



Université de Montréal

**Rôle de la signalisation Wnt non-canonique dans l'étiologie  
de l'ostéoarthrose chez l'humain**

par

Xavier Martineau

Département de Biochimie et Médecine moléculaire

Centre de Recherche du CHUM

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences  
en Biochimie

avril 2016

© Xavier Martineau, 2016

## Résumé

Les études cliniques et *in vitro* suggèrent que la sclérose de l'os sous-chondral due aux ostéoblastes (Ob) anormaux est impliquée dans la progression de l'ostéoarthrose (OA). Les Ob OA humains isolés à partir d'os sous-chondral sclérosé montrent un phénotype altéré, un niveau réduit de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine canonique et une minéralisation *in vitro* réduite. Il existe également deux voies non-canoniques, Wnt/PKC et Wnt/PCP qui ont été décrites dans la littérature. Cependant, il n'existe aucune étude qui traite de ces deux voies dans les Ob OA. Ces voies sont activées après qu'un ligand Wnt non-canonique tel que Wnt-5a se lie à un récepteur Wnt couplé à des corécepteurs de la voie non-canonique. Ceci enclenche, respectivement pour la voie Wnt/PKC- $\text{Ca}^{2+}$  et Wnt/PCP, la phosphorylation de PKC (*p*-PKC) et la phosphorylation de JNK (*p*-JNK) et agit sur les cibles en aval. Nous avons voulu déterminer s'il était possible de constater des altérations dans les voies Wnt non-canoniques dans les Ob OA.

Nous avons préparé des cultures primaires d'ostéoblastes sous-chondral humains à partir de plateaux tibiaux de patients OA subissant une arthroplastie totale du genou, ainsi qu'à partir de plateaux tibiaux recueillis à l'autopsie de patients « normaux ». L'expression des gènes impliqués dans les voies Wnt/PKC et Wnt/PCP a été évaluée par RT-qPCR et la production par Western Blot des protéines, ainsi que celle de *p*-PKC et *p*-JNK et que l'activité des facteurs NFAT et AP-1 utilisés par ces deux voies. L'activité phosphatase alcaline (ALPase) et la quantité d'ostéocalcine (OC) ont été évaluées respectivement à l'aide d'hydrolyse de substrat et d'ELISA. Le niveau de minéralisation a été évalué par la coloration au rouge Alizarine.

Nos résultats montrent que l'expression et la production de Wnt-5a étaient augmentées dans les Ob OA comparées aux Ob N et LGR5 était significativement plus élevée. De plus, l'expression de LGR5 est directement régulée via la stimulation ou la diminution de Wnt-5a, à la fois au niveau de l'ARNm et des protéines. Par ailleurs, Wnt-5a a stimulé la phosphorylation de JNK et de PKC ainsi que l'activité NFAT et AP-1. Les niveaux de minéralisation ainsi que d'activité ALPase et de sécrétion d'OC ont aussi été affectés par les changements du niveau de Wnt-5a. Ces résultats suggèrent que Wnt-5a, qui est augmentée dans les OA Ob, peut stimuler les voies Wnt non-canoniques et affecter le phénotype et la minéralisation des OA Ob humains.

**Mots-clés :** ostéoarthrose, arthrose, OA, ostéoblastes, Ob, Wnt, Wnt non-canonique, Wnt-5a

## Abstract

Clinical and *in vitro* studies suggest that subchondral bone sclerosis due to abnormal osteoblasts (Ob) is involved in the progression and/or onset of osteoarthritis (OA). Human Ob isolated from sclerotic subchondral OA bone tissue show an altered phenotype, a decreased canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway (cWnt), and a reduced mineralization *in vitro*. Besides the cWnt pathway, at least two non-canonical signaling pathways, the Wnt/PKC and Wnt/PCP pathway have been described. These pathways are activated when a non-canonical Wnt ligand like Wnt-5a binds to a Wnt receptor coupled with non-canonical co-receptors. This activates, respectively for Wnt/PKC- $\text{Ca}^{2+}$  and Wnt/PCP, the phosphorylation of PKC (pPKC) and the phosphorylation of JNK (pJNK) and their effect on downstream targets. However, there are no reports of either pathway in OA Ob. Here, we studied if alterations of the non-canonical pathways could be observed in OA Ob.

We prepared primary human subchondral Ob using the tibial plateaus of OA patients undergoing total knee arthroplasty, or from tibial plateaus of normal individuals at autopsy. The expression of genes involved in Wnt/PKC and Wnt/PCP was evaluated by RT-qPCR and their protein production by Western blot analysis, in addition to *p*-PKC and *p*-PCP and NFAT and AP-1 activity with luciferase. Alkaline phosphatase activity and osteocalcin levels were evaluated respectively by substrate hydrolysis and ELISA respectively, and mineralization levels were evaluated with Alizarin red staining.

OA Ob showed an increased alkaline phosphatase activity and osteocalcin release. The expression of Wnt5a was increased in OA Ob compared to normal. The expression of LGR5 was significantly increased in these cells. Moreover, the expression and production of LGR5 is directly modulated via the stimulation or inhibition of Wnt5a. However, Wnt5a did not stimulate the expression of LGR4. Wnt5a increased the phosphorylation of PKC and JNK as well as NFAT and AP-1 activity. Mineralization levels as well as alkaline phosphatase activity and osteocalcin secretion levels were also linked with changes in Wnt-5a levels. These data indicate that Wnt5a, which is increased in OA Ob, can directly stimulate the Wnt/PKC and Wnt/PCP pathways and this can affect the phenotype and mineralization observed in human OA Ob.

**Keywords:** Osteoarthritis, OA, osteoblast, Ob, Wnt, non-canonical Wnt, Wnt-5a

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures .....	v
Liste des abréviations.....	vi
Remerciements.....	ix
Introduction.....	1
1. Ostéoarthrose .....	2
1.1 Pathologie .....	2
1.2 Épidémiologie.....	5
1.3. Facteurs de risque .....	5
2. Cartilage.....	7
2.1 Cartilage normal.....	7
2.2 Cartilage arthrosique.....	8
3. Tissu osseux .....	11
3.1 Matrice osseuse.....	12
3.1.1 Ostéoblastes .....	12
3.1.2 Ostéoclastes.....	13
4. Tissu osseux arthrosique.....	16
4.1 Os sous-chondral OA.....	16
4.2 Biochimie de l'os sous-chondral.....	17
5. Signalisation Wnt.....	20
5.1 Signalisation Wnt canonique .....	21
5.2 Signalisation Wnt non canonique .....	23
5.2.1 Signalisation Wnt/PCP.....	23
5.2.2 Signalisation Wnt/PKC-Ca <sup>2+</sup> .....	24

6. Hypothèse de recherche .....	26
7. Article .....	27
8. Discussion générale .....	53
9. Conclusion .....	60
Bibliographie.....	i

# Liste des figures

## Introduction

Figure 1. Différence entre l'articulation du genou en santé et arthrosique. ....	4
Figure 2. Schéma des différentes zones du cartilage articulaire sain et arthrosique .....	10
Figure 3. L'origine et la localisation des différentes cellules du tissu osseux. ....	15
Figure 4. Résumé des différentes voies de signalisation Wnt.....	25
Figure 5. Résumé général des interactions observées dans l'étude .....	60

## Article

Figure 1. Expression differences measured with RT-qPCR relative to GAPDH expression. .....	45
Figure 2. Relation between Wnt-5a, LGR5 and TGF- $\beta$ 1 on gene expression in OA Ob measured with RT-qPCR and protein production measured with Western blot. ....	46
Figure 3. Effect over 21 days of siWnt-5a treatment on gene expression measured with RT- qPCR .....	47
Figure 4. Effect of Wnt-5a reduction on phenotype of OA Ob.....	48
Figure 5. Effect of Wnt-5a and Rspo-2 treatments on non-canonical Wnt pathway activity levels, as indicated by the phosphorylation levels of PKC and JNK proteins in N and OA Ob. ....	49

## Liste des abréviations

OA : Ostéoarthrose

Wnt : Wingless-related integration site

IRM : Imagerie par résonance magnétique

BML : lésion de la moelle osseuse (Bone Marrow Lesion)

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

mTOR : mammalian target for rapamycin

PTOA : OA post-traumatique (Post-traumatic OA)

ECM : Matrice extracellulaire (extracellular matrix)

IL : Interleukine

MMP : Matrix metalloproteinases

ADAMTS : A Disintegrin And Mettaloproteinase with Thrombospondin motifs

VEGF : Vascular endothelial growth factor

Runx : Runt-related transcription factor

Ob: Ostéoblaste

FGF : Fibroblast Growth Factor

BMP : Bone Morphogenic protein

PTHrP : Parathyroid Hormone related Peptide

RANK : Receptor activator of nuclear factor kappa-B

RANKL : Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

OPG : Osteoprotegerin

TGF- $\beta$ 1 : Transforming Growth Factor- $\beta$ 1

IGF : Insulin-like Growth Factor

COL1 : Collagène type 1

IMC : Indice de Masse Corporelle

PGE<sub>2</sub> : Prostaglandine E<sub>2</sub>

Wnt/PCP : Wnt Planar Cell Polarity

Wnt/PKC-Ca<sup>2+</sup> : Wnt Protein Kinase C – Ca<sup>2+</sup>

LRP : Low-density lipoprotein receptor-related protein

Fzd : récepteur Frizzled

Dvl : récepteur Dishevelled  
GSK-3 $\beta$  : Glycogen Synthase Kinase 3 beta  
APC : Adenomatous polyposis coli  
DKK : Dickopf-related protein  
Rspo : R-spondine  
LGR : Leucine-Rich G protein-coupled receptor  
SOST : Sclérostine  
GTPase : Guanosine Triphosphatase  
JNK : JUN-N-terminal kinase  
ATF2 : Activating transcription factor 2  
CAMKII : calmodulin-dependent kinase II  
NFAT : Nuclear factor regulator of associated T-cells  
ALP : Alkaline Phosphatase

*À tous ceux qui m'ont aidé et supporté durant ce cheminement*

## Remerciements

D’abord et avant tout, je tiens à remercier Dr Daniel Lajeunesse, qui m’a accueilli au sein de son équipe et qui, à chaque étape de mon cheminement, m’a aidé et offert de précieux conseils. Grâce à lui, j’ai eu l’opportunité de réaliser un projet de maîtrise stimulant et intéressant, qui m’a permis de développer plusieurs habiletés, ainsi que d’affiner mon sens critique et de raisonnement.

Ensuite, un grand merci à Dr Élie Abed, qui m’a épaulé tous les jours depuis la première journée de stage d’été pour me montrer les différentes techniques utilisées pour mon projet, ainsi que toutes les informations théoriques nécessaires pour comprendre la théorie associée à ma maîtrise. Son aide pour tous les aspects de ma maîtrise, allant de la préparation des présentations pour les conférences à l’écriture de résumés et autres, a été essentielle à ma réussite.

Également, merci à toute l’équipe du laboratoire Martel-Pelletier pour l’assistance technique régulière et essentielle ainsi que pour les conversations toujours intéressantes qui ont animé mes journées.

Un énorme merci à Valérie, qui m’a supporté et aimé tous les jours durant ces longues années et même durant les moments où je me supportais à peine.

Finalement, un merci tout spécial à toute ma famille, qui a toujours cru en moi, depuis le début de mes études (et avant), peu importe les conditions. Grâce à eux et à leur aide, j’ai pu poursuivre le cheminement que j’ai choisi et j’ai pu me rendre jusqu’ici dans les meilleures conditions possibles.

## Introduction

L'arthrite est une famille de maladies comprenant des dizaines d'affections différentes ayant pour point commun l'inflammation d'une articulation. Elle peut affecter toutes les articulations du corps. Les différentes maladies vont des formes plus bénignes comme la tendinite ou la bursite à des formes invalidantes comme la polyarthrite rhumatoïde. L'arthrite peut affecter tout le monde à n'importe quel âge, cependant, la forme la plus commune, l'arthrose a une prévalence plus élevée chez les gens de plus de 50 ans.

L'ostéoarthrose (OA) ou arthrose est une maladie des articulations qui affecte des millions de personnes partout dans le monde. Il s'agit de la maladie causant le plus grand nombre d'incapacités physiques en Amérique du Nord (1). Malgré cela, il s'agit d'une maladie qui est relativement mal comprise et pour laquelle il n'y a pas de traitement qui permettrait d'en guérir. Les seuls traitements possibles actuellement visent à réduire les douleurs ou à améliorer le fonctionnement de certaines articulations. L'arthrose est principalement caractérisée par une perte graduelle du cartilage au niveau des articulations qui peut aller jusqu'à la dénudation de l'os, et par une sclérose de l'os sous-chondral (2). Les travaux de plusieurs laboratoires, tant ceux cliniques que ceux utilisant des modèles animaux spontanés d'OA, ont suggéré que la dégradation du cartilage est précédée par la sclérose de l'os sous-chondral, ce qui suggère un dérèglement qui partirait de l'os pour venir affecter le cartilage. La signalisation Wnt est importante pour le contrôle de la formation osseuse et la minéralisation, et des travaux suggèrent que cette signalisation est aussi importante pour la sclérose de l'os sous-chondral. Ici, nous nous intéressons particulièrement à la signalisation Wnt non canonique et ses effets sur les ostéoblastes arthrosiques humains.

# 1. Ostéoarthrose

## 1.1 Pathologie

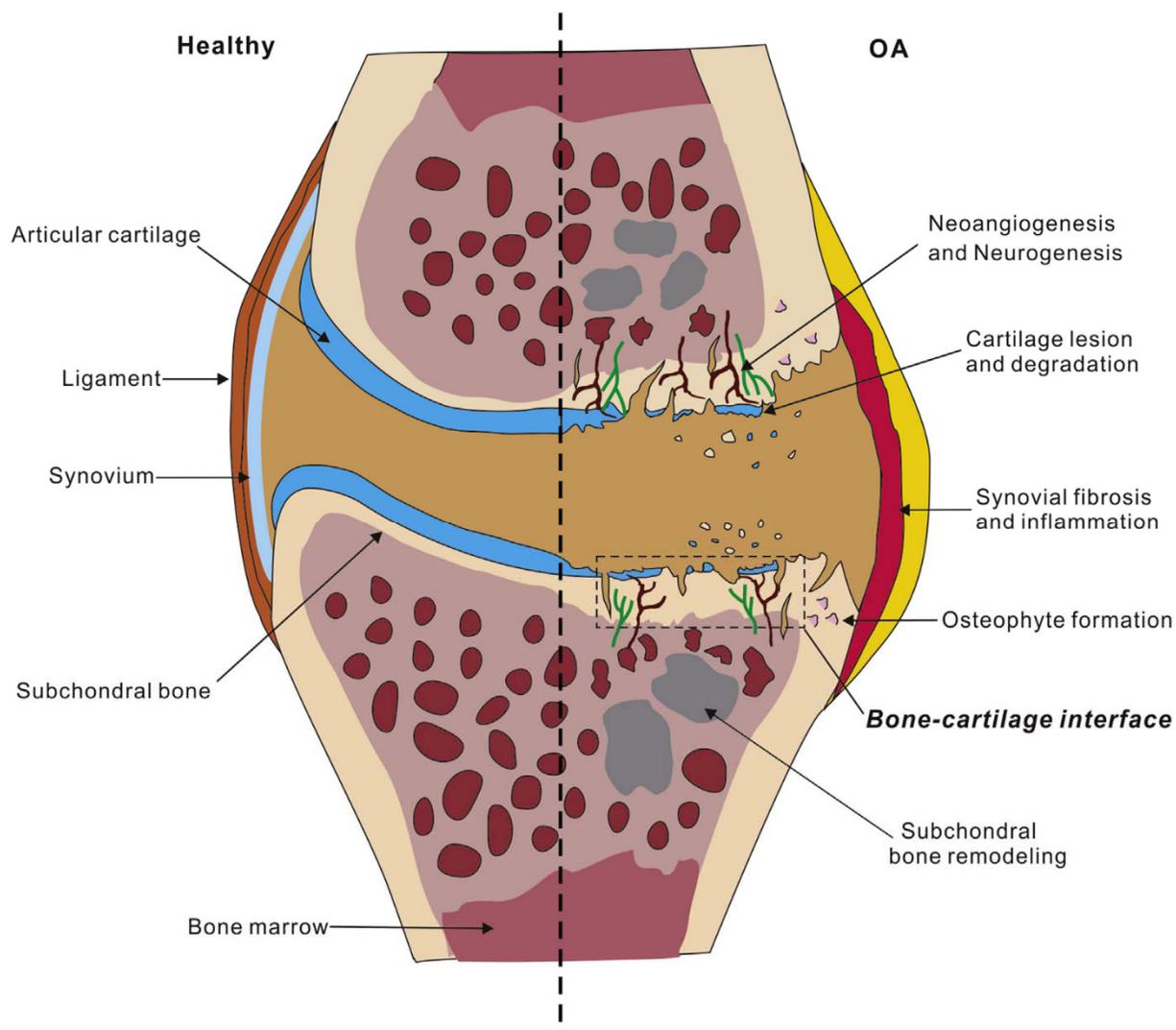
L'ostéoarthrose (OA) est la forme d'arthrite la plus commune et induit éventuellement beaucoup de douleurs aux personnes qui en sont atteintes. Généralement, il est possible d'observer une perte graduelle du cartilage aux articulations, une sclérose de l'os sous-chondral et une inflammation de la membrane synoviale (2). Il est aussi possible de détecter la présence d'ostéophytes et de constater un déséquilibre entre la perte et le gain de cartilage, ainsi que dans la vitesse de remodelage de l'os sous-chondral, ces phénomènes étant observés à différentes intensités selon la progression de la maladie (3). L'ostéoarthrose peut affecter toutes les articulations dans le corps, par contre, elle est le plus souvent observée dans les genoux et dans les hanches (4), ainsi que dans les mains. C'est pour cette raison que notre équipe ainsi que plusieurs autres s'attardent à l'OA du genou.

La vision classique de l'OA a pour principe que les symptômes commencent par la dégradation du cartilage et que celle-ci soit causée par l'usure excessive, une blessure, par l'âge ou par un surpoids qui impose un stress important aux articulations portantes (5). La dégradation du cartilage serait graduellement plus importante avec le temps, et éventuellement, les os commenceraient à se toucher directement en raison de la perte complète ou partielle du cartilage articulaire, ce qui provoque de la douleur à l'articulation durant le mouvement. L'os tenterait ensuite de se réparer d'une mauvaise manière en réponse aux lésions causées par ce contact et c'est ce qui causerait la sclérose de l'os sous-chondral. On observerait donc une formation de nouvel os qui excède la dégradation (6). Les symptômes observés dans l'os seraient donc une conséquence d'une usure anormale du cartilage, une réponse à un événement externe. Cette vision de la maladie est encore débattue, mais le consensus est en train de passer de cette vision qui est cartilage centrique à une autre vision qui reconnaît que l'OA est en fait une maladie complexe qui comporte des causes différentes en fonction de l'articulation et des différents patients (7).

Dans les faits, l'OA (du genou) est une maladie qui implique plusieurs tissus différents durant le développement et la progression de la maladie. En effet, le cartilage, la membrane

synoviale, et l'os sous-chondral jouent tous des rôles importants (8-10). Les principaux changements observés dans l'articulation sont ici illustrés sur la figure 1. Le rôle et l'importance relative de chacun de ces tissus dans le commencement et la progression de l'arthrose sont encore cependant mal compris. Il est connu qu'au début de la progression de l'OA, l'os sous-chondral est sujet à un très grand nombre de changements morphologiques qui sont dus, entre autres, à un métabolisme altéré des ostéoblastes. Ceci amène un remodelage altéré de l'os et a éventuellement comme effet la sclérose de l'os sous-chondral, c'est-à-dire une accumulation de tissu ostéoïde, un tissu semblable au tissu osseux (décrit ci-après dans la section 3), mais qui est soit mal ou pas minéralisé. En fait, on remarque que les changements dans le cartilage sont plus importants que les changements dans le tissu osseux seulement plus tard au cours de la progression de la maladie. Également, certains modèles animaux ont permis une analyse chronologique *in vivo* de la maladie et ceux-ci montrent que les changements dans l'os sous-chondral précèdent les changements dans le cartilage (11-13). Il est cependant plus difficile d'effectuer une étude semblable chez les humains, puisqu'il n'existe pas encore de marqueurs spécifiques connus nous permettant d'identifier a priori les individus qui en seront atteints.

Il existe cependant une technique qui est de plus en plus répandue pour détecter les changements structuraux *in situ* de l'os sous-chondral : l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Cette technologie permet de détecter plusieurs signes de l'OA, dont l'usure du cartilage, et la présence de lésions dans la moëlle osseuse (BML) sous l'os sous-chondral en plus de la présence d'ostéophytes, de la synovite, ainsi que de vérifier l'état des ligaments et autres structures du genou (14, 15). La présence de BML implique que la régulation de l'os ainsi que sa structure sont affectées dans les genoux OA (16). Également, une étude longitudinale a pu montrer que la perte et l'usure du cartilage sont intimement liées à la détérioration de la structure de l'os sous-chondral dans l'OA du genou (17, 18). Il s'agit déjà ici de plusieurs éléments qui semblent tous suggérer l'importance de l'os sous-chondral dans la pathologie de l'OA. En effet, de plus en plus de groupes de recherche sur l'OA confirment l'importance de l'os sous-chondral dans cette pathologie.



**Figure 1. Différence entre l'articulation du genou en santé et arthrosique.**

Tous les tissus de l'articulation sont impliqués dans la maladie; le cartilage OA est dégradé et les deux os se touchent directement. L'os sous-chondral est sclérosé et l'on peut observer la présence d'ostéophytes. Figure tirée de X.L. Yuan et coll. (2014) (10).

## 1.2 Épidémiologie

L'arthrite est un terme qui désigne les différentes affectations touchant les articulations, et tout le monde peut en souffrir, peu importe l'âge, la condition physique ou l'origine ethnique. Au Canada seulement, il y a plus de 4,6 millions de personnes qui souffrent d'arthrite, soit un adulte sur six au pays, et le nombre de personnes affectées va augmenter au courant des prochaines années jusqu'à atteindre 7,5 millions de Canadiens, en conséquence du vieillissement de la population (1). Il s'agit d'ailleurs de l'affectation chronique la plus déclarée par les femmes au Canada et de la troisième par les hommes (1). En plus de nuire gravement à la qualité de vie des personnes qui en souffrent, cette maladie a des répercussions sur l'économie canadienne; il est estimé que les pertes liées aux coûts de soins de santé et en perte de productivité des travailleurs sont de 33 milliards de dollars annuellement (19). Les personnes souffrant d'arthrite sont également 33% plus à risque d'avoir une mauvaise santé mentale ou de souffrir de troubles de l'humeur ou d'anxiété comme la dépression comparativement à ceux atteints d'autres types de maladie chronique (1).

## 1.3. Facteurs de risque

Il existe plusieurs facteurs de risque qui ont été identifiés comme pouvant effectivement augmenter les chances de souffrir de l'arthrose au courant de sa vie. Étant donné que le phénotype de la maladie est différent en fonction de l'articulation, les facteurs de risque diffèrent eux aussi légèrement selon l'articulation en question. Les principaux facteurs de risque qui sont liés à la maladie sont l'obésité, l'âge et les blessures aux articulations (1, 7, 20).

Le surpoids ou l'obésité est l'un des facteurs les plus fortement liés au développement de l'OA (21). Cette corrélation est souvent associée uniquement au poids supplémentaire qui cause un stress plus grand sur les articulations et éventuellement des dommages, mais il ne s'agit pas de la seule raison pour laquelle il s'agit d'un facteur de risque. L'obésité induit également des facteurs métaboliques et inflammatoires qui affectent la bonne santé de l'articulation et qui peuvent mener à l'arthrose (22). En effet, certaines études ont pu démontrer chez la souris que

la qualité de l'alimentation est associée au développement de l'OA et non pas le poids directement (20).

Un deuxième facteur qui est fortement associé à l'OA est l'âge (21). En effet, bien que l'arthrose puisse théoriquement survenir à n'importe quel âge, le risque augmente lors du vieillissement. La plupart des études se concentrent sur le vieillissement du cartilage et la sénescence des chondrocytes, bien que tous les tissus vieillissent en même temps. En effet, avec l'âge, l'autophagie des cellules devient moins efficace et cause une accumulation d'organelles et de protéines endommagées dans le tissu. Ceci est particulièrement dommageable dans le cartilage où il a été démontré, avec des souris délétées en PPAR $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma), que l'homéostasie du cartilage est affectée et ceci cause une dégradation accélérée du cartilage ainsi qu'une surproduction de médiateurs cataboliques, l'apoptose des chondrocytes et une expression augmentée de mTOR (mammalian target for rapamycin, un régulateur négatif de l'autophagie) (23).

Il existe une autre forme d'OA qui est nommée la PTOA (post-traumatic OA), qui se développe à la suite d'une blessure à une articulation. Cette forme d'OA offre la possibilité de traiter rapidement la blessure afin de prévenir la progression sur plusieurs années de la maladie. L'OA peut se développer en conséquence à une blessure initiale qui a entraîné des lésions dans les tissus de l'articulation qui, si non traitées, peuvent contribuer au développement de l'OA (20).

## 2. Cartilage

Le cartilage est un type de tissu connectif très spécialisé dans les articulations qui sert à fournir une surface lisse et bien lubrifiée pour que les articulations puissent bouger et distribuer les charges avec un coefficient de friction minimale. Le cartilage articulaire ne comporte ni vaisseaux sanguins ou lymphatiques ni de nerfs et peut difficilement se réparer (24).

### 2.1 Cartilage normal

Le type de cartilage qui est présent dans les articulations est de type hyalin et mesure environ 2 à 4 mm d'épaisseur. Il est composé d'une matrice extracellulaire (ECM) composée d'eau, de collagène, de protéoglycanes ainsi que d'autres protéines et le tout est parsemé des cellules spécialisées qui maintiennent la matrice, les chondrocytes (25, 26). Les différentes composantes du cartilage sont arrangées de manières spécifiques selon la zone dans laquelle ils se trouvent. On peut retrouver trois zones ou régions principales d'organisation dans le cartilage, soit la région superficielle, la région du milieu et la région profonde (figure 2).

La région superficielle représente de 10 à 20% du volume total du cartilage articulaire et sert principalement à protéger les couches inférieures de cartilage des forces de cisaillement. Les fibres de collagène de cette couche sont alignées parallèlement et très serrées. C'est cette couche qui est en contact avec le fluide synovial et qui protège les autres couches des forces de compression, de cisaillement et de tension imposées par l'articulation (24).

La région du milieu représente de 40 à 60% du volume total du cartilage articulaire et a pour fonction d'être un lien anatomique et fonctionnel entre la zone superficielle et la zone profonde. Cette région contient peu de chondrocytes et est composée de protéoglycanes et de fibrilles de collagènes plus épaisses, organisées de manière oblique, fournissant ainsi la première ligne de défense aux forces de compression (24).

La région profonde, quant à elle, fournit la plus grande partie de la résistance aux forces de compression. Elle représente environ 30% du volume du cartilage articulaire. Elle contient les fibrilles de collagène les plus grosses et la plus forte concentration de protéoglycanes ainsi

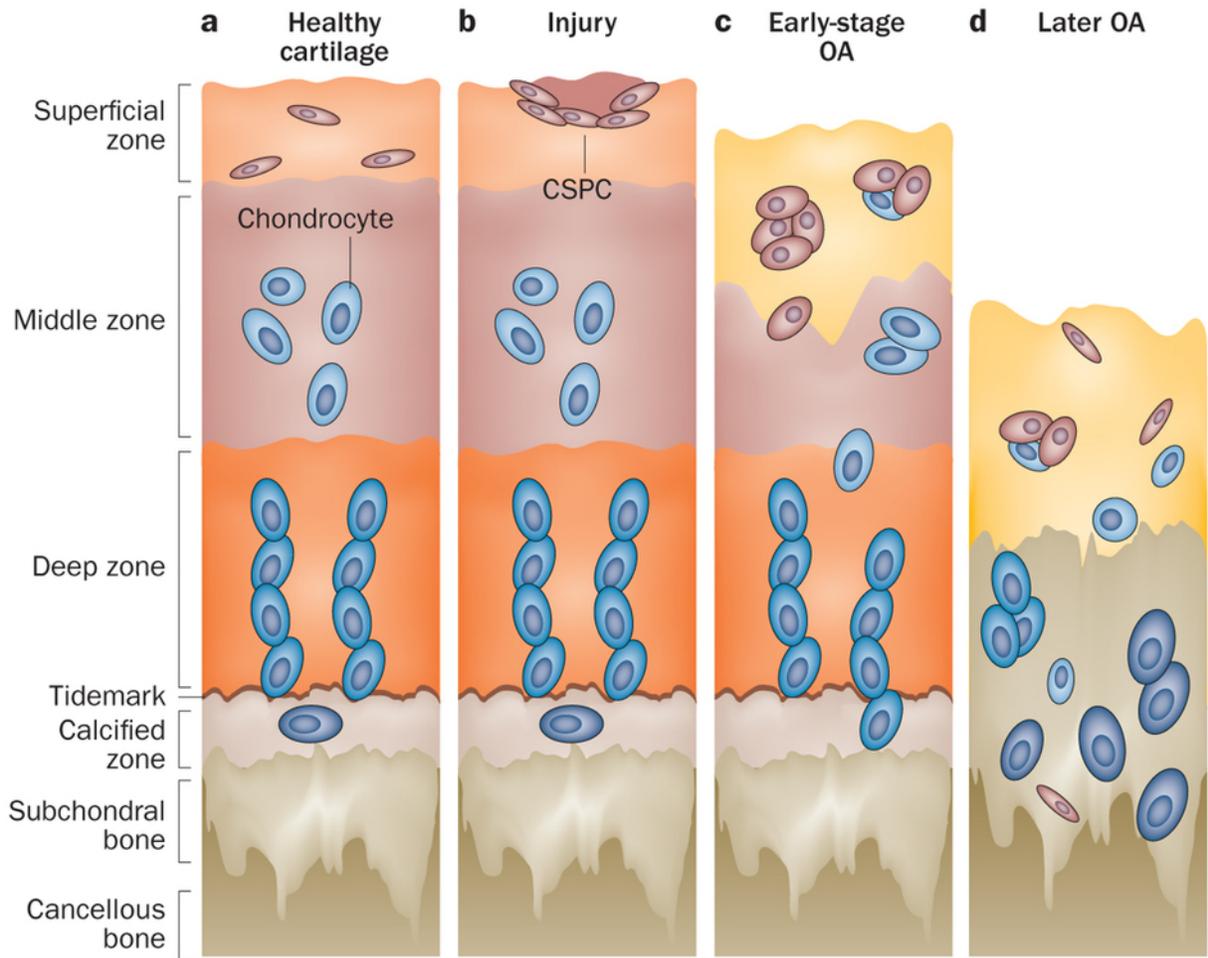
que la plus faible concentration d'eau. Les différentes composantes de cette couche sont disposées de façon à offrir la plus grande résistance possible aux forces de compression. Elle est aussi liée au cartilage calcifié, qui sert à lier fermement le cartilage à l'os sous-chondral qui se retrouve juste dessous (figure 2) (24).

Le type de cellule présent dans le cartilage est le chondrocyte. Il s'agit d'une cellule hautement spécialisée, issue des cellules souches mésenchymateuses et qui constituent environ 2% du volume total du cartilage articulaire (27). Ces cellules ont un rôle unique dans le développement et le maintien de la matrice extracellulaire. La concentration, forme et grosseur des chondrocytes varient avec leur emplacement dans le cartilage. Chacune des cellules crée un microenvironnement autour d'elle qui prend en charge la régulation des processus anaboliques et cataboliques de la matrice extracellulaire autour d'elle et conserve un équilibre entre les deux. Ce microenvironnement emprisonne la cellule dans la matrice et empêche la cellule de se déplacer dans d'autres régions du cartilage. Les chondrocytes font très rarement des contacts de cellule à cellule pour communiquer, mais répondent plutôt à divers stimuli tels que la pression hydrostatique, les facteurs de croissance et les forces mécaniques (26) en fonction de ce qui se passe dans leur microenvironnement.

## **2.2 Cartilage arthrosique**

Une fois que le cartilage articulaire arthrosique est dégradé, il ne peut plus assurer son rôle qui est de fournir une surface lisse pour que l'articulation puisse bien bouger. Plusieurs phénomènes prennent place avant et pendant cette dégradation du cartilage, et un des défis importants est de bien identifier les changements qui ont cours durant la progression de l'arthrose afin d'empêcher les dommages au cartilage. Une grande quantité de recherche a été faite pour comprendre comment la balance homéostatique du cartilage en santé est affectée et de quelle manière ceci va affecter le cartilage pour mener à l'arthrose. Il n'y a cependant pas encore de consensus sur ce qui déclenche ce déséquilibre dans la régulation du cartilage, mais il semble que le remodelage anormal de l'os sous-chondral soit généralement le premier phénomène observé et mènerait ensuite aux autres changements observés (3, 28).

Au cours du développement de l'OA, la dégradation des propriétés matérielles et structurelles du cartilage articulaire peut être associée aux différents changements qui ont lieu dans la composition moléculaire de la matrice extracellulaire. Les chondrocytes articulaires, qui sont normalement quiescents (29), vont augmenter leur activité et produire plus de molécules composant la matrice. Par contre, ils vont aussi contribuer à la destruction de la matrice en synthétisant également des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 (IL-1) et des enzymes dommageables telles que les MMPs (matrix metalloproteinases) et ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) (30). Ces changements sont aussi accompagnés d'une augmentation en expression des molécules liées à la différenciation et l'hypertrophie des chondrocytes comme le VEGF (vascular endothelial growth factor), Runx2 (runt-related transcription factor 2) et MMP13 (31). Tous ces changements entraînent une production nette plus élevée de facteurs qui vont dégrader la matrice extracellulaire du cartilage. Ceci va mener à un remodelage de celle-ci et à une perte de la structure cartilagineuse, ainsi qu'à une maturation hypertrophiée et une calcification du cartilage avec des fissures. Tout ceci se traduit en un cartilage ayant une surface rugueuse fibrilleuse ainsi qu'une réduction de l'épaisseur du cartilage (29, 32).



Nature Reviews | Rheumatology

**Figure 2. Schéma des différentes zones du cartilage articulaire sain et arthrosique**

Figure tirée de Yangzi, J., Tuan, RS. (33)

### 3. Tissu osseux

L'os est en fait un tissu dur qui est constitué principalement de minéraux, d'une matrice organique, de cellules spécialisées ainsi que d'eau. Le type de minéraux qui se trouve dans l'os est l'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ), qui est un type de cristal de phosphate de calcium. Ce sont des minéraux qui sont petits et imparfaits et qui contiennent peu de groupes hydroxyles en comparaison à d'autres minéraux. La petite taille permet une dissolution plus rapide, ce qui facilite le maintien de l'homéostasie des ions dans l'os (34).

Les fonctions mécaniques de l'os sont bien connues; il assure la rigidité, la forme, la protection et le support pour former le squelette. Malgré sa rigidité apparente, l'os est en fait une structure dynamique qui subit un remodelage constant. C'est cette activité qui permet au tissu osseux de se réparer en cas de fracture et de répondre aux différentes forces subies au courant de sa vie. Par exemple, durant l'enfance et les périodes de croissances, le taux de formation de l'os est plus grand que le taux de résorption. Ce taux s'équilibre au courant de la vie adulte et s'inverse lors du vieillissement pour conduire à une perte osseuse nette. Les propriétés mécaniques de l'os dépendent du taux de renouvellement de l'os, de la composition de la matrice de collagène, de la taille, de la structure ainsi que de la densité de ce tissu. Afin de pouvoir conserver une force adéquate de l'os, tous ces facteurs doivent être régulés de manière fine et spécifique (34).

Le squelette humain est composé de plusieurs catégories d'os. Il y a des os longs comme l'humérus, le fémur et le tibia, il y a également les os plats tels que le crâne et la scapula. Il existe deux types histologiques d'os mature : l'os cortical et l'os trabéculaire. Ces deux types se retrouvent respectivement dans l'échafaudage des os longs et à la surface des os plats. Les différents types d'os prennent forme de manières différentes, soit par formation intramembraneuse ou endochondrale, et ils proviennent de plusieurs tissus embryonnaires comme la crête neurale, l'ectoderme ou le mésoderme (35, 36).

### **3.1 Matrice osseuse**

Pour que la matrice osseuse puisse assurer sa fonction mécanique de permettre la locomotion ainsi que de protéger les organes internes, il faut qu'elle soit assez résistante. Cette matrice est essentiellement formée de fibres de collagène de type I, et leur arrangement dépend de la fonction du tissu dans lequel elles se retrouvent (37). Sur ces fibres de collagène, il y a un dépôt de minéraux qui vient augmenter la rigidité de celles-ci. Les fibres de collagène sont arrangées en structure de triple hélice, ce qui leur confère une force et une flexibilité supérieures (38). Il existe deux types principaux de chaînes de collagène de type I dans la matrice osseuse : le collagène de type I $\alpha$ 1 (COL1 $\alpha$ 1) et type I $\alpha$ 2 (COL1 $\alpha$ 2), et il y a un ratio précis qui doit être maintenu entre les deux types, sans quoi la matrice osseuse ne pourra minéraliser correctement et nous retrouverons plutôt une matrice ostéoïde mal minéralisée. Le ratio du COL1 $\alpha$ 1 sur COL1 $\alpha$ 2 passe d'environ 2,5 chez les Ob normaux à environ 8 chez les Ob OA (39). Il y a aussi toute une gamme de protéines non collagéniques qui comptent pour environ 5% de la matrice osseuse et qui ont pour rôle de maintenir l'homéostasie dans le tissu. Le tissu osseux est aussi constitué de cellules qui contrôlent le métabolisme, le taux de renouvellement ainsi que la formation du tissu. Les deux grands types de cellules qu'on peut retrouver dans ce tissu sont les ostéoblastes et les ostéoclastes. Les différents types de cellules ainsi que leur localisation dans le tissu osseux sont illustrés à la figure 3.

#### **3.1.1 Ostéoblastes**

Les ostéoblastes (Ob) sont les cellules les plus abondantes dans l'os et ce sont elles qui produisent les constituants de la matrice osseuse. Leur activité, balancée avec celle des ostéoclastes, permet d'obtenir le remodelage osseux. Celui-ci est régulé par divers facteurs, tels que la phosphatase alcaline et l'ostéocalcine (40), deux marqueurs de la minéralisation et de la formation osseuse ainsi que du remodelage osseux, qui sont altérés durant l'OA.

Les ostéoblastes proviennent des cellules souches mésenchymateuses sous l'influence de facteurs de croissance comme les FGFs (fibroblast growth factors), les BMPs (Bone morphogenic proteins), les Hedgehogs, PTHrP (parathyroid hormone related peptide) et les protéines Wnt (wingless integration site) (36, 41, 42). Leur différenciation nécessite l'intervention de plusieurs facteurs de transcription dont Ostérix et Runx2/CBFA1, et dont

l'expression dépend de celle des ligands Wnt et du BMP2 (43, 44). C'est durant la phase d'ossification intramembraneuse que les cellules souches mésenchymateuses subissent une prolifération suivie d'une différenciation en préostéoblaste, avant de devenir des ostéoblastes matures.

La différenciation des ostéoblastes requiert plusieurs facteurs. Comme mentionné, le facteur Runx2 (aussi identifié comme CBFA1) joue un rôle crucial dans le développement des ostéoblastes. Il a été identifié tout d'abord pour sa capacité à réguler le niveau d'ostéocalcine, une protéine spécifique produite par les ostéoblastes, et son rôle dans le développement est maintenant démontré (40). Il s'agit du marqueur de différenciation ostéoblastique le plus précoce connu, et son expression dans les ostéoblastes est très élevée durant le développement et juste après la naissance. Son expression est stimulée lorsque les cellules sont traitées avec des BMPs (45).

Un ostéocyte est une cellule cuboïde qui agit en groupe (100 à 400 cellules) au niveau du site de formation de la surface osseuse. Il s'agit du type de cellule le plus abondant dans l'os. Elles contiennent un complexe de Golgi très grand, signe de l'importance de sa fonction biosynthétique et sécrétrice (46). Les ostéocytes sont en fait issus des ostéoblastes et sont l'étape ultime possible de différenciation, mais le processus exact de différenciation est encore plutôt mal caractérisé (47). Ces cellules ont comme rôle d'aider à maintenir l'homéostasie calcium-sang dans le tissu osseux, et bien que leur capacité à résorber et à minéraliser le tissu osseux soit limitée, elles sont tout de même utiles pour pouvoir exercer un contrôle plus fin sur cette régulation. Cependant, leur rôle principal serait surtout sensoriel et communicatif (47).

### **3.1.2 Ostéoclastes**

L'ostéoclaste est le type de cellule qui est responsable de la résorption osseuse. Il s'agit d'une très grande cellule qui est multinucléée; elle peut contenir entre 4 et 8 noyaux. La fonction principale de ces cellules est de résorber les os minéralisés, la dentine et le cartilage calcifié. Selon l'état actuel des connaissances sur le sujet, il semble que ce soit la seule fonction de ces grosses cellules (48). La résorption osseuse est essentielle à la maturation normale du squelette ainsi qu'au remodelage et à la poussée des dents. Les ostéoclastes contribuent à l'homéostasie

du calcium dans le tissu osseux en effectuant une résorption du calcium supplémentaire si nécessaire. Il semblerait que l'ostéoclaste soit le seul type de cellule qui ait la capacité de résorber les os, cependant, il y aurait plusieurs sortes d'ostéoclastes selon le type d'os dans lequel ils se trouvent.

Les ostéoclastes chez l'adulte sont issus de cellules souches de type hématopoïétique et partagent une voie de différenciation avec les macrophages jusqu'aux étapes finales. La différenciation de ces cellules se fait à la suite d'une activation séquentielle d'une série de gènes et est affectée par plusieurs cytokines et facteurs de croissance. La participation de la voie de signalisation RANK-RANKL-OPG (Receptor activator of nuclear factor kappa-B/ligand et osteoprotegerin) dans ce processus de différenciation a été confirmée (49). Dans cette voie, RANKL présent sur les ostéoblastes va se lier à RANK qui se trouve à la surface des ostéoclastes et de ses précurseurs et ceci va réguler la différenciation en ostéoclastes multinucléés. D'un autre côté, l'OPG libéré par les pré-ostéoblastes et les ostéoblastes matures peut se lier à RANKL pour l'empêcher de se lier à RANK, ce qui va permettre d'éviter une trop grande résorption osseuse. Le ratio RANK/OPG est donc très important pour maintenir une masse osseuse adéquate (50).

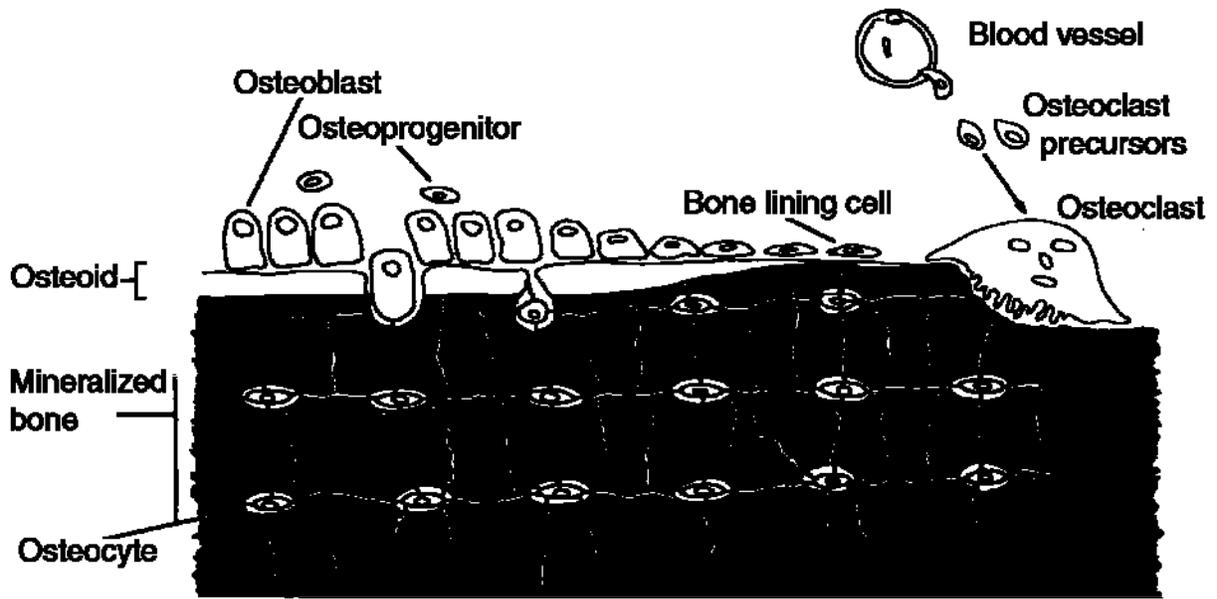


Figure 3. L'origine et la localisation des différentes cellules du tissu osseux.

Figure tirée de Marks et Popoff (1988) (51)

## 4. Tissu osseux arthrosique

### 4.1 Os sous-chondral OA

Les changements dans l'activité de l'os sous-chondral surviennent tôt dans la progression de l'OA. Plusieurs données suggèrent que ce serait en fait de là que viennent les premiers signes de l'OA. La sclérose de l'os sous-chondral est considérée comme étant un facteur déterminant pour détecter l'OA, cependant, dans les premiers stades de la maladie, il est possible d'observer une résorption de l'os sous-chondral chez certains patients ayant une forme progressive d'OA (52). Cette résorption a été bien observée en mesurant plusieurs marqueurs connus de la résorption de l'os à 3 différents points dans le temps, et les patients pour qui la condition OA se détériorait progressivement avaient une résorption osseuse plus intense alors que ceux pour qui c'était non progressif n'en avaient pas.

Il existe également plusieurs études qui ont montré que plus la maladie progresse et se rend à une étape plus avancée d'OA, plus il est possible d'observer une sclérose de l'os sous-chondral. L'équipe de Buckland-Wright *et coll.* (53, 54) a pu montrer, grâce à la radiographie micro focale quantitative chez des patients atteints d'OA, que les changements dans les articulations comprennent aussi un épaissement de la plaque sous-chondrale. Plusieurs autres équipes ont pu trouver d'autres preuves de cette sclérose grâce à différents marqueurs de formation osseuse. Il a aussi été démontré que les niveaux de facteurs de croissance tels que les *Transforming Growth Factor-β1* (TGF-β1) et *Insulin-like growth factor* (IGF-1 et -2) étaient plus élevés dans des échantillons de crête iliaque chez les patients OA (55). Étant donné que la crête iliaque n'est pas un os porteur, ceci va à l'encontre de la théorie classique de l'usure du cartilage dû à une blessure, un surpoids ou autre, et impliquerait plutôt un dérèglement plus large dans la formation et la régulation du tissu osseux de manière plus généralisée.

La sclérose osseuse dans l'OA a aussi été associée à une augmentation de la densité minérale osseuse (56). Contrairement à ce qui a déjà été pensé, l'augmentation de la densité de l'os sous-chondral est due à une augmentation de la quantité des différents composés du tissu osseux et non pas à une meilleure minéralisation. En effet, même si l'on remarque un épaissement de l'os sous-chondral chez les patients OA, l'examen d'explants de têtes fémorales OA permet de constater qu'il y a une minéralisation plus faible que chez les patients

normaux (57, 58). Autrement dit, il y aurait plus de tissu osseux, mais la qualité de celui-ci serait moins bonne, car moins bien minéralisée. En effet, il y aurait donc une augmentation de la densité globale de l'os et la minéralisation serait diminuée (59-61), et c'est ce qui expliquerait l'augmentation apparente de densité osseuse et non de la densité minérale. Cette différence dans la minéralisation de l'os sous-chondral peut être expliquée par plusieurs facteurs différents. Il y aurait d'abord une augmentation de la matrice ostéoïde. En effet, celle-ci est composée principalement d'une matrice de collagène de type 1 (COL1), c'est d'ailleurs ce type de collagène qui était augmenté dans les têtes fémorales OA par rapport aux normales (60, 61). On observe d'ailleurs une production plus grande de COL1 $\alpha$ 1 dans les cellules d'ostéoblastes (Ob) humains OA en comparaison aux ostéoblastes normaux, mais aucun changement dans la production de COL1 $\alpha$ 2. Le ratio entre COL1 $\alpha$ 1 et COL1 $\alpha$ 2 est régulé de manière très fine dans le tissu osseux normal et ce ratio est donc changé dans le tissu osseux OA. Ceci pourrait être en partie responsable de la minéralisation altérée dans les ostéoblastes humains OA liée à leur production de TGF- $\beta$ 1 (62). Également, la production de phosphatase alcaline et d'ostéocalcine est plus élevée dans les ostéoblastes humains OA en comparaison aux ostéoblastes normaux, et ceci contribue au phénotype altéré des ostéoblastes OA (63). En tenant compte de toutes ces informations, il est possible de situer l'os sous-chondral comme un constituant majeur de la pathologie de l'OA, même s'il n'est pas encore possible de le situer hors de tout doute comme site d'initiation de l'OA, et de considérer que des voies de signalisation sont probablement dérégulées dans les cellules de l'os.

## 4.2 Biochimie de l'os sous-chondral

Il existe plusieurs catégories de facteurs qui font partie de plusieurs voies de signalisation ayant une influence sur le métabolisme de l'os sous-chondral. Principalement, on peut retrouver les IGF, les TGF- $\beta$ , les BMPs et les Wnts.

Les IGFs sont un groupe de protéines de croissance qui ont une influence sur plusieurs systèmes dans le corps. Entre autres, ils régulent la formation du tissu osseux. Les ostéoblastes OA isolés à partir de l'os sous-chondral OA produisent des niveaux plus bas de protéines de liaison aux IGFs (IGF binding protein) par rapport aux Ob normaux. Étant donné qu'ils sont

ainsi moins liés, il en résulte des niveaux plus élevés d'IGF-1 en circulation dans le système (64). Ceci pourrait avoir une influence sur le remodelage de l'os étant donné leur rôle dans la formation de ce tissu. Une des conséquences pourrait être de contribuer à l'augmentation de la sclérose de l'os, ce qui est associé avec une dégradation encore plus rapide du cartilage (64).

Le TGF- $\beta$  est aussi impliqué dans plusieurs changements de la régulation du tissu osseux; il stimule la synthèse de la matrice de l'os. Cependant, comme décrit plus haut, il mène aussi à un rapport anormal des chaînes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  du collagène de type 1. Il est possible de faire un lien entre l'effet de TGF- $\beta 1$  et IGF-1 et une réponse anormale des Ob OA à la leptine. La leptine est une hormone principalement liée à la satiété et qui est produite par les tissus adipeux, mais qui est également reconnu pour son rôle sur la formation osseuse (65). En effet, la leptine stimule la production de TGF- $\beta 1$  et d'IGF-1 dans les différentes composantes des articulations (66). Ceci serait aussi cohérent avec les nombreuses études qui lient un haut indice de masse corporel (IMC) avec l'OA, étant donné les niveaux de leptine plus élevés chez les patients OA et que ces niveaux corrélaient avec l'IMC. D'un autre côté, il y a récemment eu de nouvelles preuves qui montrent que des niveaux anormaux de TGF- $\beta 1$  peuvent avoir un effet direct sur la qualité de l'os sous-chondral OA en ayant un effet sur la minéralisation (39). Un groupe a en effet démontré que lorsque les niveaux endogènes de TGF- $\beta 1$  sont abaissés dans des ostéoblastes OA, il est possible de constater que la minéralisation est améliorée. Également, ceci avait pour effet de replacer le rapport anormal de collagène de type 1 plus près de la normale dans les ostéoblastes OA (62).

Il existe un trio de molécules composé de l'OPG, de RANK et de RANKL qui est impliqué dans la résorption de l'os durant l'OA. Ces derniers font partie de la grande famille des facteurs de nécrose de tumeurs et ont été décrits comme étant un système de cytokines important pour la différenciation et la fonction des ostéoclastes. Durant le processus de remodelage de l'os, ces facteurs sont liés ensemble. RANKL est exprimé soit en forme membranaire ou soluble par les lignées cellulaires d'ostéoblastes et est essentiel pour réguler la résorption de l'os par les ostéoclastes via l'ostéoclastogénèse. RANKL stimule ceci en se liant au récepteur de surface cellulaire RANK, ce qui active une voie de signalisation cellulaire impliquée dans la survie et la formation des ostéoclastes, ce qui amène à la résorption de l'os. L'OPG, lui, est sécrété par des cellules du stroma et par les ostéoblastes entre autres. Il se lie à RANKL et empêche la liaison de celui-ci à RANK, inhibant ainsi l'activité normale de RANK

et le processus de la différenciation des cellules mononucléées en ostéoclastes matures polynucléés suivi de la résorption osseuse.

De manière intéressante, il semblerait qu'il soit possible de séparer en deux groupes les patients atteints d'arthrose. En effet, suivant la mesure des niveaux de différentes protéines produites par les ostéoblastes OA isolés à partir de l'os sous-chondral, il est possible de séparer en 2 catégories les patients OA. Les facteurs dosés étaient l'interleukine (IL)-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ 1 et la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Suivant la mesure du niveau de ces différents facteurs, il a été possible de déterminer que la production de PGE<sub>2</sub> et IL-6 par les Ob OA permettait la subdivision en deux sous-groupes de patients. Avec cette méthode, les sous-groupes sont séparés selon qu'ils produisent des niveaux proches de la normale ou plus élevés de PGE<sub>2</sub> et IL-6, et classés comme respectivement des OA bas producteurs de PGE<sub>2</sub> ou élevés. Également, une correction des niveaux de PGE<sub>2</sub> amène une correction des niveaux d'IL-6 (67). Ces systèmes de signalisation sont donc tous importants dans la pathologie de l'OA, mais un autre est particulièrement intéressant pour la régulation du métabolisme de l'os sous-chondral; il s'agit du système de signalisation Wnt.

## 5. Signalisation Wnt

Un type de signalisation dont l'importance a été démontrée dans les dernières années et sur lequel il y a de plus en plus de recherche est la signalisation Wnt. Cette signalisation est impliquée dans plusieurs maladies humaines comme le cancer du côlon, le mélanome ainsi que certaines maladies neurodégénératives. Elle est aussi très importante pour la formation de l'axe embryonnaire, la segmentation et d'autres processus développementaux chez *Drosophila melanogaster* ainsi que la prolifération de cellules souches. Les Wnts sont un groupe évolutivement conservé de protéines. Il y a au moins 19 gènes connus qui existent pour encoder des ligands Wnts (68). Ces protéines se lient à différents récepteurs cellulaires et peuvent activer plusieurs voies de signalisations différentes. Ces différentes voies sont classées selon 2 catégories majeures, soit la voie canonique ( $\beta$ -caténine dépendante) et les voies non canoniques ( $\beta$ -caténine indépendante). Cependant, chacune de ces 2 catégories se divise en plusieurs branches et certaines de ces branches interagissent entre elles.

Principalement, il est possible de déceler 3 voies « principales » soit : Wnt- $\beta$ -caténine, Wnt/PCP (Planar Cell Polarity) et Wnt/PKC- $\text{Ca}^{2+}$  (Protein Kinase C), les deux dernières étant catégorisées comme des voies non canoniques. Ces trois voies sont les mieux décrites, mais il existerait aussi plusieurs autres voies qui sont moins bien définies. De manière générale, on peut classer toutes les voies où  $\beta$ -caténine n'est pas impliquée comme étant non canoniques et vice-versa. Un résumé général de ces trois principales voies est présenté à la figure 4.

La plupart des molécules Wnt activent l'une ou l'autre des voies, bien que l'activité dépende également du contexte cellulaire et des différents récepteurs. Il est par contre presque impossible de séparer rigoureusement chacune des protéines Wnt en fonction des voies qu'elles activent. En effet, il existe plus de 15 récepteurs de Wnt et de co-récepteurs et, selon les combinaisons de ceux-ci, du type de cellule et du Wnt qui s'y associe, différentes voies de signalisation vont être activées. Il existe par contre quelques Wnts pour lesquels on sait qu'ils activent préférentiellement une voie ou une autre.

## 5.1 Signalisation Wnt canonique

La signalisation Wnt joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme de l'os, et ceci a évidemment des implications importantes pour l'OA. Dans le cas de l'ostéoartrrose, la signalisation Wnt- $\beta$ -caténine est généralement considérée comme étant la plus importante étant donné son rôle dans la différenciation des ostéoblastes (69). Il y a donc une grande partie de la recherche sur la signalisation Wnt et l'OA qui s'attarde à cette voie canonique. Les facteurs Wnt-3a et Wnt-1 sont plus souvent associés à la voie  $\beta$ -caténine dépendante. On sait également que les récepteurs LRP5 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5) et LRP6 sont plus souvent impliqués pour la voie canonique, ainsi que les récepteurs Frizzled qui sont impliqués dans la voie canonique et dans les deux voies non-canoniques principales. La signalisation débute avec la liaison d'un ligand Wnt au Frizzled/LRP, ce qui active Dvl (Dishevelled) par phosphorylation séquentielle, poly-ubiquitination et polymérisation. Ceci déplace le complexe GSK-3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3 beta) à partir d'APC (Adenomatous polyposis coli)/axin via un mécanisme encore mal connu. De cette manière, la  $\beta$ -caténine qui est maintenant stable et non phosphorylée s'accumule dans le cytosol et se transporte au noyau cellulaire pour aller se lier au bout N-terminal des facteurs de transcription LEF/TCF, ce qui va à son tour activer la transcription des gènes cibles de la signalisation Wnt canonique (70). Il existe plusieurs antagonistes à cette voie et parmi eux, DKK1 (Dickkopf-related protein 1) et DKK2 sont très intéressants étant donné leurs rôles dans la différenciation et la prolifération des ostéoblastes ainsi que pour la minéralisation (71, 72) qui, comme discuté plus haut, est déficiente dans l'OA. Or, il a été démontré que la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est affectée chez l'OA à cause de niveaux plus élevés de DKK2 dans les ostéoblastes OA, ce qui réduit l'effet de la voie et qui a des effets sur la minéralisation et change aussi le phénotype de ces cellules (73).

En plus des protéines agonistes Wnts classiques, il existe une autre catégorie de protéines qui peut se lier aux récepteurs Wnts et activer l'une ou l'autre des voies, il s'agit des R-spondines. Il existe 4 R-spondines (Rspo 1 à 4) et la Rspo2 stimule la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine et améliore la réponse des cellules à de faibles doses de Wnt. Les R-spondines peuvent aussi activer la signalisation Wnt/PCP (74). En particulier, la Rspo-1 régule la différenciation des ostéoblastes en conjonction avec Wnt-3a et la Rspo-2 régule la maturation et la minéralisation des ostéoblastes. Les R-spondines nécessitent cependant d'être couplés à des

Wnts pour pouvoir avoir un effet sur une voie de signalisation ou une autre; en effet, elles augmentent la signalisation Wnt encore plus en réponse aux agonistes Wnt standards, mais elles ne peuvent agir seules pour activer une voie de signalisation ou une autre. Les R-spondines agissent via plusieurs récepteurs cellulaires différents, nécessitant l'endocytose généralement. Une des classes de récepteurs est le LGR4, 5 ou 6 (Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptors 4, 5, 6) qui étaient des récepteurs dits orphelins, mais dont on sait maintenant qu'ils ont une haute affinité avec les R-spondines et qui stimulent les voies Wnt- $\beta$ -caténine et Wnt/PCP (75-77). Parmi les R-spondines, la Rspo-2 est importante pour l'OA étant donné, entre autres, son rôle dans la morphogenèse des membres (78). En effet, les souris dont l'expression de Rspo-2 est délétée meurent à la naissance et subissent des déformations dans les membres qui sont associées à une signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine anormale (78). Également, il a été montré que les niveaux de Rspo-2 sont réduits dans les Ob OA par rapport aux ostéoblastes normaux et que ceci est lié aux niveaux plus élevés de TGF- $\beta$ 1 dans ces cellules (79). Une correction des niveaux de Rspo-2 a un effet positif sur le phénotype des cellules en réajustant la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine. En effet, ce résultat rapporté est cohérent avec le résultat discuté plus haut par rapport à l'augmentation de DKK2 dans les Ob OA si l'on prend en considération le mécanisme d'action de la Rspo-2. Les R-spondines agissent par un mécanisme commun qui est de réguler la signalisation Wnt à l'aide de l'interaction avec LRP5 ou LRP6 pour aller empêcher la liaison avec la famille DKK d'antagonistes Wnt (80). Donc, s'il y a une diminution de Rspo-2, et une augmentation de DKK2, il est logique d'observer une diminution marquée de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine.

Un autre facteur qui peut être important dans la régulation de l'os est la sclérostine (SOST) qui est un régulateur négatif de la formation du tissu osseux et est dérivé des ostéocytes. Il fut d'abord cru que SOST était un antagoniste des BMP, mais ce n'est pas le cas, car il ne peut pas inhiber la réponse à tous les BMPs (81). Par contre, étant donné que les Wnts induisent la production de BMPs, il est très probable que SOST soit un inhibiteur de la voie de signalisation Wnt-canonique (81).

En tenant compte des informations mentionnées ci-haut, il est donc possible de déterminer que la signalisation Wnt joue un rôle relativement important dans l'OA et qu'il y ait des déséquilibres qui causent différents problèmes de l'OA. Par contre, la plupart des

recherches portent sur la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine et très peu sur les voies  $\beta$ -caténine indépendantes.

## 5.2 Signalisation Wnt non canonique

Pour ce qui est des voies non canonique, il est connu que les facteurs Wnt-5a et Wnt-11 activent préférentiellement cette voie (68), et peuvent agir via les récepteurs ROR1 et ROR2, en plus, comme dans la voie canonique, de la famille des récepteurs Frizzled (82). Il existe plusieurs informations qui démontrent que la signalisation Wnt/PCP et Wnt/PKC sont probablement elles aussi dérégées dans la pathologie de l'OA et qu'elles jouent un rôle important. Deux des protéines Wnt les mieux connues comme étant des agonistes des voies non canoniques sont Wnt-11 et Wnt-5a (83) et c'est sur cette dernière qu'il y a le plus d'informations qui convergent pour montrer son importance. Wnt-5a est connue pour réguler de nombreuses cascades de signalisations et active la signalisation Wnt non canonique. Il a été déterminé que Wnt-5a active cette voie en se liant probablement avec Frizzled, qui est un récepteur qui peut activer toutes les voies dépendamment du contexte de stimulation.

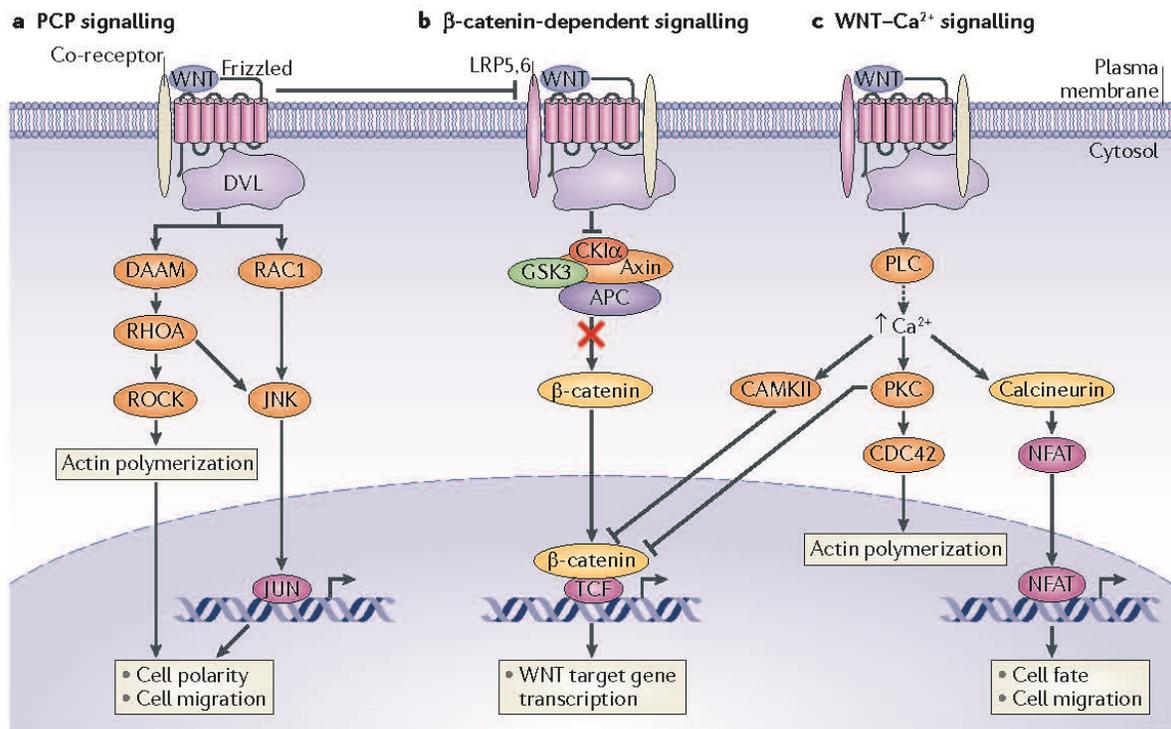
### 5.2.1 Signalisation Wnt/PCP

La voie Wnt/PCP est la mieux caractérisée des voies non canoniques. Elle a été découverte et caractérisée à la base chez la drosophile pour avoir un rôle important dans la polarité cellulaire lors du développement (68, 84), d'où son nom. Elle commence avec une liaison aux récepteurs Frizzled, ce qui active une cascade qui implique les petites GTPases RAC1 et RHOA (une famille d'enzymes qui se lie et hydrolyse les Guanosine Triphosphate) ainsi que *JUN-N-terminal kinase* (JNK). L'effet de cette voie de signalisation est de mener à des changements dans le cytosquelette et dans la polarité de la cellule via les GTPases, ainsi que l'activation transcriptionnelle de facteurs de transcriptions dépendants de JNK, par exemple ATF2 (activating transcription factor 2) (68). Il est logique de penser que cette voie peut aussi avoir un effet dans le développement et/ou la régulation des ostéoblastes, étant donné son rôle fondamental dans la régulation chez les vertébrés de plusieurs systèmes développementaux. Par

exemple, le mouvement cellulaire durant la gastrulation, la fermeture du tube neural et l'orientation des cils de l'oreille interne (84). Il est bien connu que la voie Wnt/PCP et la voie Wnt/ $\beta$ -caténine sont des antagonistes l'un de l'autre, de plus, lorsqu'on inhibe une voie, on peut généralement remarquer que l'autre est augmentée. Ceci est très intéressant, car si on sait que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est dérégulée dans l'OA, il est donc possible que la voie Wnt/PCP soit elle aussi dérégulée. Plus précisément, puisque Wnt-5a active la voie Wnt/PCP préférentiellement et que Wnt-5a peut se lier à Frizzled 2 et inhiber ainsi la liaison de Wnt-3a à ce récepteur, ceci inhiberait la voie Wnt/ $\beta$ -caténine puisque que Wnt-3a active normalement celle-ci (85). Cette voie Wnt/PCP ne nécessite pas les LRP5 ou 6 mais utiliseraient à la place ROR et PTK7 comme co-récepteur. On sait également que LGR5 est impliqué dans la médiation de cette voie (77), donc une modulation de LGR5 pourrait affecter l'intensité de la voie Wnt/PCP.

### **5.2.2 Signalisation Wnt/PKC-Ca<sup>2+</sup>**

Une seconde voie qui est relativement bien caractérisée est la voie Wnt/PKC-Ca<sup>2+</sup>. Dans ce cas-ci, les Wnts activent des protéines G hétérotrimériques via les Frizzled. Ceci va activer la phospholipase C (PLC), qui va à son tour stimuler la production de diacylglycérol et l'inositol-1,4,5-triphosphate (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>). Ce dernier va induire la relâche de Ca<sup>2+</sup> des réserves intracellulaires ainsi qu'activer la CAMKII (calmodulin-dependent kinase II), calcineurine et la PKC. Ceci va ainsi activer le facteur de régulation nucléaire associé aux cellules T (NFAT) (86, 87). Il existe très peu d'informations pour lier cette voie à l'OA, mais il serait néanmoins intéressant de l'étudier étant donnée l'importance de la signalisation Wnt pour l'OA. Pour pouvoir étudier cette voie, deux méthodes seraient intéressantes, soit la détection de la phosphorylation des protéines PKC et l'utilisation d'un test avec la luciférase pour détecter NFAT. Il existe également plusieurs autres interactions et voies de signalisations qui peuvent être caractérisées, mais ces deux dernières sont probablement les plus importantes.



**Figure 4. Résumé des différentes voies de signalisation Wnt**

Tiré de Niehrs (2012) (82)

## 6. Hypothèse de recherche

L'hypothèse présente est que la signalisation Wnt non canonique est affectée dans les ostéoblastes arthrosiques et que ce dérèglement cause une partie du phénotype altéré des ostéoblastes humains. Pour pouvoir déterminer si c'est bien le cas, nous allons donc comparer l'expression et la sécrétion de Wnt-5a et d'autres éléments associés aux voies Wnt non-canoniques entre les Ob OA et normaux. Si nous déterminons qu'un élément de ces voies de signalisation est dérégulé, nous allons ensuite tenter d'ajuster son niveau afin de constater l'effet sur la signalisation. Étant donné que l'intérêt principal est d'améliorer le phénotype fautif des Ob OA humains, nous vérifierons ensuite s'il est possible d'affecter positivement celui-ci suite aux traitements qui s'avéreront appropriés selon les résultats obtenus. L'objectif principal est ici d'évaluer le rôle que joue la signalisation Wnt non-canonique en lien avec l'ostéoarthrose, ce qui implique que nous vérifierons le comportement de ces voies dans les ostéoblastes humains arthrosiques.

## **7. Article**

### **ALTERATIONS OF THE NON-CANONICAL WNT/PCP AND WNT/PKC-CA2+ PATHWAYS IN THE HUMAN OSTEOARTHRITIC OSTEOBLASTS.**

Xavier Martineau, Élie Abed, Siwing Van, Zeid Kuzbari, Johanne Martel-Pelletier, Jean-Pierre Pelletier & Daniel Lajeunesse.

Unité de recherche en arthrose, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada, H2X 3H8

Running title: ALTERATIONS OF THE NON-CANONICAL WNT/PCP AND WNT/PKC-  
CA2+ PATHWAYS IN THE HUMAN OSTEOARTHRITIC OSTEOBLASTS

Reprint request: Daniel Lajeunesse Ph.D.,  
Unité de recherche en arthrose,  
CRCHUM  
Montréal, Québec, Canada, H2X 3H8  
Tel: (514) 890-8000 ext. 28914  
Email: 

# ALTERATIONS OF THE NON-CANONICAL WNT/PCP AND WNT/PKC-CA<sup>2+</sup> PATHWAYS IN THE HUMAN OSTEOARTHRITIC OSTEOBLASTS

## Summary

### Objective

Clinical and in vitro studies suggest that subchondral bone sclerosis due to abnormal osteoblasts (Ob) is involved in the progression and/or onset of osteoarthritis (OA). Human Ob isolated from sclerotic subchondral OA bone tissue show an altered phenotype, a decreased canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway (cWnt), and a reduced mineralization in vitro. Besides the cWnt pathway, at least two non-canonical signaling pathways, the Wnt/PKC and Wnt/PCP pathway have been described. However, there are no reports of either pathway in OA Ob. Here, we studied if alterations of the non-canonical pathways could be observed in OA Ob.

### Methods

We prepared primary human subchondral Ob using the tibial plateaus of OA patients undergoing total knee arthroplasty, or from tibial plateaus of normal individuals at autopsy. The expression of genes involved in non-canonical Wnt was evaluated by qRT-PCR and the protein production by Western blot analysis. Alkaline phosphatase activity and osteocalcin levels were evaluated respectively with substrate hydrolysis and ELISA. Mineralization levels were evaluated with Alizarin Red Staining. Wnt/PKC and Wnt/PCP pathways were evaluated by target gene expression, using the NFAT and AP-1 luciferase reporter assay.

### Results

OA Ob showed an increased alkaline phosphatase activity and osteocalcin release. The expression of Wnt5a was increased in OA Ob compared to normal. The expression of LGR5 was significantly increased in OA Ob compared to normal Ob. Moreover, Wnt5a directly stimulated the expression and production of LGR5. However, Wnt-5a did not stimulate the expression of LGR4. Wnt5a stimulated the phosphorylation of both JNK and PKC, as well as the activity of both NFAT and AP-1 transcription factors. The inhibition of Wnt-5a signaling partially corrects the abnormal mineralization, OC levels and ALPase activity of OA Ob.

## Conclusion

These data indicate that the alteration of Wnt-5a, a non-canonical Wnt activator, is implicated in the modified signalisation and phenotype observed in OA Ob.

## Introduction

Osteoarthritis (OA) is the most common form of arthritis, and knee OA is amongst the most frequent type along with hip OA. OA is generally characterized by a gradual loss of cartilage in the articulation, sclerosis of the subchondral bone and inflammation of the synovial membrane. There is also the presence of osteophytes. As a final pathological manifestation, OA represents an imbalance between the loss of cartilage due to matrix degradation and the attempt to repair the matrix (1).

Abnormal osteoblasts (Ob) are involved in the onset and/or progression of OA (2, 3). As was shown in in vitro studies, compared to normal, OA Ob demonstrate better cell proliferation (4) and an elevation in markers of differentiation such as alkaline phosphatase (ALPase), osteocalcin (OC), type 1 collagen (5-7) and growth factors such as transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) (5, 6, 8). In clinical studies, the progression of joint cartilage degeneration is associated with increased bone stiffness as well as intensified remodeling of the subchondral bone (9). OA patients have an increased bone mineral density, indicating that bone synthesis exceeds degradation (10). However, femoral heads of patients with OA obtained at autopsy showed a low mineralization pattern compared to normal tissues (11, 12). This may explain the apparent bone mineral density increase in OA as an increase in material density and not mineral density (12). The ratio of collagen type I  $\alpha$ 1 to  $\alpha$ 2 chains is increased in OA tissue and is the cause for the increase in undermineralized osteoid matrix (13). This situation was also observed in OA osteoblasts in vitro and was linked to elevated levels of transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) (6). Bone tissue remodeling and skeletal patterning involves a great number of signaling molecules and many signaling pathways are involved. More specifically, this involves the bone morphogenetic proteins (BMP), TGF $\beta$ 1 and the Wnt protein family (14-18).

Indeed, we previously reported that Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is reduced in OA osteoblasts compared to normal osteoblasts (19).

The role of the canonical Wnt signaling pathway in OA has been shown in many studies (19-21), however, there is little research existing on the role and importance of the non-canonical ( $\beta$ -catenin independent) pathways in the onset and progress of OA. Since there is growing evidence that all Wnt pathways interact with each other as well as with other pathways (22-24), it is important to examine the role that the non-canonical pathways play in this pathology.

The two principal non-canonical Wnt pathways are the Wnt/PCP and the Wnt/PKC- $\text{Ca}^{2+}$ . These pathways have been described in different models. The Wnt/PCP uses the Frizzled receptors to start a signaling cascade that uses small GTPases and eventually JUN-N-terminal kinase (JNK) to activate the final transcription factor c-JUN (AP1) (25, 26). We know that Wnt/PCP and Wnt/ $\beta$ -catenin are often antagonists and we know that the latter is affected in OA. Wnt-5a is the preferred Wnt/PCP activator ligand that binds to Frizzled 2 and could inhibit Wnt-3a binding to that receptor, thus inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling (27). The Wnt/PKC- $\text{Ca}^{2+}$  uses protein kinase C and  $\text{Ca}^{2+}$  release to eventually activate the NFAT (nuclear factor of activated t-cells) transcription factor (28). Both the Wnt/PCP and the Wnt/PKC- $\text{Ca}^{2+}$  pathways are activated via Wnt-11 or Wnt-5a (27, 29).

We have previously showed that Wnt/ $\beta$ -catenin activity was reduced and that this was due to two possible mechanisms, an increase in the Wnt antagonist Dickkopf-2 (DKK2) (19) and a reduction of the non-Wnt agonist R-spondin 2 (Rspo2) in OA Ob (8). It has indeed been shown that DKK2 is increased in response to an increase in TGF- $\beta$ 1 expression, and that this affects the phenotype of OA Ob. Also, Rspo2 could reduce the availability of the Frizzled receptor for other ligands than Wnt-3a by linking to the Leucine-rich G-coupled protein receptor

(LGR) that acts as a co-receptor for the activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. It would then be logical that a reduction in the Rspo2 activity would allow for a greater availability of Frizzled receptor thus allowing a greater activity of non-canonical Wnt pathways via Wnt-5a activation.

This study was undertaken to evaluate and characterize the importance of the non-canonical Wnt signaling pathways in human osteoarthritic osteoblasts.

## **Patients and methods**

### **Patients and clinical parameters**

Tibial plateaus were obtained from OA patients undergoing total knee replacement surgery and were prepared as previously described (6, 7, 30). Study patients (total of 42: 13 men and 29 women with a mean SD age of  $68.88 \pm 8.9$  years) were classified as having OA according to the clinical criteria of the American College of Rheumatology. No patients had received medication that would interfere with bone metabolism, including corticosteroids, for 6 months before surgery. A total of 6 subchondral bone specimens from normal individuals (4 men and 2 women with a mean  $\pm$  SD age of  $61.33 \pm 17.6$  years) were collected at autopsy within 12 hours of death. These subjects had not taken any medication that could interfere with bone metabolism and had no reported bone metabolic disease or abnormal macroscopic changes of the cartilage upon visual inspection. All human samples were acquired following a signed agreement by the patients undergoing knee surgery and, for the specimens collected at autopsy, by the relatives of the deceased, in accordance with the ethics committee guidelines of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

### **Preparation of primary subchondral bone cell cultures**

The subchondral bone plate was isolated and the cell cultures were prepared as previously described (7). At confluence, cells were passaged once at 25,000 cells/cm<sup>2</sup> and grown for 5 days in BGJb medium (Gibco) containing 10% fetal bovine serum (FBS). Confluent cells were then incubated in the presence or absence of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25[OH]<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; 50 nM) for 48 hours for the determination of biomarkers. Supernatants were collected at the end of the incubation. Cells were prepared in alkaline phosphatase buffer (100 mM glycine, 1 mM MgCl, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100; pH 10.5) for phenotype determinations, in TRIzol™ for qRT-

PCR experiments, or Laemmli buffer for Western blot analyses. Protein determination was performed by the bicinchoninic acid method. Wnt-5a signaling activity was stimulated using recombinant human Wnt-5a (rhWnt5a) protein at 100 ng/mL (R&D Systems) and TGF- $\beta$ 1 activity with recombinant human TGF- $\beta$ 1 (rhTGF- $\beta$ 1) at 10 ng/mL (R&D Systems). Also, Wnt-5a and TGF- $\beta$ 1 expressions were inhibited in OA Ob by specific siRNA (si) as previously described (7). siWnt-5a, siTGF- $\beta$ 1 and siScrambled (siSCR) preparations were Dharmacon SmartPOOL ONtarget products (a mix of 4 siRNA per target). For prolonged silencing treatments using siRNA, the treatments were repeated every 3-5 days.

### **Phenotypic characterization of human subchondral Ob cell cultures**

ALPase activity was determined by substrate hydrolysis using p-nitrophenylphosphate, and osteocalcin in cell supernatants using an EIA as previously described (6, 7). Determinations were performed in duplicate for each individual cell samples prepared from normal individuals and OA patients.

### **Evaluation of mineralization**

Confluent cells were incubated in BGJb media containing 10% fetal bovine serum (FBS), 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid, 50  $\mu$ g/ml  $\beta$ -glycerophosphate. This media was changed every two days until day 28. Mineralization of cell cultures was measured by quantification of alizarin red staining (ARS) with the procedure of Gregory et al. (31). Briefly, cells were fixed in 70% cold ethanol, incubated with 40  $\mu$ M alizarin red at pH 4.1, washed and air-dried. Cells are then extracted with 10% acetic acid for 30 min, scraped from the Petri dishes, heated at 85 °C for 10 min and then transferred on ice. An aliquot of the cell extract is incubated with 10% ammonium hydroxide and the color product read at 550 nm against a standard curve.

### **Protein determination by Western blotting**

Cell extracts were prepared for WB as previously described (7). Rabbit anti-LGR5 (1:1000, Santa Cruz biotechnologies ), rabbit anti-*p*PKC (1:1000, Cell Signaling Technology), rabbit anti-*p*JNK (1:1000, Cell Signaling Technologies) and rabbit anti-human actin (1:10,000, Sigma-Aldrich) were used as primary antibodies, whereas goat anti-rabbit IgG (1:10,000, Upstate Biotechnology, NY) were used as secondary antibodies.

### **qRT-PCR assays**

RT reactions were primed with random hexamers with 1 µg of RNA followed by PCR amplification with the Rotor-Gene Q (Qiagen) as described (4, 30, 32) using 20 pmol of specific

PCR primers: TGF-β1, F: GCGTGCTAATGGTGAAAC, R: GCTGAGGTATCGCCAGGAA; OC, F: ATGAGAGCCCTCACACTC, R: GAAAGCCGATGTGGTCAG; GAPDH, F: CAGAACATCATCCCTGCCTCT, R: GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG; Wnt-5a, F: TAAGCCCAGGAGTTGCTTTG R: GCAGAGAGGCTGTGCTCCTA ; LGR5, F: GGCTTTCTTGTCCTTCTCCT R: CGTAGGTTTGCTTTCTCAGG ; LGR4, F: GCATCTTTTTCTGCCCTGTG R: GACAACCACCTTGGCTACTG ; LRP5, F: GCCATCGACTATGACCCACT R: CAGAACAGTGTCCGGCTGTA ; CBFA1 , F: AGATGATGACACTGCCACCTCTG R: GGGATGAAATGCTTGGGAACTGC ; ALP, F: ACGTGGCTAAGAATGTCATC R: CTGGTAGGCGATGTCCTTA, added at a final concentration of 200 nM. The data were processed with the Rotorgene software and given as threshold cycle (Ct). Ct values were converted to number of target gene molecules and values expressed as the ratio to GAPDH.

### **NFAT and AP1 dual-reporter luciferase assay**

Normal and OA Ob were plated in 24-well plates at a density of  $1.5 \times 10^5$  cells/well containing 10% FBS in BGJb media and left overnight. Plasmid mixtures containing either 2 µg NFAT or

2 µg AP-1 luciferase construct (Qiagen) and 0.05 µg Renilla luciferase driven by the SV40 promoter (Promega) were transfected into cells overnight using the Transfectine (Bio-Rad) transfection Reagent according to the manufacturer's protocol. Media was changed and cells were left to recover from transfection for 6 h prior to incubation for 24 h with rh-Wnt-5a. Cells were lysed and luciferase activity evaluated using the dual luciferase assay kit (Promega). Values for NFAT and AP1 luciferase activities were normalized with Renilla activity for each individual preparation.

### **Statistical analysis**

Quantitative data are expressed as mean  $\pm$  SEM. The data were analyzed by an ANOVA followed multiple comparisons Tukey or Bonferroni-Dunn tests, and p values  $< 0.05$  were considered statistically significant between subgroups.

## Results

### Comparison of gene expression in normal and OA osteoblasts

Previous studies have shown that there are a number of differences between OA and normal Ob (33, 34) in canonical Wnt pathway related genes, but there is little information as to the differences in non-canonical Wnt gene expression in human osteoblasts. We measured, with RT-qPCR, the difference in expression between normal and OA Ob of the principal non-canonical Wnt activator in Ob, Wnt-5a. We were able to determine that Wnt-5a is ~5 fold increased in OA Ob compared to normal Ob (Figure 1A). Next, we measured the difference in expression between normal and OA Ob for the co-receptors LGR4 (Figure 1B) and LGR5 (Figure 1C). This showed that LGR4 is slightly increased although not quite significantly and that LGR5 is increased ~5 fold in OA compared to normal Ob.

### Importance of the effect on Wnt-5a on OA Ob

Since Wnt-5a is a known activator of the non-canonical pathways, we then wanted to test if the augmented expression of LGR5 could be linked to the elevated Wnt-5a expression that we measured. First, following the treatment of OA Ob cells with rhWnt-5a (100 ng/mL) during 24h, we were able to detect via RT-qPCR an increase in the relative LGR5 expression of about 2,5 fold (Figure 2B). In contrast, the increase in LGR4 expression was very slight and not significant following the same treatment (Figure 2A). Second, after measuring the effect of rhWnt-5a in Ob on LGR5 gene expression, we then wanted to confirm this with Western blotting to evaluate the effect on protein production. We were able to confirm an increase on LGR5 production following a 48h treatment with rhWnt-5a, both in OA and normal Ob (Figure 2C).

Third, having measured that the production of Wnt-5a in OA Ob cells is increased and that an increase in its concentration can increase known markers of non-canonical Wnt-signalisation,

we next wanted to measure the effect of a reduction of Wnt-5a. To test this, we used a small interfering RNA (siRNA) approach to reduce the expression of Wnt-5a (siWnt-5a). We were able to reduce the expression of Wnt-5a in OA Ob cells by an average of 50% (Figure 2D), which brings the expression level relative to GAPDH closer to the range of expression in normal Ob cells. After reducing the expression of Wnt-5a, we measured the effect on LGR5 gene expression. Using RT-qPCR, we were able to measure an average reduction of almost 50% of its expression (Figure 2E). As with the failure to increase LGR4 expression following the addition of rhWnt-5a, we were unable to detect a significant decrease in the expression of LGR4 after the siWnt-5a treatment (data not shown).

Since we previously demonstrated that the endogenous increase in TGF- $\beta$ 1 in OA Ob is responsible for the alterations of the canonical Wnt signaling pathway (5), here we also tested if TGF $\beta$ -1 could be linked to Wnt-5a expression. Both the addition (Figure 2H) of rhTGF $\beta$ -1 and its reduction (Figure 2I) showed no effect on Wnt-5a expression. Also, both the addition of rhWnt-5a and reduction with siWnt-5a had no effect on the expression of TGF $\beta$ -1 in OA Ob (Figure 2F and 2G).

### **Effect of the reduction of Wnt-5a on gene expression over time**

After having tested for genes that were affected after a punctual treatment of 24h to 48h, we wanted to measure the expression of key genes involved in osteogenesis over a period of time up to 21 days with a sustained siWnt-5a treatment and if this could modulate these genes. First, we measured the expression of Wnt-5a over 21 days after confluence in OA Ob, and it showed no significant change through the timeline (Figure 3A). In contrast, we can clearly see that LRP5 expression is reduced more and more over time, up to less than half its control level after 21 days (Figure 3B). However, LRP6 does not seem to be affected significantly over time

(Figure 3C). We also tested the effect on CBFA1/Runx2 gene expression over the same period of 21 days. Although all the differences are not significant, it is possible to observe a general tendency for an increase in the expression. Indeed, the siWnt-5a treatment increases the Runx2 expression for the first 7 days up to ~1,5 times the control level, then it has the opposite effect of decreasing it (Figure 3D). Osterix (OSX) expression also seems to be modulated in the same manner yet the variations are significant, this time increasing by about 5 fold and then decreasing below the control level (Figure 3E).

### **Phenotypic characterization of osteoblasts/In vitro mineralization and phenotypic markers following Wnt-5a reduction**

As was previously reported and as we again confirmed here (Figure 4F), ALPase level was high in all OA Ob compared to normal (5, 7). Conversely, it has been well reported that mineralization levels in OA Ob are lower than in normal Ob. We measured with Alizarin red staining the mineralization levels following a reduction with siWnt-5a during at least 28 days. This showed a significant increase in mineralization of ~30% (Figure 4A). We also measured the effect of the siWnt-5a treatment on the expression of alkaline phosphatase gene (TNAP). There was a decrease of about 50% in the expression of the gene (Figure 4B). Conversely, there was no effect on gene expression following an RhWnt-5a treatment (data not shown). The effect of a 100 ng/mL treatment with rhWnt-5a had an effect on OA Ob cells, causing an augmentation in the activity of alkaline phosphatase (Figure 4C), which is associated with OA. However, the siWnt-5a treatment had little to no effect on the alkaline phosphatase activity (data not shown). Osteocalcin activity is higher in OA Ob than in normal (Figure 4E), so we next verified via ELISA assay if a siWnt-5a treatment could also affect this OC level. This treatment showed a 40% decrease in the OC level (Figure 4D).

### **Effect on non-canonical signalisation in OA Ob**

To find what could cause the effects that were measured previously, we then verified if the Wnt non-canonical signalisation was affected in OA Ob. To ascertain this, we tested if Wnt-5a would increase the activity of the Wnt/PCP and Wnt/PKC pathways in Ob cells, and if Rspo2, which was previously described to have an impact on Wnt signalisation in OA, would act as a co-activator of these pathways. Using western blot, we first compared the phosphorylation levels between N and OA Ob and were able to detect a higher phosphorylation level in OA Ob (Figure 5A). Next, the phosphorylation of JNK protein was evaluated for the Wnt/PCP pathway and the phosphorylation of PKC for the Wnt/PKC pathway (Figure 5B). We were able to detect that rhWnt-5a increases the phosphorylation of JNK, that Rspo2 has only a slight effect by itself, but that when used with Wnt-5a, it boosts its effect (Figure 5C). The effect of Wnt5a on the phosphorylation of PKC was much smaller and Rspo2 seems to have a greater relative effect on it (Figure 5D).

We then tested if the observed effect of Wnt-5a would be confirmed by the activation of the NFAT transcription factor, which should normally be involved in the activation of the Wnt/PKC pathway. Using a dual-luciferase NFAT reporter assay, we were able to detect a 2 fold increase in the activation of NFAT (Figure 5E), showing that the increase in activity of this pathway goes all the way to the transcription factor. We also evaluated the activity of the other pathway (Wnt/PCP) via the activation of the AP-1 transcription factor and we were able to increase the AP-1 activity by 50% following a treatment with RhWnt-5a (Figure 5F).

## Discussion

The Wnt signaling pathway is known to be very important to normal skeletal tissue homeostasis and function. Subchondral bone tissue is abnormal in OA patients (11, 12, 35), and we previously showed that OA subchondral osteoblasts have altered functions (5, 7, 36). We have also previously reported the importance of the canonical Wnt signalisation in the subchondral bone isolated osteoblasts from OA patients, but there is no evidence as to the importance of non-canonical Wnt pathways in these cells or for this pathology. Indeed we have previously reported an inhibition in the Wnt agonist R-spondin 2 (8), a stimulation of the Wnt antagonists DKK2 (19) and SOST, along with increases in TGF- $\beta$ 1 (37) which can cause an imbalance in the canonical Wnt pathway signaling. It is believed that all Wnt pathways are somewhat linked (22, 38), and if this is in fact true, this would then cause an imbalance and affect the non-canonical Wnt pathways as well in OA osteoblasts. We show in this study that the non-canonical Wnt/PCP and Wnt/PCP pathways are indeed affected in OA osteoblasts, and that this can be linked to the abnormal expression of the non-canonical Wnt agonist Wnt-5a.

We have been able to observe that the expression and production of the non-canonical Wnt agonist Wnt-5a was actually increased in OA Ob compared to normal Ob along with the Wnt co-receptor LGR5. This suggested that there is effectively an imbalance in the non-canonical Wnt pathway. We next measured if this increase in Wnt-5a expression could in fact stimulate the LGR5 expression and production, because this could then be a potential link to the stimulation of the non-canonical pathways. Indeed, as it was shown by Glinka *et al.* (39), both LGR4 and LGR5 can mediate Wnt-PCP signaling, hence if Wnt-5a is able to influence LGR4 or LGR5, it could affect this non-canonical pathway in this manner. To link Wnt-5a and the modulation of LGR5, both the effect of stimulating and inhibiting the expression of Wnt-5a

were tested in OA osteoblasts, and they respectively were able to increase and reduce the LGR5 expression and production. This indicates that there is in fact a direct link between the expression of Wnt-5a and the expression of LGR5. This goes along with the previous observation that R-spondin 2 is reduced in OA Ob (8); Rspo-2 binds to a co-receptor containing LGR's (4, 5 or 6) thus reducing its availability (22). This low R-spondin 2 level previously observed in OA Ob would allow for a greater availability of LGR5, which could then be used to control the non-canonical Wnt pathways activation.

Knowing that TGF- $\beta$ 1 is a key player in human OA Ob (37), relative to the Wnt  $\beta$ -catenin pathway, we next verified if it could be linked to the observed imbalance of the non-canonical Wnt pathways. However, neither the stimulation nor inhibition of Wnt-5a or TGF- $\beta$ 1 had any significant effect on each other. This indicates that the expression of TGF- $\beta$ 1 is independent of Wnt-5a whereas the expression of Wnt-5a is independent of TGF- $\beta$ 1, while at present we have no clue as to what triggers the expression of Wnt5a in OA Ob.

The low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) 5 and 6 are known to be linked to the Wnt  $\beta$ -catenin pathway (22, 40, 41). They link with Frizzled receptors and act as co-receptors. To further investigate the interplay between the canonical and non-canonical pathways, we validated if there was indeed an effect of Wnt-5a on a number of genes involved in Wnt signaling and osteogenesis. Since Wnt-5a is already increased in OA Ob, we therefore inhibited Wnt-5a, over time, to follow its effect in OA Ob. Indeed, this inhibition caused a clear drop in relative LRP5 expression, suggesting a reduction in the canonical Wnt pathway activity in these cells. This effect seems to be limited to LRP5, as LRP6 expression was unaffected. We also were able to verify the effect of the inhibition of Wnt-5a over time on 2 key players in osteoblastic differentiation, CBFA1/Runx2 (42) and Osterix (43). Although the expression

increase for CBFA1/Runx2 was not significant, the inhibition of Wnt-5a lead to a transient increase of the expression of Osterix in the first two weeks, potentially helping the osteoblasts to differentiate. However, while this transient effect was sufficient to induce Osterix and potentially promote Ob differentiation, it failed to promote Ob mineralization.

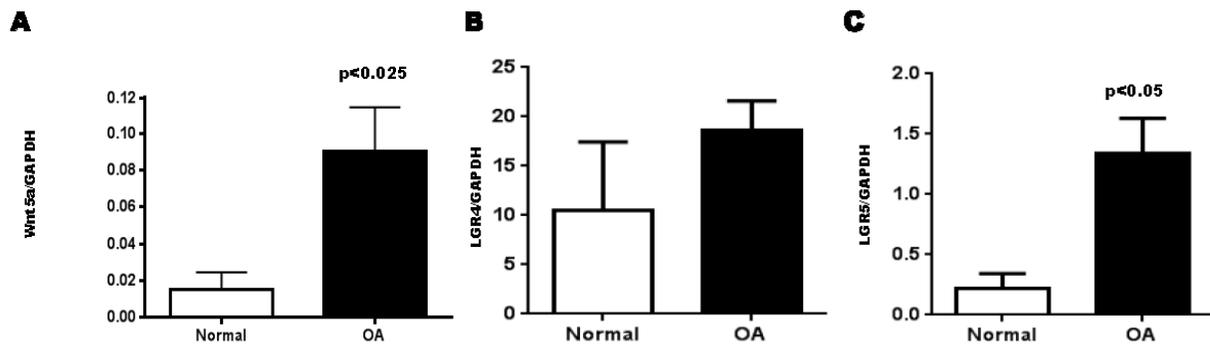
As there is little to no information on the effect of Wnt-5a on bone formation and mineralization in human, it is interesting to note that we were able to increase the mineralization, as measured by alizarin red staining, of OA osteoblasts with reduced endogenous Wnt-5a expression. Subchondral bone plate thickening and bone sclerosis are now consistent clinical findings in OA (12), but we now know that this is not linked with an increase in bone formation *per se*. This is in fact due to an increase in the formation of the bone type 1 collagen extracellular matrix with an imbalance in  $\alpha 1$  to  $\alpha 2$  chains leading to a reduced mineralization (5, 13). Therefore, this overexpression of Wnt-5a in OA osteoblasts could be in part responsible for this abnormal mineralization, along with other factors like SOST (37). The levels of osteocalcin have been shown to be increased in OA Ob (5), and we have been able to measure a reduction in the OC levels following the inhibition of Wnt-5a. Interestingly, the expression levels were not affected, indicating that the OC levels are controlled at another level than transcription. Alkaline phosphatase activity is commonly elevated in OA Ob and this also contributes to the disturbed mineralization process that is observed. This makes our finding that Wnt-5a can influence the alkaline phosphatase activity as well as the expression levels interesting. This could partly explain the better mineralization levels that were achieved following Wnt-5a inhibition.

Although the non-canonical Wnt pathways have been characterized in different cell lines (22, 44), there is little to no evidence that it is exactly the same factors that are involved in human OA Ob. To evaluate the role of each pathway, we measured the phosphorylated form of PKC

and JNK which allowed us to determine the activity level of Wnt/PCP and Wnt/PKC pathway respectively, and we also determined the activation of their transcription factors NFAT and AP-1. Our data clearly demonstrated a robust activation of the Wnt/PCP pathway in response to Wnt-5a in OA Ob, both with the phosphorylation of JNK and with the activation of AP-1. In contrast, for the Wnt/PKC pathway, the response to Wnt-5a was small at the protein level, possibly because the activity of this pathway is already high in OA Ob compared to normal Ob. Interestingly, we were able to detect an increase at the transcriptional activity level as reported by the dual NFAT/Renilla reporter assay, and NFAT is associated with the activity of the Wnt/PKC pathway. Since the phosphorylation of PKC was rather small in OA Ob in response to Wnt5a stimulation, this suggests that the NFAT activity could also be stimulated at another level than only at the *p*-PKC level in OA Ob, and this would require further investigation. Also, both with *p*-JNK and *p*-PKC, the addition of Rspo-2 in conjunction with Wnt-5a, but not alone, was able to boost the effect of Wnt-5a, supporting the idea that these two work together to stimulate the non-canonical pathways.

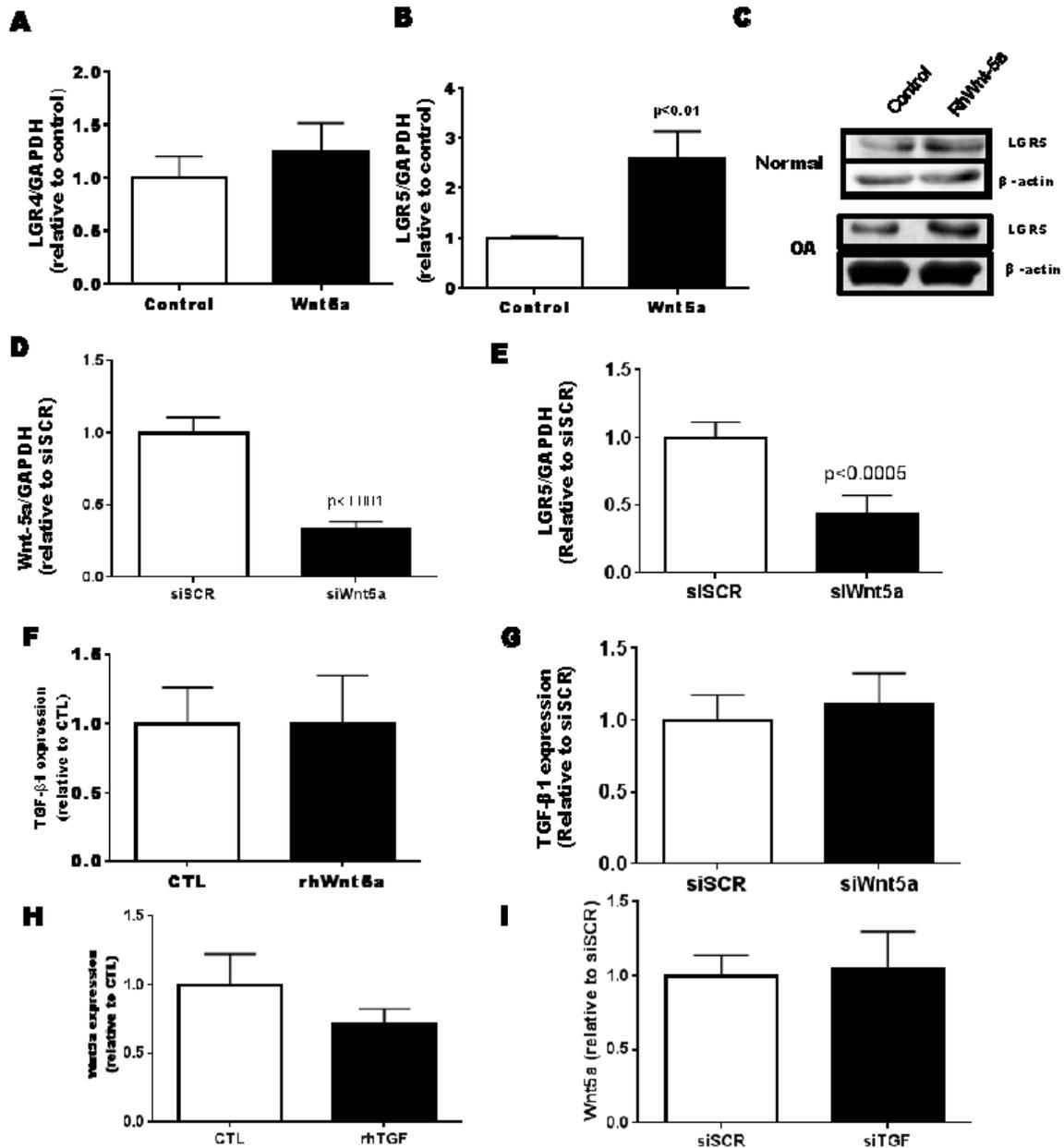
In conclusion, the findings of this study indicate that Wnt-5a plays an important role in both the non-canonical Wnt/PCP and Wnt/PKC pathways in OA osteoblasts. The high levels of Wnt-5a contribute to the altered non-canonical Wnt signalling pathways as already observed for the canonical Wnt pathway, and affects both the phenotype and the mineralization process of these cells.

## Figures



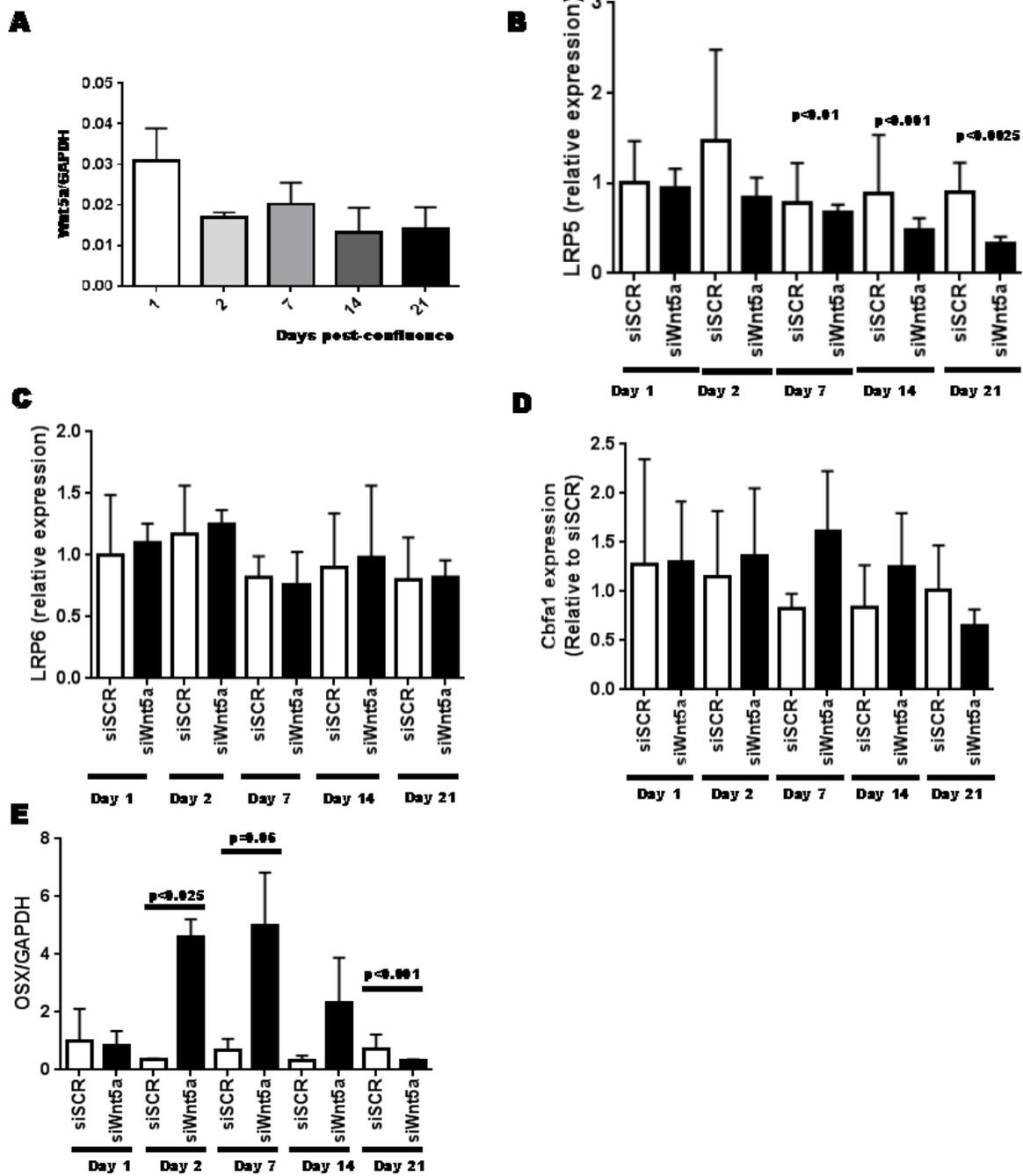
**Figure 1. Expression differences measured with RT-qPCR relative to GAPDH expression.**

Differences in the A. Wnt-5a gene between normal Ob (n=4) and OA Ob (n=16). B. LGR4 gene between N Ob (n=4) and OA Ob (n=14) and C. LGR5 gene between N Ob (n=4) and OA Ob (n=19)



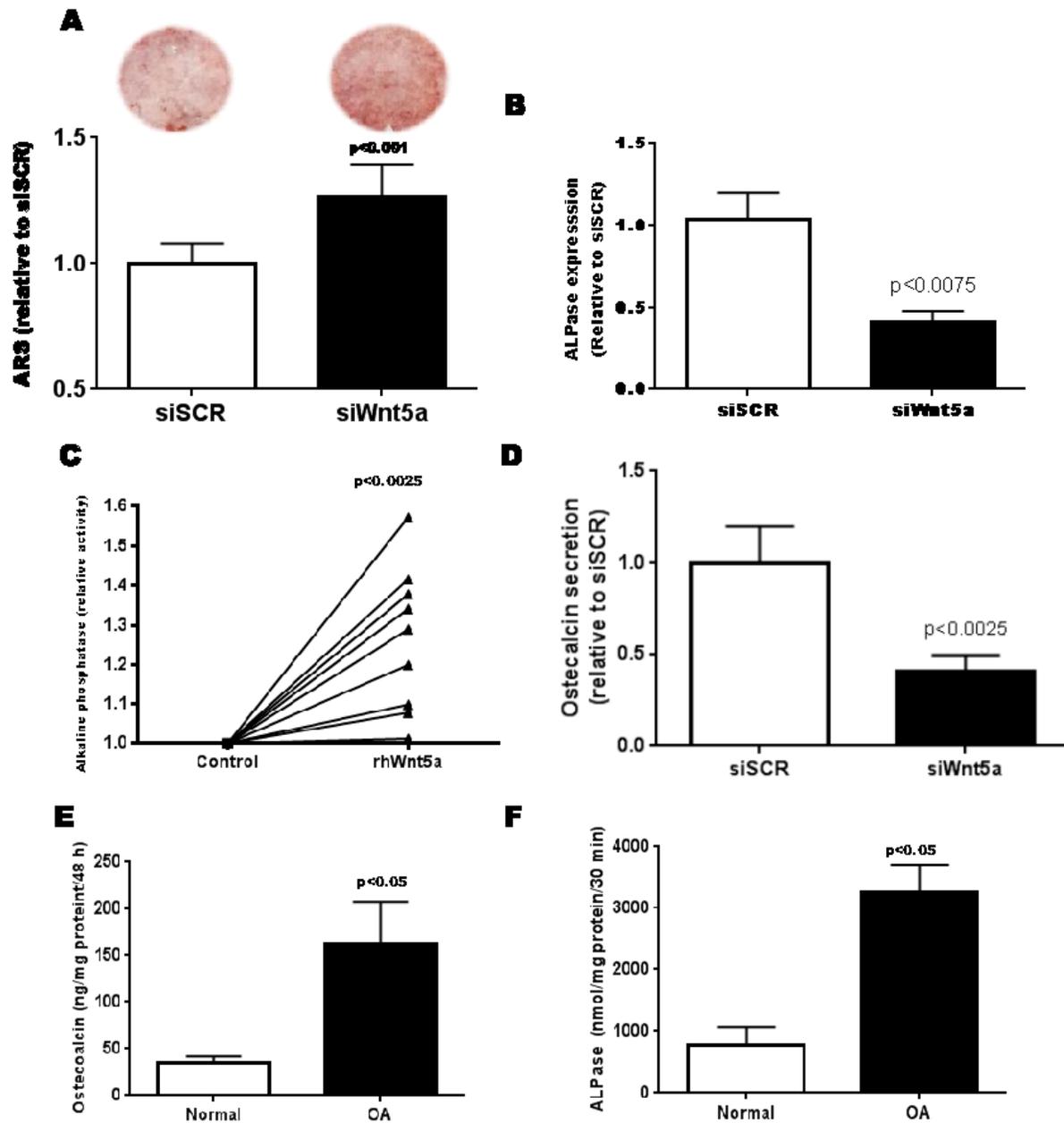
**Figure 2. Relation between Wnt-5a, LGR5 and TGF-β1 on gene expression in OA Ob measured with RT-qPCR and protein production measured with Western blot.**

RhWnt-5a (100 ng/mL) treatment on the expression of A. LGR4 gene expression and, B. LGR5 gene expression C. Effect of RhWnt-5a treatment (100 ng/mL) on both N Ob and OA Ob protein levels. LGR5 and β-actin levels were detected using selective antibodies. The result shown is representative of 6 experiments for OA Ob and 3 experiments for N Ob. D. Effect of siWnt-5a on the gene expression of Wnt-5a. E. Effect of siWnt-5a on LGR5 gene expression. F. TGF-β1 expression relative to control following 24 hours RhWnt-5a treatment and G. siWnt-5a treatment. H. Wnt-5a expression following 24 and 48 hours treatments with RhTGF-β1 (10 ng/mL). I. Wnt-5a expression following siTGF-β1 treatment.



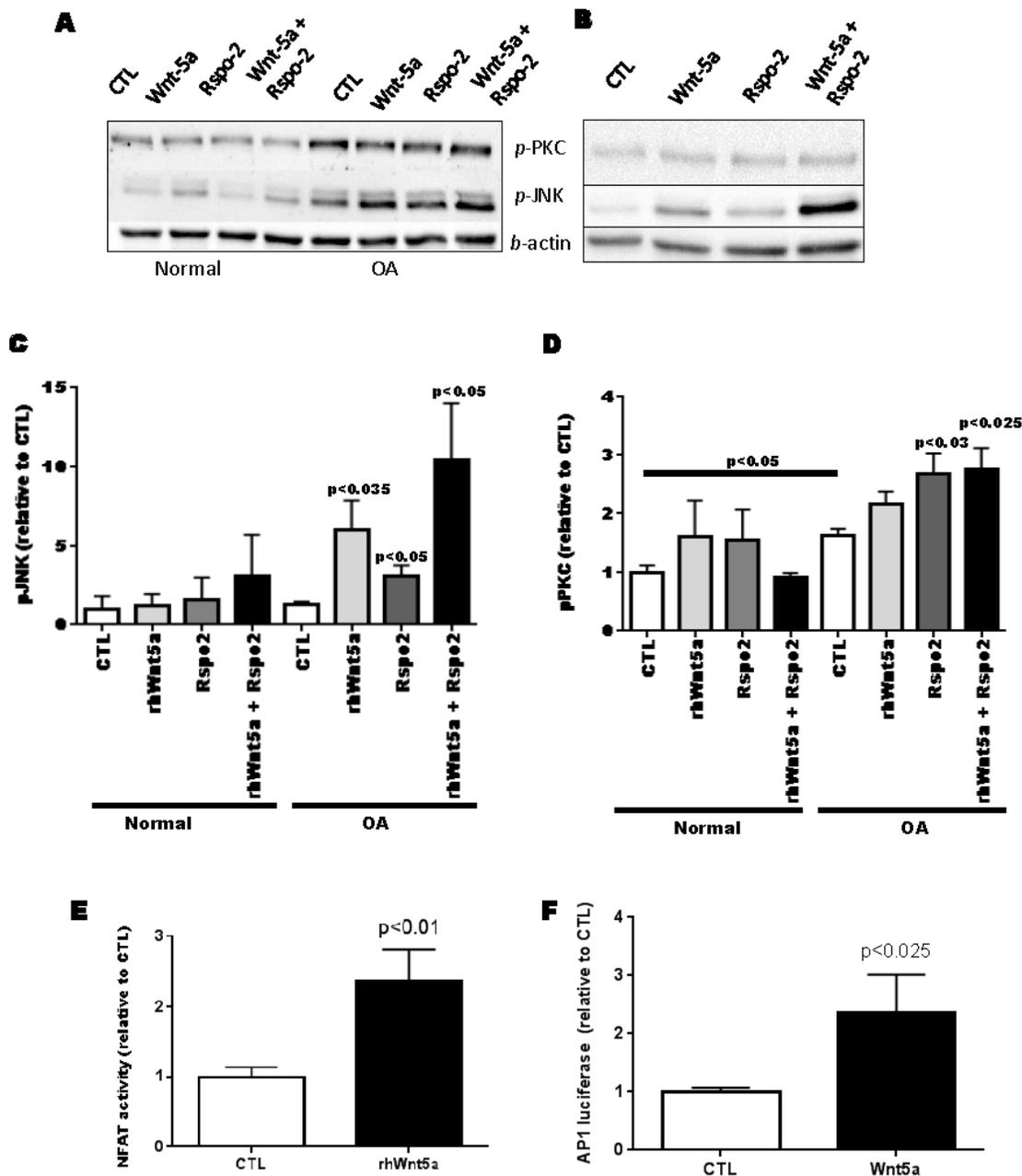
**Figure 3. Effect over 21 days of siWnt-5a treatment on gene expression measured with RT-qPCR**

Relative to siSCR expression (n=7). A. Reduction of the Wnt-5a expression over the course of 21 days with repeated siRNA treatments every 3 to 5 days. B. Reduction of LRP5 relative gene expression. C. LRP6 relative gene expression. D. CBFA1/Runx2 relative gene expression and E. Osterix gene expression.



**Figure 4. Effect of Wnt-5a reduction on phenotype of OA Ob.**

A. siWnt-5a treatment for 28 to 35 days on mineralization levels as measured with Alizarin red staining (n=5). B. Effect of the Wnt-5a inhibition on ALPase expression levels. C. RhWnt-5a treatment effect on ALPase activity levels. D. Effect of siWnt-5a treatment on relative osteocalcin secretion levels as measured with ELISA (n=14). E. Comparison of OC levels between N (n=6) and OA (n=23) Ob. F. Comparison of ALPase activity levels between N (n=6) and OA (n=42) Ob.



**Figure 5. Effect of Wnt-5a and Rspo-2 treatments on non-canonical Wnt pathway activity levels, as indicated by the phosphorylation levels of PKC and JNK proteins in N and OA Ob.**

A. Differences between levels in N and OA of *p*-JNK and *p*-PKC. B. Representative sample of the effect of Wnt-5a and Rspo-2 treatments on *p*-PKC and *p*-JNK. C. Quantification of the Western blots for *p*-JNK, relative to *b*-actin (OA: n=5, N: n=3). D. Quantification of the Western blots for *p*-PKC, relative to *b*-actin (OA: n=4 and N: n=2). E. NFAT activity level measured with dual-luciferase reporter assay following RhWnt-5a treatment in OA Ob (n=9) F. AP-1 activity level measured with dual-luciferase reporter assay following RhWnt-5a treatment in OA Ob (n=3)

## References

1. Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *Journal of cellular physiology*. 2007;213(3):626-34.
2. Lajeunesse D, Reboul P. Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. *Current opinion in rheumatology*. 2003;15(5):628-33.
3. Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *Journal of cellular physiology*. 2007;213(3):626-34.
4. Massicotte F, Aubry I, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fernandes J, Lajeunesse D. Abnormal insulin-like growth factor 1 signaling in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Arthritis research & therapy*. 2006;8(6):R177.
5. Couchourel D, Aubry I, Delalandre A, Lavigne M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, et al. Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is attributable to abnormal type I collagen production. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(5):1438-50.
6. Massicotte F, Lajeunesse D, Bendorour M, Pelletier JP, Hilal G, Duval N, et al. 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 and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2002;10(6):491-500.
7. Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, 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 and rheumatism*. 1998;41(5):891-9.
8. Abed E, Chan TF, Delalandre A, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Lajeunesse D. R-spondins are newly recognized players in osteoarthritis that regulate Wnt signaling in osteoblasts. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(12):3865-75.
9. Burr DB, Schaffler MB. The involvement of subchondral mineralized tissues in osteoarthrosis: quantitative microscopic evidence. *Microscopy research and technique*. 1997;37(4):343-57.
10. Bruckner P, Dreier R, Grassel S, Babarina AV. Common denominators of osteoarthritis and of endochondral bone formation: is osteoarthritis nothing but an inappropriate attempt at bone formation? *Z Rheumatol*. 2002;61(3):263-5.
11. Mansell JP, Bailey AJ. Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(8):1596-603.
12. Li B, Aspden RM. Composition and mechanical properties of cancellous bone from the femoral head of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1997;12(4):641-51.
13. Bailey AJ, Sims TJ, Knott L. Phenotypic expression of osteoblast collagen in osteoarthritic bone: production of type I homotrimer. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2002;34(2):176-82.
14. Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell*. 1995;80(3):371-8.

15. Laitinen M, Halttunen T, Jortikka L, Teronen O, Sorsa T, Lindholm TS. The role of transforming growth factor-beta on retarded osteoblastic differentiation in vitro. *Life Sci.* 1999;64(10):847-58.
16. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet.* 2004;5(9):691-701.
17. Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2003;18(10):1842-53.
18. Zamurovic N, Cappellen D, Rohner D, Susa M. Coordinated activation of notch, Wnt, and transforming growth factor-beta signaling pathways in bone morphogenic protein 2-induced osteogenesis. Notch target gene *Hey1* inhibits mineralization and *Runx2* transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry.* 2004;279(36):37704-15.
19. Chan TF, Couchourel D, Abed E, Delalandre A, Duval N, Lajeunesse D. Elevated Dickkopf-2 levels contribute to the abnormal phenotype of human osteoarthritic osteoblasts. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2011;26(7):1399-410.
20. Corr M. Wnt-beta-catenin signaling in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008;4(10):550-6.
21. Spater D, Hill TP, Gruber M, Hartmann C. Role of canonical Wnt-signalling in joint formation. *Eur Cell Mater.* 2006;12:71-80.
22. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2012;13(12):767-79.
23. Weivoda MM, Ruan M, Hachfeld CM, Pederson L, Howe A, Davey RA, et al. Wnt Signaling Inhibits Osteoclast Differentiation by Activating Canonical and Noncanonical cAMP/PKA Pathways. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2016;31(1):65-75.
24. Bouaziz W, Funck-Brentano T, Lin H, Marty C, Ea HK, Hay E, et al. Loss of sclerostin promotes osteoarthritis in mice via beta-catenin-dependent and -independent Wnt pathways. *Arthritis research & therapy.* 2015;17:24.
25. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S. New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *International review of cell and molecular biology.* 2011;291:21-71.
26. Simons M, Mlodzik M. Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annual review of genetics.* 2008;42:517-40.
27. Sato A, Yamamoto H, Sakane H, Koyama H, Kikuchi A. Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *The EMBO journal.* 2010;29(1):41-54.
28. De A. Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway: a brief overview. *Acta biochimica et biophysica Sinica.* 2011;43(10):745-56.
29. Fukuda T, Kokabu S, Ohte S, Sasanuma H, Kanomata K, Yoneyama K, et al. Canonical Wnts and BMPs cooperatively induce osteoblastic differentiation through a GSK3beta-dependent and beta-catenin-independent mechanism. *Differentiation.* 2010;80(1):46-52.
30. Hilal G, Massicotte F, Martel-Pelletier J, Fernandes JC, Pelletier JP, Lajeunesse D. Endogenous prostaglandin E2 and insulin-like growth factor 1 can modulate the levels of parathyroid hormone receptor in human osteoarthritic osteoblasts. *Journal of bone and mineral*

research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2001;16(4):713-21.

31. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical biochemistry*. 2004;329(1):77-84.

32. Mutabaruka MS, Aoulad Aissa M, Delalandre A, Lavigne M, Lajeunesse D. Local leptin production in osteoarthritis subchondral osteoblasts may be responsible for their abnormal phenotypic expression. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(1):R20.

33. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nature medicine*. 2007;13(2):156-63.

34. Li X, Liu P, Liu W, Maye P, Zhang J, Zhang Y, et al. Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. *Nature genetics*. 2005;37(9):945-52.

35. Mansell JP, Tarlton JF, Bailey AJ. Biochemical evidence for altered subchondral bone collagen metabolism in osteoarthritis of the hip. *British journal of rheumatology*. 1997;36(1):16-9.

36. Lajeunesse D, Massicotte F, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Subchondral bone sclerosis in osteoarthritis: not just an innocent bystander. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*. 2003;13(1):7-14.

37. Abed E, Couchourel D, Delalandre A, Duval N, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, et al. Low sirtuin 1 levels in human osteoarthritis subchondral osteoblasts lead to abnormal sclerostin expression which decreases Wnt/beta-catenin activity. *Bone*. 2014;59:28-36.

38. Saito S, Tampe B, Müller GA, Zeisberg M. Primary cilia modulate balance of canonical and non-canonical Wnt signaling responses in the injured kidney. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 2015;8:6.

39. Glinka A, Dolde C, Kirsch N, Huang YL, Kazanskaya O, Ingelfinger D, et al. LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/beta-catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep*. 2011;12(10):1055-61.

40. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005;434(7035):843-50.

41. Wray J, Hartmann C. WNTing embryonic stem cells. *Trends in cell biology*. 2012;22(3):159-68.

42. Ren D, Wei F, Hu L, Yang S, Wang C, Yuan X. Phosphorylation of Runx2, induced by cyclic mechanical tension via ERK1/2 pathway, contributes to osteodifferentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *Journal of cellular physiology*. 2015;230(10):2426-36.

43. Peng Y, Shi K, Wang L, Lu J, Li H, Pan S, et al. Characterization of Osterix protein stability and physiological role in osteoblast differentiation. *PloS one*. 2013;8(2):e56451.

44. Kobayashi Y, Uehara S, Udagawa N, Takahashi N. Regulation of bone metabolism by Wnt signals. *J Biochem*. 2016;159(4):387-92.

## 8. Discussion générale

Chaque année, la proportion de personnes atteintes d'arthrose augmente dans le monde occidental et ceci est lié en grande partie au vieillissement de la population ainsi qu'à l'augmentation du taux d'obésité en Amérique du Nord. Il s'agit là des deux facteurs de risque les plus importants pour l'OA. En effet, il est estimé que, si aucune solution n'est trouvée, le nombre de personnes atteintes d'arthrite au Canada passera de 4,6 millions en 2011 à 7,5 millions en 2036 (1). Ceci entraînera évidemment une hausse des coûts de santé directs associés au traitement de cette maladie. Déjà, il a été estimé que le coût cumulatif des soins de santé directs et les autres impacts économiques indirects allaient atteindre 233,5 milliards de dollars en 2015 au Canada seulement (88). Il y a donc ici un double avantage à chercher un traitement qui vise les causes de l'arthrose et qui pourrait éventuellement arrêter ou prévenir l'OA; il permettrait à la fois d'alléger grandement le fardeau fiscal que cette maladie représente pour notre population en plus, et surtout, d'éviter à des millions de personnes les souffrances et invalidités causées par cette maladie.

Bien qu'il y ait une profusion de recherche axée sur l'arthrite et l'arthrose sous toutes ses formes partout dans le monde, une grande partie de cette recherche porte soit sur la détection à l'aide de nouvelles méthodes d'imagerie ou sur le traitement des douleurs liées à cette maladie. Cette recherche est nécessaire pour améliorer le confort des patients ainsi que pour essayer de détecter plus tôt la maladie, mais elle ne touche pas aux causes fondamentales de l'OA. D'un autre côté, la recherche fondamentale a elle pour but de mieux caractériser les divers dérèglements qui ont lieu lors de la progression de la maladie, pour pouvoir éventuellement prévenir et même guérir en ciblant les causes au lieu de simplement traiter les conséquences.

Comme il a été mentionné précédemment, l'arthrose est une maladie des articulations, et ceci implique donc tous les tissus dans l'articulation. Cependant, grâce aux travaux antérieurs de notre laboratoire ainsi que ceux d'autres équipes, le rôle prédominant de l'os sous-chondral dans l'arthrose du genou a pu être mis en évidence (63, 89, 90), alors que la majorité de la recherche portait sur le cartilage. Plusieurs dérèglements ont été observés dans l'os sous-chondral OA, que ce soit au niveau du tissu osseux (58, 60, 61) ou de la fonction des ostéoblastes (39, 63). Au courant des dernières années, le rôle de plusieurs facteurs a été mis en évidence

grâce à notre équipe et aux travaux de plusieurs autres équipes (91-93). En effet, la diminution du niveau de R-spondine 2 (79), la stimulation de DKK2 (73), de SOST et de TGF- $\beta$ 1 (39, 94) ont été montrés comme étant des joueurs importants dans l'étiologie de l'arthrose dans les ostéoblastes humains. Tous ces facteurs sont en fait reliés ou interagissent avec la voie de signalisation Wnt canonique (ou  $\beta$ -caténine dépendante), mettant en évidence l'importance de celle-ci dans la pathologie de l'arthrose du genou humain. Les travaux de notre équipe ainsi que ceux de plusieurs autres ont ainsi permis de confirmer l'importance de cette voie pour le développement de l'OA dans l'os sous-chondral (71, 72, 95, 96).

D'un autre côté, le rôle de la signalisation Wnt non-canonique dans la progression et le développement de l'arthrose dans les Ob n'a pratiquement pas été évalué. Malgré le rôle prépondérant de la signalisation Wnt  $\beta$ -caténine dépendante, il paraît logique que la signalisation  $\beta$ -caténine indépendante puisse aussi être affectée. En effet, toutes les voies de signalisations Wnt sont liées à un certain degré (82, 97). Par exemple, les récepteurs Frizzled, dépendamment des corécepteurs et des ligands qui sont impliqués, peuvent être utilisés pour une voie ou pour l'autre. Il serait donc logique que si l'une est affectée, les autres le soient aussi, les diverses voies agissant ainsi en balancier. L'importance des voies non-canoniques a été étudiée dans plusieurs autres types de cellules et pathologies, allant, notamment, du développement de cellules souches du sang (98), à la régulation de la production de matrice extracellulaire des cellules de muscle lisses de la voie respiratoire (99) et plusieurs autres domaines liés au développement (82).

En tenant compte des connaissances accumulées sur les voies Wnt canoniques et de ce qui est connu sur les voies non-canoniques à partir de différentes sources, nous avons mené cette étude. Notre hypothèse était de démontrer un lien fonctionnel entre les modifications de la voie canonique, déjà connue dans les ostéoblastes OA humains, et la signalisation non-canonique. Grâce aux connaissances acquises sur la signalisation non-canonique dans les autres tissus et systèmes, nous avons pu démontrer que les voies Wnt non-canoniques Wnt/PKC et Wnt/PCP sont effectivement affectées dans les ostéoblastes arthrosiques humains et que ceci peut être lié à une expression et production anormale du ligand non-canonique Wnt-5a. De plus, une correction de cette production peut améliorer le phénotype anormal des Ob OA tout comme ceci a été démontré suite à une correction de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans ces cellules (79, 94).

Tout d'abord, nous avons mesuré les différences d'expression des facteurs non-canoniques afin de pouvoir déterminer s'il y avait effectivement une variation dans la signalisation Wnt non-canonique. Il a été possible d'observer que l'agoniste non-canonique Wnt-5a a une expression augmentée dans les Ob OA comparativement aux Ob normaux. Le corécepteur Wnt LGR5 avait aussi une expression augmentée. L'expression de LGR4, elle, n'avait qu'une faible variation. Ensuite, il a été possible de lier la différence d'expression de Wnt-5a et celle de LGR5 grâce à un traitement des cellules avec la protéine recombinante Wnt-5a ainsi qu'avec un autre traitement de réduction de l'expression (siRNA) qui ont respectivement permis d'augmenter et de réduire la quantité de Wnt-5a dans les cellules. Suite à ces traitements, il a été possible d'observer un lien direct entre les deux éléments : une augmentation de Wnt-5a cause une augmentation de LGR5 au niveau de l'expression et de la production alors que la réduction de Wnt-5a entraîne une correction de la production de LGR5. De la même manière qu'il a été impossible de détecter une variation dans la production endogène de LGR4, l'ajout de Wnt-5a recombinant et l'inhibition par siRNA n'a pu modifier l'expression ou la production de LGR4. Ce lien entre LGR5 et Wnt-5a est intéressant, car il a été montré par Glinka *et coll.* (77) que LGR4 et LGR5 peuvent contrôler la signalisation Wnt/PCP, ce qui permet d'associer le niveau de Wnt-5a élevé et l'augmentation de l'activité des voies Wnt non-canoniques dans les Ob OA humains.

Sachant que TGF- $\beta$ 1 est un élément majeur de contrôle des éléments impliqués dans l'arthrose dans les ostéoblastes (94), nous avons testé s'il était possible d'associer ce dernier aux modulations des voies Wnt non-canoniques. Des traitements de stimulation et d'inhibition de l'expression de TGF- $\beta$ 1 ont donc été effectués dans ce but, et dans les deux cas, aucun effet n'a été observé sur le niveau d'expression de Wnt-5a. Également, des traitements de stimulation et d'inhibition de Wnt-5a ont été effectués pour vérifier si ceux-ci avaient un effet sur l'expression de TGF- $\beta$ 1 et, dans les deux cas, aucun effet significatif n'a pu être observé. À la lumière de ces résultats, il est donc possible d'affirmer que l'expression de Wnt-5a dans les Ob OA humains est indépendante de l'expression de TGF- $\beta$ 1 et que l'expression de TGF- $\beta$ 1 est indépendante de Wnt-5a. Pour le moment, nous ne savons donc pas ce qui stimule l'expression de Wnt-5a dans les Ob OA, et une étude plus poussée en ce sens pourrait être fort utile pour avoir une meilleure compréhension de la maladie. Une piste potentielle pourrait être en lien avec la voie de

signalisation NF- $\kappa$ B et interleukine-1 $\beta$  qui influenceraient l'activité de Wnt-5a dans les chondrocytes en lien avec l'arthrite (100). Bien qu'il s'agisse d'un type cellulaire différent, il pourrait être intéressant de vérifier si ce lien s'applique aussi dans les ostéoblastes OA. Cependant, des travaux antérieurs de notre laboratoire n'ayant pas détecté de variations de l'expression d'IL-1 $\beta$  (67), cette hypothèse semble peu probable.

Les récepteurs LRP5 et LRP6 sont aussi connus comme étant des éléments importants de la voie de signalisation Wnt  $\beta$ -caténine (82, 101, 102). Ils se lient aussi aux récepteurs Frizzled tout comme LGR4 et LGR5 et agissent en tant que corécepteurs. Puisque la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est réduite dans les Ob OA et afin de mieux évaluer les interactions entre les 2 types de voies Wnt, nous avons mesuré l'effet en fonction du temps d'une réduction soutenue de l'expression de Wnt-5a sur la voie Wnt canonique. L'inhibition de Wnt-5a a causé une baisse de plus en plus marquée de l'expression relative de LRP5 en fonction du temps, ce qui permet de suggérer une baisse dans l'activité de la voie Wnt  $\beta$ -caténine. Par contre, l'effet était limité à LRP5, car LRP6 n'a pas été affecté de manière significative. L'effet de cette inhibition de Wnt-5a dans les ostéoblastes OA a aussi été mesuré sur 2 joueurs importants dans la différenciation des ostéoblastes, soit CBFA1/Runx2 (103) et ostérix (104). L'expression de CBFA1/Runx2 n'a pas varié de manière significative en réponse à l'inhibition de Wnt5a dans les ostéoblastes OA, par contre ceci a conduit à un effet transitoire sur l'expression d'ostérix. L'augmentation temporaire d'ostérix pendant les 2 premières semaines de différenciation en présence de siWnt-5a suggère potentiellement une stimulation de la différenciation cellulaire ostéoblastique. Par contre, l'inhibition de l'expression d'ostérix observée après 21 jours de ce traitement indique que d'autres éléments de contrôle ont été activés. La nature de ces éléments reste à déterminer et fera partie de travaux futurs. Par contre, cet effet de l'inhibition de Wnt-5a, bien que temporaire, a été suffisant pour induire une modification du phénotype des ostéoblastes et de permettre à ceux-ci de minéraliser.

Tel que mentionné précédemment, il y a très peu ou pas d'information sur l'effet de Wnt-5a sur les Ob OA, donc, pas non plus sur son effet sur la formation osseuse et la minéralisation dans ces cellules. Il est donc intéressant de pouvoir affirmer que la minéralisation mesurée par rouge Alizarine a été améliorée suite à une réduction de l'expression endogène de Wnt-5a. En effet, comme mentionné plus tôt, l'épaississement de la plaque d'os sous-chondral et la sclérose

osseuse sont maintenant des phénomènes reconnus et couramment retrouvés dans les études cliniques sur l'OA (58), mais cet effet n'est pas lié à une augmentation de la formation osseuse saine. Il s'agit en fait d'une augmentation de la formation de collagène de type I de l'os, avec un déséquilibre du ratio des chaînes de type I  $\alpha 1$  à  $\alpha 2$ , ce qui donne une minéralisation réduite (39, 59). Ainsi, cette surexpression observée de Wnt-5a pourrait être partiellement responsable de cette minéralisation anormale dans les Ob OA, en conjonction avec les autres facteurs précédemment rapportés. Bien que l'effet relatif de Wnt-5a sur la minéralisation ne soit pas assez grand pour qu'il puisse être identifié comme la clé de la minéralisation problématique dans les Ob OA, il s'inscrit ici comme un morceau important dans un portrait global de plus en plus complet des différents joueurs impliqués dans l'arthrose. En effet, le TGF- $\beta 1$  via l'augmentation de DKK2 entraînant une réduction de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine altère aussi le phénotype cellulaire des ostéoblastes OA et de leur minéralisation (71, 73). Ainsi, l'inhibition de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et l'augmentation des voies Wnt non-canoniques conduisent toutes deux à une altération de la différenciation cellulaire et de la minéralisation des ostéoblastes OA.

Un autre facteur qui peut servir d'indication sur l'état de la signalisation dans les Ob est le niveau d'ostéocalcine (39) qui est augmenté dans les Ob OA. Il a été possible de réduire le niveau protéique d'ostéocalcine suite à une inhibition de l'expression de Wnt-5a. Par contre, aucun effet n'a été mesuré sur le niveau d'expression du gène de l'OC, ce qui nous indique que l'effet mesuré sur son niveau protéique doit provenir d'une régulation autre qu'à la transcription. Également, l'activité phosphatase alcaline est généralement élevée dans les Ob OA et ceci aussi est lié au défaut de minéralisation (39, 63). Nous avons aussi pu affecter l'activité de la phosphatase alcaline en modulant les niveaux de Wnt-5a et ceci est particulièrement intéressant, car cela pourrait aussi expliquer partiellement l'effet observé sur la minéralisation. Il est donc intéressant de noter que les niveaux d'OC et d'ALP sont modulés avec Wnt-5a et que ceux-ci vont donc pouvoir venir affecter la capacité des ostéoblastes à minéraliser correctement. Par contre, la réduction de Wnt-5a n'a eu aucun effet sur le ratio de COLI $\alpha 1$  sur COLI $\alpha 2$  (résultats non illustrés), contrairement à ce qui avait été montré suite à une modification de la voie canonique.

Après avoir observé les altérations des récepteurs et ligands non-canoniques et avoir lié les niveaux de ceux-ci à un phénotype altéré des Ob OA, nous avons par la suite entrepris de caractériser le rôle et l'activité respective des voies non-canoniques Wnt/PKC et Wnt/PCP, afin de pouvoir juger de l'importance relative de chacune. Pour pouvoir mesurer l'activation des deux voies, il est possible de détecter les formes phosphorylées des protéines PKC et JNK (respectivement pour Wnt/PKC et Wnt/PCP). Également, la voie Wnt/PKC utilise le facteur de transcription NFAT et la voie Wnt/PCP utilise le facteur de transcription c-JUN (via AP1).

En utilisant ces approches, nous avons été capables de détecter une activation de la voie Wnt/PKC grâce à une légère augmentation du niveau de phosphorylation de PKC (*p*-PKC). Nous avons également pu confirmer cette activation grâce à la mesure de l'activité NFAT avec un essai luciférase qui avait une activité augmentée en réponse à Wnt-5a. Pour ce qui est de la faible stimulation au niveau protéique de *p*-PKC, il est possible que le niveau de base de phosphorylation de cette protéine soit déjà élevé dans les Ob OA et qu'une stimulation à l'aide de Wnt-5a ne puisse augmenter encore plus ce niveau. D'ailleurs, on peut observer que le niveau de phosphorylation de PKC est plus élevé dans les ostéoblastes OA que dans les normaux. Par contre, ici, le niveau d'activité transcriptionnelle de NFAT, tel que rapporté par luciférase, est bien augmenté, et ceci indique que cette voie doit être stimulée par *p*-PKC. Par contre, d'autres facteurs pourraient aussi contribuer à la stimulation de l'activité NFAT et ceci nécessiterait également une étude plus poussée.

Pour ce qui est de la voie Wnt/PCP, nous avons pu observer une franche augmentation du niveau de phosphorylation de JNK (*p*-JNK). Il a également été possible d'observer une augmentation du niveau d'activité d'AP1, mesuré par luciférase, suite au traitement de recombinant Wnt-5a.

Également, l'activation de la voie Wnt/PCP pourrait être reliée aux résultats obtenus suite aux traitements avec la Rspo-2. En effet, la Rspo2 se lie au corécepteur LGR (4,5 ou 6) et permet d'augmenter la réponse de la voie canonique aux agonistes Wnt canoniques. Cette liaison de Rspo2 et LGR réduit donc la disponibilité des LGR (82) dans la cellule. À l'inverse, s'il y a moins de Rspo2 et qu'il y a donc plus de LGR disponible, on observe une inhibition de la voie canonique (79, 82) couplée à une activation des voies non-canoniques. Puisque les travaux antérieurs de notre laboratoire ont permis de démontrer une diminution de l'expression et de la

production de la Rspo-2, liée à une signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine réduite (79), ceci peut expliquer la plus grande disponibilité de LGR5 qui permet de moduler à la hausse les voies non-canoniques (77). Par contre, ceci ne joue pas de rôle dans l'augmentation de la production de LGR5 et de Wnt-5a que nous avons observée. Cette augmentation de LGR5 pourrait être une réponse de la cellule à l'augmentation de l'activité Wnt non-canonique pour tenter de retrouver la balance en essayant de stimuler la voie canonique à l'aide de l'action de Rspo-2 avec LGR5. Cette stimulation ne peut par contre pas avoir lieu étant donné le faible niveau de Rspo-2 dans les Ob OA et permettrait à l'opposé une plus grande stimulation de la voie Wnt/PCP.

Ces résultats s'inscrivent dans un cadre plus large qui a pour but de caractériser le mieux possible les différentes voies de signalisation impliquées dans l'OA. Les différentes interactions que nous avons pu caractériser sont d'ailleurs schématisées à la figure 5. En effet, nous pouvons maintenant inclure les voies Wnt canoniques et non-canoniques comme étant toutes impliquées dans la pathologie de l'arthrose chez l'humain, et continuer de chercher pour caractériser le mieux possible toutes les interactions qui ont lieu. Comme mentionné en introduction, l'arthrose est une maladie de l'articulation au complet, et bien que l'implication de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans le cartilage articulaire soit étudiée, il serait intéressant de confirmer si les voies non-canoniques sont aussi dérégées ou non dans les chondrocytes arthrosiques. Ceci permettrait de déterminer si ces altérations sont uniques aux ostéoblastes arthrosiques humains.

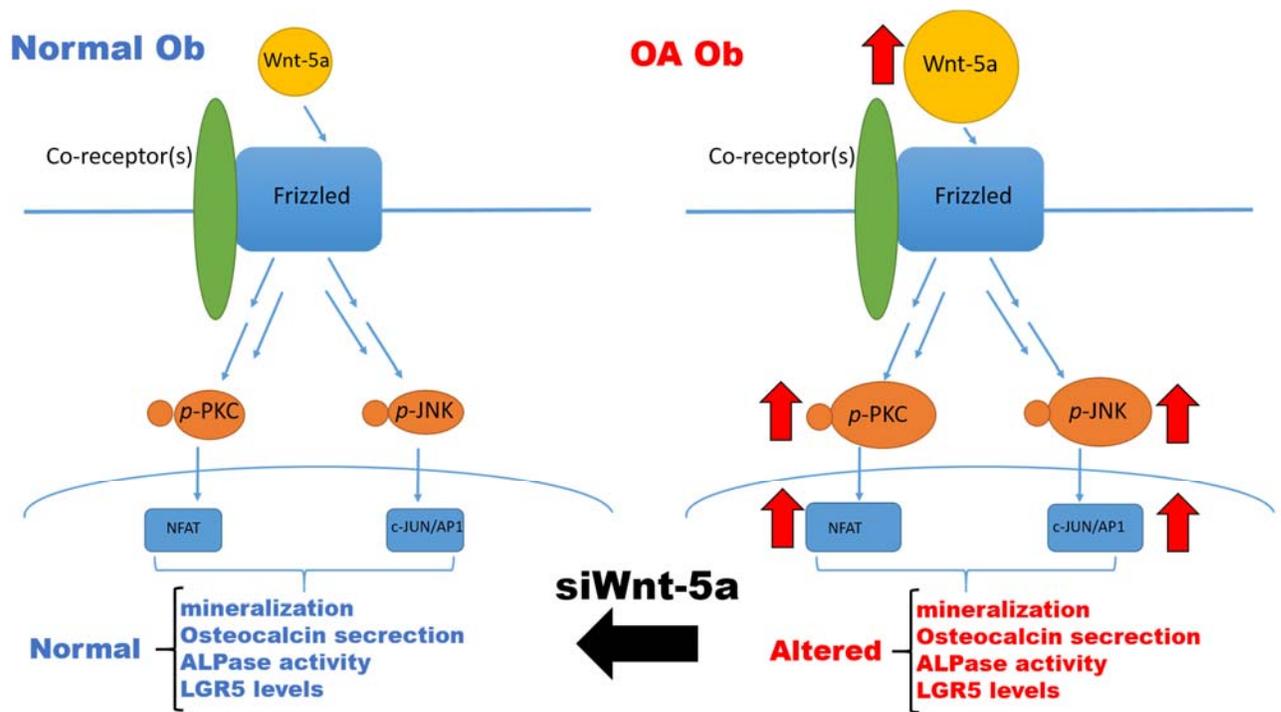


Figure 5. Résumé général des interactions observées dans l'étude

## 9. Conclusion

Grâce à cette recherche, nous avons été en mesure de préciser encore un peu plus le portrait des défauts de signalisation biochimique dans les ostéoblastes arthrosiques humains. Le rôle de Wnt-5a et l'implication des voies de signalisation Wnt  $\beta$ -caténine indépendantes dans cette maladie est maintenant plus clair. En effet, nous avons pu démontrer un lien entre Wnt-5a et LGR5, ainsi que l'effet de Wnt-5a sur le phénotype des ostéoblastes, le tout lié à deux voies de signalisation Wnt non-canonique qui sont dérégées. L'utilisation de cellules primaires des patients arthrosiques et des sujets normaux permet ici également de caractériser plus directement les changements qui ont lieu lors de l'arthrose dans les ostéoblastes humains, en comparaison à des lignées cellulaires. Ainsi, nos résultats montrent que la signalisation Wnt non-canonique est effectivement affectée dans les ostéoblastes OA, et que ceci cause une partie des dérèglements observés du phénotype et de la minéralisation de ces cellules.

## Bibliographie

1. (ACREU) Scdredédla. L'arthrite au Canada. 2013.
2. Osteoarthritis (OA). The Merck Manual of diagnosis and therapy. 2012.
3. Burr DB, Gallant MA. Bone remodelling in osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2012;8(11):665-73.
4. Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of Osteoarthritis. *Clinics in geriatric medicine*. 2010;26(3):355-69.
5. Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, Jordan KP. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2010;18(1):24-33.
6. Bruckner P, Dreier R, Grässel S, Babarina AV. Common denominators of osteoarthritis and of endochondral bone formation: is osteoarthritis nothing but an inappropriate attempt at bone formation? *Z Rheumatol*. 2002;61(3):263-5.
7. Lane NE, Brandt K, Hawker G, Peeva E, Schreyer E, Tsuji W, et al. OARSI-FDA initiative: defining the disease state of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2011;19(5):478-82.
8. Martel-Pelletier J LD, Pelletier JP. Arthritis and allied conditions : a textbook of rheumatology. 15th ed. Koopman WJ, Moreland LW, editors. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. 2 v. (xxiv, 2699, 108 ) p.
9. Findlay DM, Atkins GJ. Osteoblast-chondrocyte interactions in osteoarthritis. *Curr Osteoporos Rep*. 2014;12(1):127-34.
10. Yuan XL, Meng HY, Wang YC, Peng J, Guo QY, Wang AY, et al. Bone-cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2014;22(8):1077-89.
11. Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, Wesolowski GA, Rodan GA, Duong le T. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone*. 2006;38(2):234-43.
12. Brandt KD, Myers SL, Burr D, Albrecht M. Osteoarthritic changes in canine articular cartilage, subchondral bone, and synovium fifty-four months after transection of the anterior cruciate ligament. *Arthritis and rheumatism*. 1991;34(12):1560-70.
13. Pelletier JP, Boileau C, Brunet J, Boily M, Lajeunesse D, Reboul P, et al. The inhibition of subchondral bone resorption in the early phase of experimental dog osteoarthritis by licofelone is associated with a reduction in the synthesis of MMP-13 and cathepsin K. *Bone*. 2004;34(3):527-38.
14. Hayashi D, Guermazi A, Kwok CK. Clinical and Translational Potential of MRI Evaluation in Knee Osteoarthritis. *Current rheumatology reports*. 2013;16(1):1-9.
15. Guermazi A, Roemer FW, Haugen IK, Crema MD, Hayashi D. MRI-based semiquantitative scoring of joint pathology in osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2013;9(4):236-51.
16. Raynauld JP, Martel-Pelletier J, Berthiaume MJ, Beaudoin G, Choquette D, Haraoui B, et al. Long term evaluation of disease progression through the quantitative magnetic resonance imaging of symptomatic knee osteoarthritis patients: correlation with clinical symptoms and radiographic changes. *Arthritis research & therapy*. 2006;8(1):R21.

17. Blumenkrantz G, Lindsey CT, Dunn TC, Jin H, Ries MD, Link TM, et al. A pilot, two-year longitudinal study of the interrelationship between trabecular bone and articular cartilage in the osteoarthritic knee. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society.* 2004;12(12):997-1005.
18. Raynauld JP, Martel-Pelletier J, Berthiaume MJ, Abram F, Choquette D, Haraoui B, et al. Correlation between bone lesion changes and cartilage volume loss in patients with osteoarthritis of the knee as assessed by quantitative magnetic resonance imaging over a 24-month period. *Annals of the rheumatic diseases.* 2008;67(5):683-8.
19. Canada. *Adlad. L'impact de l'arthrite au Canada : Aujourd'hui et au cours des 30 prochaines années.* 2011.
20. Malfait AM. Osteoarthritis year in review 2015: biology. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society.* 2016;24(1):21-6.
21. Johnson VL, Hunter DJ. The epidemiology of osteoarthritis. *Best practice & research Clinical rheumatology.* 2014;28(1):5-15.
22. Thijssen E, van Caam A, van der Kraan PM. Obesity and osteoarthritis, more than just wear and tear: pivotal roles for inflamed adipose tissue and dyslipidaemia in obesity-induced osteoarthritis. *Rheumatology.* 2015;54(4):588-600.
23. Vasheghani F, Zhang Y, Li YH, Blati M, Fahmi H, Lussier B, et al. PPARgamma deficiency results in severe, accelerated osteoarthritis associated with aberrant mTOR signalling in the articular cartilage. *Annals of the rheumatic diseases.* 2015;74(3):569-78.
24. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health.* 2009;1(6):461-8.
25. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect.* 1998;47:477-86.
26. Woo SL, Buckwalter JA. AAOS/NIH/ORS workshop. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. Savannah, Georgia, June 18-20, 1987. *J Orthop Res.* 1988;6(6):907-31.
27. Alford JW, Cole BJ. Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *Am J Sports Med.* 2005;33(2):295-306.
28. Castaneda S, Roman-Blas JA, Largo R, Herrero-Beaumont G. Subchondral bone as a key target for osteoarthritis treatment. *Biochem Pharmacol.* 2012;83(3):315-23.
29. Goldring MB. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2012;4(4):269-85.
30. Goldring MB, Goldring SR. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1192:230-7.
31. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 2008;40(1):46-62.
32. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy.* 2009;11(3):224.
33. Jiang Y, Tuan RS. Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology.* 2015;11(4):206-12.
34. Marks Jr SC, Odgren PR. Chapter 1 - Structure and Development of the Skeleton A2 - Rodan, John P. Bilezikian Lawrence G. Raisz Gideon A. *Principles of Bone Biology (Second Edition).* San Diego: Academic Press; 2002. p. 3-15.

35. Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell*. 1995;80(3):371-8.
36. Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*. 1995;17(2 Suppl):77S-83S.
37. Lee SC, Shea M, Battle MA, Kozitza K, Ron E, Turek T, et al. Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by RhBMP-2 in PLGA matrix. *Journal of biomedical materials research*. 1994;28(10):1149-56.
38. Knott L, Bailey AJ. Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone*. 1998;22(3):181-7.
39. Couchourel D, Aubry I, Delalandre A, Lavigne M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, et al. Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is attributable to abnormal type I collagen production. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(5):1438-50.
40. Aubin JE, Triffitt JT. Chapter 4 - Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation A2 - Rodan, John P. BilezikianLawrence G. RaiszGideon A. *Principles of Bone Biology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2002. p. 59-81.
41. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Developmental cell*. 2005;8(5):739-50.
42. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781-810.
43. Zamurovic N, Cappellen D, Rohner D, Susa M. Coordinated activation of notch, Wnt, and transforming growth factor-beta signaling pathways in bone morphogenetic protein 2-induced osteogenesis. Notch target gene *Hey1* inhibits mineralization and *Runx2* transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(36):37704-15.
44. Silverio KG, Davidson KC, James RG, Adams AM, Foster BL, Nociti FH, Jr., et al. Wnt/beta-catenin pathway regulates bone morphogenetic protein (BMP2)-mediated differentiation of dental follicle cells. *J Periodontal Res*. 2012;47(3):309-19.
45. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and *Cbfa1*. *Endocr Rev*. 2000;21(4):393-411.
46. Klein-Nulend J, Bonewald L. Chapter 8 - The Osteocyte A2 - Martin, John P. BilezikianLawrence G. RaiszT. John. *Principles of Bone Biology (Third Edition)*. San Diego: Academic Press; 2008. p. 153-74.
47. Nijweide PJ, Burger EH, Klein-Nulend J. Chapter 6 - The Osteocyte A2 - Rodan, John P. BilezikianLawrence G. RaiszGideon A. *Principles of Bone Biology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2002. p. 93-107.
48. Väänänen K, Zhao H. Chapter 8 - Osteoclast Function: Biology and Mechanisms A2 - Rodan, John P. BilezikianLawrence G. RaiszGideon A. *Principles of Bone Biology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2002. p. 127-VI.
49. Takahashi N, Udagawa N, Takami M, Suda T. Chapter 7 - Cells of Bone: Osteoclast Generation A2 - Rodan, John P. BilezikianLawrence G. RaiszGideon A. *Principles of Bone Biology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2002. p. 109-26.
50. Boyce BF, Xing L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Current Osteoporosis Reports*. 2009;5(3):98-104.
51. Marks SC, Jr., Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat*. 1988;183(1):1-44.

52. Bettica P, Cline G, Hart DJ, Meyer J, Spector TD. Evidence for increased bone resorption in patients with progressive knee osteoarthritis: longitudinal results from the Chingford study. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(12):3178-84.
53. Buckland-Wright JC, Lynch JA, Macfarlane DG. Fractal signature analysis measures cancellous bone organisation in macroradiographs of patients with knee osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1996;55(10):749-55.
54. Buckland-Wright JC, Macfarlane DG, Lynch JA, Clark B. Quantitative microfocal radiographic assessment of progression in osteoarthritis of the hand. *Arthritis and rheumatism*. 1990;33(1):57-65.
55. Dequeker J, Mohan S, Finkelman RD, Aerssens J, Baylink DJ. Generalized osteoarthritis associated with increased insulin-like growth factor types I and II and transforming growth factor beta in cortical bone from the iliac crest. Possible mechanism of increased bone density and protection against osteoporosis. *Arthritis and rheumatism*. 1993;36(12):1702-8.
56. Sanchez C, Deberg MA, Piccardi N, Msika P, Reginster JY, Henrotin YE. Subchondral bone osteoblasts induce phenotypic changes in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2005;13(11):988-97.
57. Grynblas MD, Alpert B, Katz I, Lieberman I, Pritzker KP. Subchondral bone in osteoarthritis. *Calcified tissue international*. 1991;49(1):20-6.
58. Li B, Aspden RM. Composition and mechanical properties of cancellous bone from the femoral head of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1997;12(4):641-51.
59. Bailey AJ, Sims TJ, Knott L. Phenotypic expression of osteoblast collagen in osteoarthritic bone: production of type I homotrimer. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2002;34(2):176-82.
60. Mansell JP, Bailey AJ. Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(8):1596-603.
61. Mansell JP, Tarlton JF, Bailey AJ. Biochemical evidence for altered subchondral bone collagen metabolism in osteoarthritis of the hip. *British journal of rheumatology*. 1997;36(1):16-9.
62. Couchourel D, Bariteau G, Delalandre A, Lajeunesse D. Abnormal collagen type 1 production in subchondral osteoarthritic osteoblasts is responsible in part for altered mineralization in these cells. *Arthritis research & therapy*. 2007;9(Suppl 3):P35.
63. Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, 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 and rheumatism*. 1998;41(5):891-9.
64. Massicotte F, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Lajeunesse D. Modulation of insulin-like growth factor 1 levels in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Bone*. 2006;38(3):333-41.
65. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*. 2000;100(2):197-207.
66. Dumond H, Presle N, Terlain B, Mainard D, Loeuille D, Netter P, et al. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48(11):3118-29.
67. Massicotte F, Lajeunesse D, Bendoric M, Pelletier JP, Hilal G, Duval N, et al. 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 and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society.* 2002;10(6):491-500.

68. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S. New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *International review of cell and molecular biology.* 2011;291:21-71.

69. Hartmann C. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends in cell biology.* 2006;16(3):151-8.

70. Brunner E, Peter O, Schweizer L, Basler K. pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in *Drosophila*. *Nature.* 1997;385(6619):829-33.

71. Li X, Liu P, Liu W, Maye P, Zhang J, Zhang Y, et al. Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. *Nature genetics.* 2005;37(9):945-52.

72. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nature medicine.* 2007;13(2):156-63.

73. Chan TF, Couchourel D, Abed E, Delalandre A, Duval N, Lajeunesse D. Elevated Dickkopf-2 levels contribute to the abnormal phenotype of human osteoarthritic osteoblasts. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2011;26(7):1399-410.

74. Ohkawara B, Glinka A, Niehrs C. Rspo3 binds syndecan 4 and induces Wnt/PCP signaling via clathrin-mediated endocytosis to promote morphogenesis. *Developmental cell.* 2011;20(3):303-14.

75. Carmon KS, Gong X, Lin Q, Thomas A, Liu Q. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011;108(28):11452-7.

76. de Lau W, Barker N, Low TY, Koo BK, Li VS, Teunissen H, et al. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature.* 2011;476(7360):293-7.

77. Glinka A, Dolde C, Kirsch N, Huang YL, Kazanskaya O, Ingelfinger D, et al. LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/beta-catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep.* 2011;12(10):1055-61.

78. Aoki M, Kiyonari H, Nakamura H, Okamoto H. R-spondin2 expression in the apical ectodermal ridge is essential for outgrowth and patterning in mouse limb development. *Development, growth & differentiation.* 2008;50(2):85-95.

79. Abed E, Chan TF, Delalandre A, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Lajeunesse D. R-spondins are newly recognized players in osteoarthritis that regulate Wnt signaling in osteoblasts. *Arthritis and rheumatism.* 2011;63(12):3865-75.

80. Kim KA, Wagle M, Tran K, Zhan X, Dixon MA, Liu S, et al. R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. *Molecular biology of the cell.* 2008;19(6):2588-96.

81. Winkler DG, Sutherland MS, Ojala E, Turcott E, Geoghegan JC, Shpektor D, et al. Sclerostin inhibition of Wnt-3a-induced C3H10T1/2 cell differentiation is indirect and mediated by bone morphogenetic proteins. *The Journal of biological chemistry.* 2005;280(4):2498-502.

82. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2012;13(12):767-79.

83. Sugimura R, Li L. Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews*. 2010;90(4):243-56.
84. Simons M, Mlodzik M. Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annual review of genetics*. 2008;42:517-40.
85. Sato A, Yamamoto H, Sakane H, Koyama H, Kikuchi A. Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *The EMBO journal*. 2010;29(1):41-54.
86. De A. Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway: a brief overview. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2011;43(10):745-56.
87. Rao TP, Kuhl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circulation research*. 2010;106(12):1798-806.
88. (AAC) AdlaaC. L'impact de l'arthrite au Canada : Aujourd'hui et au cours des 30 prochaines années. 2011.
89. Lajeunesse D, Hilal G, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Subchondral bone morphological and biochemical alterations in osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 1999;7(3):321-2.
90. Lajeunesse D. The role of bone in the treatment of osteoarthritis<sup>1</sup>. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2003;12:34-8.
91. Henrotin Y, Pesesse L, Sanchez C. Subchondral bone in osteoarthritis physiopathology: state-of-the art and perspectives. *Biomed Mater Eng*. 2009;19(4-5):311-6.
92. Henrotin Y, Pesesse L, Sanchez C. Subchondral bone and osteoarthritis: biological and cellular aspects. *Osteoporos Int*. 2012;23 Suppl 8:S847-51.
93. Anderson-MacKenzie JM, Quasnicka HL, Starr RL, Lewis EJ, Billingham ME, Bailey AJ. Fundamental subchondral bone changes in spontaneous knee osteoarthritis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005;37(1):224-36.
94. Abed E, Couchourel D, Delalandre A, Duval N, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, et al. Low sirtuin 1 levels in human osteoarthritis subchondral osteoblasts lead to abnormal sclerostin expression which decreases Wnt/beta-catenin activity. *Bone*. 2014;59:28-36.
95. Kobayashi Y, Uehara S, Udagawa N, Takahashi N. Regulation of bone metabolism by Wnt signals. *J Biochem*. 2016;159(4):387-92.
96. Corr M. Wnt-beta-catenin signaling in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008;4(10):550-6.
97. Saito S, Tampe B, Müller GA, Zeisberg M. Primary cilia modulate balance of canonical and non-canonical Wnt signaling responses in the injured kidney. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 2015;8:6.
98. Murdoch B, Chadwick K, Martin M, Shojaei F, Shah KV, Gallacher L, et al. Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(6):3422-7.
99. Kumawat K, Menzen MH, Bos IS, Baarsma HA, Borger P, Roth M, et al. Noncanonical WNT-5A signaling regulates TGF-beta-induced extracellular matrix production by airway smooth muscle cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2013;27(4):1631-43.
100. Ge X-P, Gan Y-H, Zhang C-G, Zhou C-Y, Ma K-T, Meng J-H, et al. Requirement of the NF-kB pathway for induction of Wnt-5A by interleukin-1 Beta in condylar chondrocytes of the temporomandibular joint: functional crosstalk between the Wnt-5A and NF-kB signaling pathways. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2011;19(1):111-7.

101. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005;434(7035):843-50.
102. Wray J, Hartmann C. WNTing embryonic stem cells. *Trends in cell biology*. 2012;22(3):159-68.
103. Ren D, Wei F, Hu L, Yang S, Wang C, Yuan X. Phosphorylation of Runx2, induced by cyclic mechanical tension via ERK1/2 pathway, contributes to osteodifferentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *Journal of cellular physiology*. 2015;230(10):2426-36.
104. Peng Y, Shi K, Wang L, Lu J, Li H, Pan S, et al. Characterization of Osterix protein stability and physiological role in osteoblast differentiation. *PloS one*. 2013;8(2):e56451.

