



Université de Liège

Faculté de Médecine

Département des Sciences Biomédicales

GIGA - Laboratoire de Rhumatologie

Rôle de CEMIP dans la phosphorylation oxydative au sein de la membrane synoviale arthrosique

Adrien Guisse

Promoteur : Dr. Dominique de Seny

Co-promoteur : Dr. Céline Deroyer

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de **Master en Sciences Biomédicales**

Année académique 2020-2021

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier le Pr. Michel Malaise et le Dr. Dominique de Seny de m'avoir permis de réaliser mon mémoire au sein du laboratoire de Rhumatologie du GIGA et de découvrir le quotidien de la recherche.

Je remercie particulièrement le Dr. Céline Deroyer de m'avoir conseillé et guidé tout au long de ce mémoire.

Un tout grand merci à toi Zelda pour m'avoir accompagné durant les premières semaines et pour tous tes précieux conseils.

Enfin, je remercie l'ensemble du laboratoire de Rhumatologie de m'avoir aussi gentiment accueilli et pour vos conseils avisés. Merci à vous tous.

Table des matières

Introduction

1. L'arthrose.....	1
1.1 Généralités.....	1
1.2 La membrane synoviale.....	3
1.2.1 Caractérisation histologique de la membrane synoviale saine et arthrosique.....	3
1.2.2 Caractérisation cellulaire et moléculaire de la membrane synoviale saine et arthrosique.....	4
1.3 Le stress oxydant.....	6
1.3.1 Généralités.....	6
1.3.2 Mécanismes du stress oxydant.....	6
1.3.3 Le stress oxydant dans l'arthrose.....	7
1.4 Mitochondrie et phosphorylation oxydative.....	8
1.4.1 Généralités.....	8
1.4.2 Fonctionnement de la chaîne respiratoire.....	9
1.4.3 Rôle de la mitochondrie dans l'arthrose.....	10
2. CEMIP.....	12
2.1 Généralités.....	12
2.2 Rôle de CEMIP dans les cancers.....	12
2.3 Rôle de CEMIP dans la dégradation de l'acide hyaluronique.....	13
2.4 Rôle de CEMIP dans l'arthrose.....	14
2.4.1 Généralités.....	14
2.4.2 Inflammation.....	15
2.4.3 Fibrose.....	15
2.5 Régulation de l'expression de CEMIP.....	16
Objectifs.....	17

Matériel et méthodes

1. Informations sur les prélèvements/échantillons.....	18
2. Culture cellulaire.....	18
2.1 Isolement des fibroblastes synoviaux.....	18

2.2 Passage des cellules.....	18
2.3 Traitement des cellules à l'H ₂ O ₂ et à l'oligomycine.....	19
3. Déplétion de CEMIP.....	19
4. Western Blot.....	21
5. Test de viabilité cellulaire.....	24
6. Kits de luminescence/fluorescence.....	25
6.1 Potentiel membranaire mitochondrial (JC-1).....	25
6.2 Production de radicaux libres.....	26
7. Test statistique/logiciel.....	27
Résultats	
1. Contexte particulier du mémoire.....	28
2. Rôle de CEMIP dans le stress oxydant	28
2.1 Variation du taux de radicaux libres après stimulation à l'H ₂ O ₂	28
2.2 Rôle de CEMIP dans l'induction des radicaux libres.....	29
2.2.1 Validation des shRNA dirigés contre CEMIP.....	29
2.2.2 Effet de CEMIP sur la production de radicaux libres.....	30
2.2.3 Rôle de CEMIP dans l'induction des radicaux libres par l'H ₂ O ₂	31
3. Rôle de CEMIP dans la phosphorylation oxydative.....	32
3.1 Rôle de CEMIP dans la modulation du potentiel membranaire mitochondrial.....	32
3.1.1 Variation du potentiel membranaire mitochondrial après traitement à l'oligomycine.....	33
3.1.2 Validation des shRNA dirigés contre CEMIP.....	34
3.1.3 Variation du potentiel membranaire mitochondrial après déplétion de CEMIP.....	34
3.2 Modulation de la phosphorylation oxydative par CEMIP.....	35
3.2.1 Confirmation de la déplétion de CEMIP.....	35
3.2.2 Modulation de l'expression des gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire par CEMIP.....	36
3.3 Validation de la modulation de l'expression des cibles de la phosphorylation oxydative après déplétion de CEMIP.....	37
4. Effet de l'H ₂ O ₂ sur l'expression de CEMIP.....	39
5. Effet de l'H ₂ O ₂ sur l'expression des cibles de la phosphorylation oxydative.....	39
Discussion	41
Conclusion et perspectives	46
Références	47

Résumé

CEMIP, pour “Cell migration-inducing protein”, également connue sous le nom de KIAA1199 ou HYBID (« Hyaluronan binding protein involved in hyaluronan degradation ») est une protéine de 150 kDa identifiée pour la première fois au début du 21^{ème} siècle pour son rôle dans certains syndromes de surdité. Par la suite, son implication dans différents cancers a été établie. Plus récemment, le rôle de CEMIP dans la pathog nese de l’arthrose a commencé à être élucidé. CEMIP est capable de dégrader l’acide hyaluronique en fragments de bas poids moléculaire possédant des propriétés inflammatoires. Chez les patients souffrant d’arthrose, on observe une augmentation de l’expression de CEMIP. L’augmentation de la dégradation de l’acide hyaluronique qui en résulte pourrait être responsable de la mise en place d’un phénotype inflammatoire dans l’articulation et notamment au niveau de la membrane synoviale. L’inflammation pourrait provoquer l’apparition d’un stress oxydant qui lui-même pourrait être à l’origine d’un dysfonctionnement mitochondrial avec une diminution de l’activité de la phosphorylation oxydative. C’est dans ce contexte que nous avons investigué la relation entre CEMIP, le stress oxydant et la phosphorylation oxydative, et ce au sein de la membrane synoviale arthrosique. Pour ce faire, nous avons éteint l’expression de CEMIP dans des synoviocytes fibroblastiques issus de patients souffrant d’arthrose et nous avons mesuré les effets de cette déplétion sur la production de radicaux libres ainsi que sur différents paramètres de la phosphorylation oxydative tels que le potentiel membranaire mitochondrial et l’expression de différentes protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Abstract

CEMIP, for "Cell migration-inducing protein", also known as KIAA1199 or HYBID ("Hyaluronan binding protein involved in hyaluronan degradation") is a 150 kDa protein first identified at the beginning of the 21st century for its role in certain deafness syndromes. Subsequently, its involvement in various cancers was established. More recently, the role of CEMIP in the pathogenesis of osteoarthritis has begun to be elucidated. CEMIP induces hyaluronic acid degradation into low molecular weight fragments with inflammatory properties. In patients suffering from osteoarthritis, there is an increase of CEMIP expression leading to increase hyaluronic degradation. This could be responsible for the establishment of an inflammatory phenotype in the joint and particularly in the synovial membrane. Inflammation could lead to oxidative stress, which in turn could be the cause of mitochondrial dysfunction with a decrease in oxidative phosphorylation activity. In this context, we investigated the relationship between CEMIP, oxidative stress and oxidative phosphorylation within osteoarthritic synovial membrane. Accordingly, we have depleted CEMIP expression in fibroblast-like synoviocytes from osteoarthritis patients. Then, we have analyzed the production of free radicals as well as different parameters of oxidative phosphorylation such as the mitochondrial membrane potential and the expression of different proteins of mitochondrial respiratory chain.

Liste des abréviations

CEMIP: Cell migration-inducing protein

DAMPs : Danger Associated Molecular Patterns

TLR : Toll-Like Receptor

TNF- α : Tumor Necrosis factor α

TGF- β : Transforming Growth Factor β

ALK: Activin receptor-Like Kinase

α -SMA: α -Smooth Muscle Actin

NADP: Nicotinamide adénine dinucleotide phosphate

NF- κ B: Nuclear factor-kappa B

SOD: Superoxyde dismutase

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

FAD: Flavine adenine dinucleotide

COX: Cyclooxygénase

IL: Interleukine

MMP: Matrix metalloproteinase

ADAMTS: A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs

EGF: Epidermal Growth Factor

APC: Adenomatous Polyposis Coli

TCF-4: Transcription factor 4

HA : Hyaluronan ; Acide Hyaluronique

shRNA : small hairpin RNA

eGFP : enhanced Green Fluorescent Protein

ARALAR: Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1

NDUFA8: NADH dehydrogenase ubiquinone alpha subcomplex 8

ETFB : Electron transfer flavoprotein subunit beta

COX7B: Cytochrome C oxidase subunit 7b

ATP1B1: Sodium/Potassium-transporting ATPase subunit beta 1

INTRODUCTION

1. L'arthrose

1.1 Généralités

L'arthrose est la maladie rhumatologique la plus répandue puisqu'on estime à 300 millions le nombre d'individus touchés à travers le monde¹. De nombreux facteurs de risque ont été identifiés tels que l'âge, le genre, ou encore l'obésité. 10 % des hommes et 18 % des femmes de plus de 60 ans souffrent d'arthrose². L'arthrose est la première cause d'incapacité de travail et coûte chaque année plus de 300 milliards de dollars en termes de frais médicaux et de perte de productivité³. Longtemps décrite comme une maladie résultant de l'usure prématurée du cartilage suite à de trop nombreux stress mécaniques, l'arthrose est en réalité bien plus complexe et s'attaque à plusieurs composants de l'articulation (Figure 1).

Dès les premiers stades de la pathologie, l'inflammation s'installe. Paradoxalement, l'arthrose a longtemps été jugée comme une maladie non-inflammatoire et ce n'est que depuis le début des années 2000 que l'inflammation est reconnue comme ayant un rôle dans la pathogenèse de l'arthrose⁴. Lorsque la pathologie progresse et atteint un stade plus avancé, un phénotype fibreux apparaît, que ce soit au niveau du cartilage ou de la membrane synoviale⁵. La membrane synoviale s'épaissit et on observe également un pincement de l'espace intra articulaire. Inflammation et fibrose sont deux phénomènes liés. En effet, des médiateurs de l'inflammation sont libérés par différents types cellulaires présents dans l'articulation tels que les synoviocytes, les chondrocytes ou encore les macrophages et autres cellules immunitaires infiltrées⁶. Ces médiateurs sont capables à un stade précoce de la maladie d'entraîner un changement de phénotype des chondrocytes, ces derniers passant d'un phénotype différencié non-proliférant vers un phénotype dédifférencié prolifératif ayant pour objectif la régénération du cartilage. Une inflammation persistante conduit cependant par la suite à la dégradation progressive du cartilage et à une sécrétion anormale de composants de la membrane extracellulaire générant alors un état fibreux⁵.

Chez les patients souffrant d'arthrose, on observe également une sclérose de l'os sous chondral et l'apparition de petites excroissances osseuses nommées ostéophytes. L'arthrose n'est généralement détectée qu'une fois que le patient se rend chez son médecin en raison des douleurs, ce qui pose problème car la pathologie est alors généralement à un stade déjà avancé². A l'heure actuelle, il n'existe toujours pas de traitement curatif, la majorité d'entre eux visant à soulager la douleur qui est le principal symptôme de l'arthrose. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et la visco-supplémentation sont considérés comme le traitement de première ligne. Pour les patients qui ne répondent pas aux AINS ou dont la qualité de vie est profondément affectée, le remplacement intégral de l'articulation par une prothèse s'impose^{1,6}.

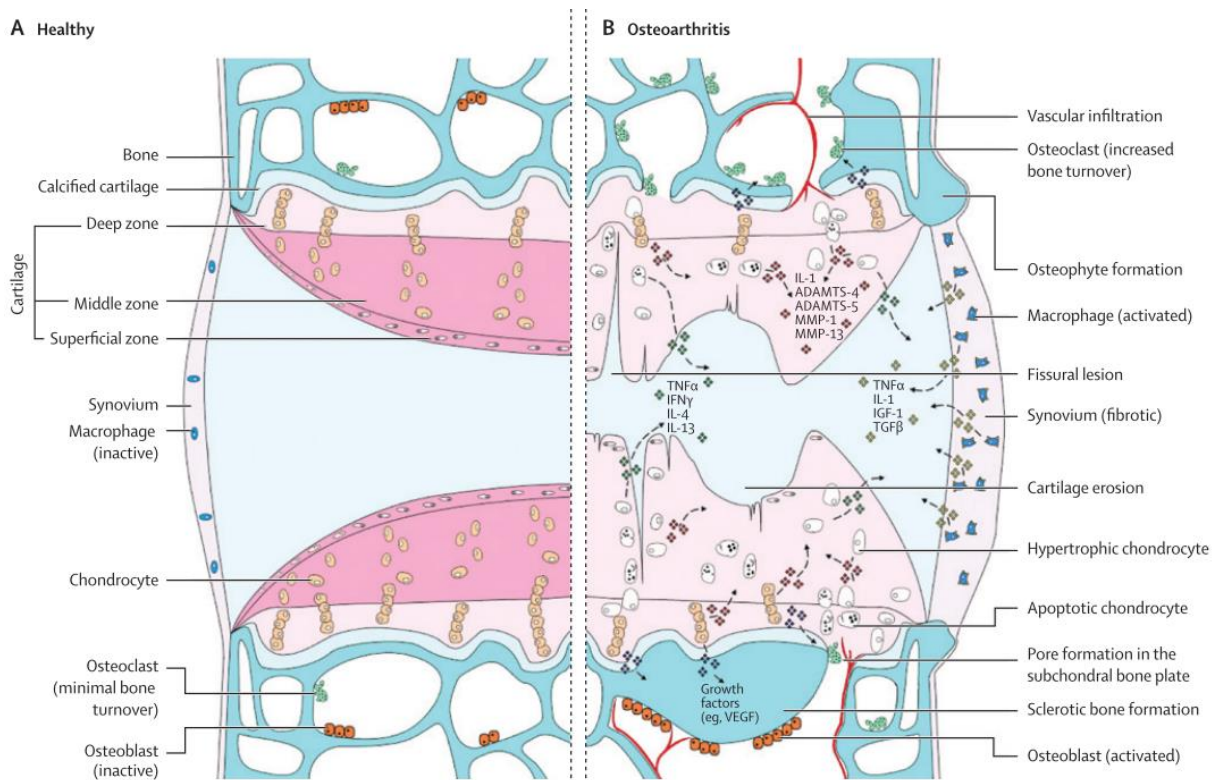


Figure 1. Modifications physiologiques et morphologiques au niveau d'un genou arthrosique. L'arthrose se caractérise par une dégradation du cartilage mais également par d'autres phénomènes tels que l'inflammation de la membrane synoviale, la sclérose de l'os sous chondral ou la formation d'ostéophytes. D'après Palmer et al, Seminar Osteoarthritis, 2015.

1.2 La membrane synoviale

1.2.1 Caractérisation histologique de la membrane synoviale saine et arthrosique

La membrane synoviale est une fine membrane entourant les articulations de type synoviales, également appelées diarthroses. Elle se compose de deux couches : l'intima et la sous-intima. La sous-intima, dont l'épaisseur peut atteindre jusqu'à 5 mm, est relativement acellulaire et riche en tissus conjonctifs. Elle contient également des vaisseaux lymphatiques et sanguins qui permettent la nutrition des chondrocytes par diffusion passive via le liquide synovial, le cartilage étant dépourvu de vascularisation. L'intima, d'une épaisseur de 20 à 40 µm, abrite les synoviocytes, les cellules peuplant la membrane synoviale⁷. Ceux-ci sont de deux types : les synoviocytes macrophagiques, également appelés synoviocytes de type A, et les synoviocytes fibroblastiques ou synoviocytes de type B. Les synoviocytes de type A sont probablement issus de monocytes sanguins qui pénètrent la sous-intima via la circulation locale et migrent ensuite vers l'intima. Ils expriment des marqueurs typiques des macrophages tels que CD68 et CD163. Dans la membrane synoviale saine, ces macrophages représentent un faible pourcentage des cellules présentes. Ils contribuent à l'évacuation de débris cellulaires et autres déchets présents dans le liquide synovial. Les synoviocytes fibroblastiques expriment le marqueur CD55 contrairement aux synoviocytes macrophagiques. Ils synthétisent l'acide hyaluronique, composant principal du liquide synovial et la lubricine qui, comme son nom l'indique, est l'actrice principale de la lubrification de l'articulation⁸. Les synoviocytes fibroblastiques expriment également plusieurs marqueurs d'adhésion comme VCAM-1, ICAM-1, CD44 et l'intégrine β1. Parmi les autres cellules situées dans la membrane synoviale, on retrouve, en petit nombre, des lymphocytes T (CD4+ ou CD8+), des lymphocytes B et des plasmocytes⁹. La membrane synoviale confère une certaine flexibilité à l'articulation et permet le mouvement des tissus adjacents relativement non déformables. Elle permet également le contrôle du trafic protéique/moléculaire et le maintien de la composition du liquide synovial¹⁰. La membrane synoviale arthrosique se caractérise par de nombreux changements morphologiques et histologiques (Figure 2). Les débris issus de la dégradation du cartilage provoquent l'inflammation de cette dernière. La membrane s'épaissit suite à une hyperprolifération cellulaire. La vascularisation de la membrane augmente et on observe une infiltration de cellules immunitaires^{7,11}. De plus, sa perméabilité est altérée ce qui entraîne une diminution des concentrations en acide hyaluronique et en lubricine et diminue ainsi la lubrification de l'articulation¹⁰.

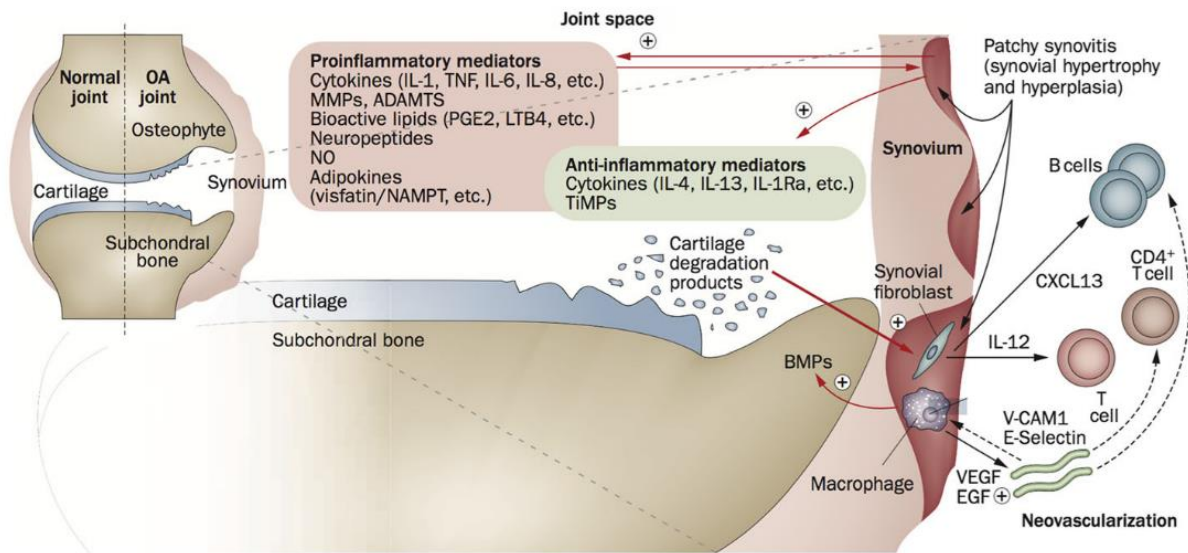


Figure 2. Evolution de la membrane synoviale chez un patient souffrant d'arthrose. Les débris issus de la dégradation du cartilage provoquent une réaction inflammatoire dans la membrane synoviale avec la production de cytokines pro-inflammatoires. Les synoviocytes prolifèrent et la vascularisation de la membrane augmente. D'après *Mathiessen et al, Synovitis in osteoarthritis : current understanding with therapeutic implications, 2017.*

1.2.2 Caractérisation cellulaire et moléculaire de la membrane synoviale saine et arthrosique

• Inflammation

Les débris issus de la dégradation du cartilage, notamment les fragments d'acide hyaluronique, sont reconnus comme des DAMPs par les récepteurs TLRs (Toll Like Récepteurs) présents à la surface des chondrocytes et des synoviocytes (Figure 2). L'activation de ces TLRs entraîne à son tour l'expression de facteurs de transcription, dont NF- κ B, responsables de la production de multiples cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF) et chémokines (IL-8, CCL-5)¹⁰.

• Prolifération cellulaire

L'activation des TLRs et la cascade de production de cytokines qui s'en suit est à l'origine d'un recrutement massif de cellules immunitaires (monocytes, macrophages, lymphocytes, ...) ¹². Par ailleurs, la prolifération des cellules endothéliales augmente, entraînant ainsi une néovascularisation de la membrane synoviale et contribuant à renforcer l'afflux de cellules immunitaires ⁴.

- **Fibrose**

La fibrose de la membrane synoviale, généralement observée dans les stades plus tardifs de l'arthrose, se caractérise par une prolifération excessive des synoviocytes fibroblastiques et un déséquilibre entre la production de collagène et sa dégradation. Le TGF- β jouerait un rôle majeur dans l'établissement de la fibrose. En effet, il a été montré que la surexpression du TGF- β dans des modèles d'animaux arthrosiques induisait la fibrose⁵. De plus, des concentrations élevées de TGF- β ont été retrouvées dans le liquide synovial de patients souffrant d'arthrose¹³. Des concentrations élevées de TGF- β pourraient être responsables de l'activation préférentielle de la voie Smad1,5 et 8 via ALK1 tandis que des concentrations plus faibles de TGF- β activeraient préférentiellement la voie Smad2, 3 via ALK5. Chez les patients arthrosiques, les concentrations élevées de TGF- β pourraient donc favoriser l'activation de la voie Smad 1, 5 et 8 entraînant ainsi une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la mise en place du phénotype fibreux¹⁴. Cependant, le rôle d'ALK1 dans la fibrose n'est pas encore tout à fait clair et la littérature est assez inconsistante à ce sujet¹⁵. De plus, il a également été démontré que l'activation de la voie Smad2,3 était stimulée dans des chondrocytes issus de patients arthrosiques et que celle-ci induisait l'expression de la protéine α -SMA, elle aussi impliquée dans les mécanismes de fibrose¹⁶.

- **Stress oxydant**

L'arthrose fait partie des pathologies dont l'incidence augmente fortement avec l'âge. Le déclin de la fonction mitochondriale lors du vieillissement est un phénomène reconnu depuis de nombreuses années et qui jouerait également un rôle dans la pathogenèse de l'arthrose¹⁷. Le stress oxydant pourrait être à la base de ce dysfonctionnement mitochondrial, en perturbant notamment la phosphorylation oxydative¹⁸.

1.3 Le stress oxydant

1.3.1 Généralités

Le stress oxydant se définit par le déséquilibre entre la production de radicaux libres et les défenses antioxydantes. Les radicaux libres sont des molécules contenant un ou plusieurs atomes d'oxygène. Ils sont instables en raison de la présence d'un électron non apparié sur la dernière couche électronique de l'oxygène. Les radicaux libres exercent plusieurs fonctions biologiques au sein des cellules. Premièrement, les radicaux libres font partie intégrante de la réponse immunitaire puisqu'ils sont produits par la NADPH oxydase des cellules phagocytaires telles que les macrophages ou les neutrophiles dans le cadre de la réponse antibactérienne¹⁹. Les radicaux libres jouent également le rôle important de messenger dans la transduction des signaux intracellulaires, dans la régulation de certains gènes et dans le cycle cellulaire. La signalisation intracellulaire dépendante des radicaux libres se fait via deux mécanismes principaux : la modification du statut rédox de la cellule et l'oxydation réversible des protéines²⁰. Par exemple, le peroxyde d'hydrogène est capable d'inhiber certaines tyrosines phosphatase par oxydation de leurs résidus cystéines, provoquant ainsi un changement de conformation et une modification de la fonction de la protéine²¹. En temps normal, le surplus de radicaux libres est neutralisé par les défenses antioxydantes telles que la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase ou encore la catalase²². Cependant, lorsque ces défenses sont dépassées, les radicaux libres sont capables d'occasionner des dégâts à différentes structures de la cellule. Le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies liées à l'âge telles que les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires et les cancers²³.

1.3.2 Mécanismes du stress oxydant

Lorsque la production de radicaux libres surpasse les capacités des défenses antioxydantes, il y a apparition du stress oxydant. Les radicaux libres sont capables d'occasionner des dégâts à différentes structures de la cellule. L'oxydation de l'ADN peut entraîner la formation d'adduits mutagènes tel que la 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanine tandis que la peroxydation des lipides, constituant majeur des membranes biologiques, peut entraîner une modification de la perméabilité et donc de la fonctionnalité de ces dernières. A titre d'exemple, des souris dont le gène de la superoxyde dismutase est inactivé par mutagenèse présentent une forte mortalité périnatale^{24,25}. Les antioxydants agissent donc comme bouclier contre l'oxydation des molécules essentielles au bon fonctionnement et à la survie des cellules.

Les radicaux libres proviennent de différentes sources. Dans les chondrocytes, les radicaux libres sont majoritairement produits par la nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydase (NADPH oxydase ou NOX). Cette dernière catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire à partir du NADP et la formation de l'anion superoxyde (O_2^-). Même si l' O_2^- est un radical relativement stable, il est capable de réagir avec d'autres molécules pour former des radicaux libres bien plus réactifs. Par exemple, il réagit avec le NO pour former du peroxyde nitrite ($ONOO^-$)²². La majorité du O_2^- est transformée en H_2O_2 par la superoxyde dismutase. Le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre en tant que tel, mais il est capable de générer via la réaction de Fenton le radical hydroxyle (OH^\cdot) fortement réactif²³. Dans le cadre de la réponse antimicrobienne, la NADPH est également présente dans les phagocytes¹⁹. Une autre source majeure de radicaux libres est la mitochondrie, à travers la phosphorylation oxydative. En effet, le transport des électrons dans la chaîne respiratoire peut parfois s'accompagner d'une fuite de ces électrons, qui sont alors libres de partiellement réduire l' O_2 et de former l' O_2^- ²⁶.

1.3.3 Le stress oxydant dans l'arthrose

Chez les patients souffrant d'arthrose, on retrouve une quantité anormalement élevée de radicaux libres couplée à une diminution significative des défenses antioxydantes. C'est notamment le cas de la superoxyde dismutase 2 (SOD2), qui catalyse la transformation de l'anion superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), moins réactif²⁷. Le stress oxydant intervient à différents niveaux dans la pathogenèse de l'arthrose (Figure 3). Il est responsable de l'augmentation de l'apoptose des chondrocytes en modulant les voies PI3K/Akt et JNK²⁸. Les radicaux libres contribuent à la perte de l'intégrité du cartilage, d'une part en inhibant la synthèse du collagène de type II et autres protéoglycans et d'autre part en induisant une désensibilisation des chondrocytes aux facteurs de croissance. Au niveau de la membrane synoviale, le stress oxydant joue un rôle important dans l'inflammation et dans la dégradation des tissus liée à cette dernière. A cet égard, il a été montré que les radicaux libres sont requis pour la signalisation via l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ résultant en l'expression de MMP-1⁸¹. Le stress oxydant est également capable, du moins *in vitro*, d'entraîner l'apoptose des synoviocytes fibroblastiques, principalement via l' O_2^- et l'activation des caspases 3 et 9²⁹.

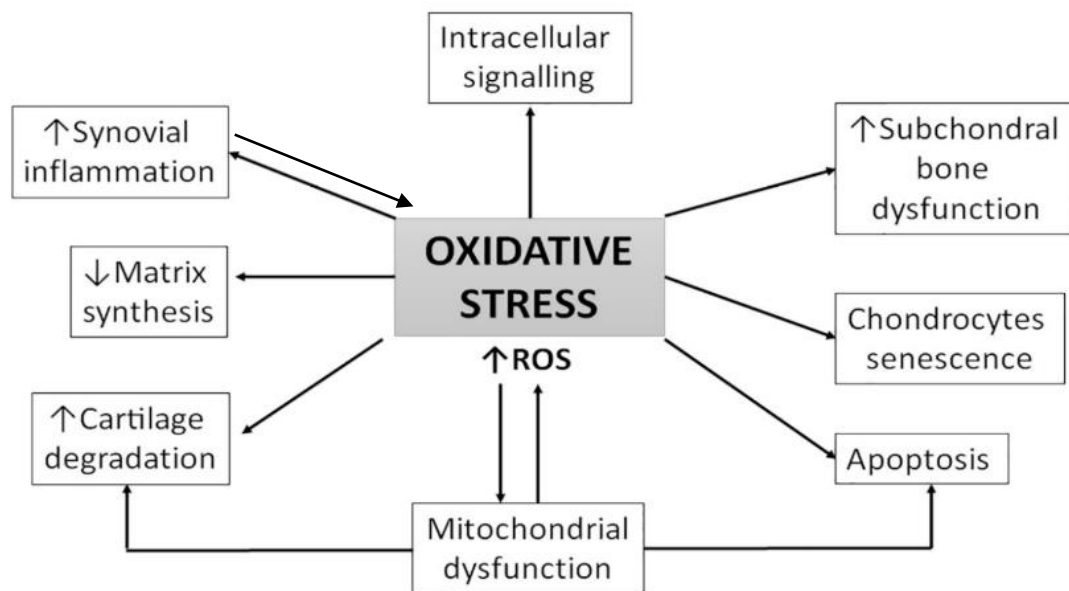


Figure 3. Influence du stress oxydant dans les différents mécanismes impliqués dans la pathogenèse de l'arthrose. Modifié d'après Zahan et al, *The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis, Medicine and Pharmacy Reports*, 2020. ROS: Reactive oxygen

1.4 Mitochondrie et phosphorylation oxydative

1.4.1 Généralités

La mitochondrie, à travers la respiration cellulaire, est l'organe responsable de la production d'ATP, c'est-à-dire la source d'énergie pour les cellules. Elle se compose d'une membrane externe, d'une membrane interne et de la matrice mitochondriale³⁰. En conditions normoxiques, la respiration cellulaire qui permet la synthèse de l'ATP se réalise en 3 grandes étapes, à savoir la glycolyse, le cycle de Krebs (également appelé cycle de l'acide citrique) et la phosphorylation oxydative. Premièrement, la glycolyse, qui se déroule dans le cytosol de la cellule, permet la production de pyruvate à partir du glucose³¹. Ensuite, le pyruvate entre dans la mitochondrie et y subit la décarboxylation oxydative afin de produire l'acétyl-coenzyme A. Ce dernier rentre dans le cycle de Krebs et permet la production de NADH. Enfin, le NADH est oxydé lors de la phosphorylation oxydative et permet la production d'ATP. La respiration cellulaire permet, à partir d'une molécule de glucose, la production de 36 molécules d'ATP³⁰.

1.4.2 Fonctionnement de la chaîne respiratoire

Différents complexes enzymatiques sont localisés dans la membrane interne de la mitochondrie (Figure 4). La NADH déshydrogénase (complexe I), la succinate déshydrogénase (complexe II), la cytochrome réductase (complexe III) et la cytochrome oxydase (complexe IV) permettent le transfert d'électrons du NADH ou du FADH₂, ces derniers étant issus du cycle de Krebs, vers l'oxygène³². Ce processus porte le nom de chaîne respiratoire et permet d'alimenter des pompes à protons (H⁺) qui vont expulser des protons dans l'espace inter membranaire de la mitochondrie, créant ainsi un gradient électrochimique de H⁺. Ce gradient va à son tour servir de moteur pour la production d'ATP. En effet, l'ATP synthase (également appelée complexe V) se sert de cette force proton-motrice pour catalyser le transfert d'une molécule de phosphate vers l'ADP et synthétiser l'ATP.³³ L'oxygène moléculaire est donc l'accepteur final des électrons de la chaîne respiratoire. 4 électrons sont nécessaires pour le réduire totalement en eau. Bien que la réduction de l'oxygène soit un processus relativement efficace, on estime que 2 à 3% de l'oxygène total consommé par les mitochondries lors de la phosphorylation oxydative n'est que partiellement réduit. La réduction incomplète de l'oxygène résulte en la production de radicaux libres²⁹.

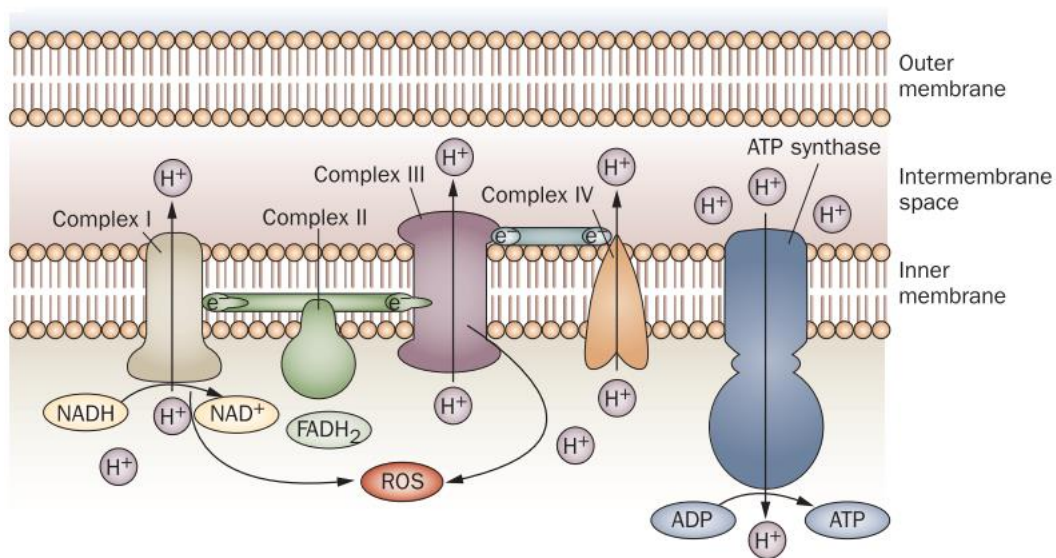


Figure 4 : La phosphorylation oxydative et les différents complexes de la chaîne respiratoire. D'après Blanco et al, *The role of mitochondria in osteoarthritis, Nature Reviews Rheumatology*, 2011.

1.4.3 Rôle de la mitochondrie dans l'arthrose

Les mitochondries ont la particularité de posséder leur propre matériel génétique. Cet ADN mitochondrial est uniquement transmis par la mère et code pour 13 protéines de la chaîne respiratoire, 2 ARN ribosomiaux et 22 ARN de transfert. Au cours de ces 3 dernières décennies, la découverte de différents polymorphismes situés dans les régions codantes de l'ADN mitochondrial a permis la classification du génome mitochondrial en haplogroupes³⁴. Ces haplogroupes ont permis aux différentes populations de s'adapter à leur environnement. On peut aujourd'hui affirmer que la probabilité pour un individu de développer de l'arthrose ainsi que l'évolution de sa maladie sont influencées par le type d'haplogroupe auquel il appartient^{35,36}. Les haplogroupes influencent notamment la production d'ATP, la consommation d'oxygène, la production de radicaux libres³⁷. Par exemple, les haplogroupes J et T montrent un effet protecteur contre l'arthrose³⁸ tandis que les personnes portant l'haplogroupe H, soit l'haplogroupe dominant chez les Européens, sont plus sujettes à développer de l'arthrose. Ceci pourrait s'expliquer par le degré de couplage entre le gradient de protons et la synthèse de l'ATP, un découplage partiel augmentant la quantité de chaleur produite et diminuant la production de radicaux libres³⁹. L'haplotype J consommerait également moins d'oxygène que l'haplotype H, ce qui contribuerait aussi à diminuer la production de radicaux libres⁴⁰.

Ces dernières années, les preuves de l'implication des mitochondries dans l'établissement de l'arthrose se sont accumulées. De nombreuses études ont révélé un dysfonctionnement mitochondrial chez les patients souffrant d'arthrose. *Maneiro et al.* ont mis en évidence une diminution de l'activité des complexes enzymatiques II et III de la chaîne de transport des électrons dans les chondrocytes des patients atteints d'arthrose. L'augmentation de la masse mitochondriale observée en parallèle pouvant s'expliquer par le besoin des chondrocytes de compenser la perte d'activité des complexes pour maintenir la production d'ATP⁴¹. Des cytokines pro-inflammatoires interagissent aussi avec la production d'énergie, le TNF- α et l'IL-1 β étant capables d'inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire⁴². Le dysfonctionnement mitochondrial est caractérisé par un stress oxydant important qui non seulement induit des dégâts cellulaires mais entraîne également une dérégulation de l'apoptose ainsi qu'une suractivation de la réponse inflammatoire⁴³. Les radicaux libres produits lors du dysfonctionnement mitochondrial sont capables de stimuler l'expression de la COX-2 dans les synoviocytes fibroblastiques⁴⁴.

A cet égard, en induisant un dysfonctionnement mitochondrial chez des synoviocytes fibroblastiques extraits de patients sains, par l'intermédiaire de l'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase, il a été montré que la production de radicaux libres est fortement augmentée tout comme l'expression de COX-2⁴⁵. A l'instar de ce qui est observé dans les cellules cancéreuses, les synoviocytes fibroblastiques des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde montrent une modification de leur métabolisme et favorisent la glycolyse au détriment de la phosphorylation oxydative⁴⁶. L'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans la glycolyse comme GLUT1, le transporteur principal du glucose, ou HK2, l'hexokinase 2 qui catalyse la première étape de la glycolyse, est augmentée dans les synoviocytes fibroblastiques de ces patients. La baisse de l'activité de la phosphorylation oxydative au profit de la glycolyse pourrait s'expliquer par le besoin des cellules de s'adapter à leur environnement inflammatoire et hypoxiques. De plus, l'inhibition de la glycolyse dans un modèle animal d'arthrite rhumatoïde a entraîné une diminution de l'inflammation chez ces animaux⁴⁶.

2. CEMIP

2.1 Généralités

CEMIP (pour “ Cell migration inducing protein “), aussi connue sous le nom de KIAA1199 ou HYBID (« Hyaluronan binding protein involved in hyaluronan degradation »), est une protéine de 150 kDa dont le gène se trouve sur le chromosome 15q25.1⁴⁷. Au début du 21^{ème} siècle, *Abe et al* ont identifié CEMIP comme une protéine dont certaines mutations entraînaient la surdité. Par la même occasion, l’expression spécifique de l’homologue murin de CEMIP a été mise en évidence au niveau de l’oreille interne et plus particulièrement au niveau des cellules de Deiters de l’organe de Corti et dans les fibrocytes du ligament spiral, suggérant un possible rôle dans le développement de l’oreille interne et de l’ou e⁴⁸. Plus récemment, CEMIP a été identifié comme un régulateur de la dédifférenciation des cellules de Schwann. En effet, lorsque CEMIP a été déplété dans des cellules de Schwann, l’expression de certains régulateurs négatifs de la myélinisation comme par exemple *c-Jun* a été diminuée tandis que l’expression du facteur de transcription *Krox20*, favorisant la myélinisation, a été augmentée. De plus, lorsque l’expression de CEMIP a été éteinte chez des souris via un système Cre/Lox, la remyélinisation après traumatisme d’un nerf a été acc l r e⁴⁹. Ces dernières années, l’implication de CEMIP dans différents cancers a également été établie tandis qu’un rôle dans la dégradation de l’acide hyaluronique et l’arthrose lui a aussi été attribu ^{50,51}.

2.2 Rôle de CEMIP dans les cancers

L’influence de CEMIP a été mise en évidence dans plusieurs cancers^{52,53,54}. Il a été montré que l’expression de CEMIP est dérégulée dans les cellules infectées par le HPV et dans les lésions (pré)néoplasiques du col de l’ut rus⁵⁵. CEMIP serait capable de promouvoir la survie des cellules en stabilisant le récepteur à l’EGF (EGFR) et en permettant la signalisation en aval du r cepteur⁵⁵. La majorité des cancers du côlon résulte de la perte de fonction du gène suppresseur de tumeur *APC* suite à une mutation, entraînant ainsi la stabilisation continue de la β -caténine et sa translocation dans le noyau où elle interagit avec différents facteurs de transcription et permet la transcription de nombreux gènes impliqués notamment dans la prolifération cellulaire et l’adhésion cellulaire. L’un de ces facteurs de transcription est TCF-4. Le gène codant pour CEMIP se trouve entouré de 4 domaines de liaison à TCF-4, suggérant ainsi que CEMIP est une cible de la voie Wnt/ β -cat nine⁵⁰.

La déplétion de la β -Caténine dans une lignée cancéreuse colorectale a entraîné la diminution de l'expression de CEMIP. De plus, et de manière tout à fait intéressante, la déplétion de CEMIP dans une autre lignée a entraîné une modification de l'expression de 67 gènes impliqués dans la voie Wnt/ β -caténine, la plupart d'entre eux voyant leur expression diminuée, indiquant une probable relation bidirectionnelle entre CEMIP et la voie Wnt/ β -caténine⁵⁶. CEMIP exerce également un rôle dans la transition épithélio mésenchymateuse (TEM). Dans les cancers gastriques, en plus de promouvoir la migration cellulaire ainsi que l'invasivité, CEMIP serait capable d'induire la transition épithélio mésenchymateuse en augmentant l'activité de la voie Wnt/ β -caténine, elle-même responsable de l'augmentation de l'expression de certaines métalloprotéinases matricielles. Le KO de CEMIP dans ces cancers a d'ailleurs entraîné une diminution de l'expression de la β -caténine et de toute une série de marqueurs relatifs à la TEM tels que la vimentine et les facteurs de transcription *Snail* et *Slug*⁵⁷. CEMIP intervient également au niveau métabolique. En effet, CEMIP est capable d'interagir avec la glycogène phosphorylase kinase et de stimuler la dégradation du glycogène et la survie des cellules cancéreuses⁵⁸.

2.3 Rôle de CEMIP dans la dégradation de l'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (HA) est un composant important de la matrice extracellulaire. Il s'agit d'un glycosaminoglycan ubiquitaire mais principalement retrouvé au niveau de la peau et des articulations⁵⁹. Il est constitué d'une succession de chaînes de N-acétylglucosamine et de glucuronate. Malgré la « simplicité » de sa structure, l'acide hyaluronique remplit diverses fonctions comme la lubrification des articulations et la résistance aux chocs. Il possède également un rôle dans la prolifération et la migration cellulaire⁶⁰. Un élément important à prendre en compte est que les fonctions de l'acide hyaluronique varient en fonction de son poids moléculaire. En effet, les HAs de haut poids moléculaire (1000-10000 kDa) ont des propriétés anti-inflammatoires et anti-angiogéniques tandis que les HAs de faible poids moléculaire ont des propriétés opposées⁵¹. L'acide hyaluronique est synthétisé dans la membrane cellulaire par des HA synthases (HAS) : HAS1, HAS2 et HAS3. La demi vie de l'acide hyaluronique est très courte. En effet, un tiers de l'acide hyaluronique total est remplacé quotidiennement⁶⁰. On a longtemps pensé que la dégradation de l'acide hyaluronique était exclusivement médiée par des hyaluronidases nommées HYAL1 et HYAL2. Les fragments d'acide hyaluronique se lient au récepteur CD44 et sont dans un premier temps clivés en fragments intermédiaires par HYAL2 avant un deuxième clivage par HYAL1.

Cependant, ce modèle ne convient pas pour expliquer le turnover rapide de l'acide hyaluronique. Premièrement, ni HYAL1, ni HYAL2 ne sont exprimées dans le cerveau qui contient pourtant d'importantes quantités d'HA. Ensuite, HYAL2 possède une très faible activité tandis que la taille des fragments générés par HYAL1 ne correspond pas à celle des fragments digérés retrouvés dans les tissus. Enfin, des souris KO pour ces deux hyaluronidases ne montrent pas d'accumulation excessive d'HA dans les tissus⁶¹. Ces données suggèrent donc l'existence d'autres enzymes impliquées dans la dégradation de l'acide hyaluronique. Les premiers travaux concernant le rôle de CEMIP dans la dépolymérisation des polymères d'HA sont apparus au début des années 2010. Rapidement, il a été mis en évidence que CEMIP était surexprimée par les synoviocytes dans les articulations arthrosiques et que l'utilisation de siRNAs dirigés contre CEMIP diminuait considérablement la dégradation des HAs dans différentes lignées fibroblastiques. Au contraire, les cellules transfectées avec un cDNA de CEMIP augmentaient la production de fragments de bas poids moléculaire⁶¹. Il est important de noter que l'activation de CEMIP se fait de manière indépendante des autres hyaluronidases⁴⁷. Plus récemment, il a été montré que l'expression de CEMIP dans les chondrocytes présents dans des zones cartilagineuses « dépourvues » d'HAs chez des patients atteints d'arthrose augmentent et que cette augmentation est proportionnelle au score de Mankin (score histologique de sévérité de l'arthrose) avec, dans les cas les plus sévères, une expression de CEMIP jusque dans les couches les plus profondes du cartilage. La déplétion de CEMIP dans ces chondrocytes a pratiquement réduit à néant leur activité de dégradation de l'acide hyaluronique. A l'inverse, la déplétion de HYAL 2 n'a réduit l'activité que de 50% tandis que la déplétion de HYAL 1 ou CD44 n'a eu aucun effet, suggérant une nouvelle fois que la voie HYAL1/HYAL2/CD44 n'est pas la voie centrale de la dégradation de l'acide hyaluronique⁴⁷.

2.4 Rôle de CEMIP dans l'arthrose

2.4.1 Généralités

Ces dernières années, le rôle de CEMIP dans l'arthrose a commencé à être élucidé. CEMIP intervient dans de multiples phénomènes liés à la pathogenèse de l'arthrose tels que la dégradation de l'acide hyaluronique, l'inflammation ou encore la fibrose.

2.4.2 Inflammation

L'augmentation de l'expression de CEMIP chez les patients souffrant d'arthrose pourrait être induite par l'inflammation. Cela a notamment été démontré dans le cancer du pancréas⁸². Les débris issus de la dégradation du cartilage sont l'une des causes de cette inflammation. Comme expliqué plus haut, CEMIP est capable de dégrader l'acide hyaluronique en fragments de bas poids moléculaire. Ces derniers, contrairement aux fragments de haut poids moléculaire, possèdent des propriétés inflammatoires. En effet, ils sont reconnus comme des motifs moléculaires associés aux dangers (DAMPs) par les récepteurs TLR-2 présents sur les chondrocytes, les synoviocytes et différentes cellules immunitaires⁶². Par la suite, l'activation des TLRs résulte notamment en l'activation de la voie NF- κ B et la production de multiples cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α et chémokines¹⁰. L'IL-1 β est une cytokine pro-inflammatoire qui intervient dans la dégradation excessive du cartilage en contribuant à l'augmentation de l'expression de certains médiateurs cataboliques tels que ADAMTS-5 et MMP13⁶³ et à la diminution de la synthèse du collagène de type II⁶⁴. La déplétion de CEMIP dans des chondrocytes issus de patients arthrosiques a entraîné une diminution de l'inflammation médiée par l'IL-1 β . En effet, l'IL-6, le TNF- α et la PGE2 ont tous vu leur expression diminuer en réponse à la déplétion de CEMIP. Par ailleurs, l'IL-1 β médierait ses effets en modulant l'activité de la voie Wnt/ β -Caténine. L'expression de la β -Caténine et des gènes régulés par celle-ci (cycline D1, MMP13, ADAMTS-5) a elle aussi diminué lorsque CEMIP a été déplété dans les chondrocytes issus de patients arthrosiques⁶⁵.

2.4.3 Fibrose

Outre son rôle dans la dégradation de l'acide hyaluronique et l'inflammation, CEMIP serait également responsable de l'apparition d'un phénotype fibreux dans les chondrocytes de patients souffrant d'arthrose. CEMIP a récemment été étudié, *in vitro*, dans un modèle de dédifférenciation des chondrocytes isolés de patients atteints d'arthrose du genou. L'analyse du transcriptome de ces chondrocytes dédifférenciés en présence ou non de shRNAs dirigés contre CEMIP a révélé de nombreux changements d'expression de certains gènes connus pour être impliqués dans l'arthrose. Dans les chondrocytes où l'expression de CEMIP est éteinte, on observe une augmentation de l'expression de gènes comme *TGFB2*, *MSX2* et *CAV2* et une diminution de l'expression de *ANKRD1* et *DHCR24*.

De nombreux gènes impliqués dans le métabolisme du cartilage (*MMP10*, *MMP19*, *COL1A1*, *COL3A1*, ...) ont également vu leur expression modifiée. De plus, l'expression de différents marqueurs de fibrose tels que les collagènes de type 1 et 3 ainsi qu' α -SMA (alpha smooth muscle actin), est également diminuée dans ces chondrocytes. L'augmentation de l'expression de CEMIP se produit avant l'apparition des premiers marqueurs de fibrose, démontrant ainsi son rôle possible d'inducteur de la transdifférenciation des chondrocytes en chondro-myofibroblastes¹⁶.

2.5 Régulation de l'expression de CEMIP

L'expression de CEMIP est influencée par plusieurs facteurs de croissance et cytokines. L'action la plus importante est médiée par le TGF- β qui augmente non seulement la synthèse d'acide hyaluronique par les HA synthases, mais contribue également à la diminution de l'expression de CEMIP. Cependant, chez les patients souffrant d'arthrose, l'inhibition de l'expression de CEMIP par le TGF- β semble insuffisante et n'empêche pas l'accumulation des fragments de faible poids moléculaire dans le liquide synovial de ces patients. En effet, il a été montré que la diminution d'expression de CEMIP en réponse à la stimulation au TGF- β par les synoviocytes issus de patients arthrosiques était minime, contrairement à la diminution de CEMIP en réponse au TGF- β observée dans des fibroblastes de la peau. Les synoviocytes sains produiraient donc des HAs de haut poids moléculaire tandis que les synoviocytes des patients arthrosiques produiraient en majorité des fragments intermédiaires voire de bas poids moléculaire en raison de la surexpression de CEMIP⁶⁶. A l'inverse, le TNF- α augmente l'expression de CEMIP par les chondrocytes chez les patients souffrant d'arthrose. Une stratégie thérapeutique visant à diminuer l'expression de TNF- α pourrait donc être envisagée⁴⁷. Cependant, une étude plus récente a montré que le TNF- α n'avait pas d'influence sur l'expression de CEMIP lorsqu'il était utilisé pour stimuler des synoviocytes issus de patients arthrosiques⁵¹. L'IL-6 a aussi été rapportée comme un promoteur de l'expression de CEMIP. L'utilisation d'un inhibiteur du récepteur à l'IL-6 (tocilizumab) a entraîné une diminution de l'expression de CEMIP par les synoviocytes de patients arthrosiques⁵¹.

Objectif(s)

CEMIP, pour « Cell migration inducing protein », est une protéine de 150 kDa premièrement identifiée au début des années 2000 pour son rôle dans certains syndromes de surdité. Par la suite, son implication dans différents cancers a été établie. Plus récemment, le rôle de CEMIP a été mis en évidence dans l'arthrose. En effet, l'augmentation de la dégradation de l'acide hyaluronique chez des patients souffrant d'arthrose est corrélée à l'augmentation de l'expression de CEMIP. L'inflammation générée par la dégradation de l'acide hyaluronique pourrait provoquer un stress oxydant et c'est dans ce contexte que nous avons cherché à savoir si CEMIP pouvait induire un stress oxydant.

Dans des travaux récents menés au sein du laboratoire de rhumatologie, il a été mis en évidence que la déplétion de CEMIP dans des synoviocytes fibroblastiques issus de patients souffrant d'arthrose entraînait la modification de l'activité de certaines voies cellulaires. La phosphorylation oxydative, principale source d'ATP de la cellule, était la voie dont l'activité était la plus augmentée lorsqu'on éteignait l'expression de CEMIP dans les synoviocytes. D'après la littérature, il a également été démontré que le stress oxydant, caractérisé par un déséquilibre entre la production de radicaux libres et les défenses antioxydantes, pouvait entraîner une diminution de la phosphorylation oxydative.

L'objectif de ce mémoire est d'investiguer la relation entre CEMIP, le stress oxydant et la phosphorylation oxydative et ce au sein de la membrane synoviale arthrosique. Dans cette optique, le potentiel membranaire mitochondrial et la production de radicaux libres seront analysés en l'absence de CEMIP, de même que l'expression de différentes protéines appartenant à la chaîne respiratoire mitochondriale. Enfin, l'influence du peroxyde d'hydrogène, un inducteur du stress oxydant, sur l'expression de CEMIP et des différentes protéines de la chaîne respiratoire sera également étudiée.

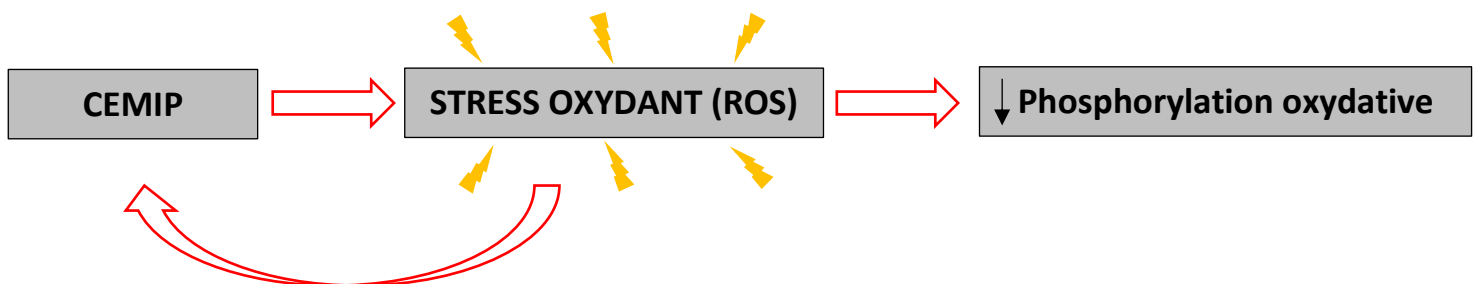


Figure 5. Relation potentielle entre CEMIP, le stress oxydant et la phosphorylation oxydative.

Matériel & Méthodes

1. Informations sur les prélèvements/échantillons

Les membranes synoviales sont issues de patients souffrant d'arthrose et subissant une arthroplastie du genou au CHU de Liège. L'étude est validée par le comité d'éthique du CHU (B707201732662; ref: 2017/147) ainsi que le comité de recherche de la biobanque (BB190058). Pour ce travail, les membranes synoviales de 19 patients ont été collectées. Ces membranes provenaient de 5 hommes et 14 femmes (age : 65 +/- 7,5 ans, IMC : 30,65 +/-5,97kg/m²)

2. Culture cellulaire

2.1 Isolement des synoviocytes

Les membranes synoviales prélevées au bloc opératoire sont stockées dans du milieu de culture cellulaire (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 4,5 g/L glucose, sans glutamine, *Lonza, 12-614F*) non supplémenté + 5 mL de mélange pénicilline-streptomycine (10 000 U de pénicilline et 10 000 U de streptomycine/mL, *Lonza, DE17-602E*) et transmises au laboratoire de Rhumatologie du GIGA. Les membranes sont découpées en morceaux et digérées par de la collagénase 0,5 mg/mL (*Sigma, C98à91*) stérilisée via un acrodisque (*PALL, 4654*) vissé sur une seringue (*BD Seringue, 300912*). La collagénase est resuspendue dans du DMEM, 10% L-glutamine (*Lonza, BE17-605E*) et 10% pénicilline/streptomycine (*Lonza, DE17-602E*) et la digestion se fait durant la nuit dans un incubateur à 37° C, 5% de CO₂ (*Binder*). Le lendemain, la membrane digérée est filtrée en deux étapes. L'échantillon est d'abord filtré au moyen d'une gaze. Le filtrat obtenu est ensuite déposé sur un tamis cellulaire (*Greiner bio-one, 542070*), puis centrifugé 5 minutes à 1400 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans du milieu complet, ce qui permet d'inactiver la collagénase. Cette étape est répétée 3 fois. Enfin, les cellules sont récupérées et transférées dans une boîte de culture cellulaire (T75, *Greiner bio-one, 658 170*) et le milieu est changé le lendemain pour éliminer les derniers débris cellulaires.

2.2 Passage des cellules

Une fois arrivées à confluence, les cellules sont passées et transférées dans une nouvelle flasque. Pour ce faire, le milieu de culture est aspiré et les cellules sont rincées avec 10 mL de PBS (*Lonza, 17-516F*). Le PBS est retiré et 3 mL de trypsine sont ajoutés afin de décoller les cellules. La trypsine est retirée et les cellules sont incubées durant 2 à 3 minutes à 37°C. Le détachement des cellules est confirmé par visualisation au microscope. Si le détachement est jugé insuffisant, les cellules sont de nouveau incubées à 37°C jusqu'à ce que le détachement soit jugé satisfaisant. Enfin les cellules sont récoltées et resuspendues dans du milieu frais.

Certaines manipulations requièrent un nombre limité de cellules et nécessitent donc une étape de comptage avant de resuspendre les cellules dans du milieu frais. Pour ce faire, 10 μL de l'échantillon sont mélangés à 10 μL de bleu de trypan (*Lonza, 17-942E*). 10 μL de ce mélange sont prélevés et déposés sur une lame de comptage de type Neubauer.

2.3 Traitement des cellules à l' H_2O_2 et à l'oligomycine

Dans le cadre de certaines manipulations, les synoviocytes fibroblastiques seront stimulés avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Sigma), un inducteur de stress oxydant, ou avec de l'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase. Pour le H_2O_2 , les synoviocytes seront stimulés à différents timing (1h, 3h, 24h) et à différentes concentrations (10, 50, 100, 150 μM) à partir d'une concentration stock 9,8 M. En ce qui concerne l'oligomycine, les synoviocytes seront stimulés durant 24 ou 72h à différentes concentrations (0,05 μM ; 0,5 μM et 5 μM) à partir d'une concentration stock de 100 mM.

3. Déplétion de CEMIP

Afin d'éteindre l'expression de CEMIP dans les synoviocytes fibroblastiques prélevés chez les patients arthrosiques, nous avons choisi la technologie de l'interférence par ARN via l'utilisation des shRNA. Ces derniers sont de petits ARNs double brins repliés en forme d'épingle à cheveux et dont la séquence est complémentaire de l'ARN messager d'une protéine dont on cherche à éteindre l'expression. Dans notre cas, le vecteur viral s'intègre dans le génome des synoviocytes, ce qui permet une transcription à long terme des shRNA. Une fois le shRNA transcrit, celui-ci est exporté hors du noyau via l'exportine 5. Dans le cytoplasme, le shRNA est clivé en sa forme active (siRNA) par l'enzyme DICER. La liaison du siRNA au complexe RISC permet l'activation de ce dernier. Le brin sens du siRNA est dégradé et le brin anti-sens permet de guider le complexe RISC vers l'ARN messager complémentaire et de réprimer la traduction de celui-ci⁶⁷. Deux shRNA de séquences différentes dirigés contre CEMIP ainsi qu'un shRNA contrôle dirigé contre l'eGFP, la protéine fluorescente verte, ont été générés à la plateforme des vecteurs viraux du GIGA.

shRNA	MOI
shEGFP	50 copies virus/cellule
shCEMIP1	50 copies virus/cellule
shCEMIP2	50 copies virus/cellule

	Séquence
shEGFP	TACAACAGCCACAACGTCTATCTCGAGATAGACGTTGTGGCTGTTGTA TTTTGG
shCEMIP1	CCGGCGAATGAAGATCATCAAGAATCTCGAGATTCTTGATGATCTTCATTGG TTTTGG
shCEMIP2	CCGGCCAGGAATGTTGAATGTCTTTCTCGAGAAAGACATTCAACATTCTGG TTTTGG

CCGG/TACA : séquence START

CTCGAG : boucle (épingle à cheveux)

TTTTGG : séquence STOP

Au jour 0, les synoviocytes sont déposés en triplicat pour chaque condition (NT, shEGFP, shCEMIP1 et shCEMIP2) sur une plaque 24 puits à raison de 50 000 cellules/puit. Le lendemain, les synoviocytes sont infectés par les lentivirus à une concentration de 50 MOI pour chaque shRNA. Après 7 jours d'incubation à 37°C, 5% de CO₂, les cellules sont lysées et les protéines totales récupérées. Pour ce faire, le milieu de culture est retiré et 70 µL de tampon de lyse sont ajoutés sur les cellules. Les échantillons sont récoltés sur glace à l'aide d'un grattoir à cellules (*Greiner bio-one, 541070*) et conservés à -20°C.

Composition du tampon de lyse :

Solution tampon stock (400 mL)

- HEPES 1M (*Lonza, BE17-737 E*) : 16 mL
- NaCl 5M (*VWR, 27788-297*) : 24 mL
- Glycérol 85% (*Merck, 1.04094.2500*) : 80 mL
- Triton X-100 (*VWR, 22-41*) : 4 mL
- Eau déminéralisée : 276 mL

Tampon de lyse (50 mL)

- Solution Tampon stock : 25 mL
- Eau stérile : 25 mL
- 1 pastille d'inhibiteur de protéase (*Roche, 11697498001*)
- DTT 1M (*Sigma, D8161*) : 50 μ L (0,15425 g/mL)
- Orthovanadate de sodium 1mM (*Sigma, S6508*) : 50 μ L (0,183 g/mL)
- Beta-glycérophosphate 25mM (*Sigma, G9891*) : 1,25 mL (0,216 g/mL)
- Fluorure de sodium 1mM (*Sigma, S7920*) : 250 μ L (0,419 g/mL)

4. Western Blot

Le western blot est une technique permettant de détecter et d'identifier des protéines. Le principe repose sur la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire dans un gel de polyacrylamide. Cette séparation se fait sous l'influence d'un champ électrique, les protéines de bas poids moléculaire migrant plus rapidement vers l'anode.

15 μ L d'échantillon sont mélangés à 15 μ L de « bleu de western » pour un volume final de 30 μ L

Composition Bleu de Western :

- Tris 1M pH 6,8 (VWR, 103156X) : 1,28 mL
- SDS 10% (Carl Roth, 0183.3) : 5,04 mL
- Glycérol 85% (Merck, 104094.2500) : 2 mL
- Bleu de bromophénol (Pharmacia Biotech, 17-1329-01) : 800 μ L
- β -mercaptoéthanol (Sigma, M3148) : 1,04 mL

Les échantillons sont déposés dans un gel de polyacrylamide dont la composition dépend de la taille de la protéine étudiée.

Protéines étudiées :

Protéine	Poids moléculaire	Gel
CEMIP	130 kDa	7%
ARALAR	75 kDa	7%
ATP1B1	40 kDa	12%
ETFB	25 kDa	14%
NDUFA8	20 kDa	14%
COX7b	10 kDa	14%

Composition du gel de polyacrylamide :

Gel de compression :

- Acrylamide 30% (Biorad, 1610156) : 455 μ L
- Eau déminéralisée : 2,38 mL
- SDS 5% (Carl Roth, 0183.3) : 140 μ L
- EDTA 0,25M (Carl Roth, X986.2) : 87,5 μ L
- Tris 1M pH 6,8 (VWR, 103156X) : 440 μ L
- APS 10% (VWR, 0486) : 37 μ L
- Temed (Biorad, 1610800) : 6 μ L

Gel de séparation :

% acrylamide	7%	10%	12%	14%
Acrylamide 30%	1,87 mL	2,5 mL	3 mL	0,75 mL
Eau	2,48 mL	1,85 mL	1,35 mL	0,85 mL
Glycérol	0,75 mL	0,75 mL	0,75 mL	0,75 mL
SDS 5%	300 μ L	300 μ L	300 μ L	300 μ L
EDTA 0,25M	187 μ L	187 μ L	187 μ L	187 μ L
Tris 1,5M pH 8,8	1,875 mL	1,875 mL	1,875 mL	1,875 mL
APS 10%	70 μ L	70 μ L	70 μ L	70 μ L
Temed	7,5 μ L	7,5 μ L	7,5 μ L	7,5 μ L

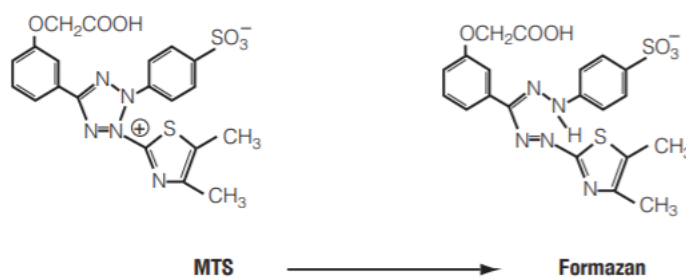
Le gel est placé dans une cuve contenant du tampon de migration (Tris 25mM, glycine 192 mM, SDS 0,1% ; *Biorad 1610772* dilué 10X dans de l'eau déminéralisée). La séparation se fait à 40 mA dans le gel de compression et à 80 mA une fois que le front de migration pénètre dans le gel de séparation. Après migration, les protéines sont transférées durant la nuit du gel vers une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) (Merck, IPVH00010) sous l'influence d'un champ électrique (40 mA) dans du tampon de transfert (Tris 25mM, glycine 82 mM, 20% de méthanol (Merck, 1060095000)). Le lendemain, la membrane est récupérée et incubée durant 1H à température ambiante dans du TBS-T 10% de lait (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1 % (Merck, 8.22184.1000)). La membrane est ensuite incubée avec un anticorps primaire dilué dans le TBS-T, 5 % de lait pendant 3H. Après incubation, 3 lavages de 5 minutes sont réalisés dans du TBS-T. La membrane est ensuite incubée durant 1H avec un anticorps secondaire dont la nature (Lapin ou souris) dépend de l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire est couplé à la HRP. Après incubation, 3 nouveaux lavages dans du TBS-T sont réalisés. Enfin, la révélation se fait à grâce à l'ECL (enhanced chemiluminescence, Thermo scientific, 32106). Le luminol présent dans l'ECL est oxydé en 3-aminophtalate par la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire. La réaction émet de la lumière qui sera capturée sur un film (Fujifilm, 4741019289).

Protéine	Ac. sec	Dilution	Firme	Ref
CEMIP	LAPIN	1/1000	Sigma	SAB2105467
ARALAR	SOURIS	1/1000	Santa Cruz	sc135840
ATP1B1	SOURIS	1/500	Santa Cruz	sc21713
ETFB	SOURIS	1/500	Santa Cruz	sc514901
NDUFA8	SOURIS	1/500	Santa Cruz	sc398098
COX7b	LAPIN	1/1000	Abcam	ab140629
GAPDH	LAPIN	1/10000	Sigma	G9545
HSP90	LAPIN	1/2000	Proteintech	13171-1-AP
HSP90	SOURIS	1/1000	Santa Cruz	sc13119
α -SMA	SOURIS	1/500	Abcam	ab124964
β -caténine	SOURIS	1/2000	Merck	05-665

Anticorps secondaire	Firme	Ref	Dilution
Anti-SOURIS	Cell Signaling Tech.	7076S	1/1000
Anti-LAPIN	Cell Signalin Tech.	7074S	1/1000

5. Test de viabilité cellulaire

Dans le but de mettre au point un modèle d'induction du stress oxydant par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), des tests de viabilité cellulaire ont été réalisés pour déterminer à partir de quelle concentration et de quel timing le H_2O_2 induit une mort cellulaire dans les synoviocytes. Le principe du test repose sur la réduction du MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazodium] (*Promega, G1112*) en présence de PMS (phénazine méthosulfate), un accepteur/donneur d'électrons intermédiaire. Le MTS est réduit en formazan, un produit qui est soluble dans le milieu de culture cellulaire. La conversion du MTS en formazan est réalisée par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules métaboliquement actives. La quantité de formazan produite est mesurée par absorbance à 450 nm et est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes.



Le test est réalisé dans une plaque 96 puits où les cellules ont été préalablement déposées et stimulées selon différentes concentrations en H_2O_2 . Un mix comprenant 2 mL de MTS et 100 μ L de PMS est préparé. 20 μ L du mix sont ajoutés à chaque puit. Les cellules sont incubées durant 1h à 37°C, 5% de CO_2 . Après incubation, l'absorbance à 450 nm est mesurée. La viabilité des synoviocytes a aussi été déterminée en présence d'oligomycine. Le protocole suivi est le même.

6. Kits de luminescence/fluorescence

Dans le but de mesurer l'impact de la déplétion de CEMIP sur différents paramètres de la phosphorylation oxydative tels que le potentiel membranaire mitochondrial, et la production de radicaux libres, nous avons utilisé différents kits dont le principe repose sur la mesure d'un signal fluorescent ou luminescent. Préalablement à l'utilisation des kits, les synoviocytes sont déposés dans une plaque 96 puits à raison de 8000 cellules/puits. Le lendemain, les shRNA sont ajoutés à raison 50 copies de virus par cellule pour chaque shRNA et les cellules incubées durant 7 jours à 37°C, 5% de CO₂.

6.1 Potentiel membranaire mitochondrial (JC-1)

Le potentiel membranaire mitochondrial a été mesuré à l'aide du kit JC-1 (Abcam, ab113850). Le JC-1 (tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) est un colorant lipophile et cationique qui va s'accumuler lors de la phosphorylation oxydative au niveau de la membrane mitochondriale, chargée négativement par la présence d'électrons. Lorsque le potentiel membranaire mitochondrial est faible, le colorant s'accumule alors dans le cytoplasme sous forme d'un monomère qui émet de la fluorescence verte à 530 nm. Une augmentation de la fluorescence émise à 530nm est donc le signe d'une diminution du potentiel membranaire (dépolariation). A l'inverse, une diminution de la fluorescence verte montre une augmentation du potentiel membranaire.

Les cellules sont lavées avec 100 µL de dilution buffer 1X. 100 µL de solution JC-1 sont ajoutés et les cellules sont incubées 10 minutes à 37°C, dans le noir. 2 nouveaux lavages sont réalisés. Les stimulants sont ajoutés et les cellules incubées pendant 1H.

Lecture de la plaque :

- Excitation :
 - 475 nm
- Emission :
 - 530 nm (monomères)

Calcul des résultats :

La valeur du milieu seul est soustraite à la moyenne des triplicats de chaque condition. La condition NT est la condition de référence (100% de fluorescence). Les autres conditions sont rapportées à la condition de référence (fluorescence relative).

6.2 Production de radicaux libres (ROS/SUP)

Afin de mesurer la production des radicaux libres dans les synoviocytes fibroblastiques, nous avons utilisé un kit de détection des ROS (Reactive oxygen species) et des SUP (Superoxydes) (Abcam, ab139476). Ce kit est basé sur la détection de deux fluorescences :

- Un colorant qui émet une fluorescence verte à 525 nm (excitation à 490 nm) pour la détection des radicaux libres totaux. Cette sonde est capable de détecter une large gamme de radicaux libres tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le peroxyde nitrite ($ONOO^-$) ou le radical hydroxyle (OH^\cdot).
- Un colorant qui émet une fluorescence orange à 620 nm (excitation à 550 nm) et qui réagit spécifiquement avec les anions superoxydes (O_2^-).

Le milieu de culture est retiré et les cellules sont rincées avec 100 μ L de tampon de lavage. 50 μ L d' H_2O_2 (*Sigma, H1009*) 100 μ M ou 50 μ L de solution contenant un inducteur de la formation des radicaux libres, la pyocyanine, sont ajoutés dans les puits contrôles (3,5 μ L pyocyanine 10 mM + 46,5 μ L wash buffer). 50 μ L de mix ROS/SUP (dilution à 1/1800) sont ajoutés dans tous les puits et les cellules sont incubées 1H à 37°C, 5% de CO₂ dans le noir.

Lecture :

- ROS : 520 nm (excitation : 485 nm)
- SUP : 610 nm (excitation : 550 nm)

Calcul des résultats :

La valeur de la condition sans cellule est soustraite à la moyenne de chaque condition. L'une des conditions sert de référence (NT ou shEGFP en fonction de la manipulation). La fluorescence mesurée est relative par rapport à la condition de référence.

7. Test statistique/logiciel

Le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Prism 6.01, *GraphPad Software, Inc*) a été utilisé afin de réaliser les graphes et tests statistiques nécessaires à la compréhension des résultats. Les tests statistiques utilisés étaient de type appariés et non paramétriques. Pour l'analyse des western blots, les bandes détectées ont été analysées par densitométrie. L'intensité de chaque bande a été mesurée avec le logiciel Image Studio Lite (Li-Cor Biosciences, Linkolin, Nebraska, NE). Pour normaliser les niveaux de protéine déposés sur gel, la valeur de la bande correspondant à la protéine étudiée a été normalisée avec l'intensité d'un étalon interne, la protéine HSP90.

Résultats

1. Contexte particulier du mémoire

Le mémoire s'est déroulé du 2 novembre 2020 au 2 avril 2021, soit en période d'épidémie de COVID-19. Les synoviocytes cultivés par le laboratoire de Rhumatologie du GIGA proviennent de membranes synoviales issues de patients souffrant d'arthrose et subissant une arthroplastie du genou. De nombreuses opérations ayant été reportées, le nombre de membranes synoviales disponibles au cours du mémoire était limité. Ceci explique le faible nombre de patients ayant été utilisés pour les différentes expérimentations et l'absence de significativité au niveau statistique.

2. Rôle de CEMIP dans le stress oxydant

Chez les patients souffrant d'arthrose, on retrouve une surexpression de CEMIP. Pour rappel, CEMIP est capable de dégrader l'acide hyaluronique en fragments de bas poids moléculaires. Ces derniers, contrairement aux fragments de haut poids moléculaires, possèdent des propriétés inflammatoires. L'inflammation générée par la dégradation de l'acide hyaluronique pourrait provoquer un stress oxydant. C'est dans ce contexte que nous avons cherché à savoir si CEMIP pouvait induire un stress oxydant.

2.1 Variation du taux de radicaux libres après stimulation à l' H_2O_2

Afin de mesurer l'influence de CEMIP sur la production de radicaux libres dans les synoviocytes fibroblastiques issus de 3 patients arthrosiques, un kit de détection des radicaux libres totaux (ROS) et des anions superoxydes (SUP) a été utilisé. La détection des radicaux libres totaux se réalise à 520 nm tandis que la détection des anions superoxydes se réalise à 610 nm. Les synoviocytes sont dans un premier temps uniquement stimulés avec du H_2O_2 50 μM durant 1H, ce dernier étant un inducteur du stress oxydant (Figure 1). Par rapport aux synoviocytes non traités, les synoviocytes traités avec l' H_2O_2 montrent une augmentation de la production totale de radicaux libres (Figure 1a) mais pas d'anions superoxydes (Figure 1b). La stimulation des synoviocytes avec la pyocyanine, un inducteur du stress oxydant fourni avec le kit, nous permet d'attester du bon fonctionnement de celui-ci (Figure 1c et 1d).

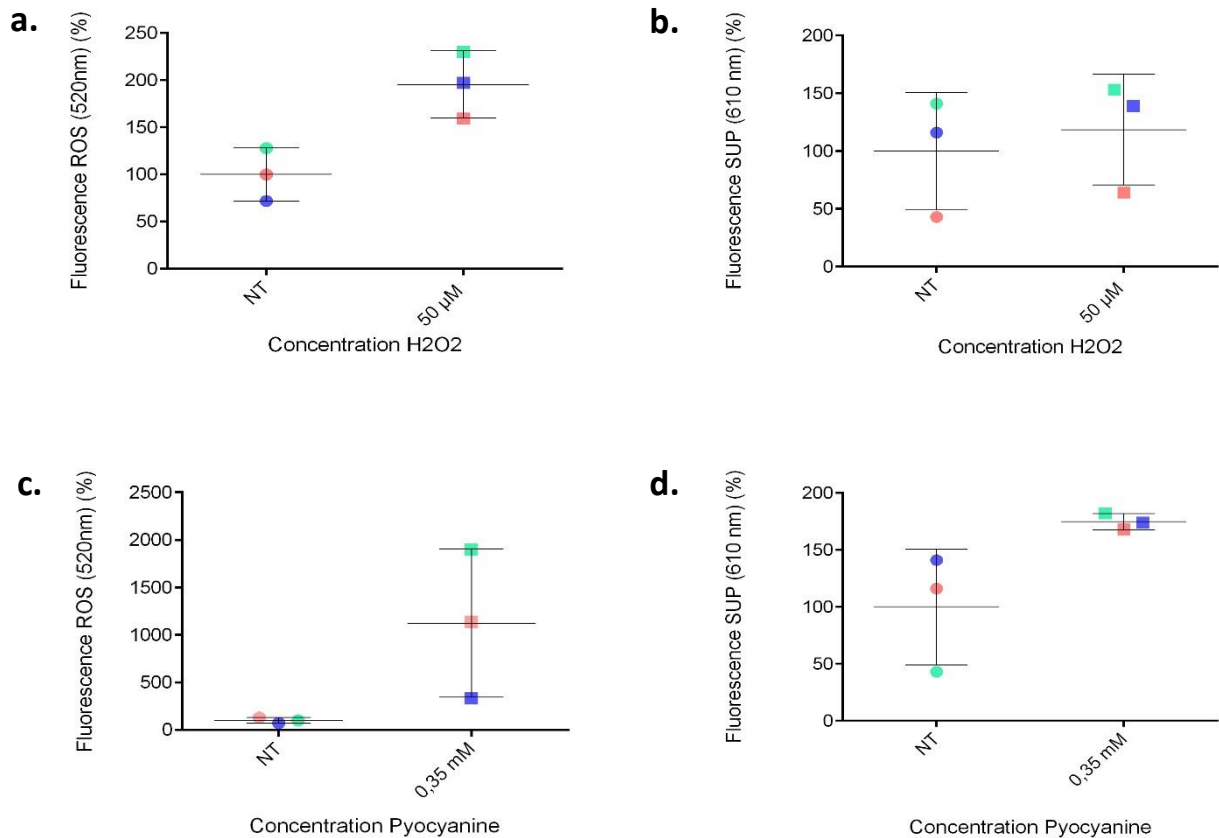


Figure 1. Mesure de la production de radicaux libres par les synoviocytes fibroblastiques non traités (NT) et traités avec du H₂O₂ 50 μM (ou la pyocyanine) durant 1h. Fluorescence relative par rapport à la condition NT **a. et b.** Production totale de radicaux libres (**a.**) et d’anions superoxydes (**b.**) par les synoviocytes après stimulation avec l’H₂O₂. **c. et d.** Production totale de radicaux libres (**c.**) et d’anions superoxydes (**d.**) par les synoviocytes après stimulation avec la pyocyanine. **n=3**

2.2 Rôle de CEMIP dans l’induction des radicaux libres

2.2.1 Validation des shRNA dirigés contre CEMIP

Pour éteindre l’expression de CEMIP dans les synoviocytes fibroblastiques des patients arthrosiques, deux shRNA de séquence différente ont été conçus. Leur efficacité a été vérifiée par western blot (Figure 2). Le western blot a permis de mettre en évidence que seul l’un des deux shRNA, en l’occurrence shCEMIP2, fonctionne. Dès lors, seul le shCEMIP2 sera utilisé pour les analyses ultérieures.

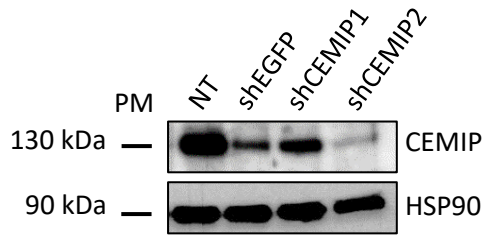


Figure 2. Vérification de la déplétion de CEMIP par les shRNA.

2.2.2 Effet de Cemip sur la production des radicaux libres

Les synoviocytes issus de 3 patients arthrosiques sont traités durant 7 jours avec des shRNA dirigés contre l'eGFP (shEGFP) ou contre CEMIP (shCEMIP2). Le milieu de culture est enlevé et le réactif de détection des ROS/SUP est ajouté. Après 1h d'incubation, la production de radicaux libres totaux (ROS) et de l'anion superoxyde (SUP) est évaluée (Figure 3). La déplétion de CEMIP semble diminuer la production de radicaux libres totaux (Figure 3a) mais ne pas avoir d'effet sur la production d'anions superoxyde (Figure 3b).

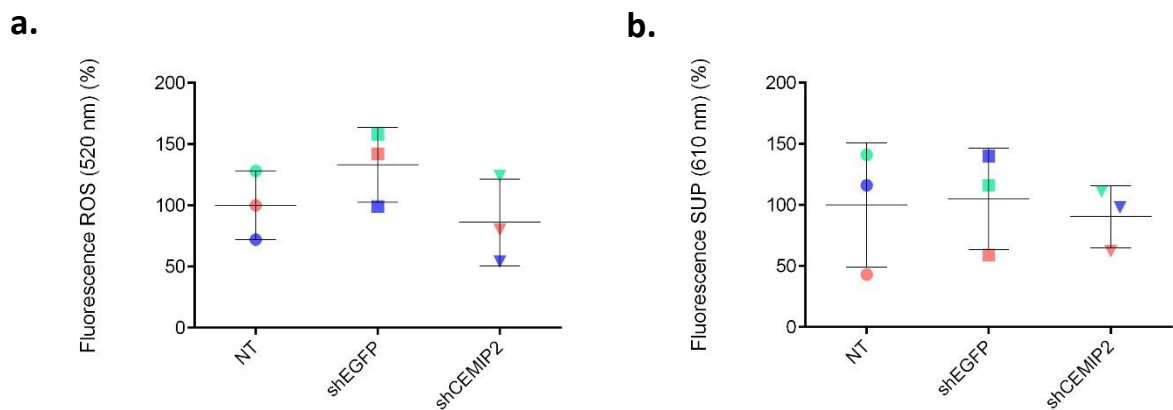


Figure 3. Mesure de la production de radicaux libres par les synoviocytes fibroblastiques de 3 patients arthrosiques après déplétion de CEMIP. Les cellules sont incubées durant 1h avec le réactif de détection des ROS/SUP. Fluorescences relatives par rapport à la condition NT. **a.** Mesure de la production des radicaux libres totaux (ROS) ; **b.** Mesure de la production de l'anion superoxyde (SUP). **n=3**

2.2.3 Rôle de CEMIP dans l'induction des radicaux libres par l'H₂O₂

Après avoir étudié l'influence de CEMIP sur la production de radicaux libres, l'influence de CEMIP dans l'induction du stress oxydant par l'H₂O₂ a été investiguée. Les synoviocytes issus de 3 patients arthrosiques sont incubés avec les shEGFP ou shCEMIP2 durant 7 jours. Le milieu de culture est enlevé et les synoviocytes sont ensuite traités avec le H₂O₂ 50 µM durant 1h. Les radicaux libres totaux (ROS) et les anion superoxydes (SUP) sont mesurés (Figure 4). Les radicaux libres totaux augmentent lorsque les synoviocytes sont stimulés avec l'H₂O₂. Cependant, la production de radicaux libres totaux diminue chez les synoviocytes dont l'expression de CEMIP est éteinte (Figure 4a).

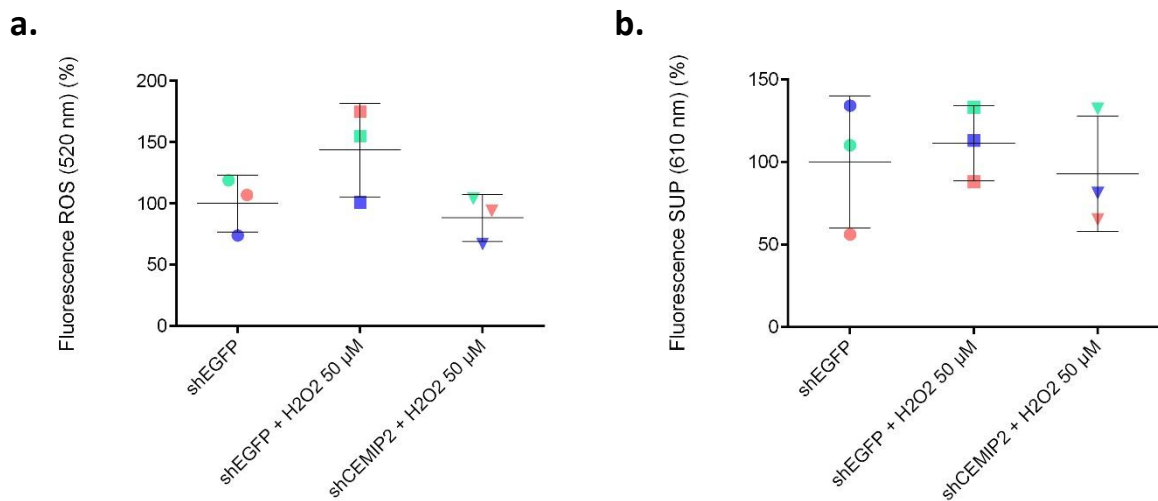


Figure 4. Mesure de la production des radicaux libres par les synoviocytes de 3 patients arthrosiques après déplétion de CEMIP et/ou stimulation par l'H₂O₂ 50 µM (1h). Fluorescences relatives par rapport à la condition de référence (shEGFP). **a.** Mesure de la production des radicaux libres totaux ; **b.** Mesure de la production de l'anion superoxyde.

3. Rôle de CEMIP dans la phosphorylation oxydative

3.1 Rôle de CEMIP dans la modulation du potentiel membranaire mitochondrial

Le potentiel membranaire mitochondrial résulte du gradient électrochimique de protons créés par la chaîne respiratoire mitochondriale³⁰. L'augmentation du potentiel membranaire mitochondrial est associée à une augmentation de ce gradient de protons. L'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase, entraîne une augmentation du gradient de protons en bloquant le retour des protons dans la matrice mitochondriale à travers l'ATP synthase⁶⁸. Nous avons investigué l'influence de CEMIP et le potentiel membranaire mitochondrial.

3.1.1 Variation du potentiel membranaire mitochondrial après traitement à l'oligomycine

L'oligomycine est un inhibiteur de l'ATP synthase. Elle entraîne une augmentation du potentiel membranaire mitochondrial en induisant l'accumulation des protons dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Pour mesurer le potentiel membranaire mitochondrial, un kit basé sur la fluorescence du JC-1 a été utilisé. Lorsque le potentiel membranaire mitochondrial augmente, la fluorescence verte (530 nm) émise par le JC-1 diminue. Les synoviocytes de patients arthrosiques (n=3) ont été stimulés avec de l'oligomycine 0,05 μ M durant 1h (Figure 5). La fluorescence à 530 nm diminue avec l'oligomycine, indiquant une augmentation du potentiel membranaire mitochondrial des synoviocytes.

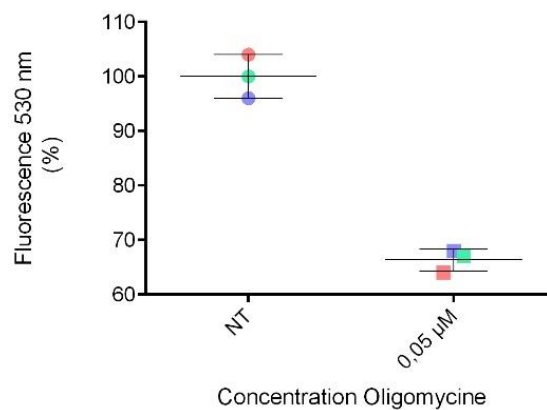


Figure 5. Variation du potentiel membranaire mitochondrial dans des synoviocytes de patients arthrosiques non stimulés (NT) et stimulés avec de l'oligomycine 0,05 μ M durant 1h. Résultats exprimés sous forme de pourcentage relatif par rapport à la condition référence (NT). n=3

3.1.2 Validation des shRNA dirigés contre CEMIP

L'expression de CEMIP est mesurée par Western Blot pour valider que les shRNA sont fonctionnels. Cependant, seul le shCEMIP2 fonctionne correctement. Par conséquent, seul le shCEMIP2 est utilisé pour la manipulation suivante.

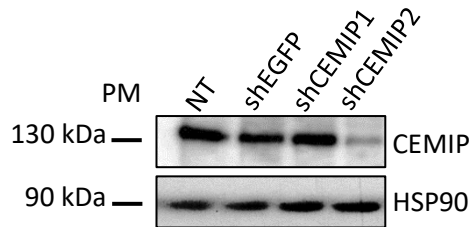


Figure 6. Vérification de la déplétion de CEMIP par les shRNA.

3.1.3 Variation du potentiel membranaire mitochondrial après déplétion de CEMIP

Le potentiel membranaire mitochondrial a été mesuré après déplétion de CEMIP dans les synoviocytes issus de 3 patients arthrosiques (synoviocytes traités avec les shRNA durant 7 jours). Même si les synoviocytes traités avec le shCEMIP2 montrent une augmentation du potentiel membranaire mitochondrial, celle-ci semble plutôt liée au virus qu'à la déplétion de CEMIP (Figure 7).

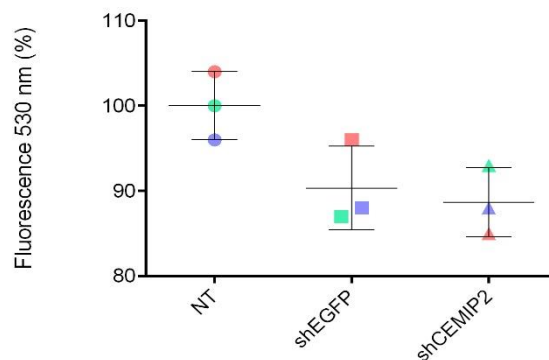


Figure 7. Mesure du potentiel membranaire mitochondrial après la déplétion de CEMIP (synoviocytes traités durant 7 jours avec les shRNA) dans les synoviocytes fibroblastiques de 3 patients arthrosiques. Mesure exprimée sous forme de fluorescence relative par rapport à la condition contrôle (NT). **n=3**

3.2 Modulation de la phosphorylation oxydative par CEMIP

Dans des travaux réalisés précédemment par le laboratoire de Rhumatologie, un séquençage de l'ARN (RNAseq) après déplétion de CEMIP dans des synoviocytes issus de patients souffrant d'arthrose a été généré. Un différentiel d'expression a été observé pour 114 gènes : 74 gènes présentant une expression diminuée et 40 gènes une expression augmentée. Par la suite, un Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) a été réalisé dans le but d'identifier des voies biologiques associées aux gènes identifiés dans le RNAseq. La phosphorylation oxydative était la voie dont l'activité augmentait le plus fortement lorsque l'on éteignait l'expression de CEMIP dans les synoviocytes. Le tableau 1 reprend l'ensemble des gènes codant pour différentes protéines des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et dont l'expression a été augmentée lors de la déplétion de CEMIP.

L'expression des protéines mises en surbrillance dans le tableau 1 (ATP1B1 : Sodium/Potassium-Transporting ATPase subunit Beta 1 ; ARALAR1 : Calcium-Binding Mitochondrial Carrier Protein ARALAR1 ; NDUFA8 : NADH Deshydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 8 ; ETFB : Electron Transfer Flavoprotein subunit beta ; COX7b : Cytochrome C Oxidase subunit 7b) a été analysée par Western Blot dans le but de confirmer les résultats du RNAseq.

3.2.1 Confirmation de la déplétion de CEMIP

La déplétion de CEMIP par les shCEMIP1 et shCEMIP2 est confirmée par Western Blot. Les deux shRNA sont fonctionnels. (Figure 8)

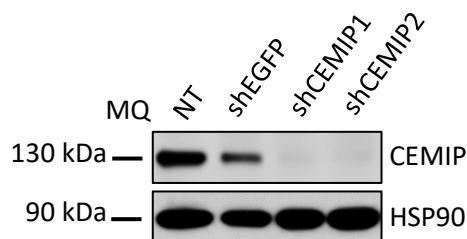


Figure 8. Confirmation de la déplétion de CEMIP par les shCEMIP1 et shCEMIP2.

3.2.1 Modulation de l'expression des gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire par CEMIP

Nom protéine	padj	FC_shCEMIP1 vs shEGFP	FC_shCEMIP2 vs shEGFP	
ATP1B1	0,021	1,61	2,94	Complexe I
ATP5G1	0,000	1,95	2,29	Complexe II
ARALAR1	0,000	1,33	1,71	Complexe III
OGDH	0,000	1,20	1,61	Complexe IV
ATP5J	0,000	1,27	1,55	Complexe V
NDUFA8	0,001	1,32	1,42	
OAT	0,000	1,18	1,49	
HCCS	0,012	1,26	1,33	
SDHD	0,024	1,15	1,39	
IDH3A	0,000	1,08	1,45	
ISCU	0,010	1,25	1,23	
ETFB	0,033	1,11	1,36	
COX7B	0,034	1,14	1,32	
NDUFB5	0,024	1,22	1,25	
MRPL15	0,011	1,16	1,30	
ACADSB	0,010	1,17	1,25	
ACADM	0,000	1,04	1,36	
ATP6AP1	0,033	1,18	1,21	
SDHA	0,013	1,16	1,23	
ATP6V1H	0,017	1,14	1,23	
UQCR10	0,000	1,00	1,37	
NDUFA5	0,045	1,05	1,27	
ATP5A1	0,047	1,11	1,20	
ATP5C1	0,000	1,02	1,27	
RETSAT	0,001	1,03	1,24	
COX5A	0,048	1,05	1,21	
CYC1	0,009	1,01	1,23	
UQCRRF1	0,033	1,03	1,20	
ATP6V1G1	0,001	1,02	1,21	
VDAC3	0,013	1,10	1,18	

Tableau 1. Ensemble des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale voyant leur expression augmentée suite à la déplétion de CEMIP dans les synoviocytes fibroblastiques issus de patients arthrosiques. Les protéines mises en surbrillance sont sélectionnées pour confirmer les résultats du RNAseq au niveau protéique (Western Blot) FC (Fold Change) ; padj (p-valeur ajustée)

3.3 Validation de la modulation de l'expression des cibles de la phosphorylation oxydative après déplétion de CEMIP

Pour confirmer les résultats obtenus lors du RNAseq, à savoir l'augmentation de l'expression de certains gènes codant pour des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative lorsque CEMIP est déplété, nous avons analysé par Western Blot l'expression au niveau protéique de certains de ces gènes (Figure 8). Les synoviocytes issus de 3 patients arthrosiques ont été traités avec les shRNA durant 7 jours en vue d'éteindre l'expression de CEMIP. Les graphes correspondent à la « quantification » des Western Blot. L'expression des différentes protéines est normalisée par l'HSP90 et rapportée à la condition de référence (NT). De l'ensemble des protéines analysées, seule ARALAR semble confirmer les résultats du RNAseq montrant une augmentation d'ARALAR en présence de CEMIP (Figure 8a).

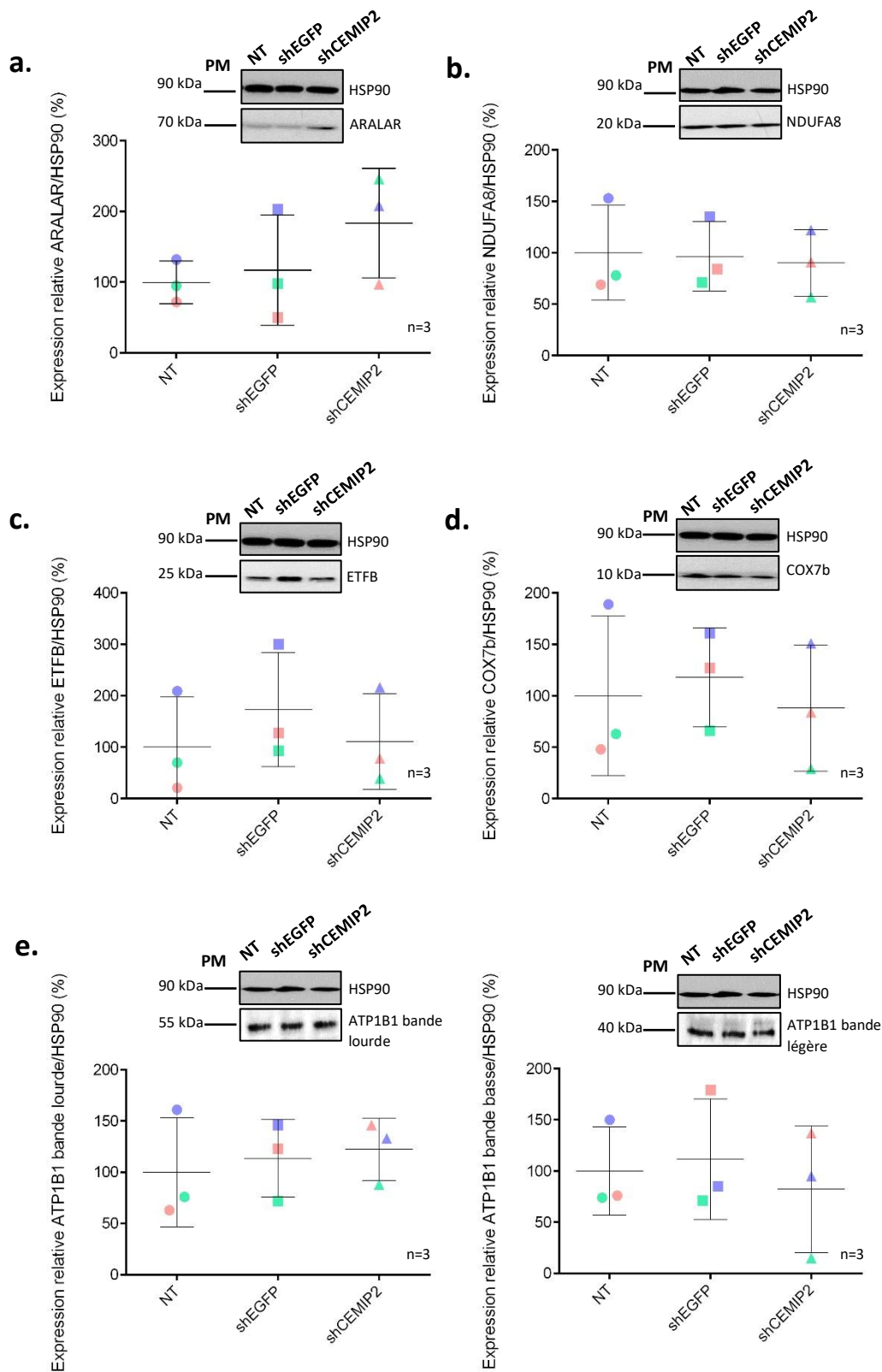


Figure 9. Analyse de l'expression des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative après déplétion de CEMIP dans les synoviocytes de 3 patients arthrosiques (n=3). L'expression des différentes protéines est normalisée par celle de la HSP90. Expression relative par rapport à la condition de référence (NT) **a.** ARALAR ; **b.** NDUFA8 ; **c.** ETFB ; **d.** COX7b ; **e.** ATP1B1

4. Effet du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sur l'expression de CEMIP

Les effets du peroxyde d'hydrogène sur l'expression de CEMIP ont été étudiés. Les synoviocytes issus de 3 patients souffrant d'arthrose ont été stimulés selon différentes concentrations durant 24H. L'expression de CEMIP a ensuite été analysée par Western Blot (Figure 10). Le peroxyde d'hydrogène ne semble pas avoir d'effets sur l'expression de CEMIP.

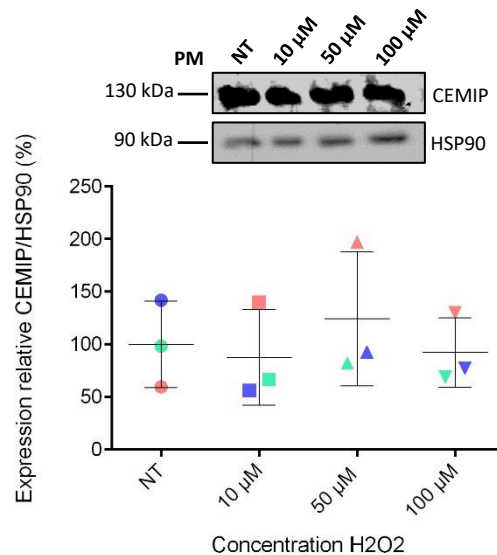


Figure 10. Analyse de l'expression de CEMIP après stimulation des synoviocytes fibroblastiques issus de patient arthrosiques ($n=3$) avec différentes concentrations de H₂O₂ durant 24h. L'expression de CEMIP est normalisée par celle de l'HSP90 et rapportée à la condition de référence (NT).

5. Effet du H₂O₂ sur les cibles de la phosphorylation oxydative

De la même manière que pour CEMIP, nous avons également étudié les effets du peroxyde d'hydrogène sur l'expression des différentes protéines de la chaîne respiratoire. Les synoviocytes issus de 3 patients souffrant d'arthrose ont été stimulés selon différentes concentrations durant 24H. L'expression des protéines a ensuite été analysée par Western Blot. Là encore, le H₂O₂ ne semble pas avoir d'effets sur l'expression des protéines étudiées (Figure 11).

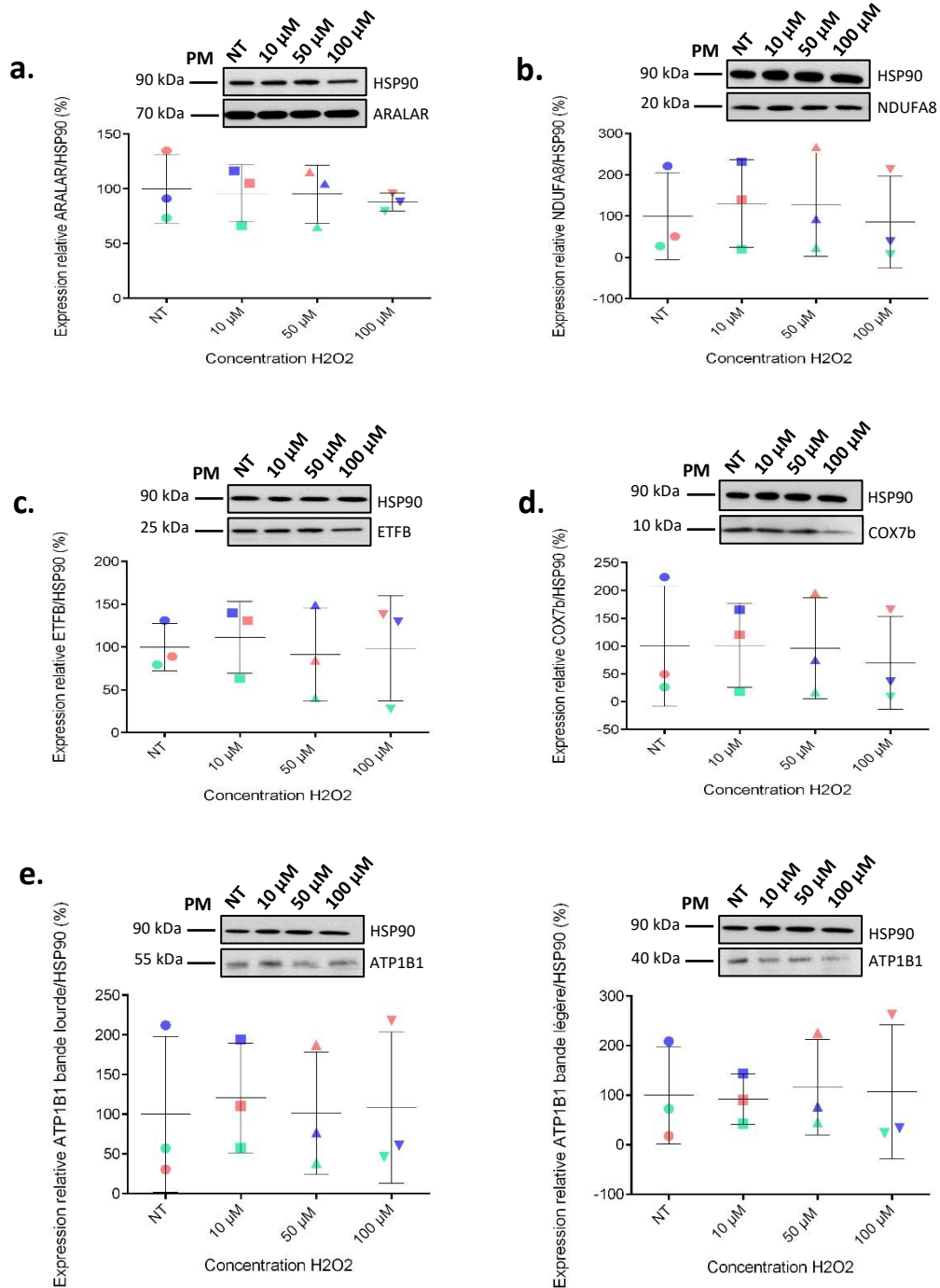


Figure 11. Analyse de l'expression des différentes protéines de la phosphorylation oxydative après stimulation des synoviocytes issus de patients arthrosiques (n=3) avec différentes concentrations d'H₂O₂ durant 24h. L'expression de CEMIP est normalisée par celle de l'HSP90 et rapportée à la condition de référence (NT). **a.** ARALAR ; **b.** NDUFA8 ; **c.** ETFB ; **d.** COX7b ; **e.** ATP1B1

Discussion

Avant toute chose, il convient de rappeler le contexte dans lequel s'est déroulé le mémoire. La crise sanitaire liée au COVID-19 a particulièrement affecté les hôpitaux. Ces derniers ont dû s'adapter et se réorganiser pour faire face à la crise. Certaines interventions chirurgicales « non urgentes » ont été postposées, notamment les arthroplasties du genou. En temps normal, le laboratoire de Rhumatologie du GIGA récupère les membranes synoviales provenant de patients souffrant d'arthrose et subissant une arthroplastie du genou au CHU de Liège afin d'en extraire les cellules. Cependant, au vu du contexte, le nombre de membranes synoviales récupérées a été très faible et a grandement impacté la robustesse des résultats. Les résultats sont donc à considérer comme préliminaires et devront être confirmés sur un plus grand nombre de patients.

Les premières découvertes suggérant un rôle potentiel de CEMIP dans la pathogenèse de l'arthrose remontent au début des années 2010. *Yoshida et al* se sont aperçus que l'augmentation de la dégradation de l'acide hyaluronique dans les synoviocytes fibroblastiques issus de patients souffrant d'arthrose était corrélée à une augmentation de l'expression de CEMIP. De plus, lorsque l'on éteignait l'expression de CEMIP dans les synoviocytes, la dégradation de l'acide hyaluronique diminuait⁶⁰. Les fragments de bas poids moléculaire résultant de la dégradation excessive de l'acide hyaluronique chez les patients arthrosiques possèdent des propriétés inflammatoires. L'accumulation de ces fragments dans le liquide synovial pourrait être responsable de la mise en place d'un phénotype inflammatoire dans l'articulation⁵¹. Cette inflammation pourrait à son tour être à la base d'une augmentation de la production de radicaux libres et ainsi provoquer un stress oxydant⁶⁹. Cependant, cette relation entre l'inflammation et le stress oxydant pourrait être bidirectionnelle. En effet, les radicaux libres produits sont capables de stimuler l'expression de la COX-2 dans les synoviocytes fibroblastiques⁴⁴. C'est dans ce contexte que nous avons cherché à savoir si CEMIP était capable d'induire un stress oxydant.

Par ailleurs, lors de précédents travaux menés dans le laboratoire de Rhumatologie du GIGA, le séquençage de l'ARN messager après déplétion de CEMIP dans des synoviocytes provenant de patients arthrosiques a permis de mettre en évidence la modulation de l'expression d'une centaine de gènes, que ce soit positivement ou négativement. Pour aller plus loin, un Gene Set Enrichment Analysis a été réalisé. Ce dernier a permis de mettre en relation les gènes dont l'expression était modifiée lors du RNAseq avec différentes voies cellulaires. La phosphorylation oxydative est ressortie comme étant la voie dont l'expression des ARNm était la plus augmentée après déplétion de CEMIP dans les synoviocytes.

Nos objectifs au cours de ce mémoire étaient donc (i) d'investiguer le rôle de CEMIP dans l'induction de radicaux libres, (ii) d'étudier le rôle de CEMIP dans la phosphorylation oxydative et (iii) d'étudier l'influence du stress oxydant sur l'expression de CEMIP et des cibles de la phosphorylation oxydative au sein de la membrane synoviale arthrosique.

Afin d'éclaircir la fonction de CEMIP dans la membrane synoviale et plus particulièrement dans les synoviocytes fibroblastiques, nous avons éteint l'expression de CEMIP dans des synoviocytes fibroblastiques issus de patients souffrant d'arthrose. La déplétion de CEMIP a été réalisée via l'utilisation de la technologie de l'interférence par ARN (shRNA). Deux shRNA de séquences différentes (#shCEMIP1 ; #shCEMIP2) visant à éteindre l'expression de CEMIP ainsi qu'un shEGFP contrôle ont été conçus à la plateforme des vecteurs viraux du GIGA. Pour chaque expérience réalisée, nous avons commencé par vérifier la déplétion de CEMIP par Western Blot. Pour l'expérience liée à la figure 8, qui a été réalisée avant mon arrivée au laboratoire, l'efficacité des deux shRNA était correcte. Toutefois, pour les expériences réalisées par la suite, (Figure 2 + Figure 6), nous avons observé que le shCemip#1 n'induisait pas de diminution de l'expression de Cemip. Les délais nécessaires pour relancer une production de shRNA étant trop longs, nous avons décidé de poursuivre les manipulations avec un seul shRNA (shCEMIP2) fonctionnel.

Dans le but d'étudier l'influence de CEMIP sur la production de radicaux libres dans les synoviocytes, nous avons utilisé un kit de détection des radicaux libres. Le kit est capable de détecter les radicaux libres totaux (ONOO⁻, HO⁻, ...) et plus spécifiquement les anions superoxydes (O₂⁻). Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est une molécule largement utilisée pour induire le stress oxydant dans différents types de cellules⁷⁰. Nous avons stimulé les synoviocytes fibroblastiques provenant de patients arthrosiques avec du H₂O₂. La production totale de radicaux libres par les synoviocytes semble augmenter (Figure 1a). Par contre, la production d'anions superoxydes semble rester stable (Figure 1b). Ceci pourrait confirmer que le H₂O₂ induit le stress oxydant majoritairement via la formation du radical hydroxyle (OH⁻) tel que décrit dans la littérature²⁶. Par la suite, nous avons mesuré la production de radicaux libres après déplétion de CEMIP dans des synoviocytes issus de patients arthrosiques. En comparaison avec les synoviocytes non traités, la déplétion de CEMIP semble entraîner une diminution de la production des radicaux libres totaux (Figure 3a) mais pas des anions superoxydes (Figure 3b). A noter que la production de radicaux libres semble augmenter pour les synoviocytes traités avec le shEGFP. Peut-être que le simple fait d'introduire un vecteur viral dans les cellules augmente la production de radicaux libres.

Enfin, nous nous sommes intéressés au rôle de CEMIP dans l'induction du stress oxydant par l' H_2O_2 . En plus de la déplétion de CEMIP, les synoviocytes ont été traités avec du H_2O_2 . Lorsque l'on ajoute le H_2O_2 aux cellules traitées avec le shEGFP, on observe une augmentation de la production des radicaux libres totaux par rapport aux cellules traitées uniquement avec le shEGFP. Par contre, lorsque CEMIP est déplété, le taux de radicaux libres totaux diminue (Figure 4a). Une nouvelle fois, il ne semble pas y avoir d'effet au niveau de la production d'anions superoxydes (Figure 4b).

La phosphorylation oxydative est le procédé par lequel les cellules synthétisent la majorité de leur ATP en condition normoxique³⁰. Nous nous sommes intéressés au rôle que pourrait jouer CEMIP dans la perturbation de celle-ci. Différents paramètres de la phosphorylation oxydative ont été mesurés après déplétion de CEMIP dans les synoviocytes issus de patients souffrant d'arthrose. Le potentiel membranaire mitochondrial a ainsi été mesuré grâce à un kit basé sur le JC-1, un colorant cationique s'accumulant au niveau de la membrane mitochondriale chargée négativement. Lorsque le potentiel membranaire diminue (dépolariation), le nombre de charges négatives au niveau de la membrane diminue également. De ce fait, le potentiel électrique transmembranaire diminue aussi. Cependant, c'est ce potentiel électrique transmembranaire qui est le moteur de l'accumulation du JC-1 dans la membrane mitochondriale. Si celui-ci diminue, le JC-1 s'accumule sous forme de monomères dans le cytoplasme diminue également et émet une fluorescence verte (530 nm). Une augmentation de la fluorescence à 530 nm est donc le signe d'une dépolariation de la membrane. L'oligomycine est un antibiotique qui inhibe l'ATP synthase et empêche le retour des protons dans la matrice mitochondriale. Ceci a pour conséquence l'augmentation du gradient de protons qui se traduit par une augmentation du potentiel membranaire mitochondrial⁷¹. Comme attendu, lorsque les synoviocytes des patients arthrosiques ont été stimulés avec de l'oligomycine, nous avons observé une diminution de la fluorescence à 530 nm, indiquant ainsi une hyperpolarisation de la membrane et donc une augmentation du potentiel membranaire mitochondrial (Figure 5). Nous avons ensuite mesuré le potentiel membranaire mitochondrial après déplétion de CEMIP dans les synoviocytes. On n'observe pas de modification du potentiel membranaire mitochondrial dans les synoviocytes déplétés en CEMIP par rapport aux cellules traitées avec le shEGFP. Par contre, le potentiel membranaire mitochondrial augmente pour les synoviocytes traités avec le shEGFP par rapport aux synoviocytes non traités (NT) (Figure 7).

Dans des travaux réalisés précédemment, le séquençage de l'ARN après déplétion de CEMIP dans des synoviocytes provenant de patients arthrosiques a révélé la modification de l'expression d'une centaine de gènes. Le GSEA réalisé par la suite a permis de mettre en relation certains de ces gènes avec une augmentation de la phosphorylation oxydative. Le tableau 1 reprend l'ensemble des gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale et dont l'expression a augmenté après déplétion de CEMIP.

Nous avons sélectionné certains de ces gènes pour tenter de confirmer les résultats obtenus lors du RNAseq. Cette sélection s'est faite sur base de la valeur du *fold change* mesurée lors du RNAseq, des complexes de la chaîne respiratoire auxquels appartiennent les protéines codées par ces gènes et sur la disponibilité des anticorps ciblant ces protéines dans le cadre d'un Western Blot. ATP1B1 code pour la sous-unité beta-1 de la Na⁺/K⁺ ATPase. ARALAR catalyse l'échange de l'aspartate avec le malate à travers la membrane interne de la mitochondrie. Ce système permet le transfert du NADH issus de la glycolyse vers la matrice mitochondriale, la membrane interne de la mitochondrie étant imperméable au NADH. Brièvement, le NADH cytosolique transfère ses électrons à une molécule d'oxaloacétate pour former du malate. Le malate ainsi obtenu traverse la membrane externe et interne de la mitochondrie. Une fois dans la matrice, le malate est oxydé en oxaloacétate et restitue ses électrons au NAD⁺ pour reformer du NADH. L'oxaloacétate est transformé en aspartate qui regagne le cytosol et y est retransformé en oxaloacétate pour recommencer un nouveau cycle⁷². NDUFA8 est l'une des 45 sous-unités constituant le complexe I de la chaîne respiratoire. NDUFA8 interviendrait seulement dans la structure du complexe et ne posséderait aucune activité catalytique⁷³. ETFB code pour la sous-unité beta de la flavoprotéine de transfert d'électrons qui permet de transférer des électrons issus de la matrice mitochondriale vers l'ubiquinone⁷⁴. Enfin, COX7B est la sous-unité 7b de la cytochrome C oxydase (complexe IV) de la chaîne respiratoire⁷⁵. Leur expression au niveau protéique a été analysée par Western Blot après déplétion de CEMIP dans les synoviocytes issus de 3 patients arthrosiques (Figure 9). De manière intéressante, la protéine ATP1B1 ressort systématiquement sous forme de deux bandes au lieu d'une. Une bande « lourde » à 55 kDa et une bande « légère » à 40 kDa (Figure 9e). Une explication possible à ce double marquage pourrait être que la protéine ATP1B1 existe sous une forme glycosylée (55 kDa) et une forme non glycosylée (40 kDa)⁷⁶. D'autres laboratoires s'intéressant à ATP1B1 et utilisant le même anticorps ont d'ailleurs obtenus les mêmes résultats⁷⁷.

Parmi l'ensemble des protéines sélectionnées, seule ARALAR tend à montrer une légère augmentation de son expression après déplétion de CEMIP. CEMIP pourrait donc diminuer l'expression d'ARALAR. Si tel était le cas, l'activité de la navette malate/aspartate diminuerait. Il y aurait une diminution de la concentration en NADH ce qui entraînerait une diminution de l'activité de la phosphorylation oxydative.

Dans l'ensemble, ces résultats ne permettent donc pas de confirmer les résultats obtenus lors du RNAseq. Cela peut paraître étonnant au vu du nombre de gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire et dont l'expression était augmentée une fois CEMIP déplété. De plus, d'autres voies telles que l'inflammation et l'EMT sont ressorties au cours de ce RNAseq et ont pu être confirmées. Un RNAseq avait également été réalisé au laboratoire après déplétion de CEMIP dans des chondrocytes arthrosiques et la phosphorylation oxydative ressortait déjà parmi les voies modifiées. Le trop faible nombre de patients utilisés pourrait être la raison pour laquelle nous n'avons pas pu confirmer les résultats du RNAseq. Une autre hypothèse serait une régulation au niveau post-transcriptionnel via des microRNA (miRNA). Les miRNA sont de petits ARN non codants capables d'inhiber l'expression d'un gène, soit en empêchant la traduction de l'ARN messager (mRNA), soit en induisant sa dégradation⁷⁸. Ceci pourrait donc expliquer pourquoi l'augmentation de l'expression des gènes codant pour les protéines de la chaîne respiratoire ne se reflète pas au niveau protéique. Enfin, les effets de la déplétion de CEMIP observés au niveau du RNAseq étaient représentatifs des 5 patients utilisés alors que l'on ne retrouve pas ces effets chez d'autres patients. Ceci souligne l'importance de valider les résultats sur un autre set de patients et à l'aide d'une autre technique. Dans un futur proche, nous tenterons de confirmer les résultats du RNAseq par qPCR, ce qui n'a pas été possible au cours du mémoire car les réactifs étaient en rupture de stock.

Pour terminer, nous avons étudié les effets d'un inducteur du stress oxydant, le peroxyde d'hydrogène, sur l'expression de CEMIP et des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale. Toutefois, ni l'expression de CEMIP (Figure 10), ni celle des protéines de la chaîne respiratoire (Figure 11) ne semblent être influencées par la stimulation des synoviocytes au H₂O₂.

Conclusion et Perspectives

Nous nous sommes intéressés au rôle de CEMIP dans la pathogenèse de l'arthrose et plus particulièrement à la relation entre CEMIP, le stress oxydant et la phosphorylation oxydative au sein de la membrane synoviale arthrosique. Malheureusement, nous avons été limités par la crise sanitaire liée au COVID-19 et n'avons pas pu obtenir autant de membranes synoviales que ce qui est habituellement nécessaire pour obtenir des résultats robustes. En conséquence, les résultats obtenus ne permettent pas de tirer de conclusions définitives mais peuvent déjà indiquer une tendance.

Au cours de ce mémoire, nous avons observé que :

1. L' H_2O_2 augmentait la production de radicaux libres dans les synoviocytes fibroblastiques.
2. La déplétion de CEMIP entraîne une diminution de la production de radicaux libres induite ou non par l' H_2O_2 .
3. La déplétion de CEMIP ne semble pas modifier le potentiel membranaire mitochondrial.
4. La déplétion de CEMIP ne semble pas influencer l'expression des protéines de la chaîne respiratoire.
5. La stimulation à l' H_2O_2 ne semble pas avoir d'effet ni sur l'expression de CEMIP, ni sur l'expression des protéines de la chaîne respiratoire.

Deux tendances se dégagent de ces résultats préliminaires. La première est que CEMIP pourrait bel et bien jouer un rôle dans l'induction des radicaux libres. La deuxième est que les paramètres de la phosphorylation oxydative (potentiel membranaire et expression des protéines de la chaîne respiratoire) que nous avons mesurés ne semblent pas être influencés par CEMIP. Cependant, un autre paramètre de la phosphorylation oxydative que nous pourrions mesurer est la production d'ATP. Etudier l'influence de CEMIP sur la production d'ATP serait peut-être plus parlant car cette dernière présente l'avantage de refléter directement l'activité de la phosphorylation oxydative. De plus, une diminution de la production d'ATP a déjà été mise en évidence dans des chondrocytes issus de patients souffrant d'arthrose⁷⁹.

A l'avenir, il serait intéressant d'étudier les voies de signalisation impliquées dans la production de radicaux libres et/ou impactées par ces derniers. C'est notamment le cas de la voie NF- κ B qui a été mise en évidence dans l'induction de l'expression de CEMIP dans des chondrocytes après stimulation de ces derniers avec de l'IL-1 β ⁸⁰. Toujours dans les chondrocytes arthrosiques, des niveaux élevés de radicaux libres sont responsables de l'inhibition de la voie PI3K/Akt et de l'activation de la voie MEK/ERK, favorisant ainsi l'inflammation²⁰.

Références

1. Abramoff, B., & Caldera, F. E. (2020). Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *Medical Clinics of North America*, 104(2), 293–311.
2. Palmer, A. J. R., Agricola, R., Price, A. J., Vincent, T. L., Weinans, H., & Carr, A. J. (2015). *Seminar Osteoarthritis*. 386.
3. Murphy, L.B., *et al* (2018), Medical Expenditures and Earnings Losses Among US Adults With Arthritis in 2013. *Arthritis Care Res*, 70: 869-876.
4. Sellam, J., & Berenbaum, F. (2010). The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 6(11), 625–635.
5. Rim, Y. A., & Ju, J. H. (2021). The role of fibrosis in osteoarthritis progression. *Life*, 11(1), 1–13.
6. Charlier, E *et al* (2019). Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA). *Biochemical Pharmacology*, 165(February)
7. Mathiessen, A., & Conaghan, P. G. (2017). Synovitis in osteoarthritis : current understanding with therapeutic implications. *Arthritis Research & Therapy*, 1–9.
8. Jay GD, Britt DE, Cha CJ. Lubricin is a product of megakaryocyte stimulating factor gene expression by human synovial fibroblasts. *J Rheumatol*. 2000 Mar;27(3):594-600.
9. D. Smith, M. (2012). The Normal Synovium. *The Open Rheumatology Journal*, 5(1), 100–106.
10. Scanzello, C. R., & Goldring, S. R. (2012). The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone*, 51(2), 249–257.
11. Wenham, C. Y. J., & Conaghan, P. G. (2010). The role of synovitis in osteoarthritis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 2(6), 349–359.
12. Griffin TM, Scanzello CR. Innate inflammation and synovial macrophages in osteoarthritis pathophysiology. *Clin Exp Rheumatol*. 2019 Sep-Oct;37 Suppl 120(5):57-63.
13. Ruiz, M. *et al*, (2019). TGFβ₁ is involved in the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and is dysregulated in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 27(3), 493–503.
14. Van Der Kraan, P. M. (2017). The changing role of TGFβ in healthy, ageing and osteoarthritic joints. *Nature Reviews Rheumatology*, 13(3), 155–163.
15. Remst, D. F. G., *et al* (2015). Unravelling osteoarthritis-related synovial fibrosis: A step closer to solving joint stiffness. *Rheumatology (United Kingdom)*, 54(11), 1954–1963.
16. Deroyer, C., *et al* (2019). CEMIP (KIAA1199) induces a fibrosis-like process in osteoarthritic chondrocytes. *Cell Death and Disease*, 10(2).
17. Bratic, A., & Larsson, N. G. (2013). The role of mitochondria in aging. *Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 951–957.
18. Loeser, R. F., Collins, J. A., & Diekmann, B. O. (2016). Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(7), 412–420.
19. Babior, B. M. (2004). NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology*, 16(1), 42–47.
20. Lepetsos, P., Papavassiliou, K. A., & Papavassiliou, A. G. (2018). Redox and NF-κB signaling in osteoarthritis. *Free Radical Biology and Medicine*, March, 0–1.

21. Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, 11(January), 613–619.
22. Lepetsos, P., & Papavassiliou, A. G. (2016). ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1862(4), 576–591.
23. Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-morte, D., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). *Oxidative stress , aging , and diseases*. 757–772.
24. Lu, N., Huang, S., & Matzuk, M. M. (1996). *Neurodegeneration, myocardial*. 93(September), 9782–9787.
25. Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F., & Vercesi, A. E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(4), 333–343.
26. Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 552(2), 335–344.
27. Gavriilidis, C., *et al.* (2013). *Mitochondrial Dysfunction in Osteoarthritis Is Associated With Down-Regulation of Superoxide Dismutase 2*. 65(2), 378–387.
28. Yu, S., & Kim, S. (2014). *Withaferin A-Caused Production of Intracellular Reactive Oxygen Species Modulates Apoptosis via PI3K / Akt and JNKinase in Rabbit Articular Chondrocytes*. 1042–1053.
29. Zahan, O. M., Serban, O., Gherman, C., & Fodor, D. (2020). The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis. *Medicine and Pharmacy Reports*, 93(1), 12–22.
30. Papa, S., *et al* (2012). The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 942).
31. Kumari, A. (2018). Chapter 1 Glycolysis. *Sweet Biochemistry*. 2018.
32. Van Der Blik, A. M., Sedensky, M. M., & Morgan, P. G. (2017). Cell biology of the mitochondrion. *Genetics*, 207(3), 843–871.
33. Wilson, D. F. (2017). Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism. *Journal of Physiology*, 595(23), 7023–7038.
34. Huoponen, K., Francalacci, P., Petrozzi, M., Morelli, L., Scoz, R., Obinu, D., Savontaus, M., & Wallace, D. C. (1996). *European mtDNAs From an Analysis of Three European Populations*.
35. Soto-hermida, A., *et al* (2014). Mitochondrion mtDNA haplogroups and osteoarthritis in different geographic populations. *MITOCH*, 15, 18–23.
36. Soto-hermida, A., *et al* (2017). *A replication study and meta-analysis of mitochondrial DNA variants in the radiographic progression of knee osteoarthritis*. *Rheumatology*. November 2016, 263–270.
37. Blanco, F.J., Valdes, A.M. & Rego-Pérez, I. Mitochondrial DNA variation and the pathogenesis of osteoarthritis phenotypes. *Nat Rev Rheumatol* **14**, 327–340 (2018).
38. Rego-Pérez, (2011). Mitochondrial DNA haplogroups and serum levels of proteolytic enzymes in patients with osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(4), 646–652.
39. Vaamonde-garcía, C., & López-armada, M. J. (2019). Role of mitochondrial dysfunction on rheumatic diseases. *Biochemical Pharmacology*, 165(January), 181–195.
40. Martínez-redondo, *et al.* (2010). Mitochondrion Human mitochondrial haplogroup H : The highest VO 2max consumer – Is it a paradox ? *Mitochondrion*, 10(2), 102–107.
41. Maneiro, *et al* (2003). Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis and Rheumatism*, 48(3), 700–708.

42. López-Armada *et al* (2006). Mitochondrial activity is modulated by TNF α and IL-1 β in normal human chondrocyte cells. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(10), 1011–1022.
43. Li, M., Luo, X., Long, X., Jiang, P., Jiang, Q., Guo, H., & Chen, Z. (2021). Potential role of mitochondria in synoviocytes. *Clinical Rheumatology* 447–457.
44. Fahmi, H., *et al.* (2001). Nimesulide reduces interleukin-1 β -induced cylooxygenase-2 gene expression in human synovial fibroblasts. *Osteoarthritis and Cartilage*, 9(4), 332–340.
45. Valcárcel-Ares, *et al* (2014). Mitochondrial dysfunction promotes and aggravates the inflammatory response in normal human synoviocytes. *Rheumatology (United Kingdom)*, 53(7), 1332–1343.
46. Garcia-Carbonell R, *et al.* Critical Role of Glucose Metabolism in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes. *Arthritis Rheumatol.* 2016 Jul;68(7):1614-26.
47. Shimizu, H *et al* (2018). Hyaluronan-Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization Is Up-Regulated and Involved in Hyaluronan Degradation in Human Osteoarthritic Cartilage. *American Journal of Pathology*, 188(9), 2109–2119.
48. Abe, S., Usami, S. I., & Nakamura, Y. (2003). Mutations in the gene encoding KIAA1199 protein, an inner-ear protein expressed in Deiters' cells and the fibrocytes, as the cause of nonsyndromic hearing loss. *Journal of Human Genetics*, 48(11), 564–570.
49. Boerboom A, Reusch C, Pieltain A, Chariot A, Franzen R. KIAA1199: A novel regulator of MEK/ERK-induced Schwann cell dedifferentiation. *Glia*. 2017 Oct;65(10):1682-1696.
50. Zhang, Y., Jia, S., & Jiang, W. G. (2014). KIAA1199 and its biological role in human cancer and cancer cells (Review). *Oncology Reports*, 31(4), 1503–1508.
51. Shiozawa, J *et al* (2020). Implication of HYBID (Hyaluronan-Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization) in Hyaluronan Degradation by Synovial Fibroblasts in Patients with Knee Osteoarthritis. *American Journal of Pathology*, 190(5), 1046–1058.
52. Kohi, S., Sato, N., Koga, A., Matayoshi, N., & Hirata, K. (2017). KIAA1199 is induced by inflammation and enhances malignant phenotype in pancreatic cancer. *Oncotarget*, 8(10), 17156–17163.
53. Jiang, Z., Zhai, X., Shi, B., Luo, D., & Jin, B. (2018). KIAA1199 overexpression is associated with abnormal expression of EMT markers and is a novel independent prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma. *OncoTargets and Therapy*, 11, 8341–8348.
54. Evensen, *et al* (2015). Hypoxia promotes colon cancer dissemination through up-regulation of cell migration-inducing protein (CEMIP). *Oncotarget*, 6(24), 20723–20739.
55. Shostak, *et al.* (2014). NF- κ B-induced KIAA1199 promotes survival through EGFR signalling. *Nature Communications*, 5.
56. Birkenkamp-Demtroder, K., *et al.* (2011). Repression of KIAA1199 attenuates Wnt-signalling and decreases the proliferation of colon cancer cells. *British Journal of Cancer*, 105(4), 552–561.
57. Jia, S., *et al*(2017). KIAA1199 promotes migration and invasion by Wnt/ β -catenin pathway and MMPs mediated EMT progression and serves as a poor prognosis marker in gastric cancer. *PLoS ONE*, 12(4), 1–16.
58. Terashima, *et al* (2014). KIAA1199 interacts with glycogen phosphorylase kinase β -subunit (PHKB) to promote glycogen breakdown and cancer cell survival. *Oncotarget*, 5(16), 7040–7050.
59. Garantziotis S, Savani RC. Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context. *Matrix Biol.* 2019 May;78-79:1-10.
60. Fraser, J. R. E., Laurent, T. C., & Laurent, U. B. G. (1997). Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, 242(1), 27–33.

61. Yoshida, H. *et al.* (2013). KIAA1199, a deafness gene of unknown function, is a new hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(14), 5612–5617.
62. Scheibner, K. A. *et al.* (2006). Hyaluronan Fragments Act as an Endogenous Danger Signal by Engaging TLR2. *The Journal of Immunology*, 177(2), 1272–1281.
63. Rousset, F., *et al.* (2015). IL-1beta mediates MMP secretion and IL-1beta neosynthesis via upregulation of p22phox and NOX4 activity in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(11), 1972–1980.
64. Robinson WH, Lepus CM, Wang Q, Raghu H, Mao R, Lindstrom TM, Sokolove J. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Oct;12(10):580-92.
65. Ding, Q. hai, *et al.* (2019). Knockdown of KIAA1199 suppresses IL-1 β -induced cartilage degradation and inflammatory responses in human chondrocytes through the Wnt/ β -catenin signalling pathway. *International Immunopharmacology*, 73(May), 203–211.
66. Nagaoka, A., *et al.* (2015). Regulation of Hyaluronan (HA) Metabolism Mediated by HYBID (Hyaluronan-binding Protein Involved in HA Depolymerization, KIAA1199) and HA synthases in growth factor-stimulated fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 290(52), 30910–30923.
67. Lambeth, L. S., & Smith, C. A. (2013). Short hairpin RNA-mediated gene silencing. *Methods in Molecular Biology*, 942, 205–232.
68. Suski JM, Lebiezinska M, Bonora M, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR. Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. *Methods Mol Biol*. 2012;810:183-205.
69. Yunus, M., Ahmad, N., & Haqqi, T. M. (2020). Biomedicine & Pharmacotherapy. *Oxidative stress and in fl ammation in osteoarthritis pathogenesis : Role of polyphenols*. 129(June).
70. Ransy C, Vaz C, Lombès A, Bouillaud F. Use of H₂O₂ to Cause Oxidative Stress, the Catalase Issue. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 30;21(23):9149.
71. Hearne A, Chen H, Monarchino A, Wiseman JS. Oligomycin-induced proton uncoupling. *Toxicol In Vitro*. 2020 Sep;67:104907.
72. Palmieri L, *et al.* Citrin and aralar1 are Ca(2+)-stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria. *EMBO J*. 2001 Sep 17;20(18):5060-9.
73. Stroud DA *et al.* Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature*. 2016 Oct 6;538(7623):123-126.
74. Watmough NJ, Frerman FE. The electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Dec;1797(12):1910-6.
75. Indrieri A, *et al.* Mutations in COX7B cause microphthalmia with linear skin lesions, an unconventional mitochondrial disease. *Am J Hum Genet*. 2012 Nov 2;91(5):942-9.
76. Ataei A, Wallick ET. Isolation and purification of the extracellular and intracellular portions of the beta subunit of (Na⁺,K⁺)-ATPase. *Prep Biochem*. 1992 Jun;22(2):123-33.
77. Kaločayová B, *et al.* Alteration of renal Na,K-ATPase in rats following the mediastinal γ -irradiation. *Physiol Rep*. 2019 Feb;7(3):e13969.
78. Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, Foti M. Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 11;20(24):6249.
79. Blanco, F. J., Rego, I., & Ruiz-Romero, C. (2011). The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(3), 161–169.

80. Ohtsuki, T *et al.* (2020). Induction of cemip in chondrocytes by inflammatory cytokines: Underlying mechanisms and potential involvement in osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9).
81. Kheradmand F, Werner E, Tremble P, Symons M, Werb Z. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science*. 1998 May 8;280(5365):898-902
82. Kohi S, Sato N, Koga A, Matayoshi N, Hirata K. KIAA1199 is induced by inflammation and enhances malignant phenotype in pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2017 Mar 7;8(10):17156-17163.