

Université de Montréal

**Rôle de la Prohibitine et de la sumoylation dans la
pathogenèse de l'ostéoarthrose**

Par

Roxanne Doucet

Programme de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de M. Sc.

en Biologie Moléculaire

Septembre 2010

© Roxanne Doucet, 2010

Université de Montréal
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

Rôle de la Prohibitine et de la sumoylation dans la pathogenèse de l'ostéoarthrose

présenté par :
Roxanne Doucet

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Muriel Aubry, président rapporteur
Alain Moreau, directeur de recherche
René St-Arnaud, membre du jury

Résumé

L'ostéoarthrose (OA) est la forme la plus commune d'arthrite et son étiologie demeure encore méconnue. Les travaux du Dr Moreau et son équipe ont permis de mettre en évidence une quasi perte d'expression du facteur de transcription Pitx1 dans les chondrocytes OA et la protéine PHB-1 a été identifiée comme étant membre d'un complexe répresseur pouvant lier le promoteur de Pitx1. Le but de la présente étude était de confirmer l'accumulation anormale de PHB-1 dans le noyau des chondrocytes OA, tel que suggéré par des données préliminaires, et d'identifier les mécanismes impliqués dans son import ou rétention au noyau. Pour ce faire, un volet mécanistique utilisant les lignées C28/I2 et U2OS fut combiné à l'étude clinique des chondrocytes articulaires de patients OA et de sujets sains. Les résultats de cette étude démontrent que chez 55 pourcent des patients OA, la Prohibitine s'accumule dans le noyau des chondrocytes articulaires et que cette accumulation corrèle avec une augmentation de la sumoylation totale dans le noyau des cellules OA. Le présent projet de recherche propose pour la première fois qu'une sumoylation accrue au sein des cellules OA pourrait être responsable de l'accumulation nucléaire de PHB-1, médiée par sa liaison aux protéines SUMO-1 via un domaine de liaison aux SUMOs (SBM) localisé aux résidus 76 à 79 de PHB-1. Les résultats de cette étude ont aussi permis de mettre en évidence que dans les chondrocytes OA, les protéines SUMO-1 et SUMO-2/3 s'accumulent dans des corps nucléaires de type PML, suggérant un recrutement de protéines interagissant avec les SUMOs au sein de ces structures dans les cellules OA. Nous sommes persuadés que cette étude générera des retombées importantes non seulement au niveau fondamental pour la compréhension des mécanismes moléculaires liés à la biologie des chondrocytes articulaires, mais aussi au niveau du développement d'outils génétiques permettant le dépistage de l'arthrose à un stade précoce.

Mots clés : Ostéoarthrose, Chondrocytes, PHB-1, Sumoylation, Import nucléaire

Abstract

Despite intensive efforts, the aetiology of Osteoarthritis (OA) remains elusive, however, genetic factors have been found to be strong determinants of the disease. Recent studies in Dr. Moreau's lab have demonstrated an aberrant nuclear accumulation of PHB-1, a ubiquitous protein implicated in multiple cellular processes, in human OA articular chondrocytes. Moreover, we have shown that PHB-1 is part of a repressor complex that binds to the promoter of Pitx1 transcription factor, through the recognition of an E2F-like binding site which could contribute to OA onset. The role of Pitx1 and PHB-1 in OA pathogenesis is not clear, the goal of this study was to characterize PHB-1 nuclear accumulation in OA chondrocytes and to determine the molecular mechanisms by which PHB-1 accumulates in the nucleus of OA chondrocytes. In our studies we used U2Os and C28/I2 as well as human chondrocytes obtained from OA and control patients. Our data confirmed that PHB-1 accumulates in the nucleus of about 55 percent of OA patients and that this accumulation correlates with an increased in sumoylation of the proteins in the nuclear fraction of OA chondrocytes. Present findings suggest that increased sumoylation could trigger PHB-1 nuclear accumulation through binding of PHB-1 to a sumoylated protein via a SUMO interacting motif (SBM) mapped to residus 76 to 79 of PHB-1. Moreover, these results demonstrate that sumoylated proteins accumulate in PML nuclear bodies in the nucleus of OA chondrocytes, suggesting the recruitment of SUMO-interacting proteins in PML bodies of arthritic chondrocytes. Further studies are needed to identify the potential sumoylated proteins which are interacting with PHB1.

Keywords: Osteoarthritis, Chondrocytes, PHB-1, Sumoylation, Nuclear import

Table des matières

Page titre	i
Identification du jury	ii
Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Liste des sigles et abréviations	xiv
Remerciements	xvi
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
CHAPITRE 2 : REVUE DE LA LITTÉRATURE	6
2.1. L’OSTÉOARTHROSE	7
2.1.1. Généralités.....	7
2.1.2. Étiologie	8
2.1.3. Cartilage articulaire	9
2.1.3.1. Structure.....	9
2.1.3.2. Homéostasie	10
2.1.4. Développement de l’OA	11
2.1.4.1. Facteurs de risque.....	11
2.1.4.1.1. L’âge	11

2.1.4.1.2.	Le sexe	12
2.1.4.1.3.	Facteurs biomécaniques: Obésité	12
2.1.4.1.4.	Utilisation excessive et traumatismes	13
2.1.4.1.5.	L'hérédité	13
2.1.4.2.	Cartilage arthrosique	14
2.1.4.3.	Rôles des chondrocytes arthrosiques.....	15
2.1.4.3.1.	Mitochondries: ATP et stress oxydatif	15
2.1.4.3.2.	Sénescence cellulaire	16
2.1.4.4.	Rôle de l'inflammation.....	18
2.1.5.	Étude de l'OA.....	19
2.1.6.	Traitements et perspectives	20
2.2.	LA PROHIBITINE	21
2.2.1.	Superfamille de protéines SPFH et domaine PHB	21
2.2.2.	Structure protéique.....	22
2.2.3.	Conservation évolutive	23
2.2.4.	Localisations cellulaires.....	23
2.2.5.	Fonctions	24
2.2.5.1.	Généralités	24
2.2.5.2.	Régulation du cycle cellulaire.....	24
2.2.5.3.	Fonctions mitochondriales.....	25
2.2.5.3.1.	Protéine Chaperone	25
2.2.5.3.2.	Maintien de l'intégrité de l'ADNmt	26

2.2.5.3.3.	Régulation des processus de fission/fusion.....	27
2.2.5.4.	Régulation de l'expression génique	28
2.2.5.4.1.	Mécanismes d'import/export nucléaire	28
2.2.5.4.2.	Régulation des gènes de réponse aux E2Fs	29
2.2.5.4.3.	Régulation des gènes de réponse à ER α	30
2.2.6.	Organismes modèles	31
2.2.7.	Modifications post-traductionnelles de PHB-1	31
2.2.7.1.	Phosphorylation	32
2.2.7.2.	Ubiquitination	33
2.2.7.3.	Sumoylation.....	33
2.2.8.	Pathologies	34
2.2.9.	Potentiel thérapeutique.....	34
2.3.	LA SUMOYLATION	35
2.3.1.	Une modification post-traductionnelle émergente et vitale ...	35
2.3.2.	Les protéines SUMOs	36
2.3.3.	La voie de sumoylation.....	37
2.3.4.	Sites de sumoylation et de liaison aux SUMOs	38
2.3.5.	Régulation de la sumoylation.....	39
2.3.6.	Les cibles de la sumoylation	40
2.3.7.	Effets généraux sur les protéines cibles	40
2.3.8.	Sumoylation et transport au noyau	41
2.3.9.	Sumoylation et répression génique.....	42

2.3.9.1. Régulation des facteurs de transcription.....	43
2.3.10. Sumoylation et corps PML.....	44
2.3.11. Sumoylation et mitochondries.....	46
2.3.12. Sumoylation et pathologies.....	47
2.3.12.1. Cancer.....	47
2.3.12.2. Arthrite rhumatoïde.....	48
2.3.12.3. Maladies neurodégénératives.....	48
2.3.13. Potentiel thérapeutique.....	49
2.4. HYPOTHÈSE.....	50
2.5. OBJECTIFS.....	50
CHAPITRE 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	51
3.1. Tissus humains.....	52
3.2. Dérivation des chondrocytes articulaires humains.....	53
3.3. Lignées cellulaires.....	54
3.4. Plasmides et constructions.....	54
3.5. Immunohistochimie.....	56
3.6. Extraction des protéines totales.....	57
3.7. Séparation des protéines nucléaires et cytoplasmiques.....	57
3.8. Essais d'Immuno/Co-immunoprécipitations.....	58
3.9. GST pull-down.....	59
3.10. Essais de sumoylation.....	60
3.11. Immunobuvardage de type Western.....	61

3.12.	Immunofluorescence	62
3.13.	Microscopie confocale	63
CHAPITRE 4 : RÉSULTATS		64
4.1.	La Prohibitine s'accumule dans le noyau des chondrocytes articulaires d'un sous-groupe de patients OA.....	65
4.2.	Les chondrocytes articulaires présentant une accumulation de PHB-1 au noyau, présentent aussi une accumulation nucléaire des protéines SUMOs	67
4.3.	Dans les chondrocytes OA, les protéines SUMOs s'accumulent dans des corps nucléaires de type PML.....	73
4.4.	PHB-1 n'est pas directement sumoylée par SUMO-1 <i>in vitro</i> , mais peut lier les protéines SUMO-1 via un motif SBM	75
4.5.	La sumoylation stabilise PHB-1 et semble être impliquée dans sa translocation/rétention au noyau	80
CHAPITRE 5 : DISCUSSION.....		83
5.1.	Profil d'expression de PHB-1 dans les chondrocytes articulaires arthrosiques.....	84
5.2.	L'accumulation nucléaire de PHB-1 corrèle avec une présence accrue de protéines sumoylées dans le noyau des chondrocytes OA	86
5.3.	La sumoylation favorise l'accumulation nucléaire de PHB-1 dans la lignée cellulaire U2OS	87
5.4.	Prohibitine et pathogenèse de l'OA	89

5.5. Sumoylation et pathogénèse de l'OA.....	90
CHAPITRE 6 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	94
RÉFÉRENCES	98

Liste des tableaux

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
Tableau I : Différentes cibles et effets de la modification par les protéines SUMOs.....	41
CHAPITRE 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	51
Tableau II : Caractéristiques des patients utilisés pour l'étude clinique des chondrocytes articulaires humains.....	52
Tableau III : Séquence nucléotidiques des amorces utilisées pour la construction des différentes protéines fusions nécessaires aux essais de sumoylation <i>in vitro</i> ainsi que pour la surexpression de protéines..	55
Tableau IV : Anticorps utilisés pour les immunobuvardages de type Western....	62
Tableau V : Anticorps primaires utilisés pour les essais d'immunofluorescence.	63

Liste des figures

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
Figure 1 : Représentation schématique des composante d'une articulation saine et d'une articulation arthrosique.....	8
Figure 2 : Coupes histologiques de cartilage articulaire de genoux humains colorées à la safranine-O.....	15
Figure 3 : Facteurs moléculaires et événements impliqués dans la pathogenèse et la progression de l'OA.....	19
CHAPITRE 4 : RÉSULTATS	64
Figure 4 : La Prohibitine (PHB-1) s'accumule dans le noyau des chondrocytes articulaires de genoux OA par rapport aux sujets sains.....	66
Figure 5 : Les protéines SUMOs s'accumulent aussi dans le noyau des chondrocytes articulaires des patients OA par rapport aux sujets sains.....	69
Figure 6 : La protéine SUMO-1 s'accumule fortement dans le noyau des chondrocytes articulaires des patients OA par rapport aux sujets sains.	70
Figure 7 : Chez les patients OA, on observe une accumulation nucléaire de PHB-1 ainsi qu'une accumulation des protéines SUMOs dans des structures nucléaires définies.	71
Figure 8 : PHB-1 co-localise aussi avec les protéines SUMOs dans la lignée MCF-7.....	72

Figure 9 :	Chez les cellules OA, les protéines SUMOs s'accumulent dans des corps nucléaires de type PML.	74
Figure 10 :	Analyse <i>in silico</i> de la séquence protéique de PHB-1.....	76
Figure 11 :	PHB-1 n'est pas sumoylable par SUMO-1.....	77
Figure 12 :	PHB-1 peut lier les protéines SUMO-1 via un SBM situé dans le domaine PHB.	79
Figure 13 :	La stimulation de la voie de sumoylation entraîne une stabilisation de la Prohibitine et promouvoit son accumulation au noyau dans la lignée cellulaire U2OS.....	81
Figure 14 :	La surexpression d'Ubc9 entraîne une diminution de la forme cytoplasmique endogène de PHB-1.....	82

Liste des sigles et abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique
ARN: Acide ribonucléique
BAP-32: B-cell receptor associated protein-32
BAP-37: B-cell receptor associated protein-37
BMP: Bone morphogenic protein
CBP: CREB-binding protein
CREB: Cyclic AMP response element binding
CHU: Centre hospitalier universitaire
CTÉ: Chaîne de transport des électrons
ER α : Estrogen receptor alpha
FBS: Sérum fœtal de veau
GAG: Glycosaminoglycan
HDAC: Histone désacétylase
Il: Interleukine
IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LAC: Ligament antérieur croisé
MEC: Matrice extra-cellulaire
MEF: Mouse embryonic fibroblast
MMPs: Métalloprotéinases
NES: Nuclear export signal
NLS: Nuclear localisation signal
NEM: N-Ethylmaleimide
NO: Monoxyde d'azote
OA: Ostéoarthrose
p53 : Protéine 53
PBS : Phosphate buffer saline
PCR: Polymerase chain reaction

PHB-1: Prohibitine

PHB-2: Prohibitone

PML: Promyelocytic Leukemia protein

PVDF: Polyvinylidene fluoride

RA: Arthrite rhumatoïde

Rb: Retinoblastoma tumor suppressor protein

REA: Repressor of estrogen receptor action

SAE: Sumo activating enzyme

SBM: Sumo binding motif

SDS-PAGE: Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SENP: Sentrin protease

SUMO: Small ubiquitin-like modifier

TGF- β : Transforming growth factor beta

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, Alain Moreau, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour ses conseils précieux, mais surtout pour sa grande humanité, qui fut grandement appréciée durant certaines périodes plus difficiles.

Je voudrais aussi remercier tous les membres du laboratoire et tous ceux qui ont de près ou de loin contribué à la réalisation de mon projet de maîtrise avec une attention particulière à Martin Pellicelli et Cynthia Picard. Je voudrais aussi remercier mesdames Charlotte Zaouter, Michelle Dion et Dominika Kozubska pour leur amitié, leur écoute attentive et tant de bons souvenirs.

Je tiens à remercier la fondation de la recherche sur les maladies infantiles (FRMI), la fondation de l'hôpital Sainte-Justine (FHSJ) ainsi que le FRSQ pour m'avoir attribué des bourses d'études m'ayant fournis le soutien financier nécessaire.

Finalement, un merci spécial à mes parents, Patrice et Sylvie, qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de mon parcours académique.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

L'ostéoarthrose (OA), est la plus commune des maladies articulaires et se caractérise principalement par une dégradation lente et progressive du cartilage articulaire, accompagné de modifications au niveau de l'os sous-chondral et d'une inflammation locale (Sharma et Berenbaum, 2007). Cette maladie, fortement associée au vieillissement (Felson *et al.*, 1995), mène à une perte progressive de la mobilité et des fonctions articulaires et s'accompagne souvent de douleurs chroniques (Altman *et al.*, 2006). Les genoux font partie des articulations les plus susceptibles à développer l'OA (Felson *et al.*, 1987; Oliveria *et al.*, 1995) et à long terme, l'arthrose est associée à de nombreuses limitations fonctionnelles et locomotrices pouvant entraîner une perte d'indépendance et une diminution considérable de la qualité de vie (Ettinger *et al.*, 1994).

À ce jour, les connaissances sur la biologie de l'OA demeurent largement incomplètes et il n'existe encore aucun traitement permettant de prévenir ou de stopper la progression de cette maladie. Ultimement, le remplacement total de l'articulation par chirurgie orthopédique s'avère être la seule intervention efficace, mais les coûts annuels reliés à de telles interventions s'élèvent à plus de 5 milliards de dollar par années au Canada (Dubuc, 1997) et à plus de 15 milliards aux États-Unis (Murray et Lopez, 1997). Avec le vieillissement actuel de la population mondiale, l'OA risque de devenir un lourd fardeau pour les systèmes de santé ainsi que pour un nombre grandissant de personnes vieillissantes (Murray et Lopez, 1997). Devant de tels faits, l'importance de développer de meilleurs outils diagnostiques et des traitements moins invasifs s'impose, mais requière d'abord une meilleure compréhension des patho-mécanismes moléculaires et cellulaires associés à l'OA.

Bien que les causes de l'arthrose primaire demeurent largement méconnues, la nature multifactorielle de cette maladie est bien établie et la forte contribution des facteurs génétiques au développement de l'OA est maintenant reconnue (Specter et

al, 1996; Felson et al, 1998; Spector et MacGregor, 2004). Dans cette optique, plusieurs études ont permis d'identifier un nombre constamment en évolution de loci de susceptibilité à l'OA (Loughlin, 2001), reflétant une grande hétérogénéité dans la nature des gènes associés à cette maladie. Toutefois, l'importance fonctionnelle de tels loci de susceptibilité demeurent à être établie et, étant donné le manque de concordance entre les différentes études (Loughlin, 2001), d'autres approches doivent être considérées afin de mieux comprendre toute la complexité de la biologie de l'OA.

Dans notre laboratoire, une approche par gène-candidat a plutôt été utilisée, basée sur l'observation que les gènes ayant un rôle fondamental dans le développement des os et des articulations s'imposent comme de bons candidats à l'étude de maladies apparaissant tardivement comme l'OA. À cet effet, les travaux du Dr Moreau et de son équipe ont permis de démontrer le rôle joué par le facteur de transcription à homéodomaine Pitx1, dans l'arthrose (Moreau *et al*, 2004; Picard *et al.*, 2007). Pitx1 est un facteur de transcription hautement exprimé dans les articulations et le périoste des os longs durant le développement (Lanctôt *et al.*, 1997; Shang *et al.*, 1997) et il a été observé que les souris hétérozygotes Pitx1^{+/-} développent progressivement plusieurs des caractéristiques cliniques normalement observées chez les humains atteints d'arthrose (Moreau *et al*, 2004). Plus récemment, une quasi-extinction de l'expression du gène *pitx1* au niveau des chondrocytes articulaires isolés de patients humains atteints d'arthrose a été démontrée (Picard *et al.*, 2007) et l'étude plus approfondie des mécanismes menant à la répression de *pitx1* et des cibles transcriptionnelles de ce dernier fait actuellement l'objet d'un projet de doctorat réalisé par Cynthia Picard (Picard *et al.*, article en préparation). Cette dernière a permis d'identifier la Prohibitine (PHB-1) comme étant membre d'un nouveau complexe répresseur pouvant lier le promoteur de *pitx1* dans les cellules OA. De plus, il a été observé que cette protéine

s'accumule anormalement dans le noyau des chondrocytes articulaires des tissus arthrosiques.

PHB-1 est une protéine mitochondriale dans la plupart des types cellulaires (Nijtmans et al., 2000; Merkwirth et Langer, 2008), mais plusieurs groupes ont démontrés que cette protéine essentielle se retrouve aussi dans le noyau où elle agit principalement à titre de co-répresseur dans l'inhibition de gènes pro-prolifératifs régulés par les facteurs E2Fs (Choi *et al.*, 2008), associés à la sénescence cellulaire. À cet effet, *pitx1* possède plusieurs sites de liaisons aux E2Fs et les résultats d'un deuxième projet de doctorat réalisé au laboratoire par Martin Pellicelli sur la régulation transcriptionnelle de *pitx1*, suggèrent que l'accumulation nucléaire accrue de PHB-1 dans les cellules OA puisse être responsable de la perte d'expression de *pitx1* (Pellicelli *et al.*, article en préparation).

Le présent projet de recherche vient donc compléter les deux projets précédemment mentionnés sur l'étude de la répression de *Pitx1* par PHB-1 dans l'arthrose et vise à déterminer par quels mécanismes moléculaires ou cellulaires cette protéine s'accumule au noyau des cellules OA. Étant donné, l'absence complète de littérature sur les mécanismes régulant l'import ou la rétention nucléaire de cette protéine, plusieurs mécanismes peuvent être envisagés. D'abord, la présence d'une mutation affectant le signal d'export nucléaire de PHB-1 (Mishra *et al.*, 2006) pourrait causer une rétention de la protéine au noyau. Ensuite, il a été rapporté que PHB-1 interagit avec les protéines SUMOs dans le noyau de cellules soumises à divers stress cellulaires (Manza *et al.*, 2004). Or, la modification post-traductionnelle par les protéines SUMOs (sumoylation) a été vastement associée à l'import nucléaire de divers facteurs de transcription et co-répresseurs (Pichler et Melchior, 2002; Gill, 2007) ainsi qu'à la répression de la transcription génique (Gill, 2005). L'interaction de la Prohibitine avec les protéines SUMOs s'est imposée comme l'hypothèse principale de cette étude.

L'étude de PHB-1 dans la pathogenèse de l'OA est particulièrement d'intérêt, puisque bien que cette protéine n'ait jamais été liée directement à l'arthrose, celle-ci est largement associée à plusieurs processus biologiques et cellulaires hautement pertinents dans l'étude de l'OA comme le vieillissement, le maintien de l'homéostasie mitochondriale (Nijtmans *et al.*, 2000; Maneiro *et al.*, 2003), la sénescence cellulaire (Schleicher *et al.*, 2008) et l'inflammation (Theiss *et al.*, 2009). Dans ce contexte, la présente étude pourrait non seulement contribuer à l'identification d'un premier mécanisme impliqué dans le transport au noyau de PHB-1, et par le fait même contribuer à élargir les connaissances fondamentales sur cette protéine multifonctionnelle, mais pourrait aussi générer des retombées importantes au niveau du développement d'outils génétiques permettant le dépistage et le traitement de l'arthrose à un stade précoce.

CHAPITRE 2 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1. L'OSTÉOARTHROSE

2.1.1. Généralités

L'arthrose, ou ostéoarthrose (OA), est la forme d'arthrite la plus commune parmi les maladies articulaires et affecte principalement les articulations dites synoviales. Brièvement, ce type d'articulation, qui inclus entre autre les genoux et les hanches, comprend une couche de cartilage articulaire (hyalin) recouvrant l'extrémité des os longs s'articulant, une cavité articulaire remplie de liquide synovial et entourée d'une capsule articulaire, le tout renforcé par des ligaments. La surface interne de la capsule fibreuse est recouverte de tissu conjonctif lâche appelé membrane synoviale composée principalement de fibroblastes et de synoviocytes (fig.1).

Le cartilage articulaire est nécessaire afin de permettre une mobilité fluide et indolore au squelette osseux et rigide. L'OA se caractérise principalement par une dégradation progressive du cartilage articulaire, qui débute habituellement par une érosion de la surface. Cependant, avec le temps, les dommages s'étendent aux zones plus profondes et on observe la présence d'importantes fissures verticales dans le tissu appelées fibrillations. Éventuellement tout le cartilage sera complètement dégradé, créant ainsi par endroit un contact entre les deux surfaces osseuses, qui entraîne de la douleur et une perte de mobilité. L'OA est aussi associée à une calcification de la matrice, accompagnée d'une croissance anormale de l'os sous-chondral adjacent, se traduisant souvent par la formation d'ostéophytes, ainsi que d'une inflammation locale associée à la membrane synoviale (fig.1) (Sharma et Berenbaum, 2007).

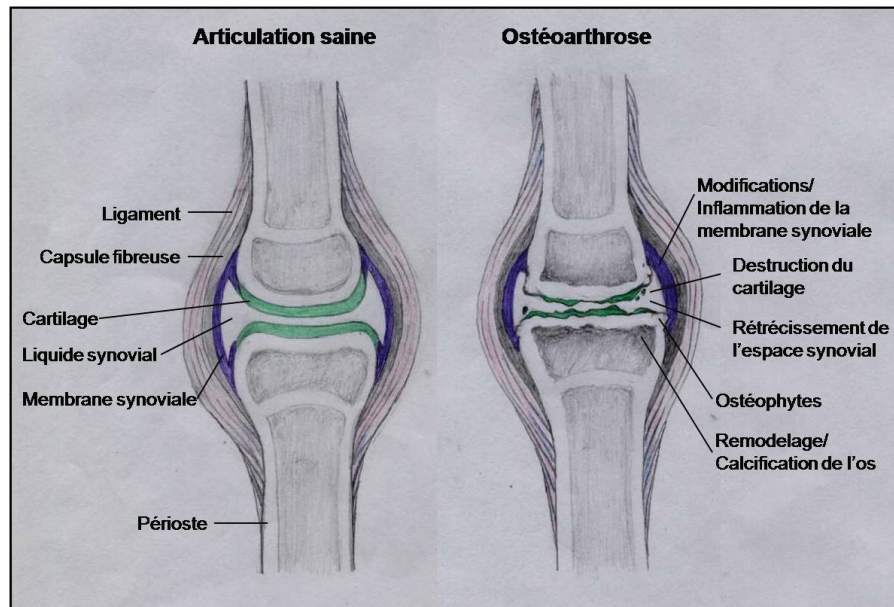


Figure 1 : Représentation schématique des composante d'une articulation saine et d'une articulation arthrosique (Doucet, 2010).

2.1.2. Étiologie

On peut diviser l'OA en deux catégories, soit l'arthrose primaire et secondaire. L'arthrose secondaire se développe suite à une autre condition, comme une déformation congénitale, une maladie rhumatismale ou osseuse, un mauvais alignement de l'articulation ou encore suite à un traumatisme, alors que l'arthrose primaire est idiopathique. Actuellement, l'étiologie de l'ostéarthrose primaire demeure largement inconnue et cette pathologie est définie comme une maladie multifactorielle et hétérogène soumise à l'influence de nombreux facteurs biomécaniques, génétiques et métaboliques. Il n'existe donc probablement pas de cause unique pouvant expliquer l'apparition de la maladie chez la totalité des

patients atteints, mais bien plusieurs événements distincts pouvant tous mener à un phénotype arthrosique.

L'ostéoarthrose affecte plusieurs tissus au sein d'une articulation. Conséquemment, il a été proposé que l'OA puisse être une maladie musculo-squelettique systémique ayant une composante métabolique (Aspden, 2008). Toutefois, comme les stades précoces de l'OA incluent majoritairement des changements au niveau des tissus cartilagineux, on attribue généralement au cartilage articulaire un rôle initiateur dans la pathogenèse de l'OA. Par contre, d'autres chercheurs ont mis en évidence que des changements au niveau de l'os sous-chondral adjacent précèdent la fibrillation et l'érosion du cartilage et contribuent à sa destruction (Radin *et al.*, 1978). Finalement, l'inflammation de la membrane synoviale est plutôt considérée comme un événement secondaire. En ce sens, une vaste majorité des études sur l'arthrose se concentrent sur la biologie du cartilage articulaire et l'étude des mécanismes impliqués dans le maintien de l'homéostasie de ce tissu.

2.1.3. Cartilage articulaire

2.1.3.1. Structure

Le cartilage articulaire est un type de tissu conjonctif composé d'un seul type de cellules, les chondrocytes, entourés d'une matrice extracellulaire (MEC) composée principalement de collagène, de protéoglycans et d'eau. La MEC du cartilage, synthétisée par les chondrocytes eux-mêmes, est composée principalement d'un réseau de fibres de collagène de type II, mais contient aussi les types VI, IX et XI. Les agrécans, les protéoglycans les plus abondants, sont d'immenses molécules composées d'une protéine centrale à laquelle sont rattachées des chaînes de glycosaminoglycans (GAGs) et contribuent largement à l'hydratation et à la

souplesse du tissu (Sharma et Berenbaum, 2007). Le cartilage articulaire ne comprend aucun vaisseau sanguin et aucun nerf. Les chondrocytes sont des cellules isolées les unes des autres dans la MEC et résidant chacune dans une lacune.

2.1.3.2. Homéostasie

L'intégrité du cartilage articulaire est maintenue grâce au remodelage constant des différents constituants de la MEC. Pour ce faire, un équilibre doit être maintenu entre les mécanismes d'anabolisme, menant à la synthèse du cartilage, et de catabolisme, favorisant sa dégradation. Ce sont les chondrocytes, des cellules post-mitotiques métaboliquement actives, qui sont en grande partie responsables de ce processus. En effet, les chondrocytes peuvent sécréter une gamme de facteurs anaboliques, comme les BMPs (bone morphogenic proteins), des prostaglandines et certains membres de la superfamille des TGF- β (Transforming growth factor- β), et cataboliques comme les métalloprotéinases (MMPs), les aggrecanases et une gamme de cytokines et chemokines (Krasnokutsky *et al.*, 2008.).

Toutefois, le taux de remodelage du cartilage est très lent et diminue davantage avec l'âge. Il est estimé que le collagène de type II ainsi que certains fragments de GAGs ont une demi-vie d'environ 100 ans (Verzijl *et al.*, 2000) et 25 ans (Maroudas *et al.*, 1998) respectivement. De plus, les chondrocytes, qui sont au centre de ce processus, cessent de se diviser avec l'âge, pour devenir des cellules post-mitotiques quiescentes ayant elles aussi une durée de vie très longue. En conséquence, les chondrocytes articulaires sont susceptibles d'accumuler avec le temps de nombreux défauts et mutations pouvant grandement influencer leurs fonctions et leur survie. Comme la présence d'un réservoir de cellules chondro-progénitrices résidant dans le cartilage demeure controversée, les cellules mortes

sont difficilement remplaçables et une mort cellulaire accrue peut avoir des effets irréversibles. Il a toutefois été récemment rapporté que dans les stades avancés d'arthrose, il y semble y avoir une invasion de cellules chondroprogénitrices dans le cartilage (Koelling *et al.*, 2009) provenant de la néovascularisation associée à l'OA (Khan *et al.*, 2009).

2.1.4. Développement de l'OA

2.1.4.1. Facteurs de risque

2.1.4.1.1. L'âge

L'âge est considéré comme le principal facteur de risque au développement de l'OA. Au cours du vieillissement, le cartilage articulaire subit des modifications au niveau de sa structure et de sa composition, qui ont pour effet de modifier les propriétés biomécaniques de la MEC (Aigner *et al.*, 2007). Par exemple, le contenu en protéoglycans du cartilage diminue et on observe une accumulation de produits de glycation avancés (AGEs : advanced glycation end products) (Verzijl *et al.*, 2000), qui ont pour effet de diminuer la souplesse et la résistance du tissu avec le temps. De plus, avec l'âge, les chondrocytes perdent progressivement leur potentiel de prolifération ainsi que leur capacité de maintenir et réparer efficacement la matrice extracellulaire (MEC) du cartilage. Donc, plus on avance en âge, et de manière plus marquée à partir de 50 ans, la perte des propriétés biomécaniques et régénératrices du cartilage articulaire rend ce tissu plus vulnérable au développement de l'OA. Il est toutefois important de noter que bien que les changements dans les propriétés du cartilage articulaire associés au vieillissement soient inévitables, le développement de l'OA ne l'est pas (Goldring et Goldring, 2007).

2.1.4.1.2. Le sexe

Plusieurs études ont démontrées que, toutes articulations confondues, l'arthrose affecte en moyenne deux fois plus de femmes que d'hommes (Felson *et al.*, 1987). De plus, bien que la prévalence de l'OA augmente avec l'âge chez les deux sexes, l'incidence de l'OA chez la femme augmente dramatiquement à la ménopause. Ces observations ont d'ailleurs donné naissance à des théories conférant un rôle chondroprotecteur des estrogènes chez la femme (Spector et Campion, 1989).

2.1.4.1.3. Facteurs biomécaniques: Obésité

Avoir un indice de masse corporelle élevée augmente significativement les risques de développer l'OA des hanches et des genoux (Grazio et Balen, 2009). Comme ces articulations supportent le poids d'une personne, il est instinctif de penser que l'excès de poids augmente les forces mécaniques supportées par ces articulations favorisant ainsi l'usure prématurée du cartilage articulaire. Toutefois, l'obésité est aussi un facteur de risque important au développement de l'arthrose des mains (Grotle *et al.*, 2008), ce qui suggère que la contribution de l'obésité au développement de l'OA irait au-delà du stress biomécanique. En ce sens, il a été démontré que la leptine, une hormone produite par les tissus adipeux et connue pour son effet sur la satiété, est augmentée chez les patients arthrosiques et pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse de l'OA (Dumond *et al.*, 2003).

2.1.4.1.4. Utilisation excessive et traumatismes

Les gens ayant un métier nécessitant de performer des mouvements répétitifs et appliquant une grande force, de même que les sportifs de haut niveau, ont plus de chance de développer l'OA. Bien que l'activité physique modérée semble aider à prévenir l'arthrose, notamment en favorisant le maintien d'un bon tonus musculaire, la pratique excessive de l'activité physique constitue un facteur de risque au développement de l'OA. Non seulement les sportifs soumettent-ils leurs articulations à des charges anormalement élevées et des impacts répétés, ils sont aussi plus à risque de blessures. Chez les sportifs, aussi bien que les non-sportifs, toute blessure articulaire augmente les risques de développer la maladie. Par exemple, la déchirure du ligament antérieur croisé (LAC), très fréquente chez les joueurs de soccer, prédispose à l'OA. La résection chirurgicale du LAC est d'ailleurs une méthode utilisée chez les modèles animaux pour induire l'arthrose (Pelletier *et al.*, 1998).

2.1.4.1.5. L'hérédité

Bien que nombreux facteurs biomécaniques et environnementaux jouent un rôle dans le développement de l'OA, plusieurs études, effectuées à l'aide de jumeaux et de familles présentant une forte prévalence d'OA, suggèrent l'existence de prédispositions génétiques au développement de l'arthrose (Spector *et al.*, 1996; Spector et MacGregor, 2004). En effet, il a été suggéré que l'influence des prédispositions génétiques puissent contribuer jusqu'à 70% des facteurs de risques (Valdes *et al.*, 2007). Jusqu'à présent, plusieurs loci de susceptibilité à l'OA ont été identifiés, toutefois, la pertinence de tels loci dans le développement de l'arthrose demeure à être démontrée (Loughlin, 2001).

2.1.4.2. Cartilage arthrosique

Les premiers stades de l'arthrose incluent plusieurs changements phénotypiques des chondrocytes, ce qui suggère un rôle initiateur des tissus cartilagineux dans le développement de l'OA. Ces changements se traduisent par une augmentation de la synthèse de diverses composantes de la matrice extra-cellulaire (MEC), d'une hypercellularité, parfois associée à la formation de clones cellulaires, ainsi qu'à l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des chondrocytes. Ces résultats suggèrent une remise en marche des mécanismes normalement impliqués dans le développement fœtal par les chondrocytes afin de tenter de régénérer la matrice environnante (Tchetina, 2005). Toutefois, en présence de dommages importants, les chondrocytes sont incapables de reproduire fidèlement l'architecture du cartilage tel qu'il a été conçu durant le développement. Progressivement, les processus cataboliques prennent le dessus et les stades plus avancés d'arthrose sont quant à eux plutôt caractérisés par une mort cellulaire accrue entraînant nécessairement une diminution de la production des composantes de la MEC, associée à une érosion/fibrillation majeure de la surface articulaire et à une diminution importante de l'épaisseur du cartilage (fig. 2).

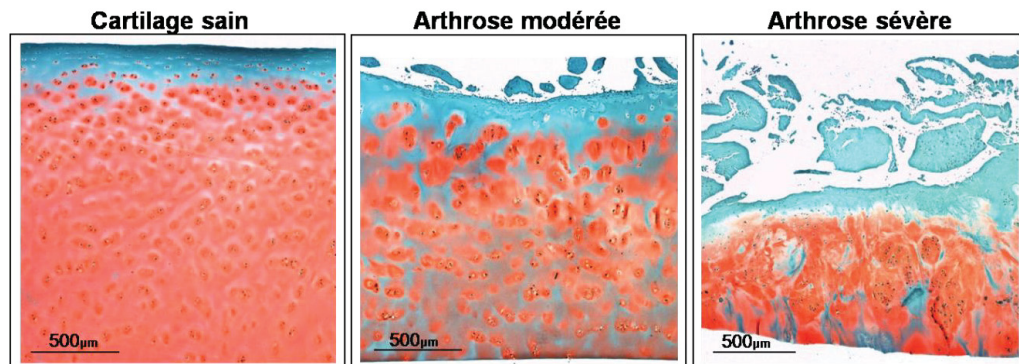


Figure 2 : Coupes histologiques de cartilage articulaire de genoux humains colorées à la safranine-O. Dans le cartilage arthrosique, on observe une perte des protéoglycans (rose), ainsi qu'une érosion/fibrillation de la surface articulaire associée à une diminution de l'épaisseur du cartilage. (Doucet, 2010).

2.1.4.3. Rôles des chondrocytes arthrosiques

2.1.4.3.1. Mitochondries: ATP et stress oxydatif

Plusieurs études suggèrent l'implication de dysfonctions mitochondriales dans l'établissement et la progression de l'OA (Terkeltaub *et al.*, 2002; Maneiro *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2004). En effet, comme le remodelage de la MEC nécessite le maintien d'un équilibre entre la production et les dépenses d'énergie, les mitochondries, qui sont en grande partie responsable de la production d'ATP par phosphorylation oxydative, font l'objet d'intenses investigations depuis de nombreuses années.

Il a été rapporté que la masse mitochondriale est augmentée dans les chondrocytes OA (Maneiro *et al.*, 2003). De plus, des changements morphologiques et une dysfonction de ces organelles dans les cellules OA ont été rapportés (Cillero-Pastor *et al.*, 2008). Il a été démontré que l'activité des complexes II et III de la chaîne de

transport des électrons est plus faible dans les cellules OA que dans les cellules contrôles, se traduisant par une diminution de la production d'ATP par mitochondrie (Maneiro *et al.*, 2003). À cet effet, il a été démontré que la baisse de production d'ATP par les mitochondries des chondrocytes entraîne une diminution de la synthèse des composantes de la matrice *in vitro*. De plus, il a été démontré que les niveaux de NO sont particulièrement élevés dans les tissus arthrosiques, une conséquence de l'induction de l'enzyme iNOS (inducible NO synthase) par plusieurs facteurs cataboliques comme IL-1 et TNF- α (Vuolteenaho *et al.*, 2003). Un déséquilibre de l'activité de la CTÉ peut modifier le statut rédox des cellules et entraîner la production accrue de l'anion super-oxyde (O₂⁻), qui peut ensuite réagir avec le NO pour former la peroxy-nitrite (ONOO⁻), un puissant agent oxydant. La présence accrue de ces radicaux libres oxygénés (ROS) peut inhiber l'activité de la CTÉ et causer de nombreux dommages aux protéines, aux lipides et à l'ADNmt. De plus, dans les chondrocytes, la production de NO entraîne une augmentation des niveaux d'ARN messager des caspases-3 et -7 et une relâche du cytochrome c (Ghafourifar *et al.*, 1999), des médiateurs de la mort cellulaire par apoptose.

En résumé, l'augmentation du stress oxydatif associé aux dommages à l'ADNmt et aux protéines ainsi que la diminution de la respiration cellulaire par les mitochondries pourraient jouer un rôle clé dans la mort cellulaire et la dégénérescence tissulaire observée dans l'OA.

2.1.4.3.2. Sénescence cellulaire

Les stress oxydatif est aussi associé au vieillissement et à la sénescence cellulaire. Comme l'OA est fortement associée à l'âge et que les chondrocytes arthrosiques

présentent plusieurs caractéristiques des cellules sénescents (diminution de la production des composantes de la MEC et des facteurs de croissances, augmentation de la production de facteurs cataboliques comme les MMPs et différentes cytokines) (Loeser, 2009), la sénescence cellulaire est particulièrement d'intérêt dans l'OA et pourrait constituer un lien entre le vieillissement et l'arthrose. Il y a principalement deux types de sénescence, la sénescence répllicative ou intrinsèque, habituellement associée au raccourcissement de la longueur des télomères, et la sénescence induite par des stress cellulaires, dite extrinsèque. Comme les chondrocytes chez l'adulte ne se divise que très rarement (Mankin *et al.*, 1963; Aigner *et al.*, 2001) la sénescence cellulaire dans l'arthrose semble plutôt associée au stress oxydatif. Toutefois, un stress oxydatif accru peut entraîner des dommages à l'ADN, notamment aux télomères ayant des effets similaires à la sénescence intrinsèque.

Tel que mentionné précédemment, les chondrocytes articulaires accumulent avec le temps et de manière plus accrue dans l'OA, des niveaux de radicaux libres oxygénés (ROS) qui excèdent les capacités anti-oxydantes des cellules, soumettant ainsi les cellules à un stress oxydatif chronique. À cet effet, il a été démontré que le stress oxydatif rend les chondrocytes humains (Del Carlo et Loeser, 2003) et de rats (Jallali *et al.*, 2005) plus susceptibles à la mort cellulaire induite par des agents oxydants. De plus, il a été démontré que l'addition de ROS exogènes peut induire l'expression de marqueurs de la sénescence dans les chondrocytes en culture (Dai *et al.*, 2006). En bref, il semble que la longue durée de vie des chondrocytes articulaires rend ces cellules plus susceptibles d'accumuler avec le temps des dommages liés aux stress cellulaires, ce qui les prédispose à la sénescence extrinsèque.

2.1.4.4. Rôle de l'inflammation

L'inflammation, principalement associée à la membrane synoviale, contribue à la progression de l'OA. Notamment, les synoviocytes peuvent produire et libérer dans l'espace synovial une gamme de cytokines et chemokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-1 β (Il-1 β) et TNF- α (Tumor necrosis factor- α), qui amplifient la réponse catabolique des chondrocytes et diminuent leur activité anabolique. Les chondrocytes et les synoviocytes peuvent aussi produire toute une gamme de médiateurs pro-inflammatoires comme les prostaglandines (PGE2), souvent associées à la douleur (Bombardieri *et al.*, 1981), et le NO.

De plus, l'inflammation s'accompagne généralement de l'invasion de la membrane synoviale par des macrophages qui produisent entre autre plusieurs facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF (vascular endothelial growth factor) (Krasnokutsky *et al.*, 2008) qui stimule l'angiogénèse. Par la suite l'angiogénèse favorise à son tour l'inflammation principalement en créant une nouvelle source pouvant acheminer des médiateurs pro-inflammatoires (Bonnet et Walsh, 2005).

La figure 3 présente un résumé de l'intégration des principaux événements associés à la progression de l'OA ainsi que des molécules impliquées dans ces processus.

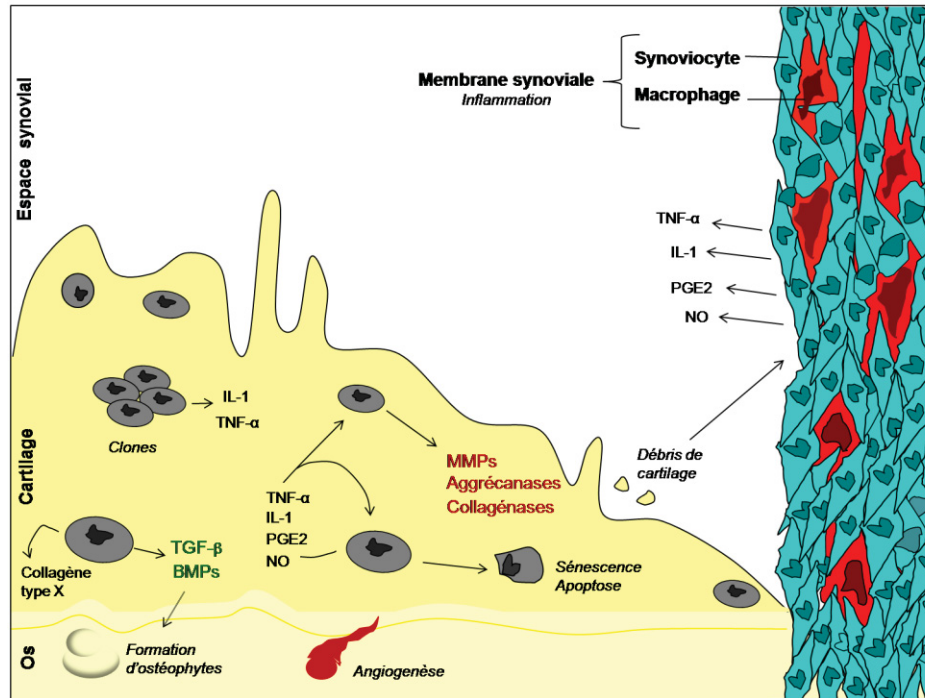


Figure 3 : Facteurs moléculaires et événements impliqués dans la pathogenèse et la progression de l'OA. Cette figure a été adaptée à partir de Krasnokutsky *et al.*, 2008.

2.1.5. Étude de l'OA

L'étude de l'OA comporte nombreux défis, notamment du à la très grande hétérogénéité clinique et au manque d'outil efficace permettant de classifier les patients. Au départ, il est donc souvent difficile de déterminer, à l'aide de l'évaluation histologique du cartilage articulaire et de quelques données cliniques, si on est en présence d'un cas d'arthrose primaire ou secondaire. De plus, comme

les patients ont généralement recours à la chirurgie à des stades avancés d'arthrose, il est difficile d'étudier les mécanismes associés à l'initiation de la maladie.

Ensuite, les chondrocytes ne conservent pas longtemps leur phénotype en culture, la quantité de matériel par patient est donc souvent très limitée. Enfin, les cellules contrôles peuvent être très difficiles à obtenir et comme l'OA est fortement présent chez les personnes âgées, il arrive que les tissus considérés comme sains, présentent plusieurs caractéristiques du cartilage arthrosique. En considérant que la douleur est souvent le principal symptôme clinique amenant les patients à consulter, mais que la tolérance à la douleur est très variable d'un individu à l'autre, de même que le degré d'impact de la douleur sur la réalisation des activités quotidiennes d'un individu, il est possible que ces patients considérés comme sains, souffrait d'arthrose, mais n'étaient tout simplement pas diagnostiqués.

2.1.6. Traitements et perspectives

Pour l'instant, il n'existe aucun moyen de prévenir ou de ralentir la progression de l'OA. Il n'existe pas non plus d'outils diagnostique, moléculaire ou génétique, permettant d'appliquer une stratégie préventive sur une population à risque de développer la maladie. Comme les chondrocytes sont incapable de réparer des dommages importants au cartilage, l'identification des personnes à risque avant l'initiation de la maladie représente un défi important, mais requière une meilleure connaissance des pathomécanismes menant au développement de l'OA ainsi que des programmes développementaux menant à l'élaboration de la structure complexe du cartilage articulaire.

Un autre défi, visant plutôt les stades plus avancés d'OA, consiste au développement de thérapies permettant de réparer efficacement les dommages au cartilage. Plusieurs stratégies ont déjà été proposées comme l'ingénierie des tissus et la thérapie génique à l'aide de facteurs anaboliques et de cellules souches mésenchymateuses (Goldring, 2006). Toutefois, leur utilité et leur efficacité demeure à être prouvée.

2.2. LA PROHIBITINE

2.2.1. Superfamille de protéines SPFH et domaine PHB

La Prohibitine (PHB-1) appartient à la superfamille de protéines SPFH, qui doit son nom aux principales protéines qui la compose (Stomatine, Prohibitine, Flotiline et HflK/C). Les membres de cette famille sont des protéines membranaires et ont en commun la présence d'un domaine SPFH aussi appelé domaine PHB. Bien que ce domaine soit hautement conservé chez les procaryotes et présent dans tous les règnes du vivant, suggérant une importance capitale de ce motif (Morrow *et al.*, 2005), il existe peu d'homologie de séquence entre les différentes protéines de cette superfamille (Winter *et al.*, 2007; Hinderhofer *et al.*, 2009). Plusieurs études phylogénétiques ont d'ailleurs tenté, mais sans succès, d'identifier un ancêtre commun aux protéines de la famille SPFH (Rivera-Milla *et al.*, 2006; Hinderhofer *et al.*, 2009) suggérant une origine indépendante des différents protéines. Récemment, les travaux publiés par Hinderhofer et collaborateurs ont proposés une origine commune aux protéines SPFH procaryotes. Les protéines SPFH eucaryotes proviendraient quant à elles de différentes familles de SPFL procaryotiques ayant évoluées de manière convergente (Hinderhofer *et al.*, 2009).

Malgré la conservation évolutive du domaine PHB, son importance biologique ainsi que sa fonction demeurent obscures. Il a toutefois été observé que les protéines contenant un domaine PHB sont toutes des protéines associées aux membranes, soit cytoplasmique (Stomatines, Flotilines, Podocine), mitochondriale (Prohibitines) ou du réticulum endoplasmique (Erlines) (Hinderhofer *et al.*, 2009), et que plusieurs d'entre elles ont tendance à former des oligomères (Winter *et al.*, 2007). Jusqu'à maintenant, le domaine PHB a été proposé comme étant un motif de reconnaissance des lipides associé à la formation de radeaux lipidiques (Brasaemle *et al.*, 2004; Morrow *et al.*, 2005) ou encore, un domaine d'interaction protéine-protéine permettant l'oligomérisation des protéines (Winter *et al.*, 2007).

2.2.2. Structure protéique

La Prohibitine, ou PHB-1, aussi appelée BAP32 (B-cell receptor associated protein-32) est une protéine ubiquitaire de 30-32 kDa contenant 272 acides aminés extrêmement conservée des levures aux humains (Mishra *et al.* 2006). PHB-1 fut identifiée pour la première fois dans des cellules hépatiques de rat et associée à l'inhibition de la prolifération cellulaire (McClung *et al.*, 1989) d'où elle tient son nom. Cette protéine, qui est l'archétype des protéines contenant un domaine PHB, possède une protéine apparentée appelée prohibitone (PHB-2), aussi connu sous le nom de BAP37 (B-cell receptor associated protein-37) ou encore REA (repressor of estrogen receptor action). Ces deux protéines, qui partagent 53% d'identité au niveau de leurs séquences en acides aminés et environ 75% de similarité (Mishra *et al.* 2006), sont toutes deux constituées d'une extrémité N-terminale hydrophobe permettant l'association à la membrane mitochondriale, suivie d'un domaine PHB et d'un domaine <<coil-coiled>> α -hélicoïdal en C-terminal (Mishra *et al.* 2006; Winter *et al.*, 2007). Chez PHB-1, un signal d'export nucléaire (NES) putatif,

résidus 257 à 270, a été identifié (Mishra *et al.* 2006; Rastogi *et al.*, 2006), tandis que PHB-2 possède un peptide signal putatif, résidus 1 à 36, ainsi qu'un signal de localisation nucléaire (NLS) putatif, résidus 86 à 89 (Mishra *et al.* 2006). Il n'existe à ce jour aucune structure tridimensionnelle acceptée des prohibitines, dû aux difficultés reliées à leur cristallisation.

2.2.3. Conservation évolutive

La séquence protéique de PHB-1 chez l'humain ne diffère que par un acide aminé conservé de la séquence de ses homologues chez le rat et la souris. Pour PHB-2, les protéines chez l'humain, le rat et la souris sont à toutes fins près identiques. Les Prohibitines sont aussi très conservées chez la Drosophile, partageant plus de 70% d'identité, ainsi que chez les levures. Les prohibitines de la levure *S. cerevisiae* partagent plus de 54% d'identités et 78% de similarités avec les protéines humaines (Mishra *et al.*, 2006). PHB-1 et PHB-2 sont donc des protéines qui ont été hautement conservées au cours de l'évolution, ce qui laisse supposer une fonction majeure de ces protéines.

2.2.4. Localisations cellulaires

La Prohibitine se retrouve principalement localisée à la membrane interne des mitochondries. Toutefois, cette protéine a aussi été identifiée à la membrane plasmique, dans le cytosol et dans le noyau. Il a été démontré que PHB-1 peut aussi être sécrétée et se retrouver dans la circulation sanguine où elle est capable

d'interagir avec les IgM (Terashima *et al.*, 1994) et favoriser l'activation du complément (Mishra *et al.*, 2006).

2.2.5. Fonctions

2.2.5.1. Généralités

De nombreuses fonctions ont été attribuées à PHB-1 notamment dans le maintien de l'homéostasie mitochondriale (Nijtmans *et al.*, 2000; Osman *et al.*, 2009), la régulation du cycle cellulaire, la régulation de la transcription génique (He *et al.*, 2008; Rastogi *et al.*, 2006) ainsi que dans la transduction de signaux via Ras-Raf (Rajalingam *et Rudel*, 2005) et la signalisation en réponse aux TGF- β (Zhu *et al.*, 2009). Les fonctions de PHB-1 ont été associées à nombreux processus biologiques comme la sénescence (Schleicher *et al.*, 2008), l'apoptose (Zhu *et al.*, 2009) et le vieillissement, aussi bien qu'à la différenciation (Xu *et al.*, 2008), la prolifération cellulaire (Merkwirth *et Langer*, 2009) et le cancer (Zhu *et al.*, 2009). Il a aussi été rapporté que la Prohibitine possède des propriétés anti-oxydantes (Theiss *et al.*, 2009). Le spectre d'action de la Prohibitine semble donc être très large et complexe, mais aucun de ses mécanismes d'action moléculaire n'est très bien connu à ce jour.

2.2.5.2. Régulation du cycle cellulaire

La Prohibitine fut longtemps associée à l'inhibition de la prolifération cellulaire, mais cette propriété fut plus tard associée à la région 3'UTR de l'ARN messager de

PHB-1, puisqu'il a été démontré que la région 3'UTR à elle seule suffit à inhiber la progression du cycle cellulaire (Jupe *et al.*, 1996; Manjeshwar *et al.*, 2003). De surcroît, plusieurs études ont rapportées des niveaux d'ARNm inversement proportionnels aux marqueurs de prolifération cellulaire dans plusieurs types de cellules et tissus (Jupe *et al.*, 1995).

2.2.5.3. Fonctions mitochondriales

2.2.5.3.1. Protéine Chaperone

Les prohibitines humaines ont été retrouvées dans plusieurs compartiments cellulaires, mais PHB-1 se localise principalement au niveau de la membrane interne des mitochondries où elle s'associe sous forme d'hétéro-oligomères formant de larges complexes en forme d'anneaux de plus de 1MDa contenant entre 16 et 20 résidus de PHB-1 et PHB-2 en alternance (Nijtmans *et al.*, 2000; Merkwirth et Langer., 2008). Les Prohibitines sont ciblées et ancrées aux membranes mitochondriales par leur extrémité N-terminale hydrophobe non clivable, de manière à exposer leurs extrémités C-terminale dans l'espace intermembranaire (Merkwirth et Langer., 2008).

De tels complexes existent également chez les levures et les bactéries. Chez *E. coli*, le complexe HflK/C, homologue au complexe PHB-1/2, interagit et régule négativement l'expression d'une protéase appelée FtsH (Kahira *et al.*, 1996). Il a donc été proposé que chez les eucaryotes, le complexe PHB-1/2 pourrait réguler la stabilité des protéines mitochondriales par inhibition de protéases membranaires. Cette hypothèse est renforcée par l'interaction des prohibitines avec la protéase membranaire mAAA (Nijtmans *et al.*, 2000). Toutefois, la fonction des prohibitines

au sein des mitochondries semble en être une de chaperonne pour les protéines nouvellement synthétisées ou importées, associées à la chaîne de transport des électrons (CTÉ) (Nijtmans *et al.*, 2000). L'action du complexe PHB-1/2 irait donc au-delà de l'inhibition de protéases et agirait plutôt par la protection, par interactions directes, des protéines de la CTÉ avec le complexe PHB-1/2. La forme en anneau du complexe ancré à la membrane interne permettrait une protection spatiale des protéines de la CTÉ durant leur assemblage. Il est facile de penser que l'association d'un tel complexe avec une protéase membranaire serait un moyen utile et direct d'envoyer à la dégradation certaines protéines qui seraient mal-repliées et de ce fait, éviter leur incorporation à la CTÉ.

Par contre, l'implication des prohibitines dans la biogenèse de la CTÉ demeure controversée, et pourrait s'avérer spécifique à certains types cellulaires, puisque la perte du complexe PHB-1/2 chez les levures et dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) n'affecte ni le potentiel membranaire, ni l'activité respiratoire de la CTÉ (Coates *et al.*, 1997; Merkwirth *et al.*, 2008). Toutefois, la perte de PHB-1 dans les cellules endothéliales provoque la sénescence cellulaire via une réduction de l'activité du complexe I ainsi que du potentiel membranaire, associés à une augmentation de la production de radicaux libres oxygénés (ROS) (Schleicher *et al.*, 2008).

2.2.5.3.2. Maintien de l'intégrité de l'ADNmt

D'autres rôles ont été attribués aux Prohibitines dans les mitochondries. Entre autre, Kasashima et collaborateurs ont démontré que PHB-1 est impliquée dans la maintenance du nombre de copies et de l'organisation en nucléoides de l'ADN

mitochondrial (ADNmt) dans les cellules HELA via la régulation de la protéine TFAM (Kasashima *et al.*, 2008).

2.2.5.3.3. Régulation des processus de fission/fusion

Indépendamment de ses fonctions dans la respiration cellulaire, PHB-1 est impliquée dans le maintien de la morphologie des mitochondries. Les mitochondries forment un réseau de tubules interconnectés constamment en remodelage par des processus de fusions et de fissions, qui sont nécessaires au maintien de la morphologie et de la fonction des mitochondries. Il semble que ce mécanisme permette l'échange de matériel génétique entre les mitochondries de manière à alléger le fardeau mutationnel de l'ADNmt qui s'accumule naturellement au cours du vieillissement. Les connaissances actuelles révèlent qu'au moins deux protéines sont essentielles aux processus de fusion/fission. Parmi celles-ci, on retrouve OPA1. Cette protéine est présente sous deux isoformes, une longue (L-OPA1), possédant un domaine d'ancrage à la membrane et une forme courte (S-OPA1) dont le domaine membranaire est clivé. La perte de la forme longue d'OPA1 est associée à la perte des processus de fusion et à la fragmentation des mitochondries (Bossy-Wetzel *et al.*, 2003).

À cet effet, une étude a démontrée que la perte de l'homologue de la Prohibitine, PHB-2, entraîne une perte de la forme longue d'OPA1 et que l'expression d'une forme non-clivable de L-OPA1 permet de rétablir le phénotype de la perte de PHB-2 (Merkwirth *et al.*, 2008). Les prohibitines seraient donc essentielles au maintien de la forme longue de OPA1 et aux processus de fusions mitochondriales. Il a été proposé que les deux isoformes de OPA1 forment un complexe situé aux jonctions des cristae mitochondriaux de manière à prévenir la relâche du cytochrome c du

lumen à l'espace intermembranaire. Une des premières étapes du processus d'apoptose étant le réarrangement des cristae médié par OPA1, les prohibitines peuvent avoir des effets pro-prolifératifs ou pro-apoptotiques via la régulation d'OPA1 (Merkwirth *et al.*, 2008).

De plus, il a été rapporté dans les cellules de type HELA, que la délétion de PHB-2 par ARN d'interférence (ARNi) résulte aussi en la fragmentation des mitochondries et en une augmentation de la mort cellulaire par apoptose de manière caspase-dépendante via la régulation négative de la protéine Hax1 (Kasashima *et al.*, 2006).

2.2.5.4. Régulation de l'expression génique

2.2.5.4.1. Mécanismes d'import/export nucléaire

Malgré son rôle primordial au sein des mitochondries, plusieurs études ont relatées la présence de PHB-1 et de PHB-2 à l'intérieur du noyau de plusieurs types cellulaires. Toutefois, d'après les connaissances actuelles, les prohibitines seraient importées de manières indépendantes à l'intérieur du noyau, ce qui suggère une fonction indépendante des deux protéines à l'intérieur de ce compartiment. PHB-2 possède un signal de localisation nucléaire putatif et il semble que son import au noyau se fasse par l'entremise d'une liaison au récepteur d'estrogène alpha (ER α) et de manière estrogène-dépendante dans les cellules HELA (Kasashima *et al.*, 2006). Pour ce qui est de PHB-1, les mécanismes reliés à son import/export du noyau demeurent méconnus. Toutefois, en situation de stress apoptotique, PHB-1 peut activer la transcription de p53 et être exporté du noyau de manière CRM-1-dépendante dans les cellules transformées (Fusaro *et al.*, 2003; Rastogi *et al.*, 2006). Les mécanismes reliés à l'import nucléaire de PHB-1 demeurent

complètement obscurs, mais on ne peut exclure que son entrée au noyau se fasse passivement, car les protéines de moins de 50 kDa peuvent entrer librement dans le noyau.

2.2.5.4.2. Régulation des gènes de réponse aux E2Fs

Quoique quelques études aient démontré un rôle de co-activateur de PHB-1 dans la régulation de l'expression génique (Fusaro *et al.*, 2003; Rastogi *et al.*, 2006), il a été démontré que PHB-1 agit principalement comme suppresseur de tumeur dans la répression des gènes régulés par les facteurs E2Fs et l'inhibition de la prolifération cellulaire (Choi *et al.*, 2007; Rastogi *et al.*, 2006b).

Les facteurs de transcription de la famille E2F (E2F1 à 8) sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose. L'activateur transcriptionnel E2F1 favorise la prolifération (Wu *et al.*, 2001), mais peut aussi induire l'apoptose dans certains systèmes (Field *et al.*, 1996). Il est connu que la protéine Rb (retinoblastoma tumor suppressor protein) est l'élément régulateur principal impliqué dans la régulation transcriptionnelle d'E2F1. La protéine Rb dans un état non-phosphorylé, peut lier de nombreuses protéines dont E2F1 et plusieurs corepresseurs, ce qui inactive E2F1. Toutefois, Rb peut être phosphorylée par des kinases cyclines-dépendantes, comme Cdk4 et Cdk6 en complexe avec la cyclineD, ce qui a pour effet la dissociation de Rb résultant en l'activation d'E2F1. La protéine p16 peut quant à elle interagir avec Cdk4 et 6, empêchant leur interaction avec la cycline D, et l'activation subséquente d'E2F1.

De récentes études ont démontrées un rôle de la Prohibitine dans la régulation des facteurs E2Fs. Effectivement, PHB-1 pourrait faciliter le recrutement de co-

répresseurs spécifiques pour inhiber les facteurs E2Fs et ce en agissant via deux voies indépendantes, dont une Rb-dépendante indirecte et une Rb-indépendante directe. Choi et collaborateurs ont démontrés que dans les cellules de type HEK293T, PHB-1 peut inhiber E2F1 en liant directement le promoteur de ce dernier et que cette répression serait Rb-indépendante. PHB-1 pourrait aussi inhiber E2F1 via la voie Rb en liant et inhibant la protéine p16. Dans les deux cas, il semble que la protéine RNF2 agisse de concert avec la Prohibitine dans l'inhibition d'E2F1 (Choi *et al.*, 2008). La localisation nucléaire de PHB-1 semble donc reliée à la répression de gènes pro-prolifératifs comme E2F1, ce qui va de pair avec le rôle attribué à la Prohibitine lors de sa découverte dans l'inhibition de la prolifération cellulaire.

2.2.5.4.3. Régulation des gènes de réponse à ER α

He et collaborateurs ont démontrés que PHB-1 peut agir à titre de co-répresseur dans l'inhibition de gènes régulés par le récepteur d'estrogène alpha (ER α) dans les cellules MCF-7, dérivées d'un cancer du sein (He *et al.*, 2008). Ces auteurs ont aussi démontré que la présence de PHB-2 stabilise PHB-1, mais inhibe son activité, probablement du à la dimérisation des deux protéines (He *et al.*, 2008). Dans le même ordre d'idées, il a été démontré que PHB-2 est importée dans le noyau de manière ER α -dépendante (Kasashima *et al.*, 2006).

2.2.6. Organismes modèles

Chez *S. cerevisiae*, la perte des Prohibitines n'entraîne pas de phénotype particulier majeur, mis à part une réduction de leur capacité à se répliquer, donc une durée de vie réduite, ainsi qu'une morphologie mitochondriale altérée dans les cellules âgées (Coates *et al.*, 2007). Toutefois, chez ces organismes, ainsi que chez *C. elegans*, la perte de PHB-1 entraîne une déstabilisation et une baisse d'expression de PHB-2 et vice versa, probablement dû à une stabilisation des deux protéines par hétérodimérisation (Berger *et al.*, 1998). Chez la Drosophile, la perte de l'homologue de la Prohibitine est létale à l'état embryonnaire (Eveleth et Marsh, 1986; Nijtmans *et al.*, 2000).

Chez les eucaryotes supérieurs, l'interdépendance des prohibitines n'a pas été démontrée. Il existe des modèles de souris PHB-2 $-/-$, qui meurent à l'état embryonnaire, et PHB-2 $+/-$, qui possèdent une réponse aux estrogènes amplifiée (Park *et al.*, 2005), cependant, les niveaux de PHB-1 dans ce modèle n'étaient pas rapportés par l'étude. Similairement, les souris PHB-1 $-/-$ meurent aussi à un stade de développement embryonnaire précoce et les souris hétérozygotes PHB-1 $+/-$ présentent une hyperprolifération des glandes mammaires (He *et al.*, 2008).

2.2.7. Modifications post-traductionnelles de PHB-1

La Prohibitine peut se retrouver dans plusieurs compartiments cellulaires et exerce plusieurs fonctions cruciales. Il est donc impératif qu'il existe plusieurs mécanismes pouvant modifier et contrôler la spécificité d'interaction et de fonction de cette molécule. Une façon rapide et réversible de modifier une protéine consiste à la modifier suite à sa synthèse par l'entremise de modifications post-

traductionnelles. La Prohibitine a été rapportée comme étant la cible de plusieurs modifications comme la phosphorylation, l'ubiquitination et la glycosylation (O-GlcNAc) dans différents contextes et types cellulaires.

2.2.7.1. Phosphorylation

Plusieurs études ont relaté la phosphorylation de PHB-1 à différents résidus, notamment Tyrosine-114, Thréonine-258 et Tyrosine-259. Il a récemment été démontré, que PHB-1 et PHB-2 peuvent lier la kinase Akt *in vitro* et *in vivo* (Kyu-Ho Han *et al.*, 2008). Akt est capable de phosphoryler PHB-1 au niveau de la thréonine-258 *in vitro* ainsi qu'*in vivo* dans les cellules HEK293T et MiaPaCa-2 (Kyu-Ho Han *et al.*, 2008). Akt, aussi appelée protéine kinase B (PKB), est une protéine sérine/thréonine kinase ayant un rôle majeur dans la régulation de l'apoptose et de la prolifération cellulaire. Akt/PKB est une cible de la voie PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) qui est activée par certains facteurs de croissance et cytokine ainsi que par l'insuline. Dans le même ordre d'idées, une autre étude a démontrée que PHB-1 pouvait être phosphorylée au résidu Tyr114 suivant une stimulation à l'insuline dans les cellules C2C12 et MCF-7 et cette phosphorylation et a été attribué à une fonction kinase du récepteur de l'insuline (IR). La phosphorylation de la tyrosine-114 de PHB-1 entraînerait la création d'un site de liaison et son interaction avec la protéine tyrosine phosphatase SPH1 (Sudharsana *et al.*, 2009) impliquée dans la voie de signalisation de l'insuline en amont d'Akt. Finalement, Ande et ses collaborateurs ont proposé un mécanisme couplant les processus de glycosylation (O-GlcNAc) et de phosphorylation des résidus tyrosine de PHB-1 dans un mécanisme qu'ils ont qualifiés d'interrupteur binaire (binary switch) (Ande *et al.*, 2009).

Dans les mitochondries des lymphocytes T humains, la présence d'une forme de PHB-2 phosphorylée en tyrosine-148 a été démontrée, mais il semble que cette phosphorylation ne soit pas requise dans la formation des complexe PHB-1/PHB-2 (Ross *et al.*,2008).

2.2.7.2. Ubiquitination

La poly-ubiquitination de PHB-1 a été démontrée dans les spermatozoïdes des mammifères. Dans ces cellules, la Prohibitine se présente sous plusieurs isoformes de poids moléculaires allant de 64 kDa à 185 kDa. Les auteurs proposent entre autre un rôle de l'ubiquitination de PHB-1 dans la transmission maternelle des mitochondries (Thompson *et al.*, 2003).

2.2.7.3. Sumoylation

La modification de PHB-1 par les protéines SUMOs n'a jamais été démontrée. Toutefois, une étude protéomique visant à identifier des protéines associées aux différentes SUMOs suite à différents stress cellulaires, a identifiée la Prohibitine comme étant une protéine interagissant avec SUMO-1 et SUMO-2/3 dans le noyau des cellules suite à un stress oxydatif (Manza *et al.*, 2004). La nature des interactions n'étaient pas spécifiés par cette étude.

2.2.8. Pathologies

La protéine PHB-1 est surtout associée au développement sporadique du cancer du sein (Jupe *et al.*, 2001). Il a aussi été démontré que la perte de fonction de PHB-1 dans les cellules cancéreuses de prostate permet de stimuler l'apoptose des cellules cancéreuses (Zhu *et al.*, 2009). Une étude protéomique a toutefois rapporté une diminution des niveaux de Prohibitine dans les cellules dérivées d'ostéosarcomes (Liu *et al.*, 2009).

2.2.9. Potentiel thérapeutique

Le potentiel suppresseur de tumeur de PHB-1, et son implication dans la sénescence et l'apoptose cellulaire fait de cette protéine une cible pour les thérapies contre le cancer dans l'inhibition de la prolifération cellulaire. Toutefois, à l'opposé, ces mêmes propriétés pourraient aussi s'avérer utiles dans le développement de traitement de maladies associées à une mort cellulaire accrue comme différents pathologies dégénératives et associées au vieillissement. À cet effet, la Prohibitine a été associée à la régulation de l'homéostasie et de la morphologie mitochondriale et il a été proposé que la perte du processus de fusion mitochondriale mène entre autre à une augmentation de la production de radicaux libres oxygénés (ROS) associée au vieillissement ainsi qu'à certaines maladies neurodégénératives (Bossy-Wetzel *et al.*, 2003). La stabilisation des mitochondries via PHB-1 à l'aide de peptides synthétiques a été envisagée et pourrait s'avérer utile dans le développement de traitements anti-âge et de pathologies associées au vieillissement (Mishra *et al.*, 2005).

De plus, la fonction nucléaire de PHB-1, en particulier dans la régulation des E2Fs et la sénescence cellulaire, élargit le spectre des potentiels thérapeutiques qu'offre cette protéine. L'utilisation de morpholinos et l'expression de plasmides ont été proposés comme moyen de cibler la Prohibitine nucléaire (Mishra *et al.*, 2005) et pourrait par exemple être utilisé pour des approches par thérapie génique dans le traitement de diverses pathologies.

2.3. LA SUMOYLATION

2.3.1. Une modification post-traductionnelle émergente et vitale

Les modifications post-traductionnelles sont des outils efficaces qui permettent aux cellules de modifier rapidement l'activité ou la fonction d'une protéine, sans en altérer les taux de synthèse et de dégradation. La sumoylation, qui consiste en la liaison covalente de molécules appelées SUMOs à un résidu lysine d'une protéine cible, est une modification post-traductionnelle qui fut identifiée par Matunis et collaborateurs en 1996 dans des cellules de mammifères (Matunis *et al.*, 1996). Depuis, plusieurs homologues des protéines SUMOs ont été identifiées chez d'autres espèces et largement étudiées entre autre chez les levures (Johnson *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1999), les plantes (Kurepa *et al.*, 2003; Nacerddine *et al.*, 2005) et la souris (Kuehn, 2005). Il a été démontré que chez *S. cerevisiae*, le gène *smt3*, codant pour l'unique protéine SUMO, est un gène essentiel (Johnson *et al.*, 1997) et que la perturbation de la voie de sumoylation bloque les cellules en phase G2 du cycle cellulaire (Seufert *et al.*, 1995). De plus, les souris chez lesquelles on inhibe la voie de sumoylation meurent à un stade de développement embryonnaire précoce (Kurepa *et al.*, 2003; Nacerddine *et al.*, 2005). Chez l'humain, des déficiences dans le processus de sumoylation ont été associées à plusieurs pathologies (Sarge et

Park-Sarge, 2009) comme le cancer (Kim et Baek, 2006), la maladie d'Huntington (Steffan *et al.*, 2004) et plusieurs autres maladies neurodégénératives causées par l'expansion des répétitions de polyglutamine (Ueda *et al.*, 2002; Dorval et Fraser, 2007). Au cours des dernières années, la modification par les protéines SUMOs a fait l'objet de recherches intensives et il ne fait plus aucun doute que la sumoylation est un processus de modification post-traductionnelle très conservé et vital au maintien de l'homéostasie des cellules eucaryotes.

2.3.2. Les protéines SUMOs

Les protéines SUMO (Small Ubiquitin-like MODifiers) sont exprimées dans toutes les cellules eucaryotes (Geiss-Friedlander et Melchior, 2007) et appartiennent à une famille de modificateurs apparentés aux ubiquitines appelés Ubls (Ubiquitin-related proteins). Tous les Ubls sont attachés à leurs protéines cibles par une cascade enzymatique semblable au processus d'ubiquitination (Anckar et Sistonen, 2007), et bien que les SUMOs possèdent très peu d'homologie de séquence avec l'ubiquitine, ces deux modificateurs adoptent une structure tertiaire hautement similaire (Dohmen, 2004). Chez les vertébrés, il existe quatre types de SUMOs appelés SUMO-1 à 4, qui possèdent toutes une taille d'environ 12 kDa et plus ou moins 100 acides aminés (Mountzouris, 2005). SUMO-2 et SUMO-3 possèdent 95% d'identités entre-elles (Mountzouris, 2005), et sont souvent mentionnées conjointement (SUMO-2/3) dans la littérature. Il a été démontré, que SUMO-2/3 se retrouvent généralement sous leur forme libre non-conjuguée dans les cellules en conditions physiologiques et qu'un stress cellulaire engendre la conjugaison des SUMO-2/3 à leurs cibles (Saitoh et Hinchey, 2000). À l'opposé, SUMO-1, qui possède seulement 47% d'identité avec SUMO-2/3 (Mountzouris, 2005), se retrouve sous sa forme conjuguée en conditions physiologiques normales et on en

retrouve très peu sous une forme libre (Saitoh et Hinchey, 2000). Il existe aussi un quatrième type de SUMO appelé SUMO-4, qui a été identifié dans les reins humains et qui s'apparente à SUMO2/3, suggérant une fonction plus spécialisée de certains types de SUMOs (Bohren *et al.*, 2004). Tout comme les molécules d'ubiquitines, SUMO-2/3 et SUMO-4 peuvent former des chaînes grâce à un la présence d'un site consensus d'attachement aux SUMOs (Tatham *et al.*, 2001; Bohren *et al.*, 2004). À l'opposé, SUMO-1 ne possède pas ce site d'attachement et modifie ses cibles sous forme de monomère. Il a toutefois été reporté qu'un résidu de SUMO-1 peut terminer une chaîne de SUMO-2/3 (Mountzouris, 2005). Les protéines SUMOs ont à l'origine été identifiées par plusieurs groupes indépendants, plusieurs autres noms leurs furent donc attribués, comme Sentrines, Smt3, GMP et UBL1.

2.3.3. La voie de sumoylation

La modification par les protéines SUMOs est un processus dynamique et réversible qui requiert la présence de nombreuses enzymes, qui ont initialement été identifiées chez la levure *S. cerevisiae* (Johnson *et al.*, 1997). Ce processus peut être disséqué en plusieurs étapes, la première étant la maturation des molécules SUMOs par clivage de leur extrémité C-terminale. Cette fonction est accomplie par les différentes SENPs (Sentrins proteases), dont il existe 7 isoformes chez l'humain (Mikolajczyk *et al.*, 2007), et permet d'exposer un résidu diglycine nécessaire à la liaison des SUMOs avec l'enzyme E1 de la voie dans un processus ATP-dépendant. La fonction d'activation E1 est accomplie par un hétérodimère composé de SAE1 et SAE2 (SUMO Activating Enzyme 1 et 2). L'enzyme E1 transfère ensuite la molécule SUMO à l'enzyme de conjugaison E2, appelée Ubc9, qui est suffisante à la reconnaissance des protéines cibles (Knipscheer *et al.*, 2008). Bien

qu'il ait été démontré que SAE1/SAE2 et Ubc9 peuvent être suffisantes au processus de sumoylation (Matunis *et al.*, 1996), la présence d'une troisième enzyme, une E3 ligase, est généralement requise et permet de favoriser l'efficacité et la spécificité de la réaction (Pichler et Melchior, 2004; Reverter et Lima, 2005). Les E3 ligases sont multiples et spécifiques. Jusqu'à présent, cette fonction a été majoritairement attribuée à 3 protéines, soit la protéine inhibitrice de l'activation des protéines STATs (PIAS) (Kahyo *et al.*, 2001), la nucléoporine RanBP2/Nup358 (Pichler *et al.*, 2002) et une protéine du groupe du polycomb, PC2 (Kagey *et al.*, 2003). Cependant, la protéine Topors (Weger *et al.*, 2005) et certaines HDACs (Gao *et al.*, 2008), ont aussi été associées à cette fonction. La sumoylation est réversible, la dernière étape consiste donc au clivage des SUMOs de leur protéine cible. Cette fonction est accomplie par les mêmes SENPs responsables de la maturation des SUMOs (Mukhopadhyay, 2007). Chaque SENP possède donc deux activités, soit d'endopeptidase et d'exopeptidase ayant des affinités différentes et spécifiques pour les différents types de SUMOs (Mikolajczyk *et al.*, 2007).

2.3.4. Sites de sumoylation et de liaison aux SUMOs

Une protéine peut posséder un ou plusieurs sites de sumoylation, qui permet l'attachement covalent d'une protéine SUMO à un résidu lysine de la protéine cible. Le site consensus de sumoylation est Ψ KXE, où (Ψ) représente un résidu hydrophobe, (K) est le résidu lysine, (X) représente n'importe lequel des acides aminés et (E) est un résidu d'acide glutamique (Geiss-Friedlander et Melchior, 2007). Les protéines peuvent aussi posséder un ou plusieurs sites de liaison aux SUMOs (SBM ou SIM) permettant aux protéines d'interagir avec les SUMOs via des interactions protéines-protéines. Le site consensus de liaison aux SUMOs est

V/I-X-V/I-V/I, où (V) est un résidu valine, (I) un résidu isoleucine et (X) représente n'importe quel acide aminé (Song *et al.*, 2004).

2.3.5. Régulation de la sumoylation

La sumoylation peut être régulée par d'autres modifications post-traductionnelles. D'abord, il peut y avoir compétition avec d'autres modifications comme l'ubiquitination et l'acétylation, qui ciblent aussi les résidus lysines (Bossis et Melchior, 2006b). De plus, il a été démontré que la phosphorylation d'un résidu sérine ou thréonine à proximité d'un site de sumoylation peut influencer positivement et négativement la modification par les protéines SUMOs (Hietakangas *et al.*, 2006; Stehmeier et Muller, 2009).

Il a été démontré qu'un stress oxydatif intense, ainsi que divers autres stress cellulaires provoquent une augmentation de la sumoylation ainsi qu'une modification globale des protéines sumoylées (Saitoh et Hinchey, 2000; Manza *et al.*, 2004). Toutefois, la présence de radicaux libres oxygénés, comme le H₂O₂, à de faibles concentrations provoque une désomoylation généralisée due à la création d'un pont disulfure entre Ubc9 et l'enzyme E1, ce qui inhibe leur fonction (Bossis et Melchior, 2006a).

Enfin, il a aussi été démontré que la protéine virale Gam1 permet d'inhiber la sumoylation en favorisant la dégradation de la SUMO E1 de manière ubiquitine-dépendante (Boggio *et al.*, 2007).

2.3.6. Les cibles de la sumoylation

Une grande majorité des cibles de la sumoylation identifiées à ce jour sont des protéines nucléaires, généralement des facteurs de transcription, des corépresseurs et des protéines impliquées dans l'organisation de la chromatine et la réplication/réparation de l'ADN (Gill, 2007). Il a d'ailleurs été rapporté que l'enzyme SAE1/SAE2 possède une localisation majoritairement nucléaire et qu'Ubc9 se retrouve habituellement associée aux filaments nucléoplasmiques du complexe du pore nucléaire (NPC) dans la vaste majorité des cellules de mammifères (Zhang *et al.*, 2002). Toutefois, plusieurs cibles cytoplasmiques, mitochondriales et membranaires ont aussi été identifiées (Harder *et al.*, 2004; Gill, 2007), la sumoylation n'est donc pas un processus exclusivement associé au noyau. (voir tableau I).

Chez l'humain, il a été démontré qu'il existe en moyenne 10% à 15% des cibles de SUMO-1 qui sont aussi des cibles de SUMO-3 lors d'études protéomiques à grande échelle (Manza *et al.*, 2004). Les différentes SUMOs semblent donc cibler des groupes distincts de protéines à modifier (Saitoh et Hinchey, 2000; Manza *et al.*, 2004), ce qui suggère que leur fonction n'est pas redondante.

2.3.7. Effets généraux sur les protéines cibles

La sumoylation peut avoir plusieurs effets sur ses cibles comme modifier leur structure, leur stabilité et leur activité, modifier le potentiel et la spécificité des interactions protéines-protéines et même influencer la localisation cellulaire de certaines protéines notamment, en provoquant leur transport au noyau. Jusqu'à ce jour, la sumoylation a été associée à un nombre impressionnant de fonctions

comme le développement, la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose et la sénescence, l'organisation de la chromatine et la régulation de la transcription génique. (Dohmen, 2004) La sumoylation permet aussi de favoriser l'assemblage de complexes multiprotéiques (Bernardi *et al.*, 2007). Le tableau I illustre quelques exemples de cibles connues de la modification par les protéines SUMOs ainsi que l'effet de telles modifications sur les protéines cibles.

Tableau I : Différentes cibles et effets de la modification par les protéines SUMOs. NPC : Complexe du pore nucléaire, RE : Réticulum endoplasmique, PML : Promyelocytic leukemia protein

Protéines cibles	Effets de la sumoylation	Références
p53	Favorise l'activation de la transcription	Rodriguez <i>et al.</i> , 1999
HDAC4	Répression de la transcription	Kirsh <i>et al.</i> , 2002
C-Jun	Régulation négative du potentiel activateur de la transcription	Müller <i>et al.</i> , 2000
Histone H4	Inhibition de la transcription	Shiio et Eisenman, 2003
p300	Inhibe l'activation de la transcription	Girdwood <i>et al.</i> , 2003
RanGAP1	Recrutement au NPC	Matunis <i>et al.</i> , 1998
PML	Favorise la formation des corps PML	Sternsdorf <i>et al.</i> , 1997
Sp100	Favofise le recrutement aux corps PML	Sternsdorf <i>et al.</i> , 1997
IKBa	Empêche l'ubiquitination	Desterro <i>et al.</i> , 1998
DRP-1	Régulation de la fission/fusion mitochondriale	Harder <i>et al.</i> , 2004
GluR6	Endocytose du récepteur membranaire	Martin <i>et al.</i> , 2007
PTP1B	Inactivation du récepteur (RE)	Dadke <i>et al.</i> , 2007
Ubc9	Amplifie l'efficacité de l'enzyme	Knipscheer <i>et al.</i> , 2009

2.3.8. Sumoylation et transport au noyau

Bien qu'il existe certaines protéines qui sont exportées du noyau suite à leur sumoylation, dans la majorité des cas, la sumoylation est plutôt associée à l'import nucléaire de protéines, comme c'est le cas pour la kinase NEMO (Huang *et al.*,

2003). Le meilleur exemple demeure quant même la relocalisation de la GTPase RanGap1 du cytoplasme au complexe du pore nucléaire suite à sa sumoylation par SUMO-1 (Matunis *et al.*, 1998). Chez les mammifères, RanGap1 sumoylée s'associe à RanBP2, une protéine du NPC étant à la fois une cible de la sumoylation et une E3 ligase (Matunis *et al.*, 1998). Au NPC, RanGap1 active l'activité GTPasique de RanBP2. Ces deux protéines, de par leur activité régulatrice du cycle Ran GTPase, sont impliquées autant dans les processus d'import que d'export de protéines au travers du NPC, via les importines et les exportines respectivement (Görlich et Kutay, 1999). De surcroît, des données *in vitro* suggèrent que la localisation SUMO-dépendante de RanGap1 au NPC est critique aux processus d'imports nucléaires (Harder *et al.*, 2004). De plus, une autre étude a démontrée que l'ajout d'un site consensus de sumoylation à une protéine est suffisant pour induire sa sumoylation dans des essais *in vitro*, toutefois *in vivo*, ces mêmes protéines ne sont sumoylées que si on leur ajoute un signal de localisation nucléaire (Rodriguez *et al.*, 2001). Ces données, ajouté au fait que l'association de certaines protéases SENPs au NPC (Melchior *et al.*, 2003) a aussi été démontrée, suggèrent un rôle actif et dynamique de la sumoylation dans la régulation des mécanismes de transport au noyau en général. Il a été proposé que les protéines puissent être sumoylées et/ou désomoylées durant leur passage au travers des pores nucléaires (Pichler et Melchior, 2002; Seeler et Dejean, 2003). À l'intérieur du noyau, l'état de sumoylation d'une protéine peut grandement influencer ses interactions, sa fonction et même sa localisation sub-nucléaire (Shih *et al.*, 2007).

2.3.9. Sumoylation et répression génique

Comme une grande majorité des protéines sumoylées sont des protéines nucléaires comme des facteurs de transcription, des corépresseurs et des co-activateurs, il

n'est donc pas surprenant que la sumoylation soit associée à la régulation de l'expression génique. En fait, bien qu'il existe quelques exemples où la sumoylation active l'expression génique (Rodriguez *et al.*, 1999), la modification par les protéines SUMOs est généralement associée à la répression de la transcription (Gill, 2005). D'après les connaissances actuelles, bien que les mécanismes moléculaires par lesquels la sumoylation agit pour réguler la transcription demeurent mal compris, il semble que la sumoylation puisse agir à plusieurs niveaux et constitue un processus très sophistiqué et spécifique de régulation de l'expression génique.

2.3.9.1. Régulation des facteurs de transcription

Tout d'abord, la sumoylation peut influencer la transcription génique en modifiant l'activité de certains facteurs de transcription et corépresseurs. En effet, la sumoylation peut favoriser le recrutement de corépresseurs/coactivateurs spécifiques en influençant les interactions protéines-protéines entre les facteurs de transcription, les corépresseur/activateurs et l'ADN. De plus, il a été observé que suite à leur sumoylation, plusieurs co-activateurs deviennent des co-répresseurs (Girdwood *et al.*, 2003).

Par exemple, plusieurs études ont suggéré un rôle important de différentes histones désacétylases (HDACs) dans la répression génique SUMO-dépendante. À cet effet, il a été démontré que la sumoylation influence l'activité répressive des HDACs surtout en favorisant leur interaction avec des substrats sumoylés. Par exemple, la sumoylation des co-activateurs p300 et CREB promouvoit leur interaction avec les HDACs, ces deux co-activateurs deviennent donc des co-répresseurs suite à leur sumoylation (Girdwood *et al.*, 2003). De plus, il a été démontré que la sumoylation

de l'histone H4, permet son interaction avec HDAC1 (Shiio et Eisenman, 2003). Les HDACs sont aussi elles-mêmes des cibles de la sumoylation. Par exemple, HDAC4 peut être sumoylée dans un processus impliquant la E3 ligase RanBP2 (Kirsh *et al.*, 2002). De plus, certaines HDACs, comme HDAC7, possèdent aussi une activité SUMO E3 ligase (Gao *et al.*, 2008).

La sumoylation peut aussi modifier la localisation cellulaire et sub-cellulaire des facteurs de transcription, ce qui permet de modifier leur disponibilité. D'abord, les mécanismes impliqués dans l'import nucléaire de nombreuses protéines, comme des facteurs de transcription, nécessite la localisation SUMO1-dépendante de RanGap1 au NPC. De plus, certains facteurs de transcription sont relocalisés au noyau suite à leur modification par les SUMOs. Chez les mammifères, il a été démontré qu'à l'intérieur du noyau, une partie des protéines modifiées par les SUMOs ou pouvant lier les SUMOs s'associent à plusieurs types de corps nucléaires. Le meilleur exemple consiste en la formation SUMO-dépendante des corps nucléaires de type PML, qui permet entre autre la séquestration de certains facteurs de transcriptions. Les corps PML seront traités plus en détails dans la prochaine section.

2.3.10. Sumoylation et corps PML

Les corps PML (PML-NBs) sont des micro-structures nucléaires hautement dynamiques composées uniquement de protéines. La principale composante des PML NBs est la protéine PML (promyelocytic leukaemia protein), dont il existe sept isoformes chez l'humain (Condemine *et al.*, 2006). Jusqu'à maintenant, les PML-NBs ont été associés à plusieurs fonctions comme la régulation du cycle cellulaire, la régulation de la transcription génique, la réponse aux dommages à

l'ADN, la sénescence et l'apoptose (Bernardi et Pandolfi, 2007). Récemment, il a été démontré que l'assemblage des PML-NBs dépend de la sumoylation des protéines PML. PML possède trois sites de sumoylation (Duprez *et al.*, 1999) en plus d'un site de liaison aux SUMOs (Shen *et al.*, 2006). Une fois sumoylées, les protéines PML peuvent s'associer entre elles et recruter plusieurs autres protéines sumoylées ou pouvant lier les SUMOs (Shen *et al.*, 2006). Il a été démontré que PML peut être modifié par les trois types de SUMOs (Kamitani *et al.*, 1998) et que la formation de chaînes par SUMO-3 serait cruciale pour l'assemblage des PML-NBs (Fu *et al.*, 2005). Il a d'ailleurs été démontré que la perte de PML ou l'expression d'une forme mutée ne possédant pas les lysines acceptrices des SUMOs, provoque une redistribution de protéines comme le régulateur transcriptionnel Sp100, le co-répresseur Daxx, et CBP (Cyclic AMP response element binding (CREB)-Binding Protein), normalement associées aux PML-NBs à l'intérieur du noyau (Zhong *et al.*, 2000).

Il a été démontré que les PML-NBs subissent des modifications au cours du cycle cellulaire qui affectent autant leur localisation, leur composition que leur fonction (Dellaire *et al.*, 2006). Les protéines SUMOs et Sp100 sont des éléments constitutifs des corps PML sauf en phase M (mitose) du cycle cellulaire. Les corps PML se retrouvent souvent associés à la chromatine (Eskiw *et al.*, 2004) et plusieurs études ont relatées un rôle des PML-NBs dans la régulation de la transcription (Kuo *et al.*, 2005). Les PML-NBs interagissent souvent avec la chromatine à des sites de transcription active dans des régions hautement acétylées (Wang *et al.*, 2004) et peuvent contenir plusieurs facteurs de transcription. Toutefois, les PML-NBs ont aussi été associés à la répression de la transcription génique (Zhang *et al.*, 2005). Il demeure incertain si ces différences sont dues majoritairement à différents PML-NBs formés par différentes isoformes de PML ou si l'hétérogénéité des complexes protéiques au sein des PML-NBs permette l'accomplissement d'une gamme de fonctions dépendamment de leur localisation,

des conditions physiologiques ou encore des phases du cycle cellulaire. Plusieurs mécanismes d'action ont été proposés. Par exemple, ces complexes multi-protéiques pourraient servir à séquestrer certaines protéines de manière à les empêcher d'accomplir leur fonction au niveau de l'ADN ou à l'opposé, à les recruter au bon endroit, au bon moment, avec les bons partenaires, au niveau de la chromatine (Bernardi et Pandolfi, 2007). D'autres études ont proposées que ces complexes puissent influencer la transcription indirectement en participant au remodelage de la chromatine et à l'établissement de domaines permissifs ou non à la transcription (Kumar *et al.*, 2007).

Enfin, certains ont proposé que les PML-NBs puissent être, avec les complexes du pore nucléaire, un des principaux sites actifs de sumoylation au sein d'une cellule (Saitoh *et al.*, 2006; Van Damme *et al.*, 2010). Cette théorie est supportée par la présence d'enzymes impliquées dans le processus de sumoylation et le nombre imposant de protéines pouvant être sumoylées dans les PML-NBs. Une fonction E3 ligase de la protéine PML a même été proposée (Seeler et Dejean, 2003). La sumoylation semble non seulement être au centre de la formation des corps nucléaires de type PML, mais pourrait aussi participer activement à la sumoylation d'autres substrats à l'intérieur du noyau.

2.3.11. Sumoylation et mitochondries

Il y a quelques années, Harder et collaborateurs ont observés qu'il existe un vaste réservoir de protéines conjuguées à SUMO-1 dans les mitochondries des cellules Cos7, suggérant que la sumoylation des protéines mitochondriales est une modification répandue (Harder *et al.*, 2004). Ces auteurs ont aussi démontré un rôle important de SUMO-1 dans la stabilisation de la GTPase apparentée aux

dynamines DRP-1 associée au processus de fission des mitochondries. Les mitochondries forment un réseau de filaments tubulaires interconnectés constamment en remodelage grâce à la succession de processus de fusion et de fission. Il a été démontré, que SUMO-1 se localise souvent aux sites de fissions mitochondriale et que DRP-1 interagit avec SUMO-1 et Ubc9 dans les cellules Cos7 (Harder *et al.*, 2004). La monosumoylation de DRP-1 par SUMO-1 stabilise DRP-1 et favorise la fragmentation mitochondriale (Harder *et al.*, 2004). De plus, il semble que la protéase SENP5 soit responsable du clivage de DRP-1/SUMO-1 et soit essentielle au maintien du métabolisme et de la morphologie des mitochondries (Zunino *et al.*, 2007). Plus précisément, SENP5 se localise au niveau du nucléolus dans les cellules en interphase, puis est exportée du noyau vers les mitochondries durant la transition de la phase G2 à la phase M entraînant la désomoylation d'une gamme de protéines mitochondriales (Zunino *et al.*, 2009). La perte de SENP5 provoque un arrêt du cycle cellulaire et corrèle aussi avec une augmentation de la production de radicaux libres oxygénés dans les mitochondries (Zunino *et al.*, 2007). L'étude de la sumoylation de DRP-1 dans les mitochondries a aussi menée à l'identification de MAPL (mitochondrial-anchored protein ligase) comme étant une E3 ligase mitochondriale (Braschi *et al.*, 2009). De plus, en situation d'apoptose, un rôle des protéines Bak et Bax dans la stimulation de la sumoylation de DRP-1 par SUMO-1 a été reporté (Wasiak *et al.*, 2007).

2.3.12. Sumoylation et pathologies

2.3.12.1. Cancer

Une augmentation de la sumoylation a été observée dans certains cancers. En effet, il a été démontré que les niveaux d'expression d'Ubc9 et de la E3 ligase PIAS3 sont augmentés dans divers types de cancers et que la surexpression d'Ubc9

stimule la prolifération cellulaire. À l'opposé, la protéine SENP1, qui favorise la désomoylation, a été retrouvée à des niveaux élevés dans certains types de cancer de la prostate et de la thyroïde. La sumoylation peut aussi influencer la tumorigenèse via la modification de nombreuses protéines ayant des fonctions anti-oncogéniques comme p53, pRB et p73.

2.3.12.2. Arthrite rhumatoïde

Il a été rapporté que dans les synoviocytes de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde (RA), Sumo-1 est up-régulé et recruté dans des corps PML. Ce phénomène a été associé à l'inhibition de l'apoptose médiée par le recrutement de molécules pro-apoptotiques comme DAXX dans les PML NBs. (Meincke *et al.*, 2007). Ce groupe a de plus démontré que ce phénomène semble associé à la transformation des synoviocytes RA entraînant la formation d'une pseudo-membrane synoviale, formée de cellules résistantes à l'apoptose, entre l'os et la prothèse chez les patients ayant subi un remplacement articulaire (Meinecke *et al.*, 2009).

2.3.12.3. Maladies neurodégénératives

À ce jour, l'implication de la sumoylation dans des pathologies a principalement été associée à la mort cellulaire dans plusieurs maladies neurodégénératives comme le Parkinson (Dorval et Fraser, 2006) et les maladies associées à l'expansion des répétitions de polyglutamines (Poly-Q) (Ueda *et al.*, 2002), qui incluent entre autre la maladie d'Huntington (Steffan *et al.*, 2004). Il a été démontré que la co-

expression de SUMO-1 et de la polyQ-atrophine-1 accélère l'agrégation des protéines et entraîne la mort par apoptose dans des modèles neuronaux (Terashima *et al.*, 2002). De plus, Ueda et collaborateurs ont démontré une augmentation de la sumoylation par SUMO-1 dans les neurones de patients souffrant de Poly-Q (Ueda *et al.*, 2002). Ces pathologies se caractérisent par une dégénérescence tissulaire et une mort cellulaire associée à l'accumulation de niveaux toxiques de certaines protéines dans des corps nucléaires (Meriin et Sherman, 2005) comme les PML NBs (Takahashi *et al.*, 2006). À cet effet, bien que l'implication de la sumoylation dans de telles pathologies commence seulement à être étudiée, il a été proposé que la sumoylation puisse influencer les mécanismes de dégradation via le protéasome en agissant de concert ou en s'opposant à l'ubiquitination (Bailey et O'Hare, 2005; Dorval et Fraser, 2007).

2.3.13. Potentiel thérapeutique

Comme plusieurs pathologies semblent être associées à une augmentation de la sumoylation, la mise au point d'inhibiteurs biochimiques ou pharmacologiques de cette voie, qui sont inexistantes pour le moment, pourrait servir au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Toutefois, étant donné le caractère non spécifique de cette modification, il pourrait s'avérer nécessaire de cibler plutôt les E3 ligases de la voie.

2.4. HYPOTHÈSE

L'accumulation aberrante de PHB-1 dans le noyau des chondrocytes articulaires pourrait être caractéristique des cellules OA. Une telle accumulation pourrait être causée par des mutations au niveau de PHB-1, par exemple au niveau du NES, et/ou au niveau des mécanismes régulant l'import ou l'export nucléaire de PHB-1, ainsi que par des modifications post-traductionnelles affectant la localisation cellulaire de PHB-1.

2.5. OBJECTIFS

#1 Confirmer et caractériser l'accumulation nucléaire de PHB-1 dans les chondrocytes articulaires arthrosiques versus sains.

#2 Déterminer par quels mécanismes cellulaires et/ou moléculaires PHB-1 s'accumule dans le noyau des chondrocytes articulaires des sujets OA, notamment par l'étude des modifications post-traductionnelles comme la sumoylation.

CHAPITRE 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1. Tissus humains

Le présent projet a obtenu l'approbation du Comité d'Éthique de la Recherche du CHU Sainte-Justine et de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont. Après avoir obtenu le consentement libre et éclairé des patients, les tissus humains provenant de chirurgies orthopédiques, obtenus en collaboration avec le Dr Partick Lavigne et l'hôpital Maisonneuve-Rosemont, ont été récoltés au CHU Sainte-Justine. Un total de 11 patients OA, 3 sujets sains, et un patient RA ont été utilisés dans cette étude. Les patients ont été choisis aléatoirement, le ratio est de 2 femmes pour 1 homme, et le degré de sévérité de la maladie a été évalué selon la classification histologique de Mankin (Mankin *et al.*, 1971).

Tableau II : Caractéristiques des patients utilisés pour l'étude clinique des chondrocytes articulaires humains. L'astérisque (*) indique les patients présentant une accumulation nucléaire de PHB-1. Ctrl : sujet sain, OA : ostéoarthrose, RA : arthrite rhumatoïde, F : femme, M : Homme

<i>Patients</i>	<i>Diagnostique</i>	<i>Sexe</i>	<i>Age</i>
1	Ctrl	F	16
2	Ctrl	M	18
3	Ctrl	F	72
4	RA	F	27
5	OA	F	81
6	OA	F	79
7	OA	M	45
8	OA	F	66
9	OA	F	64
10*	OA	M	74
11*	OA	F	83
12*	OA	M	81
13*	OA	F	86
14*	OA	M	76
15*	OA	F	52

3.2. Dérivation des chondrocytes articulaires humains

Le cartilage articulaire provenant de genoux de patients OA a été prélevé, coupé en petits morceaux et lavé deux fois dans du PBS 1X stérile pH 7,4 (Phosphate buffer saline : 0,137M NaCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄). Pour chaque patient, quelques morceaux ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% v/v, inclus dans des blocs de paraffine, puis conservés pour des analyses histologiques. Les morceaux de cartilage restant ont été incubés durant une heure à 37 °C avec agitation dans du D-MEM (Dulbecco's Modification Eagle's medium 1X : Wisent inc, St-Bruno, Québec, Canada) contenant 10% (v/v) de FBS (sérum fœtal de veau : Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada), 1% pen-strep et 1 mg/ml de pronase (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), puis digérés durant 4 à 6 heures à 37 °C sous agitation en présence de 2 mg/ml de collagénase (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) diluée dans du D-MEM complété de FBS et de pen-strep. Les tissu digérés ont été passés sur un tamis stérile, puis centrifugés à 215 x g durant 10 minutes. Les culots de chondrocytes ont été resuspendus dans un petit volume de milieu de culture et un comptage du nombre et de la viabilité cellulaire a été effectué à l'aide du Vi-Cell XR :cell viability analyser (Beckman Coulter : Mississauga, ON, Canada). Les cellules ont ensuite été mises en culture primaire à haute densité (2×10^6 cellules) dans des flasques T-75, puis passées dans des pétris 10 cm ou des labteks selon l'utilisation désirée. Les chondrocytes primaires ont ensuite été soit congelés et conservés dans l'azote liquide dans une solution de FBS contenant 10% DMSO, ou maintenus en culture au premier passage pour utilisation immédiate.

3.3. Lignées cellulaires

Tous les chondrocytes de patients, ainsi que les lignées cellulaires, MCF-7 et U2OS, ont été cultivées dans du D-MEM (Dulbecco's Modification Eagle's medium 1X : Wisent inc, St-Bruno, Québec, Canada) supplémenté de 10% (v/v) de FBS (sérum foetal de veau : Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) et de 100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada). Les cellules C28I2, une lignée de chondrocytes humains, ont été cultivées dans un milieu contenant un mélange de D-MEM et de F12 (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) dans un ratio 1:1, supplémenté de 10% FBS (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) et de 100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada). Les cellules C28I2 ont été généreusement fournies par le groupe du Dr Mary B. Goldring (Cornell University, New York) et les cellules MCF-7 ont été fournies par le groupe du Dr André Tremblay (Centre de recherche du CHU Ste-Justine). Toutes les cellules ont été cultivées à 37 °C dans un incubateur contenant 5% CO₂ et 95% d'air et le milieu de culture a été changé tous les 3 à 4 jours.

3.4. Plasmides et constructions

Les différents mutants de PHB-1 ont été construits à partir d'un clone commercial de la Prohibitine type sauvage (Origen) et clonées dans le vecteur d'expression rétroviral pLPC-3xFlag (Calabrese *et al.*, 2009), permettant de marquer les protéines d'un triple épitope Flag en N-terminal. Quatre constructions ont été effectuées dont une du type sauvage (PHB-1) et trois mutants : PHB1- Δ SBM dont un site putatif de liaison aux protéines Sumos (résidus 76 à 79) a été délété; PHB1-

Δ NES, manquant le signal d'export nucléaire (résidus 257 à 272) et PHB1-NLS, où le NES a été remplacé par un signal de localisation nucléaire. Les séquences nucléotidiques des différentes amorces utilisées sont indiquées dans le tableau III. Les plasmides pCDNA3-Myc-SUMO-1, pCDNA-Myc-SUMO-3 et pCDNA-HA-SUMO-2 ont été fournis par le laboratoire du Dr Christopher K. Glass (University of California, San Diego). Le plasmide pcDNA3.1-Gal4-Ubc9 a été fourni par l'équipe du Dr Muriel Aubry (Université de Montréal, Montréal). Les différents plasmides ont été transformés dans la souche DH5 α d'*E. coli* par un choc thermique de 45 secondes à 42 °C, suivi d'une incubation durant 16-18 heures à 37 °C avec agitation dans 450 ml de milieu 2YXT (12,5g extraits de levures; 12,5g bacto-tryptone/Litre d'eau) additionné de 50 ml de solution saline (0,17M KH₂PO₄, 0,72M K₂HPO₄). Les différents plasmides ont ensuite été isolés et purifiés par gradients de césium.

Tableau III : Séquence nucléotidiques des amorces utilisées pour la construction des différentes protéines fusions nécessaires aux essais de sumoylation *in vitro* ainsi que pour la surexpression de protéines. S : sens, AS : anti-sens.

Construtions	Plasmides	Amorces
PHB-1	pLPC-3xFlag	S: 5' GCGAATTCTGCTGCCAAAGTGTGGAGTCCATTGGC 3' AS: 5' GCCTCGAGTCACTGGGGCAGCTGAGGA 3'
PHB-1-NLS	pLPC-3xFlag	AS: 5' GCCTCGAGTCAGCCCACTTTGCGCTTTTTCTTGGGG TTCCGAGAGCGTGAGAGCTGGTA 3'
PHB-1-ΔNES	pLPC-3xFlag	AS: 5' GCCTCGAGTCAGTTCCGAGAGCGTGAGAGCTGGTA 3'
PHB-1-ΔSBM	pLPC-3xFlag	S: 5' CCACGTAATACTGGTAGCAAAGATTTACAGAATGTC 3' AS: 5' GCTACCAGTATTACGTGGTTCGAGAACGGCAGTCA 3'
GST-RanGap1	pGEX-5X-3	S: 5' ACGGATCCCCGCCTCGGAAGACATTGCCAAG 3' AS: 5' ATGAATTCGACCTTGTACAGCGTCTGCAGCAG 3'

3.5. Immunohistochimie

Les coupes de cartilage, montées sur des lames SuperFrost (Fisher Scientific, Hampton, NH, États-Unis) ont été déparaffinées en trempant les lames dans trois bains successifs de toluène, réhydratées dans quatre bains d'alcool à 100%, 90%, 70%, puis 50% et lavées dans un bain d'eau et un bain de PBS 1X pH 7,4, à raison de 5 minutes par bain. Les lames ont ensuite été chauffées 20 minutes à 65°C dans une solution de sodium citrate 0,01 mM pH 6.0, puis lavées 5 minutes au PBS 1X. Les lames ont ensuite été incubées 30 minutes dans une solution de PBS 1X contenant 0,3% triton, puis lavées 3 fois 5 minutes au PBS 1X. Après 30 minutes d'incubation dans du méthanol contenant 2% H₂O₂, les lames ont été déposées dans une chambre humide et les coupes ont été incubées 1 heure à température de la pièce dans une solution de blocage contenant du sérum normal de cheval (Vectasin ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Les coupes ont ensuite été incubées toute la nuit dans la solution de blocage contenant l'anticorps primaire (anti- PHB1 : Ab-2, Neomarker), lavées 3 fois au PBS 1X, puis incubées 45 minutes en présence de l'anticorps secondaire biotinylé, dilué dans la solution de blocage, et lavées de nouveau 3 fois au PBS 1X. Après incubation avec le complexe avidine-biotine (Vectasin ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA), le marquage a été révélé en utilisant le système diaminobenzidine (DAB) (Dako Diagnostics Canada Inc, Mississauga, ON, Canada) selon les instructions du manufacturier, donnant une coloration brunâtre à la protéine exprimée. Les coupes ont ensuite été contre-colorées à l'hématoxyline de Harris (Fisher Scientific, Hampton, NH, États-Unis) et montées d'une lamelle à l'aide du Permount (Fisher Scientific, Hampton, NH, États-Unis).

3.6. Extraction des protéines totales

Un pétri de cellules confluentes par condition été lavé deux fois dans du PBS 1X froid, puis récoltées et lysées dans un Tampon de Lyse (20 mM Tris-HCl pH7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% triton X-100, 2,5 mM Sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerolphosphate) contenant en plus un cocktail d'inhibiteurs de protéases 1X (Roche, Indianapolis, IN, USA) et de 25 mM NEM (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Après 30 à 60 minutes d'incubation à 4 °C avec agitation, les lysats protéiques ont été récolté suite à une centrifugation de 15 minutes à 11 200 x g.

3.7. Séparation des protéines nucléaires et cytoplasmiques

Entre deux et trois pétris de cellules confluentes (5×10^6 cellules/pétri) par condition ont été lavées deux fois dans du PBS 1X (10,1 mM Na_2HPO_4 ; 1,8 mM KH_2PO_4 ; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl) froid, grattées et transférées dans des tubes 1,5 ml. Après, une centrifugation de 5 minutes à 100 x g. Les culots de cellules ont été resuspendus dans 300 μl de tampon de lyse hypotonique (10 mM Hepes pH 7,9; 1,5 mM MgCl_2 ; 10 mM KCl; 1% NP-40; 0,5 mM DTT) complété avec un cocktail 1X d'inhibiteurs de protéases (Roche, Indianapolis, IN, USA) et 25 mM de NEM (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) incubées sur glace durant 25 minutes en vortexant tous les 3 à 4 minutes. Les lysats ont été centrifugés à 4 °C durant 5 minutes à 1200 x g, afin d'obtenir un culot contenant les noyaux cellulaires. Les surnageants, contenant les protéines cytoplasmiques ont été transférées dans de nouveaux tubes 1,5 ml, puis recentrifugés une deuxième fois à 4 °C durant 10 minutes à 1200 x g pour enlever les débris restants et minimiser la contamination

par les protéines nucléaires. Les surnageants ont été retransférés dans de nouveaux tubes 1,5 ml. Les culots de noyaux ont été resuspendus dans 8 ml de tampon de lyse nucléaire (50 mM Tris-HCl pH 7,6; 2 mM EDTA; 2 mM EGTA; 1 mM DTT; cocktail d'inhibiteurs de protéases 1X (Roche, Indianapolis, IN, USA), 25 mM NEM (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) contenant 0,1% triton 100-X et déposé sur 2 ml de coussin de sucrose (tampon de lyse nucléaire contenant 30% p/v de sucrose) dans des tubes de 15 ml. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 4 °C durant 50 minutes à 3500 x g dans une centrifugeuse de type Sorvall legend RT centrifuge. Le tampon a été décanté pour ne laisser au fond des tubes que les culots de noyaux purifiés, lesquels ont été resuspendus dans 50 à 100 µl de tampon Laemlli 4X (0,52 M Tris-HCl pH 6,8; 6,85% SDS; 3,3% β-mercaptoethanol; 20% glycerol) et bouillis durant 5 minutes. Après dosage des protéines par un essai de type Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 50 µg de protéines cytoplasmiques et nucléaires ont été séparés par SDS-PAGE et analysés par immunobuvardage de type Western.

3.8. Essais d'Immuno/Co-immunoprécipitations

Des cellules de type U2OS ont été transfectées avec pCMV4-Myc-Sumo1 en présence de pLPC-3xFlag-PHB-1 ou pLPC-3xFlag-PHB1-ΔSBM (15 µg d'ADN total) en utilisant la méthode de précipitation au calcium phosphate. Le milieu de culture a été changé 24 heures post-transfection et les cellules ont été récoltées 48 heures après la transfection. Les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS 1X froid, puis récoltées et lysées dans un Tampon de Lyse (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1% triton X-100; 2,5 mM Sodium pyrophosphate; 1 mM β-glycerolphosphate) contenant en plus un cocktail d'inhibiteurs de protéases 1X (Roche, Indianapolis, IN, USA) et de 25 mM NEM

(Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Après 30 à 60 minutes d'incubation à 4°C avec agitation, les lysats protéiques ont été récoltés par centrifugation de 20 minutes à 11 200 x g. Les immunoprécipitations ont été effectuées toute une nuit à 4 °C en présence de 1 à 2 mg de protéines totales et de l'anticorps primaire. Les anticorps suivants ont été utilisés : anti-PHB1 (N-20, Santa-cruz), anti-c-myc (MAB8865, Millipore). Les immunoprécipitats ont été récoltés par une heure d'incubation à 4°C en présence de protéines A/G sépharose (Amersham Biosciences Corp., Qc, Canada) et lavés 3 fois avec dans le tampon de lyse, 1 fois au PBS 1X et 1 fois avec de l'eau. Les précipitats ont été élués dans 70 µl de tampon Laemlli 3X, bouillis durant 5 minutes et 35 µl ont été utilisés pour analyse par immunobuvardage de type Western.

3.9. GST pull-down

Les protéines PHB-1 et RanGap1 ont d'abord été clonées dans le vecteur pGEX-5x-3. Les différentes protéines GST-fusion ont été produites en bactéries en utilisant la souche BL21 d'*E. coli*. Chacun des plasmides, incluant le vecteur vide, a été transformé par un choc thermique de 45 secondes à 42 °C. Les bactéries contenant chacun des plasmides ont été cultivées à 37 °C dans 400 ml de milieu 2YXT (16 g/l tryptone, 10 g/l extraits de levures, 5 g/l NaCl) jusqu'à une densité optique à 600 nm de 0.8, puis induites en présence de 0,4 mM d'IPTG pendant 4 heures à 30 °C.

Les culots de bactéries provenant d'une culture de 250 ml ont été resuspendus dans 3ml de tampon STE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) additionné de DTT (5 mM), de PMSF (1 mM) et d'un cocktail d'inhibiteurs de

protéases (Roche, Indianapolis, IN, USA). Ensuite, 1mg/ml de lysozyme (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) a été ajouté. Après 30-45 minutes d'incubation sur glace, 1,5% de sarcosyl (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) a été ajouté, puis une sonication a été effectuée à raison de 5 fois 10 secondes par tube. Les lysats cellulaires ont ensuite été transférés dans des tubes 2ml et centrifugés 10 minutes à 11 200 x g à 4 °C. Les surnageants ont été transférés dans de nouveaux tubes de 2 ml et 120 µl de billes glutathione/sépharose à 50% (Amersham Biosciences Corp., Qc, Canada) ont été ajoutés dans chaque tube. Après incubation avec agitation à 4 °C durant 2 heures, les billes ont été lavées 2 fois dans du tampon NETN (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5% NP-40), 1 fois dans du NETN 500 mM NaCl et 1 fois encore dans du NETN. Les billes ont finalement été resuspendues dans un volume égal de PBS 1X additionné d'inhibiteurs de protéases (Roche, Indianapolis, IN, USA). 5 µl de billes ont ensuite été analysé par SDS-PAGE, suivie d'une coloration au bleu de Coomassie.

3.10. Essais de sumoylation

Les protéines fusion GST-PHB1 purifiées par GST Pull-down ont été utilisées comme substrat pour les essais de sumoylation par SUMO-1. Les protéines GST et GST-RanGap1 ont été utilisées comme contrôles négatif et positif respectivement. Chaque réaction a été effectuée dans un volume total de 20 µl dans un tampon de réaction contenant 20 mM Hepes pH 7,5 et 5 mM MgCl₂, en présence de 7,5 µg/ml d'enzyme E1, de 50 µg/ml de E2, 50 µg/ml de SUMO-1 et de 20 mM ATP durant 1 heure à 37 °C. Tous les réactifs ont été obtenus commercialement (LAE Biotech International) et utilisés selon les instructions du manufacturier. Pour chaque

réaction, 5 μ l ont ensuite été séparés sur gel par SDS-PAGE et analysés par immunobuvardage de type Western.

3.11. Immunobuvardage de type Western

Tous les extraits protéiques ont été séparés par SDS-PAGE sur gels d'acrylamide à l'aide du système Mini-protean II (BioRad, Hercules, Californie). Les gels étaient constitués d'un gel de concentration, composé de 4% d'acrylamide (v/v) dans un tampon Tris 0,5 M pH 6,8 et d'un gel de résolution contenant entre 8 et 12,5% d'acrylamide (v/v) et du tampon Tris 1,5 M pH 8,8. La migration des protéines a été effectuée à température pièce sous une tension de 120 volts. Les protéines ont ensuite été transférées sur membranes de PVDF (Millipore) durant 90 minutes sous une tension de 100 volts. Une fois le transfert terminé, les membranes ont été prétraitées par une incubation de quelques secondes dans du méthanol, puis les membranes ont été incubées durant une heure dans une solution de blocage (PBS 1X, 0,02% Tween-20, 10% lait sans gras). Suite à trois lavage de 15 minutes dans du PBST (PBS 1X, 0,02% Tween-20), les membranes ont été incubées toute une nuit à 4 °C en présence de l'anticorps primaire (Tableau IV) dilué dans une solution de PBST contenant 3% BSA (Sérum d'albumine bovin : Bioshop) et 0,02% d'azoture de sodium. Le lendemain, les membranes ont été incubées en présence des l'anticorps secondaires couplés à la peroxidase (Thermo Scientific, Rockford, USA) dilués dans une solution de PBST contenant 5% lait sans gras durant une heure à température pièce. Après une heure de lavages dans du PBST, les signaux ont été révélés à l'aide du réactif ECL (Enhanced chemiluminescence substrate: PerkinElmer, Watlham, MA, USA) et détectés sur un film autoradiographie (Amersham Biosciences Corp., QC, Canada). Pour effectuer un deuxième

immunobuvardage sur une même membrane, les membranes ont été incubées dans une solution contenant 25 mM glycine pH 2,0 et 1% SDS (Sulfate de dodecyl de sodium) durant 45 minutes à température pièce avec agitation afin d'enlever les anticorps déjà présents. Les mêmes étapes ont ensuite été répétées à partir de l'étape de blocage.

Tableau IV : Anticorps utilisés pour les immunobuvardages de type Western

<i>Anticorps primaires</i>	<i>Origine</i>	<i>Compagnie</i>
anti-PHB-1 (Ab-1)	monoclonal, souris	Lab vision
anti-Sumo1 (#4930)	polyclonal, lapin	Cell Signaling
anti-PanSumo (#AP1299a)	polyclonal, lapin	Abgent
anti-Lamine A/C (#2032)	polyclonal, lapin	Cell signaling
anti-GAPDH (V-18)	polyclonal, chèvre	Santa cruz
anti-Flag (M2)	monoclonal, souris	Sigma
anti-RanGap1	monoclonal, souris	Zymed
anti-GST (M1)	polyclona, lapin	Millipore

3.12. Immunofluorescence

Des chondrocytes de patients OA et de sujets sains au premier passage ont été cultivés dans des labtek à 8 puits à raison de 10 000 cellules par puits. Après 24 à 48 heures d'incubation, les cellules ont été lavées 2 fois dans du PBS 1X et fixées dans une solution de paraformaldéhyde 3,7% et perméabilisées dans du PBS 1X contenant 0,1% Triton 100-X durant 10 minutes. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 30 minutes dans une solution de blocage (PBSA) contenant du PBS 1X supplémenté de 1% de sérum d'albumine bovin (BSA : BioShop,

Burlington, ON, Canada). Par la suite, les cellules ont été incubées en présence des anticorps primaires (Tableau V) dilués dans du PBSA durant 2 heures à 37 °C. Les anticorps secondaires (Alexa fluor : Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) dilués dans du PBSA ont ensuite été appliqués durant 1 heure à 37 °C. Après 3 lavages au PBS 1X, les lames ont été montées à l'aide d'une colle contenant du DAPI (Prolong Gold : Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), puis observées en microscopie confocale.

Tableau V : Anticorps primaires utilisés pour les essais d'immunofluorescence.

<i>Anticorps primaire</i>	<i>Origine</i>	<i>Compagnie</i>
anti-PHB-1 (Ab-1)	monoclonal, souris	Lab vision
anti-Sumo1 (A21C7)	monoclonal, lapin	Cell Signaling
anti-Sumo2/3 (18H8)	monoclonal, lapin	Cell Signaling
anti-PML (PG-M3)	monoclonal, souris	Santa Cruz

3.13. Microscopie confocale

Les lames ont été observées à l'aide d'un microscope confocal de type Zeiss LSM 510 Meta (Origine: Allemagne; Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada) à un grossissement de 630X. Les images ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Zeiss LSM image browser.

CHAPITRE 4 : RÉSULTATS

4.1. La Prohibitine s'accumule dans le noyau des chondrocytes articulaires d'un sous-groupe de patients OA.

L'expression de PHB-1 a été étudiée *in situ* par des essais immunohistochimiques réalisés sur des coupes histologiques de cartilage OA et sain à l'aide d'un anticorps anti-PHB-1. Tel que démontré à la figure 4a, on retrouve un fort marquage dans le noyau des chondrocytes contenus dans le cartilage OA. À l'opposé, aucun marquage nucléaire significatif n'a été observé dans les cellules des tissus sains (fig. 4a). La localisation subcellulaire de PHB-1 a ensuite été comparée *in vitro* par des essais d'immunofluorescence effectués sur des chondrocytes articulaires OA et sains maintenus en culture. Les résultats démontrent que dans les cellules provenant de cartilage sain, PHB-1 se retrouve majoritairement dans le cytoplasme, tandis que dans les chondrocytes OA, PHB-1 se localise non seulement dans le cytoplasme, mais aussi dans noyau (fig. 4b et 7). L'analyse par immunobuvardage de type Western des protéines nucléaires et cytoplasmiques a par la suite permis de confirmer cette tendance des chondrocytes OA à accumuler des niveaux élevés de PHB-1 nucléaire contrairement aux cellules saines et RA (fig. 5a et 6a). Plus précisément, l'étude des chondrocytes articulaires dérivés de 11 patients OA, un patient RA et trois sujets sains (tableau II), a permis d'identifier des niveaux élevés de PHB-1 nucléaire chez la moitié des patients OA testés, comparativement à aucun sujet sain et RA. Il est aussi intéressant de noter qu'en plus de la forme attendue de PHB-1 à environ 30 kDa, on retrouve dans les extraits nucléaires de patients OA, plusieurs bandes de plus haut poids moléculaires réagissant avec l'anticorps anti-PHB-1.

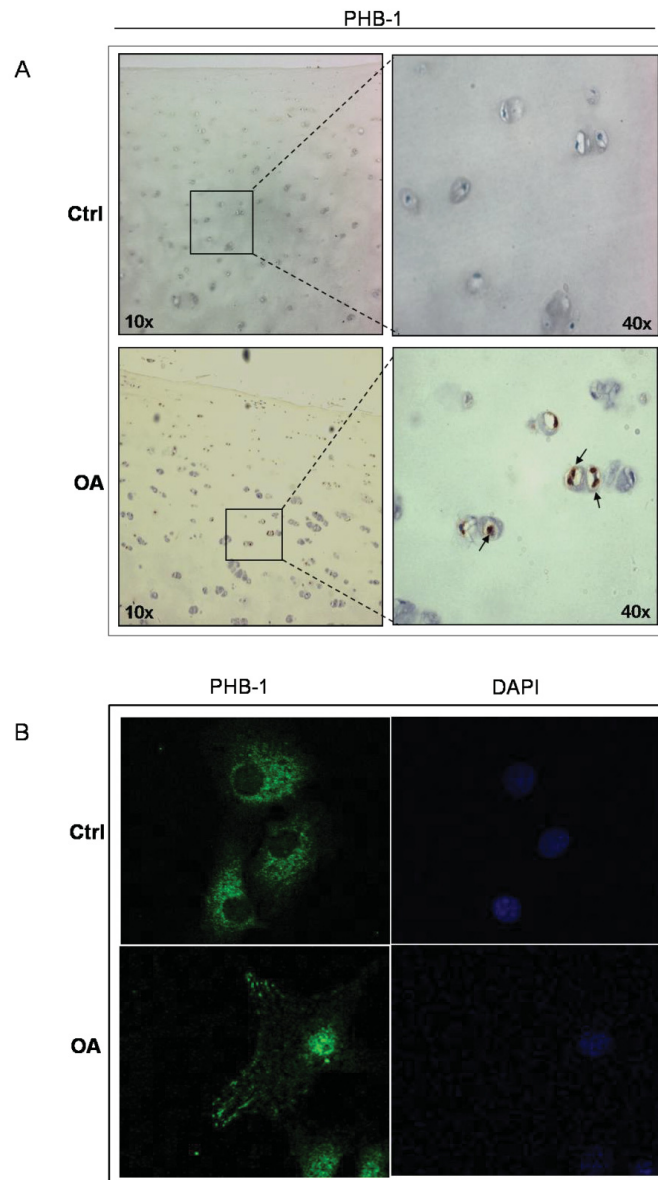


Figure 4 : La Prohibitine (PHB-1) s'accumule dans le noyau des chondrocytes articulaires de genoux OA par rapport aux sujets sains. A) Immunohistochimie sur des coupes de cartilage OA et sain dirigée contre PHB-1. B) Immunofluorescence, grossissement 630X, dirigée contre PHB-1 effectuée sur des chondrocytes articulaires de patients OA et contrôle en culture. Les cellules OA présentent une accumulation nucléaire de PHB-1, tandis que PHB-1 se localise principalement dans le cytoplasme des cellules contrôles. Le DAPI marque l'ADN et indique la position du noyau.

Comme le séquençage du gène codant pour PHB-1 chez plusieurs patients OA n'a révélé aucune mutation au niveau de la séquence codante, il a été postulé qu'une ou plusieurs modifications post-traductionnelles pourraient être à l'origine de l'accumulation nucléaire de PHB-1. Parmi les diverses modifications post-traductionnelles, la modification par les protéines SUMOs s'est avérée être un bon candidat, puisque la sumoylation est non seulement reconnue pour sa capacité à provoquer la translocation au noyau de certaines protéines, mais elle est aussi fortement associée à la répression de la transcription génique. Or, PHB-1 a d'abord été identifiée par notre groupe comme membre d'un complexe répresseur liant le promoteur du gène *Pitx1* dans les chondrocytes OA.

4.2. Les chondrocytes articulaires présentant une accumulation de PHB-1 au noyau, présentent aussi une accumulation nucléaire des protéines SUMOs

La sumoylation totale des protéines cytoplasmiques et nucléaires provenant de chondrocytes articulaires de patients a été évaluée par immunobuvardage de type Western à l'aide d'un anticorps anti-PanSUMOs. Les résultats ont démontrés que chez certains patients arthrosiques, on observe une augmentation de la sumoylation totale dans la fraction nucléaire et que ces patients correspondent précisément aux patients chez lesquels la protéine PHB-1 s'accumule fortement au noyau (fig. 5a). Une analyse plus approfondie a permis de mettre en évidence une augmentation particulière de la sumoylation par SUMO-1 dans les noyaux des cellules OA (fig. 6a). En plus de confirmer ce résultat, les essais d'immunofluorescences dirigés contre les protéines SUMOs ont permis de mettre en évidence que dans les cellules OA, SUMO-1 et SUMO-2/3 s'accumulent au noyau dans des structures définies (fig. 5b), tandis que dans les cellules provenant de cartilage sain, SUMO-1 est

localisé majoritairement en périphérie du noyau ainsi que dans le cytoplasme et SUMO-2/3 est majoritairement localisé de manière diffuse dans le noyau (fig. 5b).

Il a été observé, suite aux analyses par immunobuvardage de type Western, que les patients n'accumulent pas tous les mêmes niveaux de PHB-1 au noyau. Les analyses par immunofluorescence ont permis de démontrer que plusieurs populations de chondrocytes provenant d'un même échantillon de cartilage arthrosique présentent deux phénotypes distincts en ce qui concerne la localisation subcellulaire de PHB-1 et SUMO-1 en particulier. Tel que démontré à la figure 6b, les chondrocytes ne présentant pas d'accumulation de PHB-1, ne présentent pas non plus d'accumulation nucléaire de SUMO-1 et vice versa.

Comme PHB-1 et les protéines SUMOs s'accumulent dans le noyau des chondrocytes OA, et ce de manière cellule-spécifique (fig.6b), des essais de co-localisation par double marquage en immunofluorescences ont ensuite été effectués dans le but de déterminer si la protéine PHB-1 co-localise avec les protéines SUMOs dans les chondrocytes articulaires humains. Tel que démontré à la figure 7, PHB-1 co-localise principalement avec SUMO-1 dans le noyau des chondrocytes OA et légèrement en périphérie du noyau et dans le cytoplasme des cellules normales (fig. 7a). De tels essais ont aussi été effectués dans la lignée cellulaire MCF-7 afin de valider notre approche ainsi que les anticorps anti-PHB-1 utilisés, puisqu'il a été précédemment démontré que dans cette lignée PHB-1 est majoritairement nucléaire (Rastogi, 2006b). Les résultats démontrent que PHB-1 co-localise avec SUMO-1 dans certaines régions en périphérie du noyau et avec SUMO-2/3 à l'intérieur du noyau dans cette lignée de cellules provenant d'un cancer du sein (fig.8).

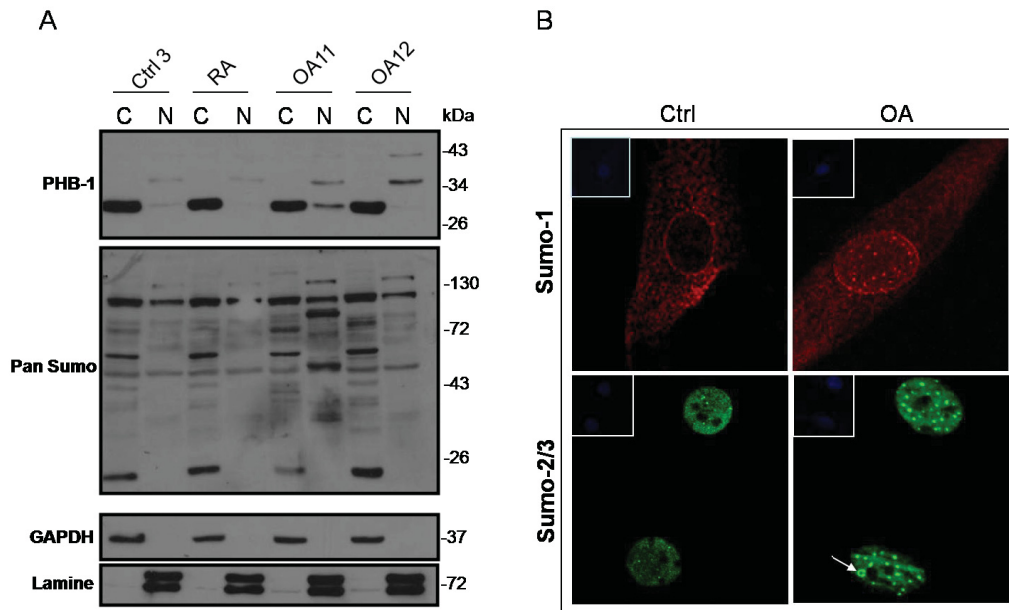


Figure 5 : Les protéines SUMOs s'accumulent aussi dans le noyau des chondrocytes articulaires des patients OA par rapport aux sujets sains. A) Immunobuvardages de type Western dirigés contre PHB-1 et les trois SUMOs (PanSUMOs), effectués à partir d'extraits nucléaires (N) et cytoplasmiques (C) provenant d'un sujet sain (cas traumatique non arthrosique), un patient RA et deux OA. Les cellules OA présentent une accumulation nucléaire de PHB-1. De plus, on observe une augmentation de la sumoylation totale dans les extraits nucléaires OA. Les deux marqueurs, soit GAPDH (cytoplasme) et Lamine A/C (noyau) démontrent que les fractions protéiques ont été efficacement séparées. B) Immunofluorescences dirigées contre SUMO-1 et SUMO-2/3, effectuées sur des chondrocytes articulaires de patients OA et contrôle. Les cellules OA présentent une accumulation des protéines SUMO-1 et SUMO-2/3 dans des structures nucléaires définies. Les encadrés indiquent la position du noyau coloré au DAPI. La flèche indique la présence d'un deuxième type de structure nucléaire parfois observée dans les cellules OA et contenant autant SUMO-2/3 que SUMO-1.

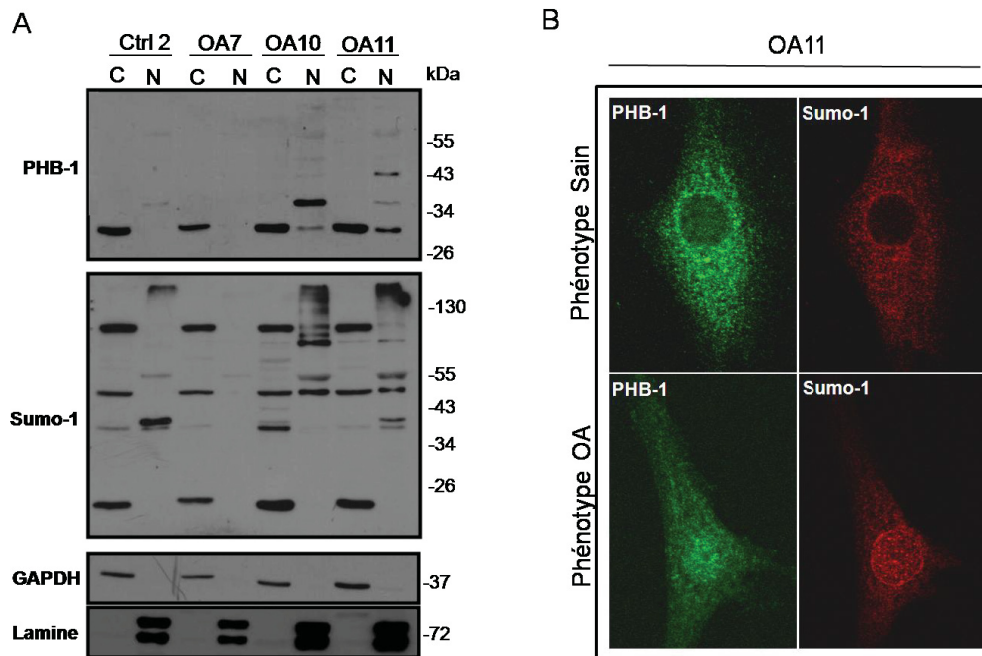


Figure 6 : La protéine SUMO-1 s'accumule fortement dans le noyau des chondrocytes articulaires des patients OA par rapport aux sujets sains. A) Immunobuvardages de type Western dirigés contre PHB-1 et SUMO-1, performés à partir d'extraits nucléaires (N) et cytoplasmiques (C) provenant d'un patient sain, trois OA. Les cellules OA présentant une accumulation nucléaire de PHB-1 démontrent aussi une augmentation de la sumoylation totale dans la fraction nucléaire. Les deux marqueurs, soit GAPDH (cytoplasme) et Lamine A/C (noyau) démontrent que les fractions protéiques ont été efficacement séparées. **B)** Immunofluorescences dirigées contre PHB-1 et SUMO-1, effectuées sur les chondrocytes articulaires du patient OA11. On observe la présence de chondrocytes présentant deux phénotypes distincts : soit les deux protéines sont absentes du noyau, soit elles s'accumulent toutes deux au noyau.

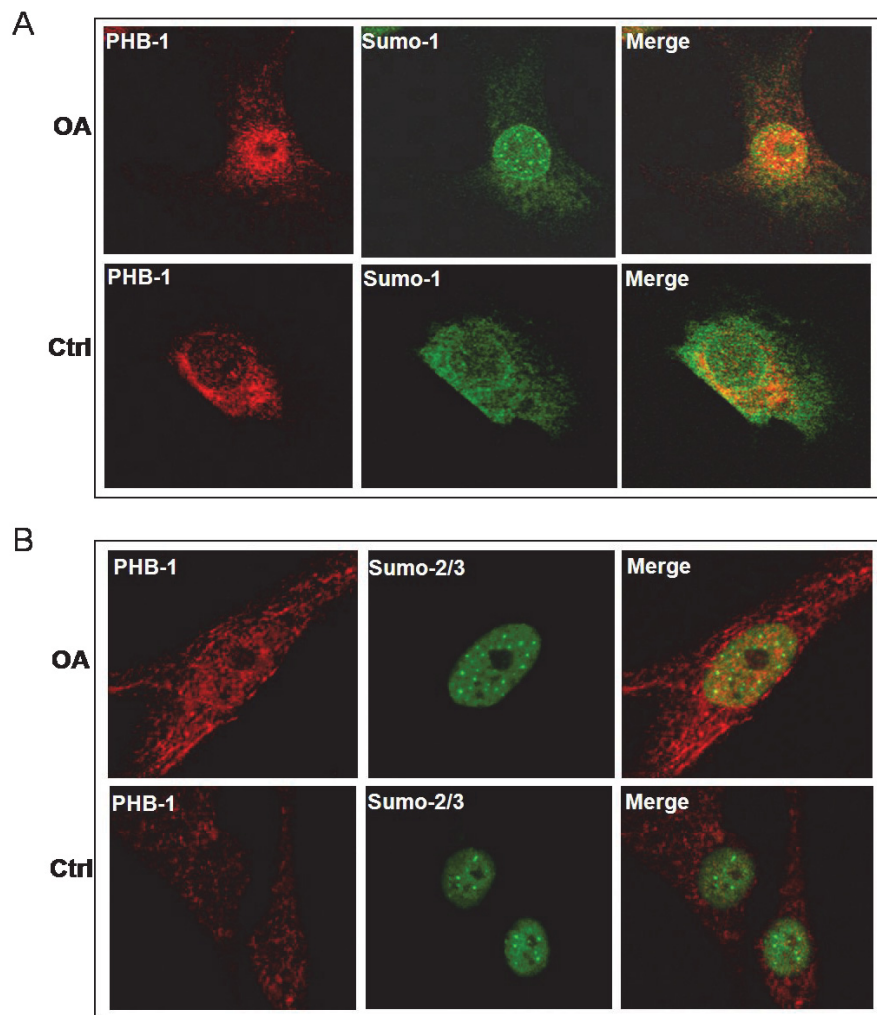


Figure 7 : Chez les patients OA, on observe une accumulation nucléaire de PHB-1 ainsi qu'une accumulation des protéines SUMOs dans des structures nucléaires définies. Des essais de doubles immunofluorescences dirigés contre PHB-1, SUMO-1 et SUMO-2/3 ont été réalisés sur des chondrocytes articulaires de patients OA et de sujets sains. Chez les patients OA, les protéines SUMOs s'accumulent dans des corps nucléaires, tandis que les patients témoins présentent peu ou pas d'accumulation des SUMOs dans des structures nucléaires définies. PHB-1 co-localise avec SUMO-1 majoritairement dans le noyau des cellules OA et en périphérie du noyau et dans le cytoplasme dans les cellules contrôle. Chez les cellules OA, PHB-1 co-localise avec SUMO-1 et SUMO-2/3 au niveau du noyau.

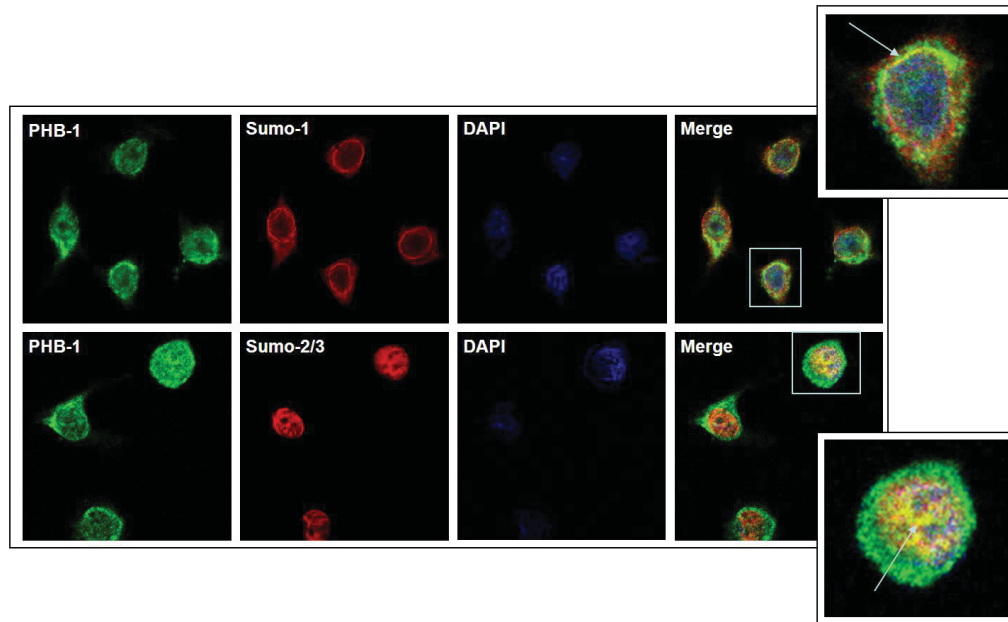


Figure 8 : PHB-1 co-localise aussi avec les protéines SUMOs dans la lignée MCF-7. Doubles immunofluorescences dirigées contre PHB-1 et SUMO-1 et PHB-1 et SUMO-2/3 dans la lignée MCF-7. Le DAPI marque l'ADN et indique la position du noyau et le panneau de droite (merge) est une colocalisation des trois autres. Dans les MCF-7, PHB-1 est majoritairement nucléaire et péri-nucléaire et colocalise avec SUMO-1 dans une partie localisée de la périphérie du noyau. PHB-1 colocalise avec SUMO-2/3 à l'intérieur du noyau.

4.3. Dans les chondrocytes OA, les protéines SUMOs s'accumulent dans des corps nucléaires de type PML

Dans le but de déterminer la nature des structures nucléaires formées par les SUMOs dans les chondrocytes OA, des essais de doubles immunofluorescences dirigés contre la protéine PML et les protéines SUMOs ont été effectués. Les résultats de la figure 9 démontrent que SUMO-1 et SUMO-2/3 co-localisent parfaitement avec la protéine PML au niveau des corps nucléaires observés dans les cellules OA. Dans les cellules contrôles provenant de sujets sains, les corps PML sont présents, mais la co-localisation de PML avec les protéines SUMO-2/3 est beaucoup plus faible (fig 9b) et on n'observe pas de co-localisation significative entre PML et SUMO-1 (fig. 9a). De plus, bien qu'aucune analyse statistique exhaustive n'ait été effectuée, les résultats illustrés à la figure 9 tendent à démontrer que dans les cellules OA, les corps PML sont légèrement plus nombreux et plus gros que dans les cellules normales. Certains chondrocytes OA présentent même une ou plusieurs structures nucléaires en anneaux de plus grandes tailles contenant autant les protéines SUMO-1 et SUMO-2/3 que PML (fig. 5b et 9a).

Bien que la protéine SUMO-1 co-localise aussi bien avec PHB-1 que PML dans le noyau des cellules OA (fig. 7a et 9a), les essais de double immunofluorescences n'ont pas démontrés de co-localisation marquée entre PHB-1 et PML. En effet, PHB-1 possède une localisation nucléaire plutôt diffuse dans les cellules OA (fig. 4b, 6a et 7a) et ne semble pas être recrutée spécifiquement dans les corps PML.

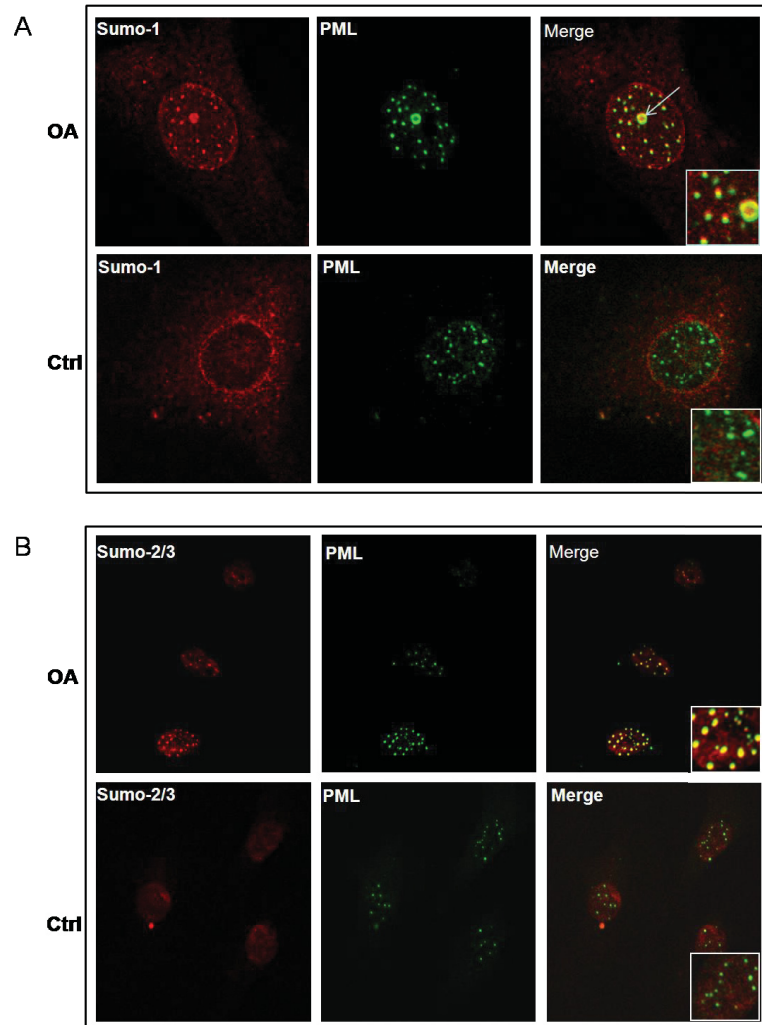


Figure 9 : Chez les cellules OA, les protéines SUMOs s'accumulent dans des corps nucléaires de type PML. Des essais de doubles immunofluorescences dirigés contre PML et SUMO-1 (A) et PML et SUMO-2/3 (B) ont été performés sur des chondrocytes articulaires de patients OA et contrôle. Dans les cellules OA, on observe une accumulation des protéines SUMO-1 et SUMO-2/3 au niveau des corps PML comparativement aux cellules saines. L'accumulation nucléaire protéines SUMO-2/3 semble associée à la formation des corps PML. À l'opposé, l'accumulation de SUMO-1 n'est pas nécessaire à la formation des corps PML. Dans les chondrocytes OA, on observe parfois la présence de corps PML de grande taille adoptant une structure en anneau, tel qu'indiqué par une flèche (Panneau A). SUMO-1 et SUMO-2/3 co-localisent avec PML dans ces structures.

4.4. PHB-1 n'est pas directement sumoylée par SUMO-1 *in vitro*, mais peut lier les protéines SUMO-1 via un motif SBM

Afin de tenter d'éclaircir la relation existant entre la protéine PHB-1 et SUMO-1, deux questions se devaient d'être adressées : la Prohibitine est-elle une cible de la sumoylation ou encore peut-elle lier les protéines SUMOs via un domaine de liaison aux SUMOs? D'abord, une analyse *in silico* de la séquence en acides aminés de PHB-1 a été effectuée dans le but de déterminer la présence de sites potentiels de sumoylation ou de liaison aux SUMOs. Tel que démontré à la figure 10, au moins 5 sites putatifs de sumoylation ont été identifiés par le logiciel SUMOplot (Mountzouris, 2005), mais les probabilités varient entre 32% et 50%. Comme la sumoylation peut être régulée par la présence d'événements de phosphorylation affectant des résidus Ser/Thr précédents les sites de sumoylations, une prédiction des sites de phosphorylation potentiels a aussi été effectuée à l'aide du logiciel NetPhos 2.0 (Blom *et al.*, 1999), mais aucun site de phosphorylation n'a été identifié à proximité des sites de sumoylation prédits. Toutefois, un site parfaitement consensus de liaison aux SUMOs a été identifié aux acides aminés 76 à 79.

Des essais de sumoylation ont ensuite été réalisés *in vitro* en présence de PHB-1 purifiée par GST pull-down, de SUMO-1, des enzymes E1 et E2 et d'ATP obtenus commercialement. La protéine RanGap1 a été utilisée comme témoin positif. Comme le démontrent les résultats de la figure 11, aucune bande correspondant à une forme sumoylée de PHB-1 n'a été détectée. De plus, aucune forme sumoylée de PHB-1 n'a été détectée, suite à l'immunoprécipitation de la protéine, et ce même en surexprimant PHB-1.

A Séquence en acides aminés de PHB1:

1 - MAAK(4)VFESIGK(11)FGLALAVAGGVNSALYNVDAGHRAVIFDRFRGVQD - 47
 48 - IVVGEETHFLIPWVQKPIIFDCRSRPRNVPVITGSKDLQNVNITLRILFRPVAS - 101
 102 - LPRIFT(108)S(109)IGEDYDERVLPSITTEILKSVVARFDAGELIT(141)QRELV - 146
 147 - SRQVS(151)DDLT(155)ERAATFGLILDDVSLTHLTFGK(177)EFTEAVEAKQV - 188
 189 - AQQEAERARFVVEK(202)AEQQKKAIIISAEGDSKAAELIANSLATAGDGLIEL - 238
 239 - RK(240)LEAAEDIAYQLSRSRNITYLPAGQSVLLQLPQ - 272

B Sites de sumoylation:

No.	Lysine	Probabilité
1	k4	0,44
2	k11	0,50
3	k177	0,32
4	k202	0,50
5	k240	0,44

C Sites de phosphorylation:

No.	Ser/Thr	Probabilité
1	S109	0,744
2	S151	0,976
3	T108	0,868
4	T141	0,894
5	T155	0,780

Figure 10 : Analyse *in silico* de la séquence protéique de PHB-1. **A)** Séquence en acides aminés de la Prohibitine. Les sites potentiels de phosphorylation sont indiqués en bleu, les sites potentiels de sumoylation sont en rouge et la présence d'un site consensus de liaison aux protéines SUMOs (SBM) est souligné en vert. **B)** Les sites de sumoylation ont été prédit à l'aide du logiciel SUMOplot et **C)** les sites de phosphorylation ont été identifiés à l'aide du logiciel NetPhos 2.0.

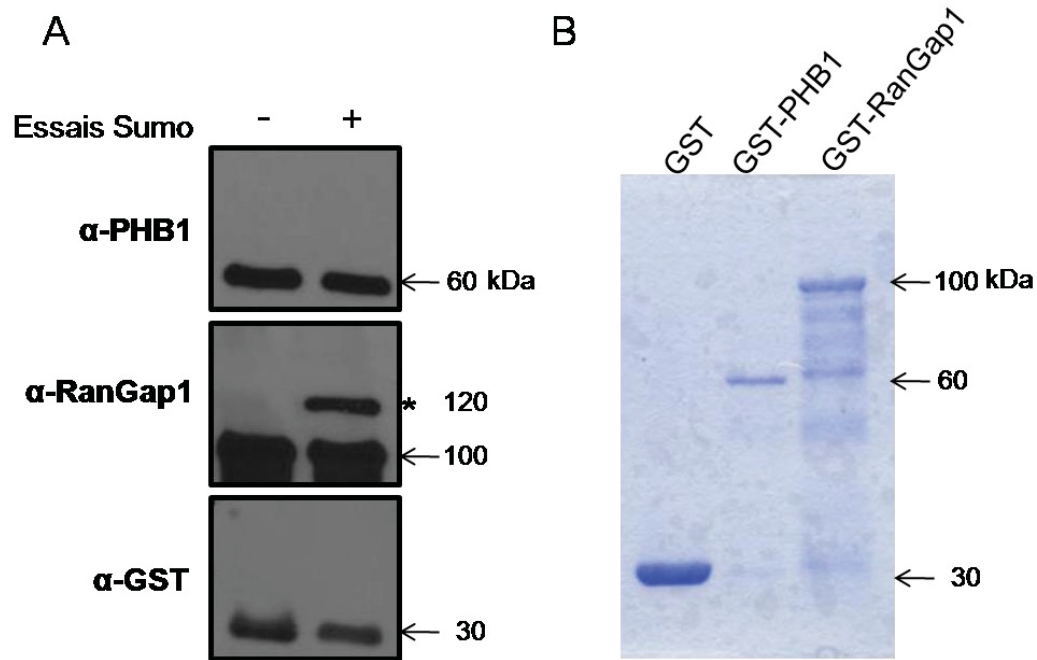


Figure 11 : PHB-1 n'est pas sumoylable par SUMO-1. Un essai de sumoylation a été effectué *in vitro* en présence de SUMO-1, des enzymes E1 et E2 et d'ATP. Les protéines fusion GST-PHB-1 purifiées par GST pull-down ont été utilisées comme substrat pour l'essai. Les protéines GST et GST-RanGap1 ont été utilisées comme contrôles négatif et positif respectivement. **A)** Les protéines purifiées par GST pull-down ont été analysées par SDS-PAGE sur gel d'acrylamide, suivi d'une coloration au bleu de Coomassie. **B)** Quatre fois moins de protéine GST a été utilisé pour l'essai par rapport aux protéines fusion. Les essais de sumoylation ont été analysés par immunobuvardage de type Western. Les flèches indiquent les protéines GST ou GST-fusion. L'astérisque (*) représente la forme sumoylée de GST-RanGap1.

Afin d'étudier l'interaction non covalente entre PHB-1 et les SUMOs, plusieurs constructions de la Prohibitine marquées d'un triple épitope Flag ont d'abord été générées, dont une de type sauvage et une où le SBM a été délété (fig. 12a). Comme les résultats précédents semblent démontrer que les protéines SUMOs et PHB-1 co-localisent majoritairement au niveau des noyaux, deux constructions ont été réalisées dans le but de forcer l'accumulation nucléaire de PHB-1, soit par délétion du NES localisé en C-terminal de PHB-1, ou en le remplaçant par un NLS (fig. 12a). Les différents plasmides ont été transfectés par infection virale dans des cellules C28/I2, une lignée de chondrocytes humains, puis les protéines cytoplasmiques et nucléaires ont été séparées. Afin de vérifier la stabilité et la localisation cellulaire des différentes protéines surexprimées, une analyse de l'expression protéique a été effectuée par immunobuvardage de type western à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-Flag. Les résultats démontrent que PHB1-NLS s'accumule légèrement plus au noyau que le type sauvage. Il est à noter que la protéine ne possédant plus de site de liaison aux SUMOs n'est que très faiblement détectée dans la fraction nucléaire (fig.12b).

La liaison de PHB-1 aux protéines SUMOs a ensuite été investiguée par des essais de co-immunoprécipitation. Pour ce faire, les protéines SUMOs, marquées d'un épitope myc ou HA, et les différentes constructions de PHB-1 ont été surexprimées transitoirement dans des cellules U2OS. Tel que démontré à la figure 12, en immunoprécipitant la protéine myc-SUMO-1 à l'aide d'un anticorps anti-c-myc, on détecte aussi PHB-1. Toutefois, cette interaction est fortement diminuée lorsque le SBM est délété (fig.12c). Dans le même type d'essais, aucune interaction n'a été détectée entre PHB-1 et SUMO-2/3.

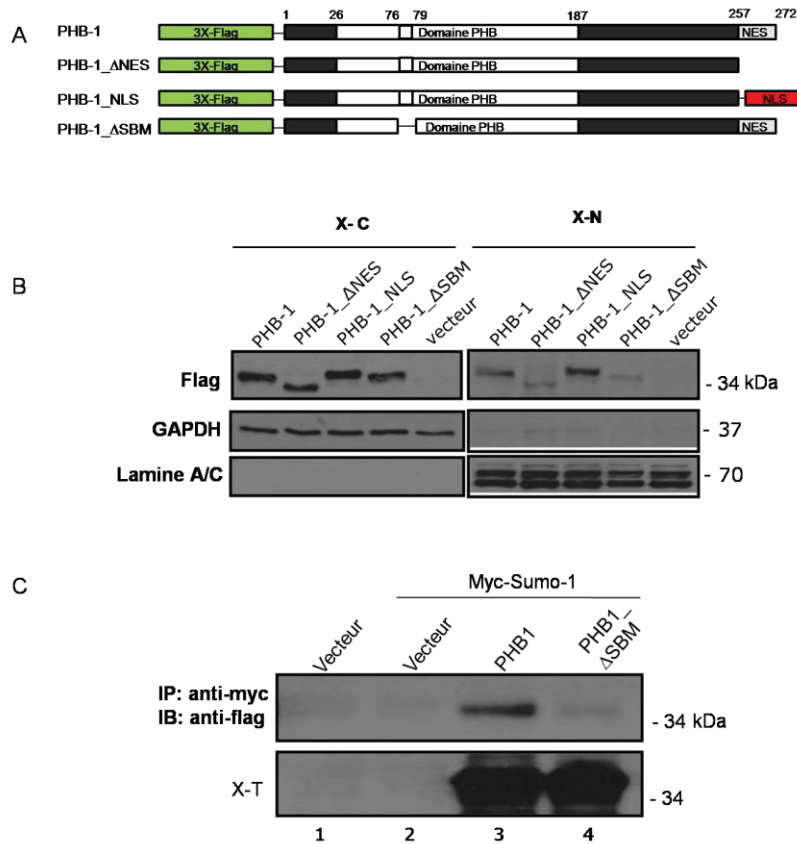


Figure 12 : PHB-1 peut lier les protéines SUMO-1 via un motif SBM situé dans le domaine PHB. **A)** Représentation schématique de différentes constructions générées pour l'étude de PHB-1. On y retrouve PHB-1 de type sauvage (PHB-1), un mutant où le signal d'export nucléaire a été délété (PHB-1_ΔNES), ou remplacé par un signal de localisation nucléaire (PHB-1_NLS), et un mutant où un domaine putatif de liaison aux SUMOs a été délété (PHB-1_ΔSBM). Toutes les constructions possèdent un triple épitope Flag en N-terminal. **B)** Des cellules C28/I2 ont été infectées avec chacune des constructions afin de produire des lignées stables. Les protéines nucléaires (X-N) et cytoplasmiques (X-C) ont été séparées, puis analysés par immunobuvardage de type Western en présence d'un anti-Flag (M2, Sigma). Les deux marqueurs, soit GAPDH (cytoplasme) et Lamine A/C (noyau) démontrent que les fractions protéiques ont été efficacement séparées. **C)** Des cellules de type HEK293 ont été co-transfectées avec myc-SUMO1 et PHB-1 ou PHB-1_ΔSBM. Des co-immunoprécipitations dirigées contre myc-SUMO1 ont été performées et analysées par immunobuvardage de type Western à l'aide de l'anticorps anti-Flag.

4.5. La sumoylation stabilise PHB-1 et semble être impliquée dans sa translocation/rétention au noyau

Dans le but d'étudier un rôle possible de la liaison de PHB-1 avec SUMO-1 dans les mécanismes d'import nucléaire de la Prohibitine, la protéine PHB-1 a d'abord été surexprimée en présence de l'enzyme Ubc9 et des différentes protéines SUMOs. Les résultats démontrent que la surexpression d'Ubc9 suffit à provoquer une augmentation majeure de l'expression de PHB-1 dans les cellules U2OS (fig. 13a). De plus, tel que démontré à la figure 13b, la stimulation de la voie de sumoylation provoque une accumulation nucléaire accrue de PHB-1 et PHB1-NLS, mais on dénote une absence quasi totale de PHB1- Δ SBM dans les extraits nucléaires. De plus, il est intéressant de noter que tout comme dans le cas des chondrocytes OA, plusieurs bandes de plus haut poids moléculaires apparemment spécifiques à PHB-1, apparaissent dans les extraits nucléaires des cellules transfectées avec PHB-1 ou PHB1-NLS en présence d'Ubc9 et de SUMO-1 (fig. 13b). Dans le même ordre d'idée, il a été observé que le traitement des cellules au MG132, un inhibiteur du système de dégradation du protéasome, provoque l'apparition d'un patron de bandes hautement similaire à celui obtenu suite à la stimulation de la voie de sumoylation (fig 13b et c.).

Enfin, comme tous les résultats de l'étude sur l'import/accumulation nucléaire de PHB-1 ont été obtenus à l'aide de formes surexprimées de PHB-1, des cellules U2OS ont été transfectées avec Ubc9 seul ou en présence des SUMOs afin de vérifier leur effet sur la protéine PHB-1 endogène. Les résultats obtenus démontrent que la stimulation de la voie de sumoylation semble favoriser la forme nucléaire de PHB-1 (fig.14).

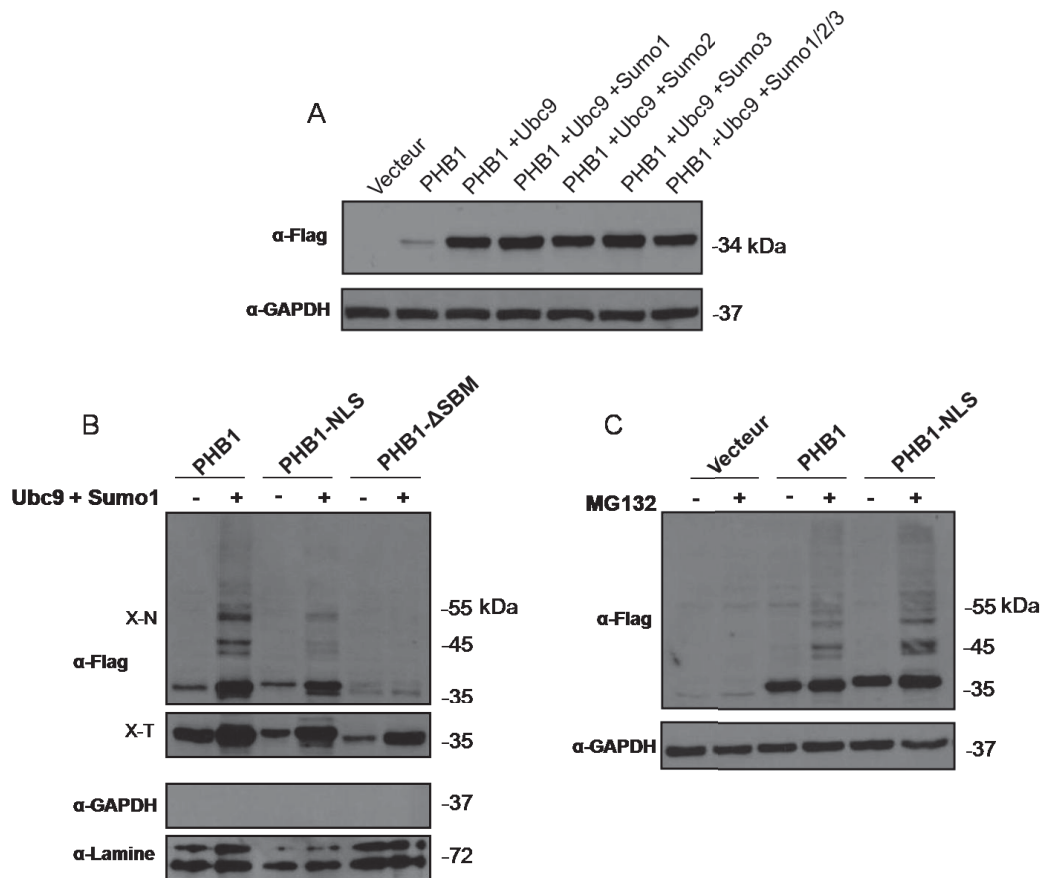


Figure 13 : La stimulation de la voie de sumoylation entraîne une stabilisation de la Prohibitine et promouvoit son accumulation au noyau dans la lignée cellulaire U2OS. A) Les cellules ont été transfectées avec le plasmide pLPC-3xFlag-PHB1 seul ou en combinaison avec différentes composantes de la voie de Sumoylation, puis les protéines totales ont été extraites. B) Les protéines nucléaires (X-N) ainsi que les protéines totales (X-T) ont été isolées à partir de cellules transfectées avec pLPC-3xFlag-PHB1, PHB1-NLS ou PHB1-ΔSBM en présence ou en absence de myc-SUMO1 et Ubc9. C) Les cellules transfectées avec le vecteur vide pLPC-3xFlag ou contenant les constructions PHB1 et PHB1-NLS ont été traitées avec le MG132 durant 4 heures, puis les protéines totales ont été extraites. Tous les extraits protéiques ont été analysés par SDS-PAGE, suivi d'un immunobuvardage de type Western en présence de l'anti-Flag (M2, Sigma). Les marqueurs cytoplasmique (GAPDH) et nucléaire (Lamine) démontrent que les protéines nucléaires ont été séparés efficacement.

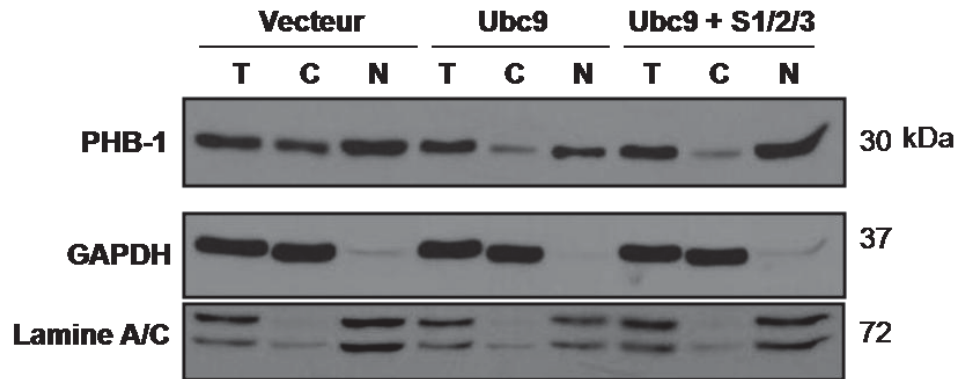


Figure 14 : La surexpression d'Ubc9 entraîne une diminution de la forme cytoplasmique endogène de PHB-1. Des cellules U2OS ont été transfectées avec Ubc9 seul ou en présence de pCMV4-myc-SUMO1, HA-SUMO2 et myc-SUMO3 ou avec le vecteur vide. Les protéines totales (T) ainsi que les extraits cytoplasmiques (C) et nucléaires (N) ont été isolés, puis analysés par SDS-PAGE, suivi d'immunobuvardages de type Western en présence des anti-PHB-1 (Ab-1, Neomarker) et anti-PHB-2 (Santa Cruz). Les marqueurs cytoplasmique (GAPDH) et nucléaire (Lamine) démontrent que les protéines ont été séparés efficacement.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION

L'importance de ce projet de recherche réside non seulement dans le fait qu'il a permis de mettre en évidence un premier mécanisme moléculaire associé à l'accumulation nucléaire de la protéine PHB-1, mais que cette étude s'insère dans un plus grand projet visant à déterminer le rôle de PHB-1 et du facteur de transcription Pitx1 dans la pathogenèse de l'OA.

5.1. Profil d'expression de PHB-1 dans les chondrocytes articulaires arthrosiques

La protéine PHB-1 est majoritairement associée à nombreuses fonctions mitochondriales (Kasashima *et al.*, 2008; Merkwirth et Langer, 2008), toutefois plusieurs groupes ont démontré que cette protéine peut transloquer au noyau et promouvoir la sénescence en favorisant le recrutement de corépresseurs spécifiques (Rastogi *et al.*, 2006a; Choi *et al.*, 2008). Les résultats de la présente étude démontrent pour la première fois que des niveaux anormalement élevés de la protéine PHB-1 s'accumulent dans le noyau des chondrocytes articulaires de certains patients atteints d'arthrose (fig.5 et 6). À l'opposé, aucune accumulation nucléaire accrue de PHB-1 n'a été observée dans les échantillons provenant de tissus sains, ou provenant de patient souffrant d'arthrite rhumatoïde, une pathologie apparentée, ce qui suggère que ce mécanisme est spécifique aux cellules OA. Suite à l'étude des chondrocytes articulaires provenant de 11 genoux arthrosiques, une accumulation nucléaire marquée de PHB-1 a pu être détectée chez plus de la moitié des patients OA (Tableau II). Le fait que cette anomalie n'affecte qu'un certain sous-groupe de patients reflète probablement l'hétérogénéité de l'OA et la présence d'étiologies multiples au sein d'une population de patients.

La population de patients OA choisis aléatoirement pour réaliser cette étude est composée de sept femmes et quatre hommes, ce qui est en accord avec les études ayant démontrées que l'OA affecte en moyenne deux femmes pour un homme (Felson *et al.*, 1987). En considérant que la protéine PHB-2 est importée au noyau de manière ER α -dépendante (Kashima *et al.*, 2006) et que cette dernière est capable d'antagoniser la fonction nucléaire de PHB-1 (He *et al.*, 2008), il serait tentant de penser que l'accumulation nucléaire accrue de PHB-1 couplé à une diminution de l'import nucléaire de PHB-2, dû à la baisse des estrogènes chez les femmes ménopausées, pourrait contribuer au développement de l'OA plus spécifiquement chez la femme. Toutefois, une présence accrue de PHB-1 nucléaire a été observée chez autant d'hommes que de femmes arthrosiques (Tableau II). Bien qu'ils demeurent à être confirmés à l'aide d'un plus grand nombre de patients, ces résultats suggèrent que l'accumulation au noyau de PHB-1 n'est pas associée à la baisse de l'effet chondroprotecteur des hormones chez les femmes ménopausées. Toutefois, il serait important de vérifier si les femmes incluses dans la présente étude étaient toutes ménopausées ou encore si elles prenaient une hormonothérapie. De plus, l'accumulation nucléaire de cette protéine a aussi été détectée dans les chondrocytes articulaires provenant de hanches OA (résultats non démontrés). Comme les hanches supportent un poids beaucoup moins important que les genoux, ces résultats suggèrent que l'accumulation au noyau de PHB-1 ne serait pas non plus un résultat de la réponse cellulaire des chondrocytes à la pression biomécanique.

5.2. L'accumulation nucléaire de PHB-1 corrèle avec une présence accrue de protéines sumoylées dans le noyau des chondrocytes OA

La sumoylation est une modification post-traductionnelle favorisant la translocation au noyau de certaines protéines (Pichler et Melchior, 2002) et cible surtout des facteurs de transcription et des corépresseurs/coactivateurs, menant généralement à la répression de l'expression génique (Gill, 2005; Garcia-Dominguez et Reyes, 2009). Dans ce contexte, un rôle de la sumoylation dans l'accumulation nucléaire de PHB-1 a été proposé.

Les analyses par immunobuvardage de type Western des extraits nucléaires de chondrocytes OA, a permis de mettre en évidence que les patients présentant une accumulation nucléaire de PHB-1, présentent aussi une sumoylation totale accrue au niveau de la fraction nucléaire (fig.5a et 6a). Malgré que les niveaux de lamine A/C indiquent une certaine variation dans la quantité des protéines nucléaires entre les patients, les essais d'immunofluorescence ont permis de confirmer l'accumulation nucléaire des protéines SUMOs dans les chondrocytes arthrosiques (fig. 5b) et plus particulièrement de SUMO-1 (fig.6). De plus, comme certaines populations de chondrocytes dérivées d'un même tissu OA étaient constituées d'un mélange de cellules accumulant ou non PHB-1 au noyau, dans différentes proportions selon les patients, il a pu être déterminé que l'accumulation de SUMO-1 et de PHB-1 se produit de manière cellule-spécifique (fig.6b) et que ces deux protéines co-localisent dans le noyau des chondrocytes OA (fig.7). La présence des deux protéines au même endroit au même moment suggère une interaction de ces deux protéines dans le noyau des cellules OA, ce qui a été confirmée par co-immunoprécipitation (fig.12c).

La présence de populations mixtes de chondrocytes présentant deux phénotypes distincts au sein d'un même échantillon de cartilage arthrosique (fig.6b) est probablement à l'origine des variations des niveaux de PHB-1 et de sumoylation totale détectés par immunobuvardage de type Western dans la fraction nucléaire entre les différents patients (fig. 5a et 6a). La présence de deux types de chondrocytes dans le cartilage OA pourrait s'expliquer de différentes façons. D'abord, l'OA est une maladie hétérogène non seulement entre les différents patients et les différentes articulations, mais aussi au niveau intra-articulaire, ce qui implique qu'au sein d'une même articulation arthrosique, tout le cartilage n'est pas affecté de manière uniforme (Brandt *et al.*, 2003). Toutefois, la méthode d'extraction des chondrocytes articulaires utilisée dans cette étude, combinait autant les zones saines qu'endommagées du cartilage. Il est donc possible que les chondrocytes situés dans des zones hautement affectées du cartilage présentent un phénotype différent des cellules situées dans les zones saines, s'apparentant davantage aux tissus contrôles. On ne peut pas non plus exclure la possibilité que l'accumulation nucléaire de PHB-1 et des SUMOs soit associée aux stades plus avancés d'arthrose et que le double phénotype observé reflète le caractère progressif de cette maladie. Enfin, il a été démontré qu'il existe au moins trois types de chondrocytes dans le cartilage arthrosique (Kouri *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 2009). Il est donc possible de penser que l'accumulation nucléaire de ces protéines soit spécifique à un type particulier de chondrocytes.

5.3. La sumoylation favorise l'accumulation nucléaire de PHB-1 dans la lignée cellulaire U2OS

Afin de mieux caractériser la relation existant entre PHB-1 et les protéines SUMOs, une analyse *in silico* de la séquence protéique de PHB-1 a d'abord été effectuée et

a permis d'identifier cinq sites potentiels de sumoylation, mais associés à des probabilités relativement faibles (fig.10). Toutefois, comme un nombre important de protéines sont sumoylées à des sites non consensus (Figuroa-Romero *et al.*, 2009), il demeure difficile à ce jour de prédire de manière fiable la présence de sites de sumoylation par une simple analyse de séquence. Des essais de sumoylation *in vitro* ont par la suite démontrés que PHB-1 n'est pas modifié de manière covalente par SUMO-1 (fig.11). On ne peut toutefois pas exclure la possibilité que certaines conditions essentielles à la réaction ne soient pas remplies par les paramètres *in vitro* de l'expérience, par exemple la présence de SUMO-2/3, d'une E3 ligase, ou d'un mécanisme de régulation impliquant une phosphorylation. Il est aussi possible que PHB-1 puisse être sumoylée par SUMO-2/3, une possibilité qui demeure à être testée.

La présente étude suggère un rôle des interactions protéines-protéines médiées par SUMO-1 dans l'accumulation nucléaire de PHB-1. En effet, bien que PHB-1 ne semble pas être une cible directe de la sumoylation, un site parfaitement consensus de liaison aux protéines SUMOs (Song *et al.*, 2004) a été identifié au sein du domaine PHB de PHB-1 (fig.10 et 12a). De plus, en utilisant la lignée cellulaire ostéoblastique U2OS, il a été démontré que PHB-1 peut lier la protéine SUMO-1 de manière non covalente et que cette interaction est perdue lorsqu'on délète les acides aminés 76 à 79 de PHB-1 correspondant au domaine de liaison aux SUMOs (fig.12c). Il a de plus été observé que la stimulation de la voie de sumoylation provoque une accumulation nucléaire accrue de PHB-1 (fig.13b) et que cette accumulation nucléaire est abolie lorsque le SBM est absent (fig.13b). Ces résultats suggèrent que le SBM de PHB-1 est nécessaire à l'import ou la rétention nucléaire de cette protéine. Il reste toutefois à déterminer si ce motif est suffisant pour l'accumulation au noyau de PHB-1. De plus, étant donné que la sumoylation de certaines protéines nécessite leur liaison non covalente aux protéines SUMOs via un SBM (Knipscheer *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009), on ne peut exclure la

possibilité que la sumoylation directe de PHB-1 soit aussi impliquée dans son import ou accumulation nucléaire.

Ces résultats correspondent à une première piste vers l'élucidation des mécanismes impliqués dans la régulation de l'import ou de la rétention nucléaire de PHB-1. Jusqu'à maintenant, quelques études ont suggérées un mécanisme d'export nucléaire de PHB-1 s'effectuant de manière CRM1-dépendante (Fusaro *et al.*, 2003; Rastogi *et al.*, 2006), mais aucun mécanisme d'import n'a été proposé jusqu'à ce jour. Une des limitations de cette étude mécanistique réside toutefois dans le fait que tous les résultats précédents ont été obtenus à l'aide de formes surexprimées de PHB-1. Bien qu'un résultat préliminaire ait permis de démontrer un certain effet de la surexpression d'Ubc9 sur la localisation cellulaire de la protéine PHB-1 endogène (fig.14), il serait important de valider ces résultats, par exemple en vérifiant l'impact de l'inhibition de la sumoylation totale, via la surexpression d'un mutant dominant négatif d'Ubc9 ou de la protéine virale Gam1 (Boggio *et al.*, 2007), sur la localisation cellulaire de PHB-1.

5.4. Prohibitine et pathogenèse de l'OA

Le présent projet de recherche propose donc que la sumoylation accrue au sein des chondrocytes arthrosiques puisse être responsable de l'accumulation nucléaire anormale de PHB-1 dans les cellules OA. Les résultats de l'étude mécanistique effectuée dans la lignée ostéoblastique U2OS, supportent ces observations et suggèrent que l'accumulation nucléaire de PHB-1 s'effectuerait via son interaction non covalente avec Sumo-1. Il est possible qu'une sumoylation accrue favorise le recrutement de PHB-1 au niveau du complexe du pore nucléaire, qui est associé à

de nombreuses protéines sumoylées comme RanGap1 (Matunis *et al.*, 1998) et la Sumo E3 ligase RanBp2 (Pichler *et al.*, 2002), favorisant ainsi l'import nucléaire subséquent de PHB-1. Ou encore, il est possible que la modification par les protéines Sumos agissent plutôt de manière à provoquer une rétention nucléaire de PHB-1, par exemple en masquant le NES de PHB-1 ou encore en favorisant l'interaction stable de PHB-1 avec d'autres protéines nucléaires. La présence accrue de PHB-1 nucléaire favoriserait ensuite le recrutement de corépresseurs spécifiques au promoteur du gène *pitx1*, menant à l'inhibition de sa transcription et au développement de l'OA (Moreau *et al.*, 2004; Picard *et al.*, en préparation; Pellicelli *et al.*, en préparation).

De plus, étant donné les fonctions mitochondriales essentielles attribuées à PHB-1 (Kasashima *et al.*, 2008; Merkwirth et Langer, 2008), il est possible que sa rétention au noyau puisse aussi avoir des effets délétères sur le métabolisme des mitochondries. Ces résultats seraient les premiers au niveau moléculaire permettant de réconcilier et d'expliquer un grand nombre d'observations publiées sur les anomalies morphologiques et fonctionnelles des mitochondries dans l'OA (Terkeltaub *et al.*, 2002; Maneiro *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2004). Une telle dysfonction mitochondriale risquerait d'augmenter la production de radicaux libres oxygénés (stress oxydatif), pouvant aussi contribuer au développement de l'OA (Blanco *et al.*, 2004).

5.5. Sumoylation et pathogénèse de l'OA

Les résultats du présent projet de recherche ont aussi permis de démontrer que dans les chondrocytes OA, les protéines SUMO-1 et SUMO-2/3 s'accumulent dans des

structures correspondant à des corps nucléaires de type PML (PML NBs) (fig.9). La formation des corps PML semble nécessiter l'accumulation des SUMO-2/3 (fig.9b), ce qui est en accord avec une étude ayant démontré que la formation de chaînes par Sumo-3 est essentielle à la formation des corps PML (Fu *et al.*, 2005). Toutefois les PML NBs sont présents même en absence d'accumulation nucléaire de SUMO-1 (fig.9a). L'augmentation de la sumoylation totale par SUMO-1 dans les extraits nucléaires de chondrocytes OA, telle qu'observée par immunobuvardage de type Western, semble donc être associée, du moins en partie, au recrutement de protéines associées à SUMO-1 dans des corps PML. Bien qu'aucune analyse statistique exhaustive n'ait été effectuée, l'accumulation nucléaire de SUMO-1 dans les cellules OA semble affecter la taille des PML NBs davantage que leur nombre au sein d'une cellule (fig.9a). Ces résultats suggèrent que dans les chondrocytes OA, il y aurait un recrutement de protéines sumoylées par, ou pouvant lier SUMO-1 dans les corps PML existants, plutôt que la formation de nouveaux PML NBs. La protéine PML est la principale cible de la sumoylation dans les corps PML (Shen *et al.*, 2006), toutefois les protéines SUMO-1 s'accumulent en périphérie de ces structures (fig.9a), ce qui suggère que l'augmentation de la taille des PML NBs n'est pas due à un recrutement de la protéine PML elle-même, mais bien au recrutement d'autres protéines sumoylées ou interagissant avec SUMO-1.

Quelques études ont rapportées des observations semblables dans divers types cellulaires, comme les cellules hépatiques Hep2 (Bailey et O'Hare, 2005), les synoviocytes (Meincke *et al.*, 2007) et les neurones (Terashima *et al.*, 2002). En effet, il a été démontré que dans les synoviocytes de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde (RA), SUMO-1 est sur exprimée et recrutée dans des corps PML. Ce phénomène a été associé à la transformation cellulaire par inhibition de l'apoptose via le recrutement de molécules pro-apoptotiques dans les PML NBs. (Meincke *et al.*, 2007; Meincke *et al.*, 2009). Bien que ce phénomène n'ait pas été observé dans

les cellules de patients OA, les résultats de ces études supportent un rôle potentiel de la sumoylation dans la pathogenèse des maladies arthritiques.

De plus, plusieurs études ont aussi établis une relation entre l'accumulation des protéines SUMOs dans des structures nucléaires définies, comme les PML NBs et certains types de corps d'inclusions, dans plusieurs maladies neurodégénératives (Ueda *et al.*, 2002; Dorval et Fraser, 2007). À cet effet, il existe un parallèle intéressant entre les maladies neurodégénératives et l'OA, puisque ces deux pathologies se caractérisent par une apparition tardive de la maladie, dont la prévalence augmente avec l'âge. De plus, ces deux maladies sont associées à une dégénérescence tissulaire progressive médiée, du moins en partie, par la mort de cellules post-mitotiques qui sont susceptibles d'accumuler avec le temps d'importantes quantités de protéines dysfonctionnelles. Il a d'ailleurs été observé que dans certaines populations de neurones, il s'accumule avec le temps des quantités toxiques de protéines dans des corps nucléaires, entraînant la mort cellulaire par apoptose et la neurodégénération (Terashima *et al.*, 2002). Il a été démontré que les protéines, SUMOs, PML ainsi que les ubiquitines se retrouvent toutes au sein des ces agrégats, et considérant le rôle supposé des PML NBs dans l'intégration des voies d'ubiquitination et de sumoylation (Bailey et O'Hare, 2005), il a été proposé que la sumoylation pourrait agir de manière à compétitionner ou altérer les mécanismes de dégradation par le protéasome dans les maladies neurodégénératives (Dorval et Fraser, 2007).

Dans ce contexte, PHB-1 semble s'accumuler au noyau sous plusieurs formes modifiées dans le noyau des chondrocytes OA (fig.5a et 6a), aussi bien que dans les cellules U2OS dans lesquelles on surexprime Ubc9 et SUMO-1 (fig.13b). Il est à noter que le même patron de bande est obtenu en traitant les cellules avec un inhibiteur du protéasome (fig.13c). Bien que la nature exacte de ces bandes de plus hauts poids moléculaires n'ait pas été identifiée par cette étude, elles pourraient

correspondre à des formes sumoylées, ubiquitinées ou encore à une combinaison de ces deux modifications. Ces résultats pourraient suggérer que l'augmentation de la sumoylation dans les chondrocytes OA, puissent contribuer à l'accumulation nucléaire de PHB-1 en empêchant la dégradation de cette dernière par le protéasome. Cette hypothèse pourrait facilement être testée par la détection de PHB-1 suite à une immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps anti-ubiquitine. L'analyse des niveaux totaux de protéines ubiquitinées par immunobuvardage de type Western et par immunofluorescence pourrait ensuite nous renseigner d'avantage sur l'impact d'une sumoylation accrue sur l'accumulation de protéines ubiquitinées, ainsi que leur relation avec les PML NBs dans les chondrocytes arthrosiques.

**CHAPITRE 6 : CONCLUSION ET
PERSPECTIVES**

En conclusion, la présente étude a d'abord permis de démontrer pour la première fois que PHB-1 s'accumule dans le noyau des chondrocytes articulaires chez la moitié des patients souffrant de gonarthrose. De plus, il a été démontré que l'accumulation nucléaire de PHB-1 corrèle avec une augmentation de la sumoylation totale dans le noyau des cellules OA. Bien que les essais de sumoylation *in vitro* tendent à démontrer que PHB-1 n'est pas une cible de la sumoylation par SUMO-1, ces deux protéines co-localisent dans les chondrocytes articulaires humains et les essais de co-immunoprécipitations ont démontrés que ces deux protéines peuvent interagir l'une avec l'autre via un motif de liaison aux SUMOs localisé dans le domaine PHB de PHB-1. De plus, il a été observé que la stimulation de la voie de sumoylation par surexpression de l'enzyme Ubc9 et de SUMO-1 dans la lignée U2OS, entraîne une accumulation nucléaire accrue de la Prohibitine, qui dépend de la présence de son site de liaisons aux SUMOs.

En considérant ces résultats, ce projet de recherche propose que l'augmentation de la sumoylation observée dans les chondrocytes arthrosiques puisse être responsable de l'accumulation nucléaire accrue de PHB-1. Bien que ces résultats nécessitent d'être confirmés par l'analyse d'un plus grand nombre de patients, les résultats obtenus dans la lignée ostéoblastique U2OS supportent cette hypothèse et suggèrent que l'accumulation nucléaire de PHB-1 s'effectuerait par des interactions protéines-protéines via les protéines SUMOs. Dans le noyau, une sumoylation accrue pourrait favoriser davantage l'interaction stable de PHB-1 avec d'autres co-répresseurs spécifiques.

Afin d'en apprécier l'ampleur, ce projet se doit d'être placé dans son contexte et considéré conjointement aux résultats de l'étude de la régulation transcriptionnelle de *pitx1* par PHB-1 (Pellicelli *et al.*, article en préparation) et de l'importance fonctionnelle de la perte de *pitx1* dans le développement de l'OA (Picard *et al.*, article en préparation) effectuées par deux étudiants au doctorat dans le laboratoire

du Dr Moreau. Collectivement, ces résultats témoignent d'un nouveau pathomécanisme conduisant au développement de l'OA et impliquant la dérégulation de PHB-1 et Pitx1 via une augmentation de la sumoylation. À plus long terme, une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait conduire au développement d'un premier outil diagnostique permettant une meilleure classification des patients et potentiellement permettre d'identifier les individus à risque de développer l'OA de façon précoce. Comme PHB-1 se retrouve dans toutes les cellules humaines, une prédisposition génétique affectant cette protéine pourrait être détectée à partir de cellules contenues dans différents fluides biologiques facilement accessibles comme le sang. De plus, la caractérisation de mécanismes moléculaires conduisant au développement de l'arthrose primaire pourrait permettre le développement d'outils pharmacologiques spécifiques permettant de ralentir et même prévenir la progression de cette maladie.

À plus court terme, il serait intéressant d'investiguer les événements menant à l'augmentation de la sumoylation dans les chondrocytes OA. Cette sumoylation accrue pourrait par exemple être causée par l'expression accrue d'enzymes impliquées dans la voie de sumoylation comme Ubc9 ou une E3 ligase spécifique, ou à l'opposé, par une perte d'expression d'une SENP associée à la désomoylation des protéines modifiées. Ces hypothèses pourraient être testées par l'analyse d'expression des niveaux d'ARNm et de protéines correspondant aux différentes enzymes impliquées dans la voie de sumoylation. Pour ce faire, une approche couplant le PCR quantitatif et l'analyse par immunobuvardage de type Western des extraits protéiques de chondrocytes OA et contrôles pourrait être utilisée. Une approche par siRNA pourrait ensuite valider ces résultats.

De plus, cette étude a aussi permis de mettre en évidence pour la première fois, que dans les cellules OA, les protéines SUMOs s'accumulent dans des corps nucléaires de type PML. Bien que l'importance fonctionnelle de ces structures dans l'OA

demeure obscure, ces résultats donnent naissance à plusieurs questions concernant entre autre la nature des protéines recrutées dans les PML NBs spécifiquement dans les cellules OA. L'identification de ces protéines pourrait permettre de mieux comprendre les effets biologiques associés à leur recrutement dans les corps PML. Pour ce faire, une approche combinant l'isolation des corps PML ou l'immunoprécipitation des protéines PML à partir d'extraits protéiques de chondrocytes arthrosiques et contrôles, couplée à l'identification par spectrométrie de masse des protéines associées à PML pourrait être envisagée.

Enfin, étant donné l'antagonisme existant entre PHB-1 et PHB-2, il serait intéressant d'examiner la contribution de PHB-2 dans la pathogenèse de l'OA. Comme ces deux protéines peuvent agir conjointement dans certaines circonstances et s'antagoniser dans d'autres, l'étude de l'effet de l'augmentation de la sumoylation sur la localisation cellulaire de PHB-2 pourrait contribuer à mieux caractériser la fonction des Prohibitines dans les chondrocytes arthrosiques.

RÉFÉRENCES

Aigner, T., Hemmel, M., Neureiter, D., Gebhard, P.M., Zeiler, G., Kirchner, T. et McKenna, L. (2001). Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal ageing and osteoarthritis human articular knee cartilage: a study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability on chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage. *Arthritis Rheum* **44** :1304-1312.

Aigner, T., Haag, J., Martin, J. et Buckwalter, J. (2007). Osteoarthritis: ageing of matrix and cells, going for a remedy. *Curr Drug targets* **8**: 325-331.

Altman, R., Asch, E., Bloch, D., Borenstein, D., Brandt, K., Christy, W., Cooke, T.D., Greenwald, R., Hochberg, M., *et al.* (1986). The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* **29**: 1039-1049.

Ande, S., Moulik, S. et Suresh, M. (2009). Interaction between O-GlcNAc modification and tyrosine phosphorylation of prohibitin: implication for a novel binary switch. *PLoS ONE* **4** (2): e4586.

Anckar, J. et Sistonen, L. (2007). SUMO: getting it on. *Biochem Soc Trans* **35**(6): 1409-1413.

Artal-Sanz, M. et Tavernarakis, N. (2009). Prohibitin couples diapause signalling to mitochondrial metabolism during ageing in *C. elegans*. *Nature* **461**: 793-798.

Aspden, R.M. (2008). Osteoarthritis: a problem of growth not decay? *Rheumatology* **47**(10):1452-60.

Berger, K. et Yaffe, M. (1998). Prohibitin family members interact genetically with mitochondrial inheritance components in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **18**: 4043-4052.

Bernardi, R., et Pandolfi, PP. (2007) Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nature* **8**: 1006-1016.

Blanco, FJ., Lopez-Armada, M. et Maneiro, E. (2004). Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion* **4**: 725-728.

Blom, N., Gammeltoft, S., et Brunak, S. (1999). Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* **294**(5): 1351-1362.

Boggio., R., Passafaro., A. et Chiocca, SA. (2007). Targetting SUMO E1 to ubiquitin ligases: a viral strategy to counteract sumoylation. *J Biol Chem* **282**: 15376-15382.

Bohren, KM., Nadkarni, V., Song, JH., Gabbay, KH. et Owerback, D. (2004). A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem* **279**: 27233-27238.

Bombardieri, S., Cattani, P., Ciabattini, G., Di Munno, O., Pasero, G., Pastrono, C., Pinca, E. et Pugliese, F. (1981). The synovial prostaglandin system in chronic inflammatory arthritis : differential effects of steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Br J Pharmacol* **73**(4): 893-901.

Bonnet, CS. et Walsh, DA. (2005). Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology* **44**(1): 7-16.

Bossis, G. et Melchior, F. (2006a). Regulation of SUMOylation by reversible oxidation of SUMO conjugating enzymes. *Mol cell* **21**: 349-357.

Bossis, G. et Melchior, F. (2006b). SUMO: regulating the regulator. *Cell Div* **1**:13.

Bossy-Wetzell, E., Barsoum, M.J., Godzik, A., Schwarzenbacher, R. et Lipton, S.A. (2003). Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol* **15**: 706-716.

Brandt, K.D., Doherty, M. et Lohmander, L.S. (2003). *Osteoarthritis*, Second edition. Oxford, UK: Oxford University Press 54, fig. 5.2.

Brasaemle, D.L., Dolios, G., Shapiro, L. et Wang, R. (2004). Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **279**: 46835-46842.

Braschi, E., Zunino, R. et McBride, H. (2009). MAPL is a new mitochondrial SUMO E3 ligase that regulates mitochondrial fission. *EMBO* **10** (7): 748-754.

Calabrese, V., Mallette, F.A., Deschênes-Simard, X., Ramanathan, S., Gagnon, J., Moores, A., Ilangumaran, S. et Ferbeyre, G. (2009). SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence. *Mol Cell* **36**(5):754-67.

Choi, D.S., Hong, S., Kim, I. et Kang, S. (2008). Prohibitin interacts with RNF2 and regulates E2F1 function via dual pathways. *Oncogene* **27**: 1716-1725.

Cillero-Pastor, B., Caramés, B., Lires-Deán, M., Vaamonde-García, C., Blanco, F.J. et López-Armada, M.J. (2008). Mitochondrial dysfunction activates cyclooxygenase 2 expression in cultured normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum* **58**(8): 2409-2419.

Coates, J., Jamieson, D., Smart, K., Prescott, A. et Hall, P. (1997). The prohibitin family of mitochondrial proteins regulate replicative lifespan. *Curr Biol* **7**: 607-610.

Condemine, W., Takahashi, Y., Zhu, J., Puvion-Dutilleul, F., Guegan, S., Janin, A. et de Thé, H. (2006). Characterization of endogenous human promyelocytic leukemia isoforms. *Cancer Res* **66**(12): 6192-6198.

Dadke, S., Cotteret, S., Yip, SC., Jaffer, ZM., Haj, F., Ivanov, A., Rauscher, F 3rd., Shuai, K., Ng, T., Neel, BG. et Chernoff, J. (2007). Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by sumoylation. *Nature Cell Biol* **9**: 80-85.

Dai, SM., Shan, ZZ., Nakamura, H., Masuko-Hongo, K., Kato, T., Nishioka, K. et Yudoh, K. (2006). Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of calveolin-1: possible involvement of calveolin-1-induced down regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **54**: 818-831.

Del Carlo Jr, M. et Loeser, RF. (2003). Increased oxidative stress with aging reduces chondrocytes survival: correlation with intracellular glutathione levels. *Arthritis Rheum* **48**: 3419-3430.

Dellaire, G., Eskiw, CH., Dehghani, H., Ching, RW. et Bazett-Jones, DP. (2006). Mitotic accumulation of PML protein contribute to the re-establishment of PML nuclear bodies in G1. *J Cell Sci* **119**: 1034-1042.

Desterro, JM., Rodriguez, MS. et Hay RT. (1998). SUMO-1 modification of IkappaBalph inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell* **2**: 233-239.

Dumont, H., Presle, N., Terlain, B., Mainard, D., Loeuille, D., Netter, P. et Pottie, P. (2003). Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **48**(11): 3118-3129.

Dohmen, R.J. (2004). SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta* **1695**: 113-131.

Dorval, V. et Fraser, PE. (2006). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and α -synuclein. *J Biol Chem* **281**: 9919-9924.

Dorval, V. et Fraser, PE. (2007). SUMO on the road to neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 694-706.

Dubuc, M. (1997). Mieux comprendre et traiter l'arthrose. *FRSQ-Recherche en Santé* **15**.

Duprez, E., Saurin, A.J., Desterro, J.M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M.N., Solomon, E., de Thé, H., Hay, R.T. et Freemont, P.S. (1999). SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci* **112**: 381-393.

Ettinger, W.H., Davis, M.A., Neuhaus, J.M. et Mallon, K.P. (1994). Long-term physical functioning in persons with knee osteoarthritis from NHANES. I: effects of comorbid medical conditions. *J Clin Epidemiol* **47**(7): 809-815.

Eveleth, D.J. et Marsh, J. (1986). Sequence and expression of the Cc gene, a member of the dopa decarboxylase gene cluster of *Drosophila*: possible translation regulation. *Nucleic Acid Res* **14**: 6169-6183.

Eskiw, CH., Dellaire, G. et Bazett-Jones, DP. (2004). Chromatin contributes to structural integrity of promyelocytic leukaemia bodies through a SUMO-1-independent mechanism. *J Biol Chem* **279**: 9577-9585.

Felson, DT., Naimark, A., Anderson, J., Kazis, L., Castelli, W. et Meenan, RF. (1987). The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham osteoarthritis study. *Arthritis Rheum* **30**(8): 914-918.

Felson, DT., Zhang, Y., Hannan, MT., Naimark, A., Weissman, BN., Aliabadi, P. et Levy, D. (1995). The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham osteoarthritis study. *Arthritis Rheum* **38**(10): 1500-1505.

Felson, DT., Couropmitree, NN., Chaisson, CE., Hannan, MT., Zhang, Y., McAlindon, TE., LaValley, M., Levy, D. et Myers, RH. (1998). Evidence for a Mendelian gene in a segregation analysis of generalized radiographic osteoarthritis: the Framingham study. *Arthritis Rheum* **41**:1064.

Field, SJ., Tasi, FY., Kuo, F., Zubiaga, AM., Kaelin, WG Jr., Livingston, DM., Orkin, SH. et Greenberg, ME. (1996). E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress cell proliferation. *Cell* **85**(4): 549-561.

Figueroa-Romero, C., Iñiguez-Lluhí, JA., Stadler, J., Chang, CR., Arnoult, D., Keller, PJ., Hong, Y., Blackstone, C. et Feldman, EL. (2009). SUMOylation of the mitochondrial fission protein Drp1 occurs at multiple nonconsensus sites within the B domain and is linked to its activity cycle. *FASEB J* **23**:3917-3927.

Fu, C., Ahmed, K., Ding, H., Ding, X., Lan, J., Yang, Z., Miao, Y., Zhu, Y., Shi, Y., Zhu, J., Huang, H. et Yao, X. (2005). Stabilization of PML nuclear localization by conjugation and oligomerization of SUMO-3. *Oncogene* **24**: 5401-5413.

Fusaro, G., Dasgupta, P., Rastogi, S., Joshi, B. et Chellappan, S. (2003). Prohibitine induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling. *J Biol Chem* **278**: 47853-47861.

Gao, C., Ho, CC., Reineke, E., Lam, M., Cheng, X., Stanya, KJ., Liu, Y., Chakraborty, S., Shih, HM. et Kao, HY. (2008). Histone deacetylase 6 promotes PML sumoylation and is essential for PML nuclear body formation. *Mol Cell Biol* **28**(18): 5658-5667.

Garcia-Dominguez, M. et Reyes, JC. (2009). SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control. *Biochim Biophys Acta* **1789**(6-8): 451-459.

Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, JF., Duclus, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C. et Desjardins, M. (2001). The phagosome proteome : insight into phagosome functions. *J Cell Biol* **152**: 165-180.

Geiss-Friedlander, R. et Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature* **8**: 947- 956.

Gharfourifar, P., Schenk, U., Klein, SD. et Richter, C. (1999). Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release isolated mitochondria. *J Biol Chem* **274** : 31185-31188.

Gill, G. (2005). Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* **15**: 536-541.

Gill, G. (2007). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Gen Dev* **18**: 2046-2059.

Girdwood, D., Bmpass, D., Vaughan, OA., Thain, A., Anderson, LA., Snowden, AW., Garcia-Wilson, E., Perkins, ND., et Hay, RT. (2003). P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* **11**: 1043-1054.

Goldring, MB. (2006). Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage disease. *Best Pract Clin Rheum* **20**(5): 1003-1025.

Goldring, MB. et Goldring, SR. (2007). Osteoarthritis. *J Cell Physiol* **213**: 626-634.

Görllich, D. et Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Ann Rev Cell Dev Biol* **15**: 607-660.

Grazio, S. et Balen, D. (2009). Obesity: risk factor and predictor of osteoarthritis. *Lijec Vjesn* **131**(5-6):162-163

Grotle, M., Hagen, KB., Natvig, B., Dahl, FA. et Kvien, TK. (2008). Obesity and osteoarthritis in knee, hip and/or hand: an epidemiological study in the general population with 10 years follow-up. *BMC Musculoskelet Disord* **2**(9):132.

Harder, Z., Zunino, R. et McBride, H. (2004). Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participate in mitochondrial fission. *Curr Biol* **14**: 340-345.

He, B., Feng, Q., Mukherjee, A., Leonard, DM. et DeMayo, FJ. (2008). A repressive role for prohibitin in estrogen signaling. *Mol Endocrinol* **22**(2): 344-360.

Hinderhofer, M., Walker, C. A., Friemel, A., Stuermer, C. A., Möller, H. M. et Reuter, A. (2009). Evolution of procaryotic SPFH proteins. *BMC Evol Biol* **9** (10).

Huang, TT., Wuerzberger-Davis, SM., Wu, ZH. et Miyamoto, S. (2003). Sequential modification of NEMO/IKK γ by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF κ B activation by genotoxic stress. *Cell* **115**: 565-576.

Jallali, N., Ridha, H., Thrasivoulou, C., Underwood, C., Butler, PE. et Cowen, T, (2005). Vulnerability to ROS-induced cell death in ageing articular cartilage : the role of antioxidant enzyme activity. *Osteoarthritis Cartilage* **13**:614-622

Johnson, ES., Schwienhorst, I., Dohmen, RJ. et Blobel G. (1997). The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other protein by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *EMBO* **16**: 5509-5519.

Jupe, ER., Liu, XT., Kiehlbauch, JL., McClung, JK. et Dell'Orco, RT. (1995). Prohibitin antiproliferative activity and lack of heterozygosity in immortalized cell lines. *Exp Cell Res* **218**: 577-580.

Jupe, ER., Badgett, AA., Neas, BR., Craft, MA., Mitchell, DS., Resta, R., Mulvihill, JJ., Aston, CE. et Thompson, LF. (2001). Single nucleotide polymorphism in prohibitin 39 untranslated region and breast-cancer susceptibility. *Lancet* **357**(9268):1588-1589.

Jupe, E., Liu, X., Kiehlbauch, JL., McClung, JK. et Dell'Orco, R. (1996). Prohibitin in breast cancer cell lines: loss of antiproliferative activity is linked to 3' untranslated region mutations. *Cell Growth Differ* **7**: 871-878.

Kagey, MH., Melhuish, TA. et Wotton, D. (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3 ligase. *Cell* **113**:127-137.

Kahyo, T., Nishida, T. et Yasuda, H. (2001). Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell* **8**: 713-718

Kamitani, T., Nguyen, HP., Kito, K., Fukuda-Kamitani, T. et Yeh, ET. (1998). Covalent modification of PML by the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *J Biol Chem* **273**: 3117-3120.

Kasashima, K., Ohta, E., Kagawa, Y. et Endo, H. (2006). Mitochondrial functions and estrogen receptor-dependent nuclear translocation of pleiotropic human Prohibitine 2. *J Biol Chem* **281** (47): 36401- 36410.

Kasashima, K., Sumitani, M., Satoh, M. et Endo, H. (2008). Human prohibitin 1 maintains the organization and stability of the mitochondrial nucleoids. *Exp Cell Res* **314**: 988-996.

Khan, IM., Williams, R. et Archer, CW. (2009). One flew over the progenitor's nest: migratory cells find home in osteoarthritic cartilage. *Cell Stem Cell* **4**: 282-284.

Kihara, A., Akiyama, Y. et Ito, K. (1996). A protease complex in the *Escherichia coli* plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY. *EMBO* **15**: 6122-6131.

Kim, KI. et Baek, SH. (2006) SUMOylation code in cancer development and metastasis. *Mol Cell* **22**: 247-253

Kim, ET., Kim, KK., Matunis, MJ. et Ahn, JH. (2009). Enhanced SUMOylation of proteins containing a SUMO-interacting motif by SUMO-Ubc9 fusion. *Biochem Biophys Res Commun.* **388**(1): 41-45

Kirsh, O., Seeler, JS., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F. et Dejean, Q. (2002). The SUMO E3

ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO* **21**: 2682-2691.

Knipscheer, P., Flotho, A., Klug, H., Olsen, JV., Van Dijk, WJ., Fish, A., Jonhson, ES., Mann, M., Sixma, TK. et Pichler, A. (2008). Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination. *Mol Cell* **31**:371-382.

Koelling, S., Kruegel, J., Irmer, M., Path, JR., Sadowski, B. et Miro, X. (2009). Migratory chondrogeni progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis. *Cell Stem Cell* **4**: 324-335.

Kouri, JB., Jimenez, SA., Quintero, M. et Chico, A. (1996). Ultrastructural study of chondrocytes from fibrillated and non-fibrillated human osteoarthritic cartilage *Osteoarthritis Cartilage* **4**: 111-125.

Krasnokutsky, S., Attur, M., Palmer, G., Samuels, J. et Abramson, B. (2008). Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **16** : S1-S3.

Kuo, HY., Chang, CC., Jeng, JC., Hu, HM., Lin, DY., Maul, GG., Kwok, RPS. et Shih, HM. (2005). SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of DAXX. *PNAS* **102**(47): 16973-16978.

Kuehn, MR. (2005). Mouse Ubc9 knockout: many path(way)s to ruin. *Dev Cell* **9**: 727-728.

Kumar, PP., Bischof, O., Purbey, PK., Notani, D., Urlaub, H., Dejean, A. et Galande, S. (2007). Functional interaction between PML and SATB1 regulates

chromatin-loop architecture and transcription of the MHC class 1 locus. *Nature Cell Biol* **9**: 45-56.

Kurepa, J., Walker, JM., Smalle, J., Gosink, MM., Davis SJ., Durham, TL., Sung, DY. et Vierstra, RD. (2003). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **278**(9): 6862-6872.

Kyu-Ho Han, E., McGonigal, T., Butler, C., Giranda, V. et Luo, Y. (2008). Characterization of Akt overexpression in MiaPaCa-2 cells: Prohibitin is an Akt substrate both in vitro and in cells. *Anticancer Res* **28**: 957-964.

Lanctôt, C., Lamolet, B. et Drouin, J. (1997). The bicoid-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* **124**(14): 2807-2817.

Lee, HC., Yin, PH., Lu, CY., Chi, CW. Et Wei, YH. (2000). Increase in mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J* **348**: 425-432.

Lin, DY., Huang, YS., Jeng, JC., Kuo, HY., Chang, CC., Chao, TT., Ho, CC., Chen, YC., Lin, TP., Fang, HI., Hung, CC., Suen, CS., Hwang, MJ., Chang, KS., Maul, GG. et Shih, HM. (2006). Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol Cell* **24**: 341-354.

Liu, X., Zeng, B., Ma, J. et Wan, C. (2009). Comparative proteomic analysis of osteosarcoma cell and primary cultured osteoblastic cell. *Cancer Invest* **27**: 345-352.

- Loeser, RF. (2009) Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging in the cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartilage* **17**(8): 971-979.
- Loughlin, J. (2001). Genetic epidemiology of primary osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* **13**(2): 111-116.
- Maneiro, E., Martin, MA., De Andrés, MC., Lopez-Armada, MJ., Fernandez-Sueiro, JL., Del Hoyo, P., Galdo, F., Arenas, J. et Blanco, FJ. (2003). Mitochondrial respiratory activity is altered in OA human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* **48**: 700-708.
- Manjeshwar, S., Branam, D., Lerner, M., Brackett, D. et Jupe, E. (2003). Tumor suppression by the prohibitin gene 3' untranslated region RNA in human breast cancer. *Cancer Res* **63**: 5251-5256.
- Mankin, HJ. (1963). Localization of tritiated thymidine in articular cartilage of rabbits. *J Bone Joint Surg* **45-A**: 529-540.
- Mankin, HJ., Dorfam, H., Lippiello, L. et Zarins, A. (1971). Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from oste-arthritic human hips. *J Bone Joint Surg* **53-A**(3): 523-537.
- Manza, LL., Codreanu, SG., Stamer, SL., Smith, DL., Wells, KS., Roberts, RL. et Liebler, DC. (2004). Global shifts in protein sumoylation in response to electrophile and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* **17**:1706-1715
- Maroudas, A., Bayliss, MT., Uchitel-Kaushansky, N., Schneiderman, R. et Gilav, E. (1998). Aggrecan turnover in human articular cartilage: use of aspartic acid racemisation as a marker of molecular age. *Arch Biochem Biophys* **350**: 61.

Marsh, J.L. (2004). SUMO modification of huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* **304**: 100-104.

Matunis, M.J., Coutavas, E. et Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGap1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **135**: 1457-1470.

Matunis, M.J., Wu, J. et Blobel, G. (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein RanGAP1 to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **140**: 499-509.

McClung, J.K., Danner, D.B., Stewart, D.A., Smith, J.R., Scheider, E.L., Lumpkin, C.K., Dell'Orco, R.T. et Nuell, M.J. (1989). Isolation of a cDNA that hybrid selects antiproliferative mRNA from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* **164**: 1316-1322.

Meinecke, I., Cinski, A., Baier, A., Peters, M.A., Dankbar, B., Wille, A., Drynda, A., Mendoza, H., Gay, R.E., Hay, R.T., Ink, B., Gay, S. et Pap, T. (2007). Modification of PML protein by SUMO-1 regulates Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *PNAS* **104**(12): 5073-5078.

Melchior, F., Schergaut, M. et Pichler, A. (2003). SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pore. *TRENDS Biochem Sci* **28**(11): 612-618.

Meriin, A.B. et Sherman, M.Y. (2005). Role of molecular chaperones in neurodegenerative disorders. *Int J Hypothermia* **21**(5): 403-419.

Merkwirth, C., Dargazanli, S., Tatsuta, T., Geimer, S., Lower, B., Wunderlich, F. T., von Kleist-Retzow, J. C., Waisman, A., Westermann, B. et Langer, T. (2008).

Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes Dev* **22**: 476-488.

Merkwirth, C. et Langer, T. (2008). Prohibitin function within mitochondria: Essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1793**(1): 27-32.

Mikolajczyk, J., Drag, M., Békés M., Cao, J.T, Ronai, Z. et Salvesen, GS. (2007). Small Ubiquitin-related Modifier (SUMO)-specific Proteases: Profiling the specificities and activities of human SENPs. *J Biol Chem* **282**(36): 26217-26224.

Mishra, S., Murphy, LC., Nyomba, BLG. et Murphy, LJ. (2005). Prohibitin: potential target for new therapeutics. *TRENDS Mol Med* **11**(4): 192-197.

Mishra, S., Murphy, LC., et Murphy, LJ. (2006). The prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J Cell Mol Med* **10** (2): 353-363.

Moreau, A., Wang, DS., Jacques, S., Chassaing, C., Landreville, V., Martel-Pelletier, J. et Fernandes, J. (2004). New emerging roles of transcription factor Pitx1 and Reg growth factor in osteoarthritis pathogenesis. *Arthritis Res Ther* **6** (suppl 3): 78.

Morrow, IC. et Parton, RG. (2005). Flotilins and the PHB domain protein family: rafts, worms and anaesthetics. *Traffic* **6**: 725-740.

Mountzouris J. (2005). SUMO: the gardian of the proteome. *Trans Post* **1**(2).

Müller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, JS., Haupt, Y. et Dejean, A. (2000). C-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* **275**: 13321-13329.

Mukhopadhyay, D. et Dasso, M. (2007). Modification in reverse: the SUMO proteases. *TRENDS Biochem Sci* **32**(6): 286-295.

Murray, CJ. et Lopez, D. (1997). Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: global burden of disease study. *Lancet* **349**(9064): 1498-1504.

Nacerddine, K., Lehembre, F., Bhaumik, M., Artus, J., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., Pandolfi, PP. et Dejean, A. (2005). The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell* **9**: 769-779.

Nijtmans, LG., de Jong, L., Sanz, M., Coates, PJ., Berden, JA., Back, JW., Muijsers, AO., van der Spek, H. et Grivell, LA. (2000). Prohibitins act as membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO* **19** (11): 2444-2451.

Oliveria, SA., Felson, DT., Reed, JL., Cirillo, PA. et Walker AM. (1995). Incidence of symptomatic hand, hip and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum* **38**(8): 1134-1141.

Park, S., Xu, J., Frolova, A., Liao, L., O'Malley, B. et Katzenellenbogen, B. (2005). Genetic deletion of the repressor of estrogen activity (REA) enhances the response to estrogen in target tissues in vivo. *Mol Cell Biol* **25**: 1989-1999.

Pelletier, JP., Jovanovic, D., Fernandes, JC., Manning, P., Connor, JR., Currie, MG., Di Battista, JA. et Martel-Pelletier, J. (1998). Reduced progression of osteoarthritis *in vivo* by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* **41**: 1275-1286.

Picard, C., Azeddine, B., Moldovan, F., Martel-Pelletier, J. et Moreau, A. (2007). New emerging role of Pitx1 transcription factor in osteoarthritis pathogenesis. *CORR* **462**: 59-62.

Pichler, A., Gast, A., Seeler, JS., Dejean, A., et Melchior, F. (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* **108**: 109-120.

Pichler, A. et Melchior, F. (2002). Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic* **3**: 381-387.

Pichler, A. et Melchior, F. (2004). SUMO E3 ligases. *SUMOylation molecular biology and biochemistry*, G. Van Wilson ed. (Norwich, U.K.: Horizon Press).

Radin, EL., Abernethy, PJ., Townsend, PM. et Rose, RM. (1978). The role of bone changes in the degeneration of articular cartilage in osteoarthrosis. *Acta Orthop Belg* **44**(1):55-6.

Rajalingam, K. et Rudel, T. (2005). Ras-Raf signaling needs prohibitin. *Cell cycle* **4** (11): 1503-1505.

Rastogi, S., Joshi, B., Dasgupta, P., Morris, M., Wright, K. et Chellappan, S. (2006a). Prohibitin facilitates cellular senescence by recruiting specific corepressors to inhibit E2F target genes. *Mol Cell Biol* **26** (11): 4161-4171.

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

Reverter, D. et Lima, CD. (2005). Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex. *Nature* **435**: 687-692.

Rivera-Milla, E., Stuermer, C. et Malaga-Trillo, E. (2006). Ancient origin of reggie (flotilin), reggie-like, and other lipid-raft associated proteins:convergent evolution of the SPFH domain. *Cell Mol Life Sci* **63**: 343-357.

Rodriguez, MS., Desterro, JM., Lain, S., Midgley, CA., Lane, DP. et Hay, RT. (1999). SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO* **18**: 6455-6461.

Rodriguez, MS., Dargemnot, C. et Hay, RT. (2001). SUMO-1 conjugation *in vivo* requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* **276**: 12654-12659.

Ross, J., Nagy, Z. et Kirken, R. (2008). The PHB1/2 phosphocomplexe is required for mitochondrial homeostasis and survival of human T cells. *J Biol Chem* **283**(8): 4699-4713.

Saitoh, H. et Hinchey, J. (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* **275**: 6252-6258.

Saitoh, N., Uchimura, Y., Tachibana, T., Sugahara, S., Sayito, H. et Nakao, M. (2006). In situ SUMOylation analysis reveals a modulatory re of RanBP2 in the nuclear rim and PML bodies. *Exp cell Res* **312**: 1418-1430.

Sarge, KD. et Park-Sarge, OK. (2009). Sumoylation and human disease pathogenesis. *Cell* **34**(4): 200-205.

Schleicher, M., Shepherd, BR., Suarez, Y., Fernandez-Hernando, C., Yu, J., Pan, YLM., Shadel, GS. et Sessa, W. (2008). Prohibitin-1 maintains the angiogenic capacity of endothelial cells by regulating mitochondrial function and senescence. *J Cell Biol* **180**: 101-112.

Seeler, JS. et Dejean, A. (2003). Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nature Rev Mol Cell Biol* **4**: 690-699.

Seufert, W., Futcher, B., et Jentsch, S. (1995). Role of ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* **373**: 78-81.

Shang, J., Luo, Y. et Clayton, DA. (1997). Backfoot is a novel homeobox gene expressed in the mesenchyme of developing hind limb. *Dev Dyn* **209**(2): 242-253.

Sharma, L. et Berenbaum, F. (2007). *Osteoarthritis : a companion to rheumatology*. L. Sharma et F. Berenbaum ed. (Philadelphia: Mosby Elsevier).

Shen, TH., Lin, HK., Scaglioni, PP., Yung, TM. et Pandolfi, PP. (2006). The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol Cell* **24**: 331-339.

Shih, HM., Chang, CC., Kuo, HY. et Lin, DY. (2007). DAXX mediates SUMO-dependant transcriptional control and subnuclear compartmentalization. *Biochem Soc Transi* **35**(6): 1397-1400.

Shiio, Y. et Eisenman, RN. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *PNAS* **100**: 13225-13230.

Spector, TD. et Campion, GD. (1989). Generalized osteoarthritis : a hormonally mediated disease. *Ann Rheum Dis* **48**(6): 523-527.

Spector, TD., Cicuttini, F., Baker, J., Loughlin, J. et Hart, D. (1996). Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ* **312**: 940.

Spector, TD. et MacGregor, AJ. (2004). Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage* **12** (Suppl A): S39-S44.

Steffan, JS., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, LC., Slepko, N., Illes, K., Lukacsovish, T., Zhu, YZ., Cattaneo, E., Pandolfi, PP., Thompson, LM., Stehmeier, P. et Muller, S. (2009). Phospho-regulated SUMO interaction modules connect the SUMO system to CK2 signaling. *Mol Cell* **33**: 400-409.

Sternsdorf, T., Jensen, K. et Will, H. (1997). Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J Cell Biol* **139**: 1621-1634.

Song, J., Durrin, LK., Wilkinson, TA., Krontiris, TG. et Chen, Y. (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *PNAS* **101**: 14373-14378.

Sudharsana, R., Yuanyuan, G., Nyomba, B. et Suresh, M. (2009). Insulin induced phosphorylation of Prohibitine at tyrosine114 recruits Sph1. *Biochim Biophys Acta* **1793**(8):1372-1378.

Takahashi-Fujigasaki, J., Arai, K., Funata, N. et Fujigasaki, H. (2006). SUMOylation substrates in neuronal intranuclear inclusion disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* **32**: 92-100.

Tanaka, K., Nishide, J., Okazaki, K., Kato, H., Niwa, O., Nakagawa, T., Matsuda, H., Kawamukai, M. et Murakami, Y. (1999). Characterization of a fission yeast homologue, pmt3p, required for multiple nuclear events, including control of telomere length and chromosome segregation. *Mol Cell Biol* **19**: 8660-8672.

Tatham, MH., Jaffray, E., Vaughan, OA., Desterro, JM., Botting, CH., Naismith, JH. et Hay, RT. (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* **276**: 35368-35374.

Terashima, M., Kim, KM., Aldachi, T., Nielsen, PJ., Reth, M., Kholer, G. et Lamers, MC. (1994). The antigen receptor of B lymphocytes is associated with prohibitin and prohibitin-related protein. *EMBO* **13**: 3782-3792.

Terashima, T., Kawai, H., Fujutani, M., Maeda, K. et Yasuda, H. (2002). SUMO-1 co-localized with mutant atrophin-1 with expanded polyglutamines accelerates intranuclear aggregation and cell death. *Neuroreport* **13**: 2359-2364.

Terkeltaub, R., Johnson, K., Murphy, A. et Ghosh, S. (2001). Invited review: the mitochondrion in osteoarthritis. *Mitochondrion* **1**: 301-319.

Theiss, AL., Kumar, VM., Obertone, T., Jones, DP., Hansen, J., Gewirtz, AT., Merlin, D. et Sitaraman, SV. (2009). Prohibitin is a novel regulator of antioxidant response that attenuates colonic inflammation in mice. *Gastroenterol* **137**: 199-208.

Thompson, WE., Ramalho-Santos, J. et Sutovsky, P. (2003). Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. *Biol Reprod* **69**: 254-260.

Ueda, H., Goto, J., Hashida, H., Lin, X., Oyanagi, K., Kawano, H., Zoghbi, HY., Kanazawa, I. et Okazawa, H. (2002). Enhanced SUMOylation in polyglutamine diseases. *Biochem Biophys Res Commun* **293**: 307-313.

Valdes, AM., Loughlin, J., Oene, MV., Chapman, K., Surdulescu, GL., Doherty, M. et Spector, TD. (2007). Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* **56**: 137-146.

Van Damme, E., Laukens, K., Dang, TH. et Van Ostade, X. (2010). A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. *Int J Biol Sci* **6**(1):51-67.

Verzijl, N., DeGroot, J., Thorpe, SR., Bank, RA., Shaw, JN., Lyons, TJ., Bijlsma, JW., Lafeber, FP., Baynes, JW. et TeKoppele, JM. (2000). Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem* **275**: 39027-39031.

Vuolteenaho, K., Moilanen, T., Hämäläinen, M. et Moilanen, E. (2003). Regulation of nitric oxide production in osteoarthritic and rheumatoid cartilage. Role of endogenous IL-1 inhibitors. *Scand J Rheumatol* **32**(1):19-24.

Wang, J., Shiels, C., Sasieni, P., Wu, PJ., Islam, SA., Freemont, PS. et Sheer, D. (2004). Promyelocytic leukaemia nuclear bodies associate with transcriptionally active genomic regions. *J Cell Biol* **164**:515-526.

Wasiak, S., Zunino, R. et McBride, H. (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP-1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J Cell Biol* **177** (3): 439-450.

Weger, S., Hammer, E. et Heilbronn, R. (2005). Torpors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo. *FEBS lett* **579**: 5007-5012.

Winter, A., Kämäräinen, O. et Hofmann, A. (2007). Molecular modeling of prohibitin domains. *Proteins* **68**(1): 353-362.

Wu., L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, HI., Sang, L., Chong, GT., Nuckolls, F., Giangrande, P., Wright, FA., Field, SJ., Greenberg, ME., Orkin, S., Nevins, JR.,

Robinson, ML. et Leone, G. (2001). The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* **414**(6862): 457-452

Xu, DH., Tang, J., Li, QF., Shi, SL., Chen, XF. et Liang, Y. (2008). Positional and expressive alteration of prohibitin during the induced differentiation of human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* **14**: (32): 5008-5014.

Zhang, H., Saitoh, H. et Matunis, MJ. (2002). Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex. *Mol Cell Biol* **22**: 6498-6508.

Zhang, R., Poustovoitov, MV., Ye, X., Santos, HA., Chen, W., Daganzo, SM., Erzberger, JP., Serebriiskii, IG., Canutescu, AA., Dunbrack, RL., Pehrson, JR., Berger, JM., Kaufman, PD. et Adams, PD. (2005). Formation of macroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* **8**: 19-30.

Zhong, S., Müller, S., Ronchetti, S., Freemont, PS., Dejean, A. et Pandolfi, PP. (2000). Role of SUMO-1 modified PML in nuclear body formation. *Blood* **95**: 2748-2752.

Zhu, B., Zhai, J., Zhu, H. et Kyprianou, N. (2009). Prohibitin regulates TGF- β induced apoptosis as a downstream effector of smad dependent and -independent signaling. *Prostate* **70**(1): 17-26.

Zunino, R., Braschi, E., Xu, L. et McBride, H. (2009). Translocation of SenP5 from the nucleoli to the mitochondria modulates DRP-1 dependant fission during mitosis. *J Biol Chem* **284** (26): 17783-17795.

Zunino, R., Schauss, A., Rippstein, P., Andrade-Navarro, M. et McBride, H. (2007). The SUMO protease SENP5 is required to maintain mitochondrial morphology and function. *J Cell Sci* **120**: 1178-1188.

