl Med*. 3:101ra93 (2011).



# CHAPITRE 3

## DISCUSSION

## Discussion

La voie de signalisation Wnt est un régulateur puissant du développement et de la fonction cellulaire. Elle a été l'objet de nombreuses études. La signalisation Wnt est nécessaire pour de nombreux processus de développement embryonnaire y compris la détermination du sexe et le développement des organes. Après la naissance, la signalisation Wnt est cruciale pour la régulation de la masse osseuse du squelette tout au long de la vie (1). Les ligands Wnt sont des glycoprotéines sécrétées qui activent en outre, dans les ostéoblastes comme dans d'autres types cellulaires, une voie de signalisation canonique agissant sur la protéine  $\beta$ -caténine, et augmentent son accumulation dans le cytosol. Les ligands Wnt peuvent aussi activer des voies de signalisation non-canoniques, mais la présente étude s'étant orientée sur l'étude de la régulation de la voie Wnt-canonique, nous concentrerons notre discussion sur cet aspect.

Les ligands Wnt canoniques se lient aux récepteurs Wnt frizzled (FZD) et aux protéines liées à des récepteurs de LDL-5 et 6 (LRP5/6). Cette liaison augmente le niveau de la  $\beta$ -caténine libre, non phosphorylée, qui agira comme un facteur de transcription et régulera la différenciation des ostéoblastes (2).

Dans les ostéoblastes arthrosiques, des études ont montré une modification de certains composants moléculaires de la voie Wnt canonique comme le FZD-1 en réponse à un traitement continu de l'hormone parathyroïdienne (PTH) (3,4). Par contre, les travaux précédents du laboratoire avaient démontré que le niveau d'expression des récepteurs LRP5, LRP6 et Fz n'était pas affecté comparativement aux ostéoblastes normaux (128).

La PTH est le principal régulateur de l'homéostasie calcique par ses actions sur les os et les reins. Elle est critique pour le remodelage osseux, en exerçant les deux effets anaboliques et cataboliques sur l'os par l'activation du récepteur à la PTH, un récepteur couplé aux protéines G dans les ostéoblastes (OB) (5). La PTH, donnée sur forme d'injection, a été le premier agent anabolisant approuvé pour le traitement de l'ostéoporose aux États-Unis (5,6).

Les modifications au niveau de l'os sous-chondral chez les sujets arthrosiques pourraient être liées à la perturbation de la signalisation Wnt et à une diminution de la réponse à la stimulation par l'hormone parathyroïdienne (PTH) telle que démontrée *in vitro* par notre laboratoire (7).

De même, la production d'AMPc dans les ostéoblastes est couplée à la PTH en faisant intervenir le récepteur PTH, la protéine G et l'activation de l'adénylate cyclase. De manière fort intéressante, nos

données indiquent une réduction de la production d'AMPc PTH-dépendante dans les ostéoblastes OA (8).

D'autres études ont démontré que la diminution de la signalisation Wnt dans les ostéoblastes OA est due à une augmentation des antagonistes de cette voie dont le Dickkopf-2 (DKK2) (8,9). Par ailleurs, des travaux récents ont démontré que le récepteur à la PTH interagit avec LRP6, le récepteur des ligands Wnts canoniques, et que les antagonistes DKKs, plus spécifiquement DKK1, bloquent cette interaction, pouvant entraîner une diminution de la production d'AMP cyclique dépendante à la PTH (10).

Puisque les travaux antérieurs du laboratoire ont démontré une diminution de la production d'AMPc par les ostéoblastes OA (11), une diminution du niveau de récepteurs à la PTH dans ces cellules (12), et une augmentation de l'expression et de la production de DKK2 aussi dans ces cellules (13), nos objectifs étaient donc de démontrer si une altération de l'interaction entre le récepteur à la PTH et LRP6 est présente dans les ostéoblastes OA, et le rôle clé de DKK2 dans cette altération, et si nous pourrions démontrer une correction de la réponse à la PTH suite à la correction de l'inhibition engendrée par les niveaux élevés de DKK2 dans ces cellules.

Nous avons testé directement l'effet de l'inhibition de DKK2 sur PTH-R et LRP-6 impliqués dans la signalisation Wnt. Les résultats montrent une augmentation de l'expression protéique du récepteur à la PTH après une baisse de l'expression protéique de DKK2. Ces résultats ont suivi un premier test d'expression par PCR qui n'a pas révélé de différence au niveau de l'expression de l'ARNm de PTH-R et LRP-6 après un traitement de DKK2 siRNA. Les résultats sur l'ARNm nous ont suggéré qu'il n'existe aucune inhibition au niveau de l'expression du récepteur à la PTH. Par contre, l'expression protéique de PTH-R a augmenté après l'inhibition de DKK2 dans le milieu. Ces résultats nous permettent de suggérer que l'affichage de récepteur PTH pouvait être réduit soit par sa dégradation ou par l'inhibition de son recyclage.

Pour prouver l'une ou l'autre de ces deux hypothèses, nous avons inhibé la voie de dégradation du récepteur à la PTH. La voie d'endocytose par la clathrine est la voie connue pour la dégradation du PTH-R (14). L'extrémité carboxy-terminale du récepteur à la PTH contient de multiples sites de phosphorylation et un domaine de régulation contrôlant son interaction avec la  $\beta$ -arrestine, et son endocytose (15). Normalement, si le récepteur à la PTH n'est pas dégradé, il est recyclé vers la membrane plasmique (16).

D'autres études ont montré que les antagonistes peuvent conduire à la phosphorylation du récepteur PTH et son internalisation. Les récepteurs internalisés sont soit recyclés à la surface après déphosphorylation, ou dégradés par la voie de clathrine-dépendante (14).

Lors de la stimulation avec l'hormone parathyroïdienne de manière intermittente, le récepteur est capable de se recycler à la surface membranaire, l'hypothèse sur laquelle repose le traitement de l'ostéoporose. Ceci est basé sur le fait que l'administration intermittente de la parathormone (Teriparatide) exerce un effet anabolique en entraînant une stimulation de la formation osseuse (16), notamment une augmentation de l'activité des ostéoblastes, sur le tissu osseux. L'administration continue de PTH conduirait par contre à un effet catabolique sur le tissu osseux (78). Les résultats escomptés lors de mon travail pouvaient permettre, entre autres, de valider si le traitement décrit ci-dessus serait valable sur des sujets arthrosiques.

Il a été démontré que le taux de PTH chez les patients arthrosiques est dans les limites normales, par rapport aux patients atteints d'ostéoporose (17). Alors, nous proposons que l'administration de la parathormone ne serait pas suffisante pour activer et recycler le récepteur à la PTH tant que la signalisation Wnt n'est pas corrigée chez les ostéoblastes arthrosiques puisque celle-ci est réduite en raison des niveaux élevés de DKK2.

Les résultats qui ont montré l'augmentation de l'expression protéique du récepteur à la PTH après l'inhibition de l'antagoniste DKK2 nous ont permis de démontrer par la suite que celui-ci intervienne dans l'internalisation de PTH-R, et favorise sa dégradation par les vésicules de clathrine. En effet, les résultats de l'inhibition de la voie de dégradation de clathrine par le triflupromazine ont montré une augmentation de l'expression du récepteur à la PTH dans la fraction membranaire qui pourrait être dû à l'inhibition de sa voie de dégradation. De plus, comparativement au contrôle, l'inhibition de l'antagoniste DKK2 en présence de triflupromazine dans les ostéoblastes OA augmente plus la concentration du récepteur à la PTH dans la fraction membranaire et diminue plus son expression dans la fraction cytosolique. Donc, on pourrait conclure que l'augmentation de l'affichage membranaire du récepteur à la PTH peut être attribuée non seulement à l'inhibition de sa voie de dégradation mais aussi à l'inhibition de DKK2, un antagoniste de la voie de la signalisation Wnt canonique.

Il a été reporté dans plusieurs études que LRP6 synergise avec Fz, un récepteur transmembranaire de la signalisation Wnt canonique (17). Cette découverte suggère que LRP6 est un composant du complexe de récepteur de Wnt (18). Pour cela, nous avons étudié aussi l'effet de l'inhibition de

DKK2 sur LRP6. L'inhibition de l'antagoniste DKK2 n'a pas montré une influence significative sur l'expression de l'ARNm de LRP6, ni au niveau protéique. Ceci suggère que l'altération de l'interaction entre les récepteurs à la PTH et LRP6 est réalisée au niveau de l'expression protéique du récepteur à la PTH et non pas directement sur LRP6, et que l'altération de la voie de signalisation Wnt canonique observée dans les études précédentes (17) pourrait aussi être due à la diminution de l'affichage du récepteur à la PTH en présence de niveau élevé de l'antagoniste DKK2 chez les sujets arthrosiques via une rétroaction dépendante de la voie PTH-AMPC-PKA déjà observée dans les ostéoblastes (19)

Contrairement à nos résultats avec le DKK2, une étude avec DKK1 a rapporté que ce dernier est un ligand de plus haute affinité pour le récepteur LRP6 et inhibe la signalisation Wnt par sa liaison à ce récepteur en empêchant la formation du complexe FZ-LRP6 induite par un ligand Wnt. Cette interaction entre LRP6 et DKK1 semblait être une inhibition spécifique de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (20).

Pour vérifier que l'inhibition de l'antagoniste DKK2 influence spécifiquement le récepteur à la PTH et non pas d'autres récepteurs membranaires, nous avons aussi étudié l'expression de l'IGF-R1, le récepteur de l'IGF-1. Une augmentation de la libération locale de l'IGF-1 a été observée dans les ostéoblastes OA (21). Son augmentation altérerait le système urokinase/plasmine pour ainsi favoriser la production de la matrice extracellulaire. En parallèle, l'IGF-1 agirait via la voie ERK1/2 pour augmenter la prolifération des ostéoblastes, retarder leur apoptose et augmenter l'activité de la phosphatase alcaline. Les IGF-1 sont très présents dans le tissu osseux et ils ont un rôle important dans la formation osseuse. L'IGF-1 possède une action mitogène sur les chondrocytes ainsi que sur les ostéoblastes (21). IGF-1 stimule la différenciation de ces derniers en augmentant spécialement la transcription de collagène (21,22). Dans les ostéoblastes arthrosiques, l'interaction entre l'IGF-1 et son récepteur (IGF-R1) altère donc leur activité via des voies autres que la signalisation Wnt. En effet, après l'inhibition de DKK2 par siRNA, l'expression protéique de l'IGF-R1 n'a pas changée. Ces résultats suggèrent donc une influence spécifique de DKK2 sur le récepteur à la PTH et non sur d'autres récepteurs de ces cellules.

La correction du niveau d'expression du récepteur à la PTH par l'inhibition de l'antagoniste DKK2 nous a permis par la suite de vérifier sa fonctionnalité par le dosage de la production de l'AMPC PTH-dépendante en présence et absence de traitement DKK2 siRNA.

L'hormone parathyroïdienne peut activer différentes voies intracellulaires dans les ostéoblastes (22). Elle peut stimuler la formation d'AMPc et la protéine kinase A (PKA) (20), activer la voie du calcium/protéine kinase C (PKC) via l'inositol triphosphate (IP3) (20, 21), et augmenter la concentration de calcium intracellulaire (22,23). L'activation de ces seconds messagers peut alors conduire à des changements dans l'expression de gènes spécifiques. Cependant, l'activation de la voie AMPc-PKA est considérée la plus importante dans les cellules ostéoblastiques (19,24).

Nos résultats ont montré que la PTH peut stimuler la production de l'AMPc dans les ostéoblastes OA non traités par DKK2-siRNA. Toutefois, cette réponse a été multipliée dans les ostéoblastes OA dont le niveau de DKK2 a été inhibé. En se référant aux résultats précédents, nous pouvons conclure que le DKK2 dans ces conditions peut agir sur la fonctionnalité de PTH/PTH-R et par conséquent DKK2 altère l'interaction PTH/AMPc. DKK2 peut donc provoquer un découplage fonctionnel entre l'induction hormonale et le récepteur à la PTH, puisque en corrigeant l'expression de DKK2, la production de l'AMPc se multiplie. Des résultats similaires avaient déjà été rapporté par Hilal et al (70) et la présente étude suggère une explication à la diminution de production d'AMPc démontrée dans ces travaux. Nos résultats montrant une réponse augmentée à la PTH dans les ostéoblastes arthrosiques après la correction de niveau de récepteur PTH via l'inhibition des antagonistes DKK2 permettant ainsi de valider notre hypothèse initiale.

La production de l'AMPc PTH-dépendante implique l'activation de récepteur G et l'activation de l'adénylate cyclase. Des données précédentes (25) n'ont montré aucune altération de l'activité de l'adénylate cyclase dans les ostéoblastes OA parce que la stimulation de ces cellules avec de la forskoline, un diterpène qui stimule directement l'enzyme, donne un niveau de formation de l'AMPc similaire entre les ostéoblastes normaux et OA. En outre, nous avons montré par la présente étude que la réduction de PTH-R dans ces cellules pathologiques semble être responsable de la diminution de la réponse à la PTH. En effet, parmi les facteurs locaux altérés dans les ostéoblastes OA, le récepteur de la PTH est moins exprimé et les ostéoblastes OA produiraient de façon anormale plus de leptine par rapport aux cellules normales (26).

De même, Bailey et al (59) ont démontré que la faible expression de récepteur PTH conduit à la diminution de la réponse à la PTH dans les ostéoblastes OA. Cela entraînerait une réduction de la dégradation matricielle, et donc possiblement une augmentation relative du contenu en collagène de type 1.

Une étude par Hilal *et al.*, 2001 (75) avait déjà évalué le taux de récepteur PTH dans les ostéoblastes OA allant de cas modérés à des cas sévères. Les résultats ont montré une diminution progressive du taux de PTH-R de 10% chez les cas qui présentent la pathologie modérée à 60 % chez les cas sévères en comparaison avec les cas normaux. De plus, l'étude de l'interaction entre la PTH et son récepteur qui a été réalisée par une analyse de Scatchard indique que l'affinité de liaison pour la PTH dans les ostéoblastes OA est similaire aux ostéoblastes humains normaux, mais que sa capacité maximale de liaison est diminuée (27).

La réduction spécifique du récepteur à la PTH peut être liée à plusieurs paramètres qui altèrent la signalisation dans les cas arthrosiques. Un de ces paramètres (antagoniste DKK2 élevé) est prouvé dans notre étude être responsable de la réduction de l'affichage membranaire de PTH-R.

Notre étude sur les ostéoblastes arthrosiques a été combinée par une autre sur les cellules d'ostéosarcome (SaOS-2) que nous avons considéré comme un modèle de cellules normales. Il a été déjà suggéré que le TGF- $\beta$ 1 pourrait induire l'expression de DKK2 dans les ostéoblastes normaux (26). Puisque les travaux antérieurs du laboratoire (128) ont démontré que le TGF- $\beta$ 1 était responsable de la stimulation de la production de DKK2 dans les ostéoblastes OA, nous avons donc utilisé ici cette information pour tester si le TGF- $\beta$ 1 pouvait induire DKK2 dans les cellules SaOS-2, et ainsi réduire leur capacité de réponse à la PTH.

La stimulation de DKK2 dans les SaOS-2 par leur traitement par TGF- $\beta$ 1 a donné des résultats similaires à ceux observés dans les ostéoblastes humains arthrosiques. En effet, cette stimulation agit sur le récepteur à la PTH en inhibant l'expression protéique de ce dernier, mais pas l'expression de son ARNm. Cette inhibition au niveau protéique est suivie par une diminution de la production de l'AMPc en réponse à la stimulation par la PTH. Ces résultats sur les ostéosarcomes appuient ceux observés avec les ostéoblastes arthrosiques humains. Les deux études ont indiqué, en effet, l'implication de l'antagoniste DKK2 dans la réduction de la production de l'AMPc PTH-dépendant dans les ostéoblastes arthrosiques. Nous pouvons donc suggérer que la stimulation par le TGF- $\beta$ 1 induit dans les cellules SaOS-2 une altération des niveaux de DKK2 qui à leur tour ont été responsables de la diminution des niveaux protéiques membranaires de PTH-R sans agir sur l'expression de l'ARNm du récepteur.

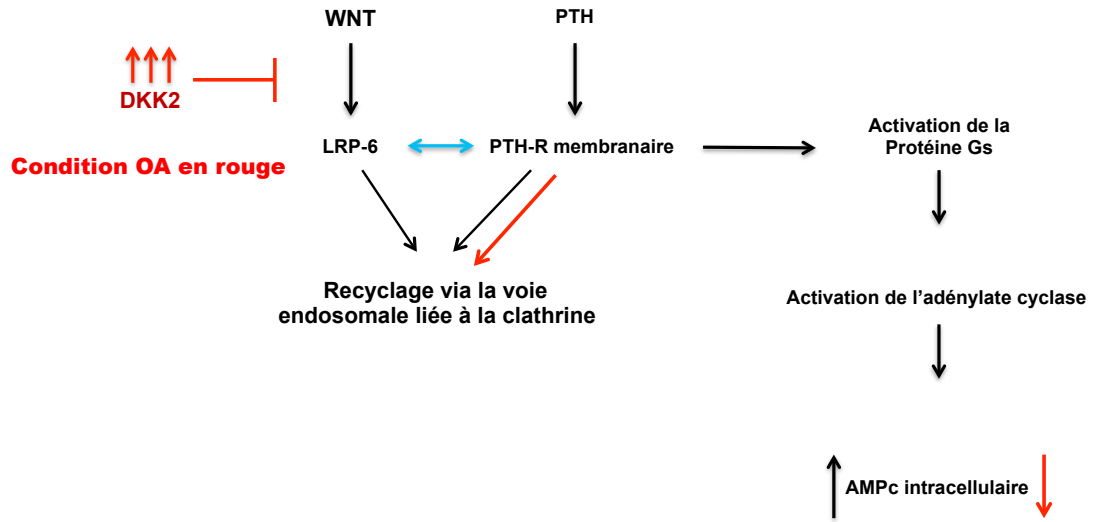
Le concept classique de l'action de l'hormone parathyroïdienne est la stimulation de la résorption osseuse afin de réguler le taux de calcium sérique. Toutefois, son administration d'une manière

intermittente stimule sélectivement la formation osseuse (16, 27, 28, 29). Ceci a été exploitée comme la seule thérapie anabolique approuvée par la FDA pour la maladie d'ostéoporose (30, 31). Dans la dernière décennie, des progrès significatifs ont été accomplis dans la détermination du mécanisme d'action de la PTH. On sait maintenant que la PTH se lie à son récepteur PTH-R (32,33) et active la protéine G. Cela conduit à la production de l'AMPc et l'activation de la phospholipase C (PLC), ce qui active finalement la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC) (31,35). Ces études indiquent que la production d'AMPc stimulée par la PTH est critique pour l'initiation de la cascade de signalisation qui se traduit par une augmentation du nombre d'ostéoblastes. Nos résultats au cours de la présente étude confirment que ceci ne pourra se produire chez les ostéoblastes OA tant que le taux de DKK2 est élevé et que la signalisation Wnt n'est pas corrigée.



## Schéma récapitulatif des résultats du projet

### Interaction de la signalisation Wnt et PTH : condition normale en noir



# **CHAPITRE 4**

## **CONCLUSION**

## **Conclusion**

Nos données ont montré la diminution du récepteur de l'hormone parathyroïdienne dans les ostéoblastes humains sous-chondrales, en raison de, au moins, l'augmentation des antagonistes DKK2. Ces derniers altèrent principalement l'expression de PTH-R probablement en affectant leur recyclage et favorisant leur dégradation. L'incapacité de triflupromazine, inhibiteur de la voie de clathrine, de restaurer pleinement les niveaux de PTH-R indique également que d'autres voies de signalisation sont impliquées dans ce règlement.

Cela indique également que la pathologie de l'arthrose peut être due à une altération dans les tissus de l'os sous-chondral, une hypothèse qui étaye la notion selon laquelle un défaut osseux pourrait suivre une dégradation du cartilage et contribuer à l'apparition ou la progression de l'arthrose.

Nos résultats suggèrent l'importance de la correction de niveau de récepteurs PTH via la correction de la signalisation WNT dans les ostéoblastes arthrosiques.

Une meilleure compréhension de la façon de la correction de la signalisation WNT pour moduler les effets de PTH peut nous aider à être plus efficace dans le ciblage de remodelage osseux pour le traitement de l'ostéarthrose et pour le développement futur de nouveaux protocoles ou des traitements pour améliorer la thérapie pour l'ostéarthrose et d'autres défauts squelettiques.

Les orientations futures devraient se concentrer sur une meilleure compréhension des rôles de chacun des facteurs Wnt dans l'os sous chondral, leurs cibles et les interactions qu'ils peuvent avoir avec d'autres voies.

Avec leurs diverses fonctions et rôles dans de nombreux processus biologiques, l'isolement et la caractérisation des protéines Wnt va certainement fournir des indications sur les mécanismes et les modes d'action. Ses interactions avec les récepteurs, corécepteurs, les protéoglycanes et les protéines sécrétées soulignent le rôle essentiel de la signalisation Wnt comme dans la régulation et le contrôle du comportement cellulaire.

De plus, les études du gène de PTH et leurs récepteurs impliqués dans le développement de cartilage et l'os peuvent contribuer à ce débat dans les quelques prochaines années.

# CHAPITRE 5

## RÉFÉRENCES

- 1- Pedroni, G., Zweifel, P. Les coûts sociaux du rhumatisme en Suisse. Bâle, Pharma Information (Collection Economie et Santé 9) (2002).
- 2- Centers for Disease Control and Prevention. Health-related quality of life and activity limitation - Eight states. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998; 47: 134-140 (1995).
- 3- Centers for Disease Control and Prevention. Prevalence of disabilities and associated health conditions among adults-United States. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2001; 50: 120-125 (1999).
- 4- Raina, P., Dukeshire, S., Lindsay, J., Chambers, L.W. Chronic conditions and disabilities among seniors: an analysis of population-based health and activity limitation surveys. Ann Epidemiol; 8: 402-409 (1998).
- 5- Wagenhäuser, F.J. Die Rheumamorbidity: eine klinisch-epidemiologische Untersuchung. Bern, Hans Huber, (1969).
- 6- Office fédéral de la statistique. Les scénarios de l'évolution démographique de la Suisse 2000-2060: série complète de scénarios. Neuchâtel, OFS, (2002).
- 7- Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme: Band 1: Systematisches Verzeichnis. Bern, Hans Huber, 10e éd, (1994).
- 8- Lawrence, R.C., Helmick, C.G., Arnett, F.C., Deyo, R.A., Felson, D.T., Giannini, E.H. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. Arthritis Rheum 41: 778-799 (1998).
- 9- Jacobsson, L., Lindgarde, F., Manthorpe, R. The commonest rheumatic complaints of over six weeks' duration in a twelve-month period in a defined Swedish population. Prevalences and relationships. Scand J Rheumatol; 18: 353-360 (1989).
- 10- Meunier, P. L'ostéoporose. [3e éd.], [entièrement revue et mise à jour]. Issy-les-Moulineaux; Masson; "Le Quotidien du médecin"; (2005).
- 11- Clunie, G. Osteoporose. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson; (2009).
- 12- Centre collaborateur de l'organisation mondiale de la santé. L'ostéoporose en milieu professionnel; (2002).
- 13- Cummings, S.R., Melton, L.J. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. Lancet. 359 (9319): 1761-7 (2002).
- 14- Lee, J., et al. Health care guideline: diagnosis and treatment of adult degenerative joint disease (DJD) of the knee. Institute for clinical systems improvement (ICSI). Site des ICSI, [En ligne]. <http://www.icsi.org/knowledge/detail.asp?catID=29&itemID=165> (2003).

- 15- Tehlirian C.V, Batho J.M. Rheumatoid arthritis. [L'arthrite rhumatoïde] A. Clinical and laboratory manifestations. [Cas cliniques et de laboratoire]. Primer on the Rheumatic Diseases [Abécédaire des maladies rhumatismales] 13e édition. Klippel, J.h., Stone, J.H., Crofford, L.J. While PJ (Eds). Springer 114-121 (2008).
- 16- Laadhar, L., Zitouni, M., Kalle-Sella, M., Mahjoub, M., Sellami, S., Makni S. Physiopathologie de l'arthrose. Du cartilage normal au cartilage arthrosique: facteurs de predisposition et mécanismes inflammatoires. Rev Méd Inter; 28:531-536 (2007).
- 17- Becerra, J., Adrades, J.A., Guerado, E., Zamora-Navas, P., Lopez-Puertas, J.M. & Reddi, AH. Articular cartilage: structure and regeneration. Tissue Engineering Part B Review, Vol.16, No.6, pp. 617-627 (2010).
- 18- Bush, P.G. & Hall, AC. Passive osmotic properties of in situ human articular chondrocytes within non-degenerate and degenerate cartilage. Journal of Cellular Physiology, Vol.204, No.1, pp.309-319 (2005).
- 19- Clarke, R.B., Hatano, N., Kondo, C., Belke, D.D., Brown, B.S., Kumar, S., Votta, B.J. & Giles, W.R. Voltage-gated K<sup>+</sup> currents in mouse articular chondrocytes regulate membrane potential. Channels, Vol.4, No.3, pp. 179-191 (2010).
- 20- Schmidt, D., Mackay, B. Ultrastructure of human tendon sheath and synovium: implications for tumor histogenesis. Ultrastruct Pathol. 3:269-283 (1982).
- 21- Steinberg, P.J., Hodde, K.C. The morphology of synovial lining of various structures in several species as observed with scanning electron microscopy. Scanning Microsc. 4: 987-1020 (1990).
- 22- Johansson, H., Sjolander, P., Sojka, P.A sensory role for the cruciate ligaments. Clin Orthop Relat Res; 268:161-178 (1991).
- 23- Carlson, C.S., Loeser, R.F., Purser, C.B., Gardin, J.F., Jerome, C.P. Osteoarthritis in cynomolgus macaques. III: Effects of age, gender, and subchondral bone thickness on the severity of disease. J Bone Miner Res; 11:1209-17 (1996).
- 24- Radin, E.L., Paul, I.L., Tolkoﬀ, M.J. Subchondral bone changes in patients with early degenerative joint disease. Arthritis Rheum; 13:400-5 (1970).
- 25- Sanchez, C., Deberg, M.A., Piccardi, M., Niska, P., Reginster, J.Y., Henrotin, Y. Osteoblasts from the sclerotic subchondral bone downregulate aggrecan but upregulate metalloproteinases expression by chondrocytes. This effect is mimicked by interleukin-6, interleukin-1beta and oncostatin M pre-treated non-sclerotic osteoblasts. Osteoarthritis Cartilage; 13:979-87 (2005).
- 27- Hinton, R., Moody, R.L., Davis, A.W. et al. Osteoarthritis: diagnosis and therapeutic considerations. Am Fam Physician; 65: 841-848 (2002).
- 28- Felson, D.T., Lawrence, R.C., Dieppe, P.A. et al., Osteoarthritis : New insights. Part1 : The

disease and its risk factors. *Ann Intern Med*; 133: 635-646 (2000).

28-Valdes, A.M., Evangelou, E., Kerkhof, H.J., et al. The GDF5 rs143383 polymorphism is associated with osteoarthritis of the knee with genome-wide statistical significance [archive], *Ann Rheum Dis*. 70:873–875 (2011).

29- El Hajjaji, H., Williams, J.M., Devogelaer, J.P., Lenz, M.E., Thonar, E.J., Manicourt, D.H. Treatment with calcitonin prevents the net loss of collagen, hyaluronan and proteoglycan aggregates from cartilage in the early stages of canine experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*; 12:904-11 (2004).

30- Blumenkrantz, G., Lindsey, C.T., Dunn, T.C. et al. A pilot, two-year longitudinal study of the interrelationship between trabecular bone and articular cartilage in the osteoarthritic knee. *Osteoarthritis Cartilage*; 12:997-1005 (2004).

31- Svensson, O., Malmen, S.M., Fajutrao, L., et al. Greater reduction of knee pain than hip pain in osteoarthritis as treated with naproxen, as evaluated by WOMAC and SF -36. *Ann Rheum Dis*; 65: 781-784 (2006).

32- Carney, S.L., Billingham, M.E.J., and Catron, B. Changes in proteoglycan turnover in experimental canine osteoarthritic cartilage. *Matrix*, (12): p. 137 (1992).

33- Taichman, R.S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem cell niche. *Blood* 105: 2631–2639 (2005).

34- Eriksen, E.F., Axelrod, D.W., Melsen, F. Bone histomorphometry. Raven Press, New York, pp 1–12 (1994).

35- Harada, S., Nagy, J., Sullivan, A., Thomas, K., Endo, N., Rodan, G., and Rodan, S. Induction of vascular endothelial growth factor by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Invest*, 93: 2490-6 (1994).

36- Canalis, E., Centrella, M., and McCarthy, T. Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *J Clin Invest*, 81: 1572-7(1988).

37- Sennerby, L., Thomsen, P., Ericson, L.E. Early bone tissue responses to titanium implants inserted in rabbit cortical bone (I). Light microscopic observations. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 4, 240–250 (1993).

38- Logan, C.Y., Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781–810 (2004).

39- Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., Gerasimov, U.V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 20: 263–272 (1987).

40- Yamaguchi, A., Komori, T., Suda, T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 21: 393–411 (2000).

- 41- Aubin, J., Triffitt., and JT. Mesenchymal stem cell and osteoblast Differentiation, p. 59-82. In Principles of bone biology, (ed.) Bilezikian J., Raisz L. G., Rodan G. A., San Diego, CA, USA (2002).
- 42- Yamaguchi, A., Komori, T., and Suda, T. Regulation of Osteoblast differentiation Mediated by Bone Morphogenic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr. Rev.* 21: 393–411 (2000).
- 43- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., Bradley, A., Karsenty, G. Increased bone formation in osteocalcin deficient mice. *Nature*.382: 448–452 (1996).
- 44- Logan, C.Y., Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20,781810 (2004).
- 45- Church, V.L., FrancisWest, P. Wnt signalling during limb development. *Int J Dev Biol* 46 (7), 92736 (2002).
- 46- Boyce, B.F., Xing, L., Jilka, R.J., Bellido, T., Weinstein, R.S., Parfitt, A.M., Manolagas, S.C. Apoptosis in bone cells. In: Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan, G.A. (eds.) *Principles of Bone Biology*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp 151168 (2002).
- 47- Franz-Odenaal, T.A., Hall, B.K. and Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Developmental Dynamics*; 235: 176- 90 (2006).
- 48- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T. and Martin, T.J. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.* 20, 345-357 (1999).
- 49- Väänänen, H.K. Osteoclast function: Biology and mechanisms. In *Principles of Bone Biology* (ed. J. P. Bilezikian, L. G. Raisz and G. A. Rodan), pp. 103-113. San Diego: Academic Press (1996).
- 50- Kong, Y.Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveiras-Santos, A., Van, G., Itie, A., et al., OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397, 315-323 (1999).
- 51- Nutt, S.L., Heavey, B., Rolink, A.G. and Busslinger, M. Commitment to The B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 401, 556 562 (1999).
- 52- Rattanakul, C., Lenbury, Y., et al., Modeling of bone formation and resorption mediated by parathyroid hormone: response to estrogen/PTH therapy. *Biosystems* 70 (1), 55–72 (2003).
- 53- Kroll, M.H. Parathyroid hormone temporal effects on bone formation and resorption. *Bull. Math. Biol.* 62 (1), 163–188 (2000).
- 54- Ma, Y.L., Cain, R.L. et al., Catabolic effects of continuous human PTH (1–38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-



associated bone formation. *Endocrinology* 142 (9), 4047–4054 (2001).

55- Martin, R.B., Burr, D.B., and Sharkey, N.A. *Skeletal tissue mec.* New York: Springer. xiv, 392 (1998).

56- Carbonare, L. and Giannini, S. Bone microarchitecture as an important determinant of bone strength, *J. Endocrinol. Invest.* 27, 99-105 (2004).

57- McIlwraith, C.W. *Anatomy and physiology of equine joints*, (1996).

58- Tamba Guillaume, Gyô. *Le diagnostic de l'arthrose du membre de cheval.* Th. Med. Vet.: Toulouse: TOU 333, 4008 (2005).

59- Bailey, C.J., Reid, S.W.J., Hodgson, D.R et al. Risk factors associated with musculoskeletal injuries in Australian Thoroughbred racehorses, *Prev. vet. Med.*, 32, 47-55 (1997).

60- Lo, GH., Zhang, Y., McLennan, C., et al. The ratio of medial to lateral tibial plateau bone mineral density and compartment-specific tibiofemoral osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 14:984-90 (2006).

61- Blumenkrantz, G., Lindsey, C.T., Dunn, T.C., et al. A pilot, two-year longitudinal study of the interrelationship between trabecular bone and articular cartilage in the osteoarthritic knee. *Osteoarthritis Cartilage*, 12: 997-1005 (2004).

62- Sanchez, C., Deberg, M.A., Piccardi, M., Niska, P., Reginster, J.Y., Henrotin, Y. Osteoblasts from the sclerotic subchondral bone downregulate aggrecan but upregulate metalloproteinases expression by chondrocytes. This effect is mimicked by interleukin-6, interleukin-1beta and oncostatin M pre-treated non-sclerotic osteoblasts. *Osteoarthritis Cartilage*; 13: 979-87 (2005).

63- Hilal, G., Martel-Pelletier, J., Pelletier, JP., Ranger, P., Lajeunesse, D. Osteoblast-like cells from subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis Rheum*; 41:891-9 (1998).

64- Radin, E.L., Paul, I.L., Tolkoff, M.J. Subchondral bone changes in patients with early degenerative joint disease. *Arthritis Rheum*; 13: 400-5 (1970).

65- Ohta, S., Imai, K., Yamashita, K., Matsumoto, T., Azumano, I. & Okada Y. Expression of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human osteoarthritic cartilage. *Lab Invest*; 78: 79-87 (1998).

66. Freemont, A.J., Hampson, V., Tilman, R., Goupille, P., Taiwo, Y., Hoyland, J.A. Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. *Ann Rheum Dis.* 56: 542-9 (1997).

67. Makowski, G.S. & Ramsby, M.L. Zymographic analysis of latent and activated forms of matrix metalloproteinase-2 and -9 in synovial fluid: correlation to polymorphonuclear leukocyte infiltration and in response to infection. *Clin Chim Acta.* 329: 77-81 (2003).

68. Imai, K., Ohta, S., Matsumoto, T., Fujimoto, N., Sato, H., Seiki, M. & Okada, Y. Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and activation of progelatinase A in human osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol.* 151: 245-56 (1997).
- 69- Massicotte, F., Lajeunesse D., Benderdour M., Pelletier J.P., Hilal G., Duval N. & Martel-Pelletier J. Can altered production of interleukin-1beta, interleukin-6, transforming growth factor-beta and prostaglandin E (2) by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis Cartilage.* 10: 491-500 (2002).
- 70- Hilal, G., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Ranger, P. & Lajeunesse, D. Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis Rheum.* 41: 891-9 (1998).
- 71- Mansell, J.P. & Bailey, A.J. Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J Clin Invest.* 101: 1596-603 (1998).
- 72- Henrotin, Y.E., Sanchez, C., Deberg, M.A., Piccardi, N., Guillou, G.B., Msika, P. & Reginster, J.Y. Avocado/soybean unsaponifiables increase aggrecan synthesis and reduce catabolic and proinflammatory mediator production by human osteoarthritic chondrocytes. *J Rheumatol.* 30:1825-34 (2003).
- 73- Lajeunesse, D., Reboul, P. Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. *Curr Opin Rheumatol* 15:628–633 (2003).
- 74- Cantatore, F.P., Crivellato, E., Nico, B., Ribatti, D. Osteocalcin is angiogenic in vivo. *Cell Biol Int* 29: 583–585 (2005).
- 75- Hilal, G., Massicotte, F., Martel-Pelletier, J., Fernandes, J.C., Pelletier, J.P., Lajeunesse, D. Endogenous prostaglandin E2 and insulin like growth factor 1 can modulate the levels of parathyroid hormone receptor in human osteoarthritic osteoblasts. *J Bone Miner Res* 16:713–721 (2001).
- 76- Mansell, J.P., Tarlton, J.F., Bailey, A.J. (Biochemical evidence for altered subchondral bone collagen metabolism in osteoarthritis of the hip. *Br J Rheumatol* 36:16–19 (1997).
- 77- Massicotte, F., Lajeunesse, D., Benderdour, M., Pelletier, J.P., Hilal, G., Duval, N., Martel-Pelletier, J. Can altered production of interleukin-1beta, interleukin-6, transforming growth factor-beta and prostaglandin E(2) by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients? *Osteoarthritis Cartilage* 10: 491–500 (2002).
- 78- Tat, S.K., Padrines, M., Theoleyre, S., Couillaud-Battaglia, S., Heymann, D., Redini, F., Fortun, Y. OPG/membranous-RANKL complex is internalized via the clathrin pathway before a lysosomal and a proteasomal degradation. *Bone* 39:706–715 (2006).
- 79- Janssens, K., Vanhoenacker, F., Bonduelle, M., et al. Camurati-Engelmann disease :review of the clinical, radiological, and molecular data of 24 families and implications for diagnosis and treatment. *J*

Med Genet; 43 :1-11(2006).

80- Benichou, O.D., Laredo, J.D., de Vernejoul. MC Type II autosomal dominant osteopetrosis (AlbersSchonberg disease): clinical and radiological manifestations in 42 patients. *Bone*; 26: 87-93 (2000).

81- Krishnan, V., Bryant, H.U. Macdougald, O.A. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest*; 116:1202-9 (2006).

82- Lioté F. Cytokines et voies de signalisation cellulaire au cours de la polyarthrite rhumatoïde. *Rev Rhum[Ed Fr]*; 69 (Suppl 5) : 206s-12s (2002).

83- Kyriakis, J.M., and J. Avruch. "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." *Physiol Rev* 81(2): 807-69 (2001).

84- Morel, J.C., Park, C.C., et al., "A novel role for interleukin-18 in adhesion molecule induction through NF kappa B and phosphatidylinositol (PI) 3-kinase-dependent signal transduction pathways." *J Biol Chem* 276(40): 37069-75 (2001).

85- Roux, PP., and Blenis, J. "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2): 320-44 (2004).

86- Calao, M., Burny, A., Quivy, V., Dekoninck, A., Van Lint, C.A. pervasive role of histone acetyltransferases and deacetylases in an NF-kappaB-signaling code. *Trends Biochem Sci*; 33 : 339-49 (2008).

87- Chen, L.F., Williams, S.A., Mu, Y., Nakano, H., Duerr, J.M., Buckbinder, L., Greene, W.C. NF-kappa B RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Mol Cell Biol*. 25: 7966-75 (2005).

88- Zarnegar, B., Yamazaki, S., He, J.Q., Cheng, G. Control of canonical NF-kappaB activation through the NIK-IKK complex pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*; 105: 3503-8 (2008).

89- Basak, S., Shih, V.F., Hoffmann, A. Generation and activation of multiple dimeric transcription factors within the NF-kappaB signaling system. *Mol Cell Biol*. 28: 3139-50 (2008).

90- Saccani, S., Pantano, S., Natoli, G. Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers. *Mol Cell*; 11: 1563-74 (2003).

91- Khan, K.A., Coquette, A., Davrinche, C., Herbein, G. Bcl-3-regulated transcription from major immediate-early promoter of human cytomegalovirus in monocytederived macrophages. *J Immunol*; 182: 7784-94 (2009).

92- Herlaar, E., and Brown, Z. "p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease." *Mol Med Today* 5(10): 439-47 (1999).

93- Kyriakis, J.M. and Avruch, J. "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction

pathways activated by stress and inflammation." *Physiol Rev* 81(2): 807-69 (2001).

94- Kataoka, T., Budd, R.C., et al. "The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways." *Curr Biol* 10(11): 640-8 (2000).

95- Neff, L., Zeisel, M. et al. "ERK 1/2- and JNKs-dependent synthesis of interleukins 6 and 8 by fibroblast-like synoviocytes stimulated with protein I/II, a modulin from oral streptococci, requires focal adhesion kinase." *J Biol Chem* 278(30): 27721-8 (2003).

96- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D. & Huelsken, J. Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7551–7559 (2007).

97- Brack, A.S. et al. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 317, 807–810 (2007).

98- Abrami, L., Kunz, B., Iacovache, I. & van der Goot, F.G. Palmitoylation and ubiquitination regulate exit of the Wnt signaling protein LRP6 from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 5384–5389 (2008).

99- Cselenyi, C.S., et al. LRP6 transduces a canonical Wnt signal independently of Axin degradation by inhibiting GSK3's phosphorylation of beta-catenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 8032–8037 (2008).

100- Clevers, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469–480 (2006).

101- Muncan, V., et al. T-cell factor 4 (Tcf7l2) maintains proliferative compartments in zebrafish intestine. *EMBO Rep.* 8, 966–973 (2007).

102- Kitagaki, J., Iwamoto, M., Liu, J.G., Tamamura, Y., Pacifici, M., Enomoto, M. Activation of beta-catenin-LEF/TCF signal pathway in chondrocytes stimulates ectopic endochondral ossification. *Osteoarthritis Cartilage*; 11: 36–43 (2003).

103- Chen, Y., Alman, B.A. Wnt pathway, an essential role in bone regeneration. *J Cell Biochem*; 106: 353–362 (2009).

104- Nelson, W.J., Nusse, R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*; 303: 1483–1487 (2004).

105- Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V., Kaykas, A. WNT and beta catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet*; 5: 691–701 (2004).

106- Wang, H.Y., Malbon, C.C. Wnt signaling, Ca<sup>2+</sup>, and cyclic GMP: visualizing Frizzled functions. *Science*; 300: 1529–1530 (2003).

107- Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, P.J, Yang, Y. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J. Cell Biol.* 162: 899–908 (2003).

- 108- Hu, H., Hilton, M.J., Yu, D.M. Ornitz, F. Long, Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development, *Development* 132 49–60 (2005).
- 109- Karsenty, G., Wagner, E.F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development, *Dev. Cell* 2 389–406 (2002).
- 110- Nam, J.S., Turcotte, T.J., Smith, P.F., Choi, S., Yoon, J.K. Mouse cristin/ R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. *J. Biol. Chem.* 281: 13247–13257 (2006).
- 111- Semenov, M., Tamai, K., He, X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J. Biol. Chem.* 280: 26770–26775 (2005).
- 112- Little, R.D., Recker, R.R., Johnson, M.L. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N. Engl. J. Med* 347:943-944 (2002).
- 113- Little, R.D., Carulli, J.P., Del Mastro, R.G., et al. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am. J. Hum. Genet.* 70:11-19 (2002).
- 114- Mani, A., Radhakrishnan, J., Wang, H., Mani, A., Mani, M.A., Nelson-Williams, C., Carew, K.S., Mane, S., Najmabadi, H., Wu, D., Lifton, R.P. LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. *Science* 315:1278-1282 (2007).
- 115- Kim, K.A., Zhao, J., Andarmani, S., et al. R-Spondin proteins: a novel link to beta-catenin activation. *Cell Cycle*; 5: 23–26 (2006).
- 116- Abed, E., Chan, T.F., Delalandre, A., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Lajeunesse, D. R-spondins are newly recognized players in osteoarthritis that regulate Wnt signaling in osteoblasts. *Arthritis Rheum.* 63: 3865–3875 (2011).
- 117- Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, P.J., Yang, Y. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J. Cell. Biol.* 162: 899–908 (2003).
- 118- Niehrs, C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* 25, 7469–7481 (2006).
- 119- Bilic, J., Huang, Y.L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C.M., Bienz, M., and Niehrs, C. Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* 316, 1619–1622 (2007).
- 120- Zeng, X., Huang, H., Tamai, K., Zhang, X., Harada, Y., Yokota, C., Almeida, K., Wang, J., Doble, B., Woodgett, J., et al., Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* 135, 367–375

(2008).

121- Potts, J.T., Gardella, T.J. Progress, paradox, and potential: parathyroid hormone research over five decades. *Ann N Y Acad Sci.* 1117:196–208 (2007).

122- Lane, N.E., Silverman, S.L. Anabolic therapies. *Curr Osteoporos Rep*; 8:23–7 (2010).

123- Choudhary, S., Huang, H., Raisz, L., Pilbeam, C. Anabolic effects of PTH in cyclooxygenase-2 knockout osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*; 372: 536–41 (2008).

124- Morham, S.G., Langenbach, R., Loftin, C.D., Tiano, H.F., Vouloumanos, N., Jennette, J.C., et al. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell*; 83:473–82 (1995).

125- Wan, M., Yang, C., Li, J., Wu, X., Yuan, H., Ma, H., He, X., Nie, S., Chang, C., and Cao, X. Parathyroid hormone signaling through low-density lipoprotein-related protein 6. *Genes Dev.* 22, 2968–2979 (2008).

126- Wang, B., Yang, Y., Abou-Samra, AB., Friedman, P.A. NHERF1 regulates parathyroid hormone receptor desensitization; interference with  $\beta$ -arrestin binding. *Mol Pharmacol.* 75:1189–1197. [PubMed: 19188335] (2009).

127- Altman, R., Asch, E., Bloch, D., Bole, G., Borenstein, D., Brandt, K., et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum*; 29:1039-49 (1986).

128- Thomas, C., Denis, C., Aline, D., Nicolas, D. & Daniel, L. Elevated Dickkopf-2 levels contribute to the abnormal phenotype of human osteoarthritic osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*; 26: 1399-1410 (2011).

129- Krishnan, V., Bryant, H.U., MacDougald, O.A. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 2006; 116: 1202–1209. Les effets de l'hormone parathyroïdienne sur la voie de signalisation Wnt dans l'os. *J Cell Biochem.* 95 (6): 1178-1190 (2005).

130- Potts, J.T., Gardella, T.J. Progress, paradox, and potential: parathyroid hormone. Research over five decades. *Ann N Y Acad Sci*; 1117: 196–208 (2007).

131- Lane, N.E., Silverman, S.L. Anabolic therapies. *Curr Osteoporos Rep*; 8: 23–7 (2010).

132- Rodan, GA., Rodan, SB. Expression of the osteoblastic phenotype. In: Peck WA, editor. *Bone and mineral research.* Vol. 11. Amsterdam: Elsevier. p. 244-85 (1990).

133- Malecz, N., Bambino, T., Bencsik, M., Nissenson, R.A. Identification of phosphorylation sites in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone. Receptor phosphorylation is not required for agonist-induced internalization. *Mol Endocrinol.* 12: 1846–1856. [PubMed: 9849959] (1998).

134. Chauvin, S., Bencsik, M., Bambino, T., Nissenson, R.A. PTH receptor recycling: role of receptor dephosphorylation and  $\beta$ -arrestin. *Mol Endocrinol.* 16: 2720–2732. [PubMed: 12456793] (2002).
- 135- Miedlich, S.U., Abou-Samra, A.B. Eliminating phosphorylation sites of the parathyroid hormone receptor type 1 differentially affects stimulation of phospholipase C and receptor internalization. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 295:E665–E671. [PubMed: 18577695] (2008).
- 136- Ferrari, S.L., Behar, V., Chorev, M. Rosenblatt M, Bisello A. Endocytosis of ligand-human parathyroid hormone receptor 1 complexes is PKC-dependent and involves  $\beta$ -arrestin2. Real-time monitoring by fluorescence microscopy. *J. Biol. Chem*; 274: 29968–29975. [PubMed: 10514480] (1999).
- 137- Conway, BR., Minor, LK., Xu, JZ., Andrea, MR., Ghosh, RN., Demarest, KT. Quantitative analysis of agonist-dependent parathyroid hormone receptor trafficking in whole cells using a functional green fluorescent protein conjugate. *J. Cell. Physiol*; 189:341–355. [PubMed: 11748592] (2001).
- 138- Ferguson, SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* 53:1–24. [PubMed: 11171937] (2001).
- 139- Lajeunesse, D. The role of bone in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 12 Suppl A, S34–38 (2004).
- 140- Abramson, S.B. & Attur, M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 11, 227 (2009).
- 141- Zhang, Y. & Jordan, J.M. Epidemiology of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 34, 515–529 (2008).
- 142- Kulkarni, N.H., Halladay, D.L., Miles, R.R., Gilbert, L.M., Frolik, C.A., Galvin, R.J., Martin, T.J., Gillespie, M.T., and Onyia, J.E. Effects of parathyroid hormone on Wnt signaling pathway in bone. *J. Cell. Biochem.* 95, 1178–1190 (2005).
- 143- Suzuki, A., Ozono, K., Kubota, T., Kondou, H., Tachikawa, K., and Michigami, T. PTH/cAMP/PKA signaling facilitates canonical Wnt signaling via inactivation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in osteoblastic Saos-2 cells. *J. Cell. Biochem.* 104, 304–317 (2008).
- 144- Yamamoto, H., Sakane, H., Michiue, T., Kikuchi, A. Wnt3a and Dkk1 regulate distinct internalization pathways of LRP6 to tune the activation of beta-catenin signalling. *Dev Cell* 15:37–48 (2008).
- 145- Bukayama, S., Schipani, E., Juppner, H., Lanske, B., Kronenberg, H.M., Abou-Samra, A.B., Bringham, FR. Role of protein kinase-A in homologous down-regulation of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acid in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Endocrinology* 134:1851–1858 (1994).

- 146- Partridge, N.C., Bloch, S.R., Pearman, A.T. Signal transduction pathways mediating parathyroid hormone regulation of osteoblastic gene expression. *J. Cell. Biochem.* 55: 321–327 (1994).
- 147- Dunlay, R., Hruska, K. PTH receptor coupling to phospholipase C is an alternate pathway of signal transduction in bone and kidney. *Am J Physiol* 258: F223–F231 (1990).
- 148- Cosman, F., Morrow, B., Kopal, M., Bilezikian, J.P. Stimulation of inositol phosphate formation in ROS 17/2.8 cell membranes by guanine nucleotide, calcium, and parathyroid hormone. *J. Bone Miner Res.* 4: 413–420 (1989).
- 149- Civitelli, R., Fujimori, A., Bernier, S.M., Warlow, P.M., Goltzman, D., Hruska, K.A., Avioli, L.V. Heterogeneous intracellular free calcium responses to parathyroid hormone correlate with morphology and receptor distribution in osteogenic sarcoma cells. *Endocrinology* 130: 2392–2400 (1992).
- 150- Yamaguchi, D.T., Hahn, T.J., Iida-Klein, A., Kleeman, C.R., Muallem, S. Parathyroid hormone-activated calcium channels in an osteoblast-like clonal osteosarcoma cell line. cAMP dependent and cAMP-independent calcium channels. *J. Biol. Chem* 262: 7711–7718 (1987).
- 151- Fukayama, S., Tashjian, A.H. Jr, Bringhurst F.R. Mechanisms of desensitization to parathyroid hormone in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Endocrinology* 131: 1757–1769 (1992).
- 152- Woolley DE., Tetlow LC. Observations on the microenvironmental nature of cartilage degradation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1997; 56:151–61.
- 153- Reya, T., Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005 ; 434 : 843-50.